Rôle de la faune sauvage dans le système multi-hôtes de Mycobacterium bovis et risque de transmission entre faune sauvage et bovins : étude expérimentale en Côte d'Or

Ariane Payne

▶ **To cite this version:**

Ariane Payne. Rôle de la faune sauvage dans le système multi-hôtes de Mycobacterium bovis et risque de transmission entre faune sauvage et bovins : étude expérimentale en Côte d'Or. Biologie animale. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10040 . tel-01081144

HAL Id: tel-01081144

https://theses.hal.science/tel-01081144

Submitted on 7 Nov 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE
E2M2

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le
14 mars 2014
par

PAYNE Ariane

TITRE :

Rôle de la faune sauvage dans le système multi-hôtes de *Mycobacterium bovis* et risque de transmission entre faune sauvage et bovins. Etude expérimentale en Côte d'Or

Directrices de thèse :
GILOT-FROMONT Emmanuelle
DUFOUR Barbara

JURY :

Mme.CHEVALIER Véronique	Rapporteur
M. HEWISON Mark	Rapporteur
Mme LESELLIER Sandrine	Examinateur
M. SAY Ludovic	Examinateur
M. HARS Jean	

A Julien,

que j'entends toujours rifougner

Remerciements

A **Jean Hars**, initiateur et bâtisseur de ce projet (et ce ne fût pas chose facile !), puis encadrant très présent, attentif et constructif. Pour tout cela et pour le plaisir d'avoir travaillé ensemble, je lui suis très reconnaissante …et je mesure ma chance.

Aux **financeur**s, qui ont manifesté leur intérêt pour ce travail, sans qui cette thèse n'aurait pu voir le jour et qui ont permis de la réaliser dans les meilleures conditions. J'adresse mes sincères remerciements à la **Direction Générale de l'alimentation** et à **Alexandre Fediaevsky** particulièrement, au **Conseil Régional de Bourgogne** (**Géraldine Harly et Dominique Marillet** particulièrement), au **Conseil Général de Côte d'Or** (à **Fabienne Gerriet et Alicia Boudou** particulièrement), à la **Fédération départementale des chasseurs de Côte d'Or** et à P**ascal Sécula, Michel Chalumeau et Fabrice Aubert** en particulier, au **Groupement de défense sanitaire de Côte d'Or** et à **Pascal Martens et Stéphane Ratay** en particulier, à l**'ONCFS** et à la **Fédération Nationale des Chasseurs** (au Président de la FNC, **Bernard Baudin**, au Président de la FDC 65, responsable de la commission sanitaire de la FNC, **Jean-Marc Delacasso**, à **Charlotte Dunoyer**, et **Eva Faure**, en particulier). Je remercie également **Jean-Roch Gaillet** DRAAF de Bourgogne, pour son soutien avant et pendant le déroulement de la thèse.

A **Emmanuelle Gilot-Fromont et Barbara Dufour**, mes deux directrices de thèse, qui m'ont suivie pas à pas, m'ont apportée leurs lumières scientifiques… et un peu de sagesse. Merci pour cet encadrement 4 étoiles !

A l'**ONCFS**, qui a hébergé cette thèse et a participé à son financement. Travailler au sein d'un organisme qui réunit autant de compétences scientifiques et des agents, ayant une très bonne connaissance du terrain a été un réel bénéfice. Au sein de la **direction des études et de la recherche de l'ONCFS**, je remercie particulièrement **Sandrine Ruette**, **Sophie Rossi, Eric Baubet et Clément Calenge**, que j'ai régulièrement sollicités, chacun dans leur domaine de compétence, et qui m'ont permis d'avancer et d'enrichir mon travail. Je remercie également Pierre Migot, Guillaume Rousset, Olivier Mastain et Jean-Yves Chollet, pour avoir soutenu ce projet.

A l'**ANSES**, je remercie **Maria–Laura Boschiroli**, **Céline Richomme** et **Benoit Durand** pour leur participation au comité de cette thèse et nos collaborations fructueuses, qui ne vont surement pas s'arrêter là.

A **Loïc Bollache de l'Université de Bourgogne** et maintenant de l'INRA, pour sa participation au comité de thèse, pour m'avoir sélectionné la crème des stagiaires et pour avoir suggéré une suite à cette thèse.

A **Julien Philippe** et **Jonathan Fligny**, techniciens de la FDC 21 qui m'ont épaulée successivement dans le travail de terrain et sans qui je n'aurais pu mener à bien ce travail, merci pour

avoir gardé votre bonne humeur malgré les pièges vides à 6h du matin des jours durant! Nous avons fait un super travail d'équipe.

A **Pauline Freycon, Julia Dolhem et Lucile Millet** pour la motivation, l'énergie et les compétences dont elles ont fait preuve dans leur stage sur le terrain et dans l'analyse des données, et donc pour leur apport substantiel à cette thèse.

A **Stéphane Barbier**, pour m'avoir ouvert les portes du monde cynégétique de la vallée de l'Ouche, pour sa participation et son aide quasi-systématique aux opérations de capture de sangliers, pour les prélèvements réalisés sur le gibier et également pour m'avoir permis de loger dans sa clinique, au plus près des sangliers ! Et pour encore pas mal d'autres choses. Cette thèse te doit beaucoup !

A **Daniel Hénot**, **André Négrini**, **Claude Givord** et **Alain Roche**, toujours prêts à venir donner un coup de main pour les captures de sangliers. Merci pour cette aide précieuse sur le terrain.

A **Pauline Hubert** pour son aide au tout début des captures

Aux **lieutenants de louveterie** qui ont été des interlocuteurs privilégiés pour le travail de terrain et ont contribué au bon déroulement de la collecte de données. Je remercie particulièrement **Jeannick Gautherot** et **Dominique Rigaud** qui m'ont également aidée sur le terrain, **Georges Balluet**, **Manuel Contour** et **Laurent Guyon**.

Aux **sociétés de chasse qui ont accepté d'avoir des pièges sur leur territoire** de chasse et qui m'ont indiqué des sites de capture

Aux **éleveurs ayant accepté que des caméras-pièges soient posées sur leur exploitation** et installant même parfois des dispositifs pour pouvoir les placer. Un merci spécial à **Sylvain Lecourt** pour avoir déplacé et utilisé son tractopelle pour aller chercher un collier de blaireau enfoui dans un terrier à plus de 2 mètres sous terre et également à la **famille Desserey** pour leur accueil et leur aide.

Au **laboratoire départemental de Côte d'Or** pour avoir réalisé une grande partie des prélèvements et des analyses pour la partie excrétion en plus du travail qui incombe à un laboratoire d'un département où sévit la tuberculose. Un grand merci donc à **Eric Gueneau et à l'équipe de microbiologie** d'avoir accepté et absorbé cette charge de travail supplémentaire.

Au **pôle microbiologie environnementale et risque sanitaire de l'INRA de Dijon** et plus particulièrement à **Alain Hartmann et Elodie Barbier** pour leur collaboration sur le volet excrétion de la thèse. Merci également à **Céline Fossot** et **Anne-Laure Blieux** qui ont réalisé les premières analyses au cours de leur stage.

A la **Direction interrégionale Bourgogne Franche-Comté de l'ONCFS** :

Merci à **Yves Laplacette** et **Patrick Rebillard**, pour m'avoir accueillie dans leurs locaux, d'abord de la brigade nord à Vénarey les Laumes puis à Dijon.

Merci aux **agents du service départemental de la Côte d'Or** qui ont participé aux opérations de terrain.

Merci à **Sophie Chappa** pour avoir visionné et décortiqué des heures de vidéosurveillance, et toujours dans la bonne humeur !

Merci à **Christophe Ferrier** pour sa conséquente et précieuse aide en SIG et ses vidéos magiques pour la soutenance !

Merci à **Delphine Chenesseau**, **Caroline Le Goff** et **Isabelle Breton** pour leur soutien amical tout au long de mon travail d'analyse de rédaction et jusqu'aux derniers moments avant la soutenance !

A la **DDPP 21**, qui a été un partenaire-clé tout au long de cette thèse. Merci pour toutes les données transmises et pour m'avoir impliquée dans la gestion de ce dossier. Je remercie particulièrement **Thierry Grosjean** (qui a toujours le mot pour rire), **Pierre Aubert, Fabrice Chevalier, Anélise Taconnet** et à la CIREV, **Aurore Duvauchelle**.

A la **DDT21**, je remercie **Olivier Houiste** et **Laurent Tisné** pour m'avoir fourni les données nécessaires à mes analyses

A **Marion Ripoche** pour avoir rassemblé, synthétisé les données de la DDPP 21 et rédigé un beau rapport avec tout cela.

A **Edouard Reveillaud** pour avoir testé en Dordogne le protocole d'estimation de densité des blaireaux et pour tout le travail réalisé dans ce département.

Je remercie **mes « répétiteurs » de soutenance à l'ONCFS, à EPI et EpiMAI** pour leur disponibilité, leur écoute et leurs conseils.

Je remercie **les membres du jury, Véronique Chevalier, Mark Hewison, Sandrine Lesellier et Ludovic Say** pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail, pour leur regard et leurs commentaires enrichissants.

A **mes amis**, qui ont suivi mes péripéties de « captureuse » de sangliers et de blaireaux (et ont participé pour certains) et ont été un bol d'oxygène pendant ces 3 années de boulot intense.

A **mes parents** qui ont également suivi de près cette aventure, ses hauts et ses bas. Un très grand merci pour leur aide et leur soutien dans le sprint final et la préparation du pot de thèse.

A **mon frère** pour son soutien et son intérêt pour toute cette technologie utilisée dans cette étude, et pour avoir bricolé quelques-uns des colliers GPS de blaireau et pour son aide dans l'amélioration de mes communications en anglais.

Résumé

RESUME en français

La tuberculose bovine causée par *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) est une zoonose multi-hôtes. Outre les bovins, elle peut être transmise à des populations sauvages variées dont certaines peuvent entretenir l'infection et/ou la retransmettre aux bovins, pouvant empêcher leur assainissement. Les conditions de persistance de *M. bovis* dans les populations sauvages ont été étudiées dans différentes régions du monde, mettant en lumière des statuts épidémiologiques variables selon les espèces et les contextes géographiques, cynégétiques et zootechniques. Notre objectif était de déterminer le rôle des différentes populations-hôtes sauvages impliquées dans le système multi-hôtes de *M. bovis* en Côte d'Or où, en plus des bovins, la tuberculose bovine, circule chez le blaireau, le sanglier, le cerf et le renard. Pour cela, nous avons estimé les niveaux d'infection et d'excrétion, les niveaux de densité, et au moyen d'un suivi télémétrique et de dispositif de vidéosurveillance, nous avons estimé les contacts entre les populations sauvages et les bovins. Nos résultats suggèrent que les trois populations ayant le rôle le plus important et aptes à retransmettre l'infection aux bovins sont le blaireau, le sanglier et le cerf, mais d'autres études sont encore nécessaires pour confirmer ces hypothèses et savoir si certaines d'entre elles peuvent entretenir l'infection de façon autonome. Elles pourraient, également, conjointement, constituer une communauté d'hôtes réservoir. Enfin, nos résultats nous ont permis de caractériser le risque de transmission de tuberculose bovine de ces populations sauvages vers les bovins et de proposer des mesures de lutte visant à réduire ce risque.

TITRE en anglais

Role of wildlife in the *Mycobacterium bovis* multi-host system and risk of transmission between wildlide and cattle. Experimental study in Côte d'Or.

RESUME en anglais

Bovine tuberculosis, caused by *Mycobacterium bovis* is a multi-host zoonosis. Besides cattle, it can be transmitted to various wild populations and some of them are able to maintain or to spillback the infection to cattle, thus hampering control strategies. The maintenance of *M. bovis* by wild populations is dependent on species, on geographical configurations, and on hunting and husbandry practices. Our objective was to investigate the role the different wild populations involved in the *M. bovis* multi-host system of Côte d'Or, where bTB has been reoccuring in cattle since 2002 and has also been found in badgers, wild boar, red deer and foxes. To do so, we have assessed different risk factors. These include infection rate, ability to

shed *M. bovis*, populations densities and level of indirect contact between wild populations and cattle. For the latter factor, we have tracked 11 wild boars and 10 badgers and used remote surveillance in cattle farms. Our results suggest that, in the study site, badgers, wild boar and red deer may be able to spillback the infection to cattle. Nevertheless, further studies are required to confirm these hypotheses and to investigate whether some of these wild populations can act, individually as reservoirs. It might also be the case that, taken jointly, these wild populations could constitute a maintenance community. On the basis of our results, we made recommandations aiming at reducing the risk of spillback transmission.

DISCIPLINE
Epidémiologie- Ecologie

MOTS-CLES

Mycobacterium bovis, système multi-hôtes, réservoir, faune sauvage, transmission, évaluation du risque

KEY-WORDS

Mycobacterium bovis, multi-host system, reservoir, wildlife, transmission, risk assessment

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

UMR 5558 Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, Université Lyon 1, 43 bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex

Valorisation des travaux

PUBLICATIONS DANS DES REVUES INTERNATIONALES

Payne A., Boschiroli M.L., Gueneau E., Moyen J.L., Rambaud T., Dufour B., Gilot-Fromont E., Hars J. Bovine tuberculosis in Eurasian badgers (*Meles meles*) in France. *Eur J Wildl Res,* 2013, **59**, 331-339

Richomme C., Boadella M., Courcoul A., Durand B., Drapeau A., Corde Y., Hars J., **Payne A**., Fedievsky A., Boschiroli M.L. Exposure of wild boar to *Mycobacterium tuberculosis* complex in France since 2000 is consistent with the distribution of bovine tuberculosis outbreaks in cattle ; Plos One, 2013, 8 (10), 1-7

SOUMISSION DANS DES REVUES INTERNATIONALES

Payne A., Ruette S, Millet L., Hars J., Dufour B., Gilot-Fromont E. Factors influencing the risk of indirect contact between badgers (*Meles meles*) and cattle in bovine tuberculosis infected area in France

AUTRES PUBLICATIONS

Payne A., Boschiroli M. L., Gueneau E., Moyen J.L., Rambaud T., Dufour B., Gilot-Fromont E., Hars J. La tuberculose bovine chez le blaireau (*Meles meles*) en France. *Epidémiologie et Santé Animale,* 2012, **62**: 43-53.

Payne A., Millet L., Hars J., Dufour B., Gilot-Fromont E. Interactions entre sangliers, blaireaux et bovins en Côte d'Or : quelle opportunité pour la transmission de *Mycobacterium bovis* ? *Epidémiologie et Santé Animale,* 2013, **63**: 77-92

Hars J., Garin-Bastuji B., Richomme C., **Payne A**., Rossi S. De l'éradication à la réapparition des maladies infectieuses animales. Les dangers de la faune sauvage : contexte et outils de gestion. *Epidémiologie et Santé Animale,* 2013, **64**: 57-69

COMMUNICATION ORALE LORS DE CONGRES INTERNATIONAUX

Payne A., Boschiroli M. L., Millet L., Gueneau E., Moyen J.L., Rambaud T., Dufour B., Gilot-Fromont E., Hars J. Bovine tuberculosis in badgers in France: prevalence and risk of transmission between cattle and badgers ». In *13th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics, 20-24 August 2012*, 35. Maastricht.

COMMUNICATION AFFICHÉE LORS DE CONGRÈS INTERNATIONAUX

Payne A., Boschiroli M. L., Ruette S., Reveillaud E., Dolhem J., Gueneau E., Moyen J.L., Rambaud T., Dufour B., Gilot-Fromont E., Hars J. Bovine tuberculosis infection and population density of badgers (*Meles meles*) in two regions in France ». In *Convergence in Wildlife Health Joint 61st WDA/10th Biennial EWDA Conference Lyon 23-27 July 2012*, 236. Lyon: WDA-EWDA.

COMMUNICATION AFFICHÉE LORS DE CONGRÈS NATIONAUX

Payne A., Millet L., Hars J., Dufour B., Gilot-Fromont E. Utilisation des pâtures par les blaireaux et les sangliers en Côte d'Or : quelle opportunité pour la transmission de *Mycobacterium bovis* ? In *colloque de la Société française de comportement animal SFECA, 19-21 novembre 2013.* Dijon

SOMMAIRE

Remerciements **5**

Résumé **9**

Valorisation des travaux **11**

INDEX DES TABLEAUX **19**

INDEX DES FIGURES **23**

Introduction **27**

Mycobacterium bovis un agent pathogène multi-hôtes modèle, à l'interface entre faune domestique, faune sauvage et homme **29**

1. ....Concepts théoriques **30**
1.1. Notion d'agent pathogène multi-hôtes 30
1.2. Notions de réservoir et de communautés d'hôtes 30
1.3. Conditions permettant la constitution d'un réservoir 31
1.3.1. .Taux de reproduction de base 31
1.3.2. .Facteurs affectant la transmission d'un agent pathogène 32
1.3.3. .Taille critique de la population 32
1.3.4. .Conclusion 33
2. ....Caractéristiques de Mycobacterium bovis **34**
2.1. Généralités 34
2.2. Pathogénie 34
2.3. Survie de M. bovis dans le milieu extérieur 35
2.4. Diversité des souches de M. bovis et lien avec sa virulence 36
3. ....Importance et enjeux de la tuberculose dans la faune sauvage **37**
3.1. Situation historique et actuelle de la tuberculose dans l'élevage bovin en Europe 37
3.2. Enjeux liés à la présence de M. bovis dans la faune sauvage 38
3.3. Situation en France 40
3.3.1. .Chez les bovins 40
3.3.2. .Dans la faune sauvage 42

3.4. Diversité des communautés-hôtes sauvages de M. bovis dans le monde..49
3.4.1. .Exemples hors de l'Europe 49
3.4.2. .En Europe 54
3.5. Synthèse et conclusion 57
4. ....Facteurs de risque de persistance de la tuberculose dans la faune sauvage et de transmission-retour aux bovins 60
4.1. Facteurs de risque liés à l'hôte 61
4.2. Facteurs de risque liés à la relation hôte-pathogène 65
4.3. Facteurs géographiques 69
4.4. Facteurs anthropogéniques 71
4.5. Synthèse et conclusion 73
5. ....Mesures de gestion de la tuberculose bovine dans la faune sauvage.....76
6. ....Problématique : création d'un réservoir sauvage et transmission de *M. bovis* aux bovins, quel risque pour la Côte d'Or ?.....77

Etude du rôle des populations sauvages dans le système multi-hôtes de M. bovis et risque de transmission entre populations sauvages et bovins en Côte d'Or..... 81

1. ....Contexte géographique et importance de l'élevage bovin en Côte d'Or....82
1.1. Contexte géographique.....82
1.1.1. .Climat 82
1.1.2. .Paysages 83
1.2. Elevage bovin 85
1.3. Conclusion 86
2. ....Situation épidémiologique des bovins en Côte d'Or 87
2.1. Gestion de la tuberculose bovine.....87
2.2. Evolution des foyers 87
3. ....Niveau d'infection de *M. bovis* dans la faune sauvage en Côte d'Or 90
3.1. Protocole commun à toutes les espèces surveillées 91
3.1.1. .Echantillonnage.....91
3.1.2. .Méthodes diagnostiques 92
3.1.2.1.Inspection des carcasses et histologie 92
3.1.2.2.Préparation des prélèvements pour la culture et la PCR 93
3.1.2.3.Culture 93
3.1.2.4.PCR 94
3.1.2.5.Typage des souches 94
3.1.2.6.Analyses statistiques.....94
3.2. Niveau d'infection chez le cerf 95
3.2.1. .Matériel et méthode.....95
3.2.1.1.Echantillonnage.....95
3.2.1.2.Méthodes diagnostiques.....95

3.2.2. Résultats 97
3.2.3. Discussion 99
3.3. Niveau d'infection chez le sanglier 101
3.3.1. Matériel et méthodes 101
3.3.2. Résultats 103
3.3.3. Discussion 106
3.4. Niveau d'infection chez le blaireau 109
3.4.1. Matériel et méthodes 109
3.4.2. Résultats 112
3.4.3. Discussion 115
3.5. Niveau d'infection chez les autres espèces 118
3.5.1. Matériel et méthode 118
3.5.2. Résultats 119
3.5.3. Discussion 120
4. Capacité d'excrétion de *M. bovis* par les blaireaux et les sangliers 122
4.1. Matériel et méthode 123
4.1.1. Echantillonnage 123
4.1.1.1. Sangliers 123
4.1.1.2. Blaireaux 123
4.1.2. Prélèvements 123
4.1.2.1. Sangliers 123
4.1.2.2. Blaireaux 124
4.1.3. Préparation pour la PCR 124
4.1.3.1. Fèces 124
4.1.3.2. Glandes salivaires et rein 125
4.1.3.3. Urine 125
4.1.3.4. Ecouvillons trachéaux et laryngés 125
4.1.4. PCR 125
4.1.5. Typage génétique des souches 126
4.2. Résultats 127
4.2.1. Sangliers 127
4.2.2. Blaireaux 129
4.3. Discussion 131
4.4. Synthèse et conclusion générale sur les niveaux d'infection et sur l'excrétion chez les espèces sauvages réceptives à M. bovis en Côte d'Or 135
5. Densité des populations de cerfs, sangliers et blaireaux en Côte d'Or ... 138
5.1. Densité des populations de cerfs et de sangliers 139
5.1.1. Matériel et méthode 139
5.1.1.1. Site d'étude 139
5.1.1.2. Indicateurs de densité 140
5.1.2. Résultats 142
5.1.2.1. Cerfs 142

5.1.2.2.Sangliers 144
5.1.3. Discussion 146
5.2. Densité des populations de blaireaux 149
5.2.1. Matériel et méthode 150
5.2.1.1.Choix de la méthode 150
5.2.1.2.Site d'étude 151
5.2.1.3.Echantillonnage 151
5.2.1.4.Récolte des données sur les transects 152
5.2.1.5.Estimation des densités de terriers occupés 153
5.2.1.6.Estimation de la taille des groupes par piégeage vidéographique 154
5.2.1.7.Estimation des densités de blaireaux 154
5.2.2. Résultats 155
5.2.2.1.Densité en terriers occupés 155
5.2.2.2.Estimation de la taille des groupes 157
5.2.2.3.Estimation de la densité de blaireaux 158
5.2.3. Discussion 159
6. Contact entre populations sauvages et bovins 162
6.1. Utilisation des pâtures par les sangliers et les blaireaux 163
6.1.1. Matériel et méthode 164
6.1.1.1.Site d'étude et choix des lieux de capture 164
6.1.1.2.Données météorologiques et périodes 165
6.1.1.3.Captures, équipement de colliers GPS et suivi télémétrique 166
6.1.1.4.Traitement des données de géolocalisation 168
6.1.1.5.Analyses statistiques 169
6.1.2. Résultats 171
6.1.2.1.Sangliers 171
6.1.2.2.Blaireaux 178
6.1.3. Discussion 186
6.2. Fréquentation des sites d'élevage par la faune sauvage 191
6.2.1. Matériel et méthode 192
6.2.1.1.Définition des points surveillés, choix des exploitations et des sites d'étude 192
6.2.1.2.Protocole de surveillance 193
6.2.1.3.Analyses 194
6.2.2. Résultats 197
6.2.2.1.Données récoltées 197
6.2.2.2.Nombre de visites par nuit 199
6.2.2.3.Description des visites 206
6.2.3. Discussion 215

Discussion générale: rôle des populations sauvages dans le système multi-hôtes de M. bovis en Côte d'Or, estimation du risque de transmission aux bovins et recommandations 221

1. Rôle des populations sauvages dans le système multi-hôte de *M. bovis* en Côte d'Or 222

1.1. Démarche utilisée pour l'évaluation du rôle des différentes espèces 222
1.2. Limites des données produites 225
1.3. Rôle de la population de cerfs 226
1.4. Rôle de la population de sangliers 234
1.5. Rôle de la population de blaireaux 243
1.6. Rôle de la population de renards 252
1.7. Rôle de la population de chevreuils 253
1.8. Conclusion sur le rôle de chaque population sauvage 254
1.9. Evaluation de la capacité de la communauté d'hôtes sauvages à maintenir la tuberculose bovine 254
1.9.1. .Concepts théoriques 255
1.9.2. .Possibilités d'interactions interspécifiques entre les différents hôtes sauvages de *M. bovis* en Côte d'Or 255
1.9.3. .Conséquences épidémiologiques des interactions entre les différentes populations-hôtes sauvages de la Côte d'Or 257
1.9.4. .Conclusion 258

2. ....Caractérisation spatiale, temporelle et zootechnique du risque de transmission de M. bovis entre faune sauvage et bovins en Côte d'Or...259
2.1. Caractérisation spatiale du risque 259
2.1.1. .A l'échelle des parties sud et nord de la zone infectée 259
2.1.2. .A l'intérieur des zones sud et nord 261
2.2. Caractérisation temporelle du risque 264
2.2.1. .Limites méthodologiques 264
2.2.2. .Evaluation du risque 264
2.3. Caractérisation des pratiques d'élevage à risque 273
2.3.1. .Attractivité des points d'alimentation et d'abreuvement et évaluation du risque de transmission lié à leur utilisation par la faune sauvage273
2.3.2. .Caractérisation des sites à risque 279
2.3.3. .Conclusion 283

3. ....Recommandations 283
3.1. Mesures visant à limiter le rôle des populations sauvages dans le système multi-hôtes de M. bovis en Côte d'Or 284
3.1.1. .Dans les populations de sangliers et de cerfs 284
3.1.1.1.Propositions de renforcement de la surveillance et résultats attendus 284
3.1.1.2.Propositions de mesures de lutte 284
3.1.2. .Dans les populations de blaireaux 287
3.1.2.1.Propositions de renforcement de la surveillance et résultats attendus 287
3.1.2.2.Proposition de mesures de lutte 288
3.1.3. .Dans les populations de chevreuils et de renards 292
3.1.4. .Conclusion et perspectives 292

3.2. Recommandations en termes de pratiques d'élevage 293
3.2.1. .Au niveau des pâtures.....293
3.2.1.1.Gestion des lisières 293
3.2.1.2.Gestion des points d'abreuvement 294
3.2.1.3.Gestion des points d'alimentation.....295
3.2.1.4.Gestion du pâturage.....296
3.2.2. .Au niveau des bâtiments 297
3.2.3. .Conclusion 299

Conclusion 301

Références bibliographiques 303

ANNEXE 1 Protocole de mise en culture des prélèvements pour isolement de mycobactéries chez l'animal……323

ANNEXE 2 Protocole suivi pour la détection de *Mycobacterium bovis* par PCR à partir de tissus, utilisant le kit commercial TaqVet *Mycobacterium tuberculosis* complex 2 wells……327

ANNEXE 3 Article publié dans European Journal of Wildlife Research ……..335

ANNEXE 4 Protocole suivi pour la détection de *Mycobacterium bovis* dans certains excretas……..345

ANNEXE 5 Détermination sous R de la fonction de détection utilisée en distance sampling pour l'estimation des densités de blaireaux…….347

ANNEXE 6 Article soumis à European Journal of Wildlife Research…349

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 : volets de surveillance de la tuberculose bovine dans la faune sauvage à appliquer en fonction du niveau de risque (le niveau 1 correspond au risque le moins élevé) estimé selon le protocole de Sylvatub (Source : Note de service DGAL/SDSPA/N2011-8214).....43

Tableau 2 : caractéristiques des méthodes diagnostiques de *M. bovis* utilisées dans la faune sauvage en France (d'après Maeder 2008).....45

Tableau 3 : description des situations épidémiologiques où des cas infectées par *M. bovis* ont été détectées dans des populations sauvages libres en France : espèces impliquées, taux d'infection, caractéristiques des lésions, type de paysage et situation chez les bovins. (D'après Zanella, Duvauchelle, et al. 2008; Richomme et al. 2010; Reveillaud 2011; Hars et al. 2012; Hars et al. 2013 et données DGAL).....48

Tableau 4 : description de différentes communautés d'hôtes sauvages de *M. bovis* à travers le monde : statut épidémiologique des populations et rôle dans la transmission-retour aux bovins.....59

Tableau 5 : effet qualitatif de différents facteurs sur le risque de persistance, de transmission interspécifique, de transmission-retour aux bovins, d'extension spatiale et d'amplification de l'infection à *M. bovis* dans la faune sauvage.....75

Tableau 6 : protocole suivi pour la surveillance programmée de la tuberculose chez le cerf entre 2003 et 2013. (VO : vallée de l'Ouche ; HC : Hautes Côtes).....96

Tableau 7 : résultats de la surveillance programmée et événementielle de la tuberculose chez le cerf entre 2003 et 2013 dans les zones sud et nord de l'aire d'infection et dans le reste du département (Source : DDPP21).....98

Tableau 8 : protocole suivi pour la surveillance programmée et événementielle de la tuberculose chez le sanglier entre 2003 et 2013 (VO : Vallée de l'Ouche ; HC : Hautes Côtes).....102

Tableau 9 : résultats de la surveillance programmée de la tuberculose chez le sanglier entre 2003 et 2013 dans la partie sud et la partie nord de zone infectée et dans le reste du département (Source : DDPP21).....105

Tableau 10 : protocole suivi pour la surveillance programmée de la tuberculose chez le blaireau entre 2003 et 2013. (VO : vallée de l'Ouche ; HC : Hautes Côtes).....111

Tableau 11 : résultats de la surveillance programmée de la tuberculose chez le blaireau entre 2009 et 2013 dans la partie sud et la partie nord de zone infectée et dans le reste du département (Source : DDPP21).....114

Tableau 12 : protocole suivi pour la surveillance programmée de la tuberculose chez le chevreuil entre 2005 et 2012.....119

Tableau 13 : protocole suivi pour la surveillance programmée de la tuberculose chez le renard entre 2005 et 2012.....119

Tableau 14 : résultats de la surveillance de la tuberculose chez le renard entre 2005 et 2012 dans la partie sud et la partie nord de zone infectée et dans le reste du département (Source : DDPP21)....120

Tableau 15 : préparation des échantillons et PCR réalisés sur les excrétas analysés 127

Tableau 16 : statut infectieux et résultats de la détection de *M. bovis* dans les excrétas des sangliers 128

Tableau 17 : statut infectieux et résultats de la détection de *M. bovis* dans les excrétas de blaireaux ayant fourni au moins un résultat positif.....130

Tableau 18 : caractéristiques des 3 zones sélectionnées pour l'estimation des densités de blaireaux (les surfaces sont exprimées en km^2) 151

Tableau 19 : caractéristiques des transects réalisés 155

Tableau 20 : estimations de densité en terriers occupés D (TO/km²) par zone et par type de milieu en Côte d'Or en 2012. 157

Tableau 21: résultats du piégeage vidéographique par zone échantillonnée.....157
Tableau 22 : densités moyennes (blaireaux/km²) des blaireaux en Côte d'Or dans les 3 zones échantillonnées.....158
Tableau 23 : variables testées dans les modèles linéaires généralisés mixtes expliquant le nombre de localisations sur les pâtures par nuit ou par 24h et la surface de pâture incluse dans le domaine vital et le centre d'activité par mois. Les valeurs extrêmes des variables quantitatives figurent entre parenthèse.....170
Tableau 24 : caractéristiques des sangliers équipés de collier GPS.....173
Tableau 25 : comparaison des modèles expliquant le nombre de localisations par 24h sur les pâtures (*nloc*, après transformation racine carrée) pour les sangliers. Le modèle sélectionné apparait en jaune. 174
Tableau 26 : résultats du modèle retenu expliquant le nombre de localisations en pâture par nuit par sanglier (*nloc*, après transformation racine carrée) : valeurs des paramètres estimés au carré et P-value des tests de Wald. 175
Tableau 27 : comparaison des modèles expliquant la surface de pâture incluse dans le domaine vital par mois par sanglier (*pat_dv* après transformation log). Le modèle sélectionné apparait en jaune. .176
Tableau 28 : résultats du modèle retenu expliquant la surface incluse dans le domaine vital par mois par sanglier (*pat_dv* après transformation log) : valeurs des paramètres estimés (échelle log) et P-value des tests de Wald. 176
Tableau 29 : comparaison des modèles expliquant la surface de pâture incluse dans le centre d'activité par mois par sanglier (*pat_ca* après transformation log). Le modèle sélectionné apparait en jaune. 177
Tableau 30 : résultats du modèle retenu expliquant la surface incluse dans le centre d'activité par mois par sanglier (*pat_ca* après transformation log) : valeurs des paramètres estimés (échelle log) et P-value des tests de Wald.....177
Tableau 31 : caractéristiques des 10 blaireaux équipés de collier GPS.....180
Tableau 32 : comparaison des modèles expliquant le nombre de localisations par nuit sur les pâtures (*nloc*, après transformation racine carrée) pour les blaireaux. Le modèle sélectionné apparait en jaune. 181
Tableau 33 : résultats du modèle retenu expliquant le nombre de localisations en pâture par nuit par blaireau (*nloc*, après transformation racine carrée) : valeurs des paramètres estimés au carré et P-value des tests de Wald. 182
Tableau 34 : comparaison des modèles expliquant la surface de pâture incluse dans le domaine vital par mois par blaireau (*pat_dv*, après transformation racine carrée). Le modèle sélectionné apparait en jaune. 184
Tableau 35 : résultats du modèle retenu expliquant la surface incluse dans le domaine vital par mois par blaireau (*pat_dv* après transformation racine carrée) : valeurs des paramètres estimés au carré et P-value des tests de Wald. 184
Tableau 36 : comparaison des modèles expliquant la surface de pâture incluse dans le centre d'activité par mois par blaireau (*pat_ca* après transformation racine carrée). Le modèle sélectionné apparait en jaune. 185
Tableau 37 : résultats du modèle retenu expliquant la surface moyenne incluse dans le centre d'activité par mois par blaireau (*pat_ca,* après transformation racine carrée) : valeurs des paramètres estimés au carré et P-value des tests de Wald. 186
Tableau 38 : répartition du dispositif de vidéosurveillance selon les sites et les points surveillés en pâture et en bâtiment.....196
Tableau 39 : description des comportements relevés pour l'analyse à partir des séquences vidéo ...196
Tableau 40 : nombre de nuits et nombre de sessions de vidéosurveillance réalisés entre décembre 2011 et janvier 2013 197
Tableau 41 : résultat retenu expliquant le nombre de visites de cerfs par nuit : valeurs des paramètres du modèle de Poisson et P-value des tests de Wald (les classes abreuvoirs et points d'eau ont été regroupés en point d'abreuvement, de même pour auge et bâtiment, regroupé en point d'alimentation). 200
Tableau 42 : résultat du modèle retenu expliquant le nombre de visites de sangliers par nuit : valeurs des paramètres du modèle de Poisson et P-value des tests de Wald.....202

Tableau 43 : résultat du modèle retenu expliquant le nombre de visites de blaireaux par nuit : valeurs des paramètres du modèle de Poisson et P-value des tests de Wald.....203
Tableau 44 : résultat du modèle retenu expliquant le nombre de visites de chevreuils par nuit : valeurs des paramètres du modèle de Poisson et P-value des tests de Wald (les classes abreuvoirs et points d'eau ont été regroupés en point d'abreuvement, de même pour auge et bâtiment en point d'alimentation). 205
Tableau 45 : résultat du modèle retenu expliquant le nombre de visites de renards par nuit : valeurs des paramètres du modèle de Poisson et P-value des tests de Wald.....206
Tableau 46 : grille de qualificatifs utilisés pour l'estimation des probabilités d'émission (Sources : AFSSA 2008 et Dufour et al. 2011).....222
Tableau 47 : résumé des paramètres et des comportements utilisés pour l'évaluation du rôle du cerf dans le système multi-hôtes de *M. bovis*. Tous les paramètres sont issus de l'étude expérimentale sauf indication faisant référence à la littérature (min et max : valeur minimale et maximale des données brutes ; µ : valeur moyenne).....227
Tableau 48 : évaluation qualitative pour le cerf du niveau de prévalence, de la capacité d'excrétion, du niveau de densité et du niveau de contact entre cerfs et bovins. Le score attribué au comportement spatial concerne le risque d'extension spatiale et le score attribué au comportement social concerne le risque de transmission intraspécifique 228
Tableau 49 : résumé des paramètres et des comportements utilisés pour l'évaluation du rôle du sanglier dans le système multi-hôtes de *M. bovis*. Tous les paramètres sont issus de l'étude expérimentale sauf indication faisant référence à la littérature (min et max : valeur minimale et maximale des données brutes ; µ : valeur moyenne). 235
Tableau 50 : évaluation qualitative pour le sanglier du niveau de prévalence, de la capacité d'excrétion, du niveau de densité et du niveau de contact entre sangliers et bovins. Le score attribué au comportement spatial concerne le risque d'extension spatiale et le score attribué au comportement social concerne le risque de transmission intraspécifique 236
Tableau 51 : résumé des paramètres et des comportements utilisés pour l'évaluation du rôle du blaireau dans le système multi-hôtes de *M. bovis*. Tous les paramètres sont issus de l'étude expérimentale sauf indication faisant référence à la littérature (min et max : valeur minimale et maximale des données brutes ; µ : valeur moyenne). 244
Tableau 52 : évaluation qualitative pour le blaireau du niveau de prévalence, de la capacité d'excrétion, du niveau de densité et du niveau de contact entre blaireaux et bovins. Le score attribué au comportement spatial concerne le risque d'extension spatiale et le score attribué au comportement social concerne le risque de transmission intraspécifique 245
Tableau 53 : évaluation qualitative de la probabilité de tenir différents rôles épidémiologiques dans le système multi-hôtes de *M. bovis* pour les populations de cerfs, de sangliers, de blaireaux, de renards et de chevreuils de la zone infectée de tuberculose bovine (- : très peu probable ; + : assez probable ; ++ : probable ; +++ : très probable).....254
Tableau 54 : classement de l'effet relatif des saisons sur l'utilisation des pâtures et la fréquentation des points d'alimentation et des points d'abreuvement (les saisons où les bovins se trouvent dans les pâtures figurent en vert) (grille AFSSA 2008) 266
Tableau 55 : évaluation qualitative de la persistance de *M. bovis* dans l'environnement selon la saison (selon la grille AFSSA, 2008) 268
Tableau 56 : évaluation qualitative de la probabilité d"excrétion de *M. bovis* par les blaireaux, sangliers et cerfs en fonction des saisons (AFSSA 2008)f 270
Tableau 57 : Estimation qualitative relative du risque de transmission de *M. bovis* des blaireaux, sangliers et bovins selon les points d'alimentation et d'abreuvement fondée sur le niveau de fréquentation, la durée des visites et l'opportunité d'excrétion de *M. bovis* (établie en fonction du comportement observé et de la capacité d'excrétion). Les chiffres en gras correspondent au score qualitatif attribué selon la grille de l'AFSSA (2008). 275

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : situation des pays d'Europe vis-à-vis de l'infection à *M. bovis* chez les bovins et dans la faune sauvage Les populations constituant un: réservoir avéré apparaissent en noir et celles ayant un rôle épidémiologique inconnu apparaissent en gris (Sources : Gortazar et al. 2012 et Anonymous, 2009).....39

Figure 2 : évolution des foyers de tuberculose bovine détectés chaque année de 1995 à 2010 (Source : DGAl). 41

Figure 3 : répartition spatiale et temporelle des foyers bovins en France entre 2000 et 2012 et répartition des départements où des cas de tuberculose bovine ont été détectés dans la faune sauvage (dans le département de la Haute-Marne il s'agit de sangliers infectés provenant d'un parc de chasse) (source : DGAL). 41

Figure 4 : évolution de la prévalence apparente d'infection chez le cerf et le sanglier en forêt de Brotonne-Mauny entre 2001 et 2012 (source : Hars et al. 2013).....47

Figure 5 : pluviométrie annuelle de la Côte d'Or (Source : Bourgogne Nature 2011) 83

Figure 6 : les différents types de paysages présents en Côte d'Or (Source :DREAL Bourgogne/SDD/GVI 2011) 84

Figure 7 : les différents types de sol de la Côte d'Or (Source : Vaucoulon & Chiffaut 2004) 84

Figure 8 : nombre de vaches allaitantes par canton en Côte d'Or en 2010 (source : Agreste, Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt) 85

Figure 9: évolution du nombre de foyers de tuberculose bovine en Côte d'Or entre 2002 et 2013 (Source : DDPP 21).....88

Figure 10 : répartition par commune des foyers bovins cumulés entre 2002 et 2013 en Côte d'Or. Les souches de *M. bovis* identifiées sont indiquées entre parenthèse (ND : non déterminé) (Source : DDPP21).....89

Figure 11 : évolution du nombre de foyers de tuberculose bovine en dans la partie nord et la partie sud de la zone infectée de Côte d'Or entre 2002 et 2013 (Source : DDPP 21).....89

Figure 12 : répartition des différentes zones d'échantillonnage au sein de la zone infectée de Côte d'Or pour la surveillance de la tuberculose dans la faune sauvage.....92

Figure 13 : lésion pulmonaire purulente sur une biche infectée par *M. bovis* (Photo : Stéphane Barbier) 97

Figure 14 : nombre de sangliers analysés et nombre de sangliers positifs *M. bovis* par culture (spoligotypes identifiés) par commune entre 2003 et 2013 103

Figure 15 : évolution de la prévalence apparente de *M. bovis* (isolé par culture) chez le sanglier entre 2003 et 2013 dans la zone sud et la zone nord de l'aire infectée de Côte d'Or. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance à 95%.....106

Figure 16 : nombre de blaireaux analysés et nombre de blaireaux positifs *M. bovis* par culture (spoligotypes identifiés ; ND : non déterminé) par commune entre 2009 et 2013 112

Figure 17 : évolution de la prévalence apparente d'infection à *M. bovis* (isolé par culture) chez le blaireau entre 2009 et 2013 dans la partie sud et la partie nord de la zone infectée (Source : DDPP21).....115

Figure 18 : excrétas ayant fourni un résultat positif à au moins l'une des PCR ou par typage génétique par blaireau analysé 131

Figure 19 : localisation des unités de gestion cynégétiques, des sangliers et des cerfs positifs cumulés entre 2003 et 2013 (VO : vallée de l'Ouche ; HC : Hautes Côtes).....140

Figure 20 : évolution des tableaux de chasse et de l'IKa de cerfs en vallée de l'Ouche et Hautes Côtes entre 2001 et 2013 (Source FDC 21 et DDT 21) 143

Figure 21 : évolution des tableaux de chasse sur l'unité de gestion cynégétique n°7 entre 2005 et 2013 (Source FDC 21 et DDT 21).....143

Figure 22 : évolution des tableaux de chasse de cerfs dans l'unité de gestion cynégétique n°12 entre 2005 et 2013 (Source FDC 21 et DDT 21)....144
Figure 23 : évolution des tableaux de chasse de sangliers dans l'unité de gestion cynégétique n°5 entre 2005 et 2013 (Source FDC 21 et DDT 21)....145
Figure 24 : évolution des tableaux de chasse de sangliers dans l'unité de gestion cynégétique n°7 entre 2005 et 2013 (Source FDC 21 et DDT 21)....145
Figure 25 : évolution des tableaux de chasse de sangliers dans l'unité de gestion cynégétique n°12 entre 2005 et 2013 (Source FDC 21 et DDT 21)....146
Figure 26 : localisation des trois zones échantillonnées pour déterminer la densité des blaireaux en Côte d'Or, et localisation des transects prospectés dans chaque zone....152
Figure 27 : répartition des terriers recensés par l'échantillonnage sur les trois zones d'étude....156
Figure 28 : définition et caractéristiques des périodes utilisées dans l'analyse. Pour les blaireaux, elles correspondent à P1 jusqu'à P4. Pour les sangliers, elles correspondent aux 4 saisons. Sous chaque mois, est indiqué le nombre de nuits à lombrics dans la zone sud (case gauche) et dans la zone nord (case droite).....166
Figure 29 : représentation des domaines vitaux (MCP100% et Kernel 95%) de 3 sangliers suivis (S1, S4 et S6) et localisation des pâtures.....172
Figure 30 : prédictions du modèle expliquant le nombre de localisations sur les pâtures par 24h en fonction des saisons et selon que les nuits sont favorables ou non favorables aux lombrics pour un sanglier ayant 31,5% de pâture disponible (disponibilité moyenne)....175
Figure 31 : prédictions du modèle expliquant la surface de pâture dans le domaine vital mensuel (échelle exponentielle) chez le sanglier, en fonction de sa part de pâture disponible (le nombre de nuits à lombrics par mois est ici fixé à 0)....177
Figure 32 : représentation des domaines vitaux (MCP100% et Kernel 95%) et localisation des terriers de capture de 4 blaireaux suivis (B1, B2, B9 et B10) et répartition des pâtures....179
Figure 33 : prédiction du modèle expliquant le nombre de localisations par nuit sur les pâtures en fonction de la température minimale aux différentes périodes pour un blaireau vivant en bord de pâture....182
Figure 34 : distribution des quantiles des résidus du modèle expliquant le nombre de localisations sur les pâtures par nuit (***nloc***, cercles) comparée à la distribution normale (ligne).....183
Figure 35 : prédictions du modèle expliquant la surface de pâture dans le DV mensuel en fonction de la distance terrier-pâture aux différentes périodes....185
Figure 36 : répartition de la fréquence des visites (nombre de visites / nombre de nuits de surveillance) de la faune sauvage (toutes espèces confondues) en fonction des sites surveillés (les numéros en abscisse correspondent chacun à l'identifiant d'un site)....198
Figure 37 : répartition de la fréquence des visites (nombre de visites / nombre de nuits de surveillance) de la faune sauvage (toutes espèces confondues) en fonction des types de point surveillés....198
Figure 38 : prédictions du modèle expliquant le nombre de visites de cerfs par nuit sur les différents types de points surveillés (aliment : auges et bâtiments ; abreuvement : point d'eau et abreuvoir) en fonction des saisons....200
Figure 39 : prédictions du modèle expliquant le nombre de visites de sangliers par nuit sur les différents types de points surveillés en fonction des saisons....202
Figure 40 : prédictions du modèle expliquant le nombre de visites de blaireaux par nuit sur les différents types de points surveillés en fonction des saisons....203
Figure 41 : prédictions du modèle expliquant le nombre de visites de chevreuils par nuit sur les différents types de points surveillés (aliment : auges et bâtiments ; abreuvement : point d'eau et abreuvoir) en fonction des saisons....205
Figure 42 : durée des visites de cerfs en fonction des différents sites surveillés....207
Figure 43 : distribution des comportements relevés sur les visites de cerfs selon les sites surveillés 208
Figure 44 : biche léchant une pierre à sel dans une pâture....208
Figure 45 : durée des visites de sangliers observées sur les différents points surveillés....209
Figure 46 : nombre de sangliers observés par visite en fonction des différents sites surveillés....210

Figure 47 : distribution des comportements relevés sur les visites de sangliers selon les sites surveillés....211
Figure 48 : sangliers s'abreuvant sur un abreuvoir en pâture....211
Figure 49 : durée des visites de blaireau observées sur les différents points surveillés....212
Figure 50 : visites de deux blaireaux sur une auge en pâture....213
Figure 51 : distribution des comportements relevés sur les visites de blaireaux selon les sites surveillés....214
Figure 52 : contact proche avec un bovin observé au niveau d'une auge en pâture....214
Figure 53 : évolution de l'indice kilométrique d'abondance (IKa) et de la prévalence apparente dans la zone sud de la Côte d'Or (en haut) et en forêt de Brotonne (en bas).....230
Figure 54 : évolution de la prévalence apparente et de l'indice de densité (nombre de réalisations par km^2) en zone sud entre 2003 et 2013. 239
Figure 55 : synthèse de l'évaluation du risque qualitative (AFSSA 2008) de transmission-retour aux bovins par les populations de cerfs, de sangliers et de blaireaux (les valeurs affichées correspondent à la valeur médiane du score attribué dans le paragraphe 1).....260
Figure 56 : sectorisation de la partie sud de la zone infectée en fonction du nombre de bovins par commune et du paysage (Sources DDPP 21 et Corine land cover).....262
Figure 57 : synthèse du risque qualitatif (AFSSA 2008) relatif de transmission de *M. bovis* entre cerfs et bovins selon les saisons (les valeurs des scores correspondent aux valeurs médianes des intervalles fournis). 271
Figure 58 : synthèse du risque qualitatif (AFSSA 2008) relatif de transmission de *M. bovis* entre sangliers et bovins selon les saisons (les valeurs des scores correspondent aux valeurs médianes des intervalles fournis). 271
Figure 59 : synthèse du risque qualitatif relatif (AFSSA 2008) de transmission de *M. bovis* entre blaireaux et bovins selon les saisons (les valeurs des scores correspondent aux valeurs médianes des intervalles fournis) 272
Figure 60 : synthèse de l'évaluation du risque qualitative (AFSSA 2008) de transmission de *M. bovis* entre cerfs et bovins lié à l'utilisation de différentes infrastructures d'élevage. 278:
Figure 61 : synthèse de l'évaluation du risque qualitative (AFSSA 2008) de transmission de *M. bovis* entre sangliers et bovins lié à l'utilisation de différentes infrastructures d'élevage.....278
Figure 62 : synthèse de l'évaluation du risque qualitative (AFSSA 2008) de transmission de *M. bovis* entre blaireaux et bovins lié à l'utilisation de différentes infrastructures d'élevage.....279
Figure 63 : densité des blaireaux piégés (nb blaireaux/km^2) cumulé sur 2009 et 2013 (source : Ruette et Dolhem, non publiés, d'après données de la DDPP21).....290
Figure 64 : exemples de dispositifs visant à protéger les infrastructures d'élevage contre l'intrusion de blaireaux (Source : Judge et al. 2011) 298

Introduction

Les agents pathogènes multi-hôtes circulant à l'interface entre homme, faune domestique et faune sauvage sont susceptibles de poser des problèmes de santé publique, d'avoir des impacts économiques dans les filières agricoles et de soulever des enjeux de conservation (Cleaveland et al. 2001). La présence, souvent non détectée, ou tardivement, de tels pathogènes multi-hôtes dans la faune sauvage, dont les interactions sont grandissantes avec la faune domestique et l'homme, peut être cause d'émergence ou de réémergence de maladie dans le compartiment domestique et représenter un risque zoonotique (Daszak et al. 2000; Rhyan & Spraker 2010; Miller et al. 2013).

Si ces agents pathogènes doivent être contrôlés, il est alors nécessaire de comprendre quels mécanismes épidémiologiques peuvent conduire à leur émergence et à leur persistance au sein du système multi-hôtes qui les héberge. L'identification de réservoirs de l'infection pouvant être constitués d'une ou de plusieurs populations-hôtes, mais également du compartiment environnemental si l'agent pathogène est apte à survivre en milieu abiotique, est requise pour pouvoir mener des actions de lutte (Haydon et al. 2002). Or, l'implication éventuelle de populations sauvages dans ces réservoirs complique la gestion des maladies car l'écologie, les comportements ainsi que l'expression clinique engendrée par ces agents pathogènes dans ces populations sont le plus souvent peu connus et difficilement maîtrisables. Il reste, de plus, de nombreuses incertitudes concernant la manière dont se constituent les réservoirs, en particulier multi-hôtes, leur fonctionnement et de quelle façon il est possible de maitriser une infection dans ce contexte (Haydon et al. 2002; Rhyan & Spraker 2010).

La tuberculose bovine causée par la bactérie *Mycobacterium bovis* est une zoonose multi-hôtes dont l'hôte réservoir initial est constitué par les bovins. Les enjeux sanitaires et économiques qu'elle induit ont donné lieu à la mise en œuvre de programmes d'éradication à travers le monde dans les cheptels bovins. Cependant, la transmission à de multiples populations sauvages a été détectée et représente aujourd'hui un nouveau défi pour les gestionnaires (Palmer 2013).

La bactérie *M. bovis*, est donc un très bon exemple d'infection qui a donné lieu à des phénomènes de transmission depuis un réservoir domestique, pouvant entrainer la constitution de réservoirs dans la faune sauvage, lesquels peuvent retransmettre l'infection au compartiment domestique. Selon les régions, ces réservoirs sont composés d'une ou de plusieurs espèces de statut éventuellement différent. Dans une première partie, nous avons étudié les différents systèmes multi-hôtes de *M. bovis* impliquant des populations sauvages à

travers le monde, ceci, afin de mieux comprendre à la fois comment et en fonction de quoi est déterminé le rôle épidémiologique d'une population, en quoi représente-t-elle un risque de transmission-retour aux bovins et quelle gestion est alors possible.

La France est reconnue indemne de tuberculose bovine par l'Union Européenne depuis 2001 mais elle connaît une recrudescence de l'infection à *M. bovis* dans certains départements parmi lesquels la Côte d'Or. Dans ce département, des cas sur des espèces sauvages appartenant à différentes espèces ont été détectées mais leur statut au sein du système multi-hôtes de *M. bovis* est mal connu. Dans une deuxième partie, nous avons estimé pour la Côte d'Or, différents facteurs de risque, pouvant conduire à la persistance et à la transmission interspécifique de la bactérie, notamment vers les bovins. Enfin, dans une troisième partie, nous avons fait la synthèse de ces premiers chapitres en évaluant le rôle de ces populations sauvages et notamment le risque qu'elles puissent constituer un réservoir et qu'elles retransmettent la tuberculose aux bovins. Cette évaluation, ainsi que les données récoltées nous ont permis de proposer des mesures de gestion dans la faune sauvage et en élevage visant à limiter ce risque.

Chapitre 1

Mycobacterium bovis un agent pathogène multi-hôtes modèle, à l'interface entre faune domestique, faune sauvage et homme

Dans cette partie bibliographique nous avons abordé dans un premier temps les concepts théoriques d'agent pathogène multi-hôtes, de réservoir et de communauté d'hôtes. Nous avons ensuite expliqué quels étaient les enjeux de la présence de la tuberculose bovine dans la faune sauvage en insistant sur la situation européenne puis française. En décrivant différents systèmes multi-hôtes de *M. bovis*, leur configuration et leur gestion, nous avons tenté de dégager les facteurs de risque de pérennisation de l'infection par les populations sauvages et comment celles-ci pouvaient constituer une source d'infection pour les bovins.

1. CONCEPTS THÉORIQUES

1.1. Notion d'agent pathogène multi-hôtes

Un agent pathogène multi-hôtes, qu'il soit de nature viral, bactérien, parasitaire ou prion est un organisme capable d'infecter des hôtes d'espèces différentes. C'est le cas de 62% des pathogènes zoonotiques et 77% des pathogènes touchant les animaux domestiques (Cleaveland et al. 2001). D'un point de vue écologique, un tel agent peut être qualifié de « généraliste » par opposition aux agents pathogènes « spécialistes » qui infectent une seule espèce ou des espèces très proches (Woolhouse et al. 2001).Cette capacité à s'adapter à un large spectre d'hôtes représente un facteur de risque d'émergence de maladies chez les humains comme chez les animaux domestiques et sauvages (Cleaveland et al. 2001). Elle peut être liée aux voies de transmission de l'agent. En effet, la voie par contact direct favorise la transmission intra spécifique alors que la transmission par contact indirect ou la transmission vectorielle, accroit les opportunités pour le pathogène d'infecter des populations-hôtes différentes (Fenton & Pedersen 2005). Les changements environnementaux, la fréquence et l'intensité des interactions entre la faune sauvage, la faune domestique et l'homme a multiplié les opportunités de transmission des agents pathogènes multi-hôtes d'un compartiment à l'autre, favorisant ainsi l'émergence de systèmes multi-hôtes inédits (Daszak et al. 2000; Palmer et al. 2012).

1.2. Notions de réservoir et de communautés d'hôtes

La capacité de l'hôte à maintenir et à transmettre le pathogène définit son statut épidémiologique (Haydon et al. 2002). Plusieurs terminologies ont ainsi été définies.

Le terme de réservoir désigne un système écologique dans lequel l'agent infectieux peut survivre indéfiniment (Ashford 2003). Haydon et al. (2002) ajoute à cette définition une notion de population source et de population cible, le réservoir étant une ou plusieurs populations ou environnements connectés (population source) dans lequel le pathogène peut être maintenu en permanence et à partir duquel l'infection est transmise à une population cible. Dans le cas d'agents multi-hôtes, le réservoir peut être constitué de plusieurs populations d'espèces différentes et peut inclure des vecteurs et des compartiments abiotiques. L'ensemble forme alors une communauté réservoir de l'infection dans laquelle peuvent se trouver des hôtes non essentiels à la maintenance du pathogène mais jouant un rôle dans sa transmission à la population cible.

A l'intérieur de cette communauté, on distingue ainsi les **hôtes réservoirs** (« maintenance host » en anglais) où l'infection persiste de façon autonome par transmission

intraspécifique à l'intérieur de la population et qui peuvent être une source d'infection pour d'autres populations réceptives (Ashford 2003).

Les **hôtes de liaison** (« spillover host » en anglais) sont incapables de maintenir seuls, de façon pérenne, l'infection sans source de contamination extérieure à la population mais peuvent transmettre l'agent pathogène à une autre population (Fenton & Pedersen 2005; Corner 2006; Rhyan & Spraker 2010; Nugent 2011)

Hôtes réservoirs et hôtes de liaison peuvent amplifier l'infection en augmentant rapidement la charge infectieuse sur une zone donnée, ils sont alors qualifiés **d'hôtes amplificateurs**, ou encore être des **hôtes vecteurs spatiaux** (permettant l'extension de l'infection dans l'espace) ou **vecteurs temporels** (permettant l'extension de l'infection dans le temps) (Corner 2006; Rhyan & Spraker 2010; Nugent 2011)

Enfin, il existe également des **culs de sac épidémiologiques** (Caley & Hone 2005; Nugent 2011), ne jouant aucun rôle ni dans la maintenance de l'infection ni dans sa transmission. A ce titre, ils ne sont pas inclus dans la communauté d'hôtes réservoir tel que définie précédemment.

La transmission d'agents infectieux à partir d'un réservoir domestique vers la faune sauvage sympatrique est cause d'émergence de maladies infectieuses dans la faune sauvage. Les hôtes sauvages peuvent à leur tour constituer un réservoir et retransmettre l'infection à la faune domestique (**transmission-retour** ou « spill back » en anglais) (Daszak et al. 2000). Ces différentes configurations mettent en lumière l'importance de définir la population cible et la population source comme le proposent Haydon et al. (2002).

1.3. Conditions permettant la constitution d'un réservoir

1.3.1. **Taux de reproduction de base**

L'aptitude d'une population ou d'une communauté d'hôtes à être réservoir est conditionnée par la dynamique de l'infection au sein de cette communauté, qui repose sur la transmissibilité de l'agent pathogène à l'intérieur ou entre populations-hôtes. Cette aptitude correspond au R_0 ou taux de reproduction de base qui se définit par le nombre moyen de cas secondaires provoqués par un sujet atteint d'une maladie transmissible au sein d'une population entièrement réceptive (Lloyd-Smith, Cross, et al. 2005; Ward & Smith 2012; Palmer 2013).

Pour qu'un hôte ou une communauté soit réservoir, R_0 doit être égal ou supérieur à 1. Dans le cas contraire, un réservoir ne peut être constitué. Pour un hôte de

liaison, R_0 est compris entre 0 et 1 et pour un cul de sac épidémiologique, R_0=0 (Caley & Hone 2005; Ward & Smith 2012).

Dans le cas d'une maladie densité-dépendante, R_0 dépend à la fois du taux de transmission entre individus et du nombre d'individus réceptifs présent à un moment donné. Ces deux paramètres interviennent donc dans la capacité d'une population à être réservoir (Lloyd-Smith, Cross, et al. 2005; Ward & Smith 2012).

1.3.2. **Facteurs affectant la transmission d'un agent pathogène**

A l'échelle individuelle, les facteurs affectant la transmission d'un agent pathogène sont la ou les voies d'infection, la dose infectante (qui peut être différente selon les voies d'infection), la localisation et la sévérité des lésions, conditionnant elles-mêmes les voies et les niveaux d'excrétion de l'agent (Corner 2006).

A l'échelle populationnelle, il faut tenir compte de la prévalence, c'est-à-dire du nombre d'individus infectés et aptes à transmettre l'infection ainsi que du nombre d'individus réceptifs. Le niveau d'interaction entre ces deux « catégories » de la population est déterminant pour la transmission. Dans le cas d'un agent multi-hôtes à transmission indirecte, la durée de survie de l'agent en dehors des hôtes ainsi que les niveaux de prévalence de chaque population-hôte et les interactions entre chacune d'elles interviennent également (Corner 2006; Nugent 2011).

Le statut de réservoir d'une population dépend donc de la prévalence de l'infection, de la pathologie induite par l'agent pathogène et des caractéristiques démographiques, écologiques et comportementales des populations

1.3.3. **Taille critique de la population**

La taille critique d'une population est celle en dessous de laquelle l'agent pathogène ne peut persister indéfiniment (Haydon et al. 2002; Lloyd-Smith, Cross, et al. 2005). Cette taille peut renvoyer à l'abondance de la population ou à sa densité selon le type de modèle utilisé.

Par ailleurs, on peut distinguer la valeur seuil de la population nécessaire à l'établissement d'une infection au sein d'une population de la valeur seuil requise pour faire persister cette infection. La détermination de ces valeurs seuil est délicate car la dynamique d'un agent pathogène au sein d'une population dépend de nombreux facteurs incluant la structure sociale et spatiale des hôtes, la dynamique de la population, la relation hôte-pathogène, qui peuvent varier d'une population à une autre et d'un contexte écologique à un autre. Dans ce but, la modélisation peut s'avérer utile mais la taille critique de la population

peut également être déduite d'études empiriques dans le cas par exemple, où la disparition d'une maladie est observée dans une population dont on a réduit l'abondance (Lloyd-Smith, Cross, et al. 2005).

Ainsi, la densité peut être un curseur pour établir le statut épidémiologique d'une population, capable de maintenir l'infection seulement si sa taille dépasse un certain seuil (Caley & Hone 2005; ANSES 2011; Nugent 2011). Pour un agent multi-hôtes, cette notion est plus complexe du fait de la coexistence de plusieurs populations-hôtes en interaction (Lloyd-Smith, Cross, et al. 2005). Dans ce cas, on parle d'une « configuration seuil » de la communauté d'hôtes (Holt et al. 2003) qui doit prendre en compte la transmission intraspécifique et interspécifique des différentes populations hôtes composant la communauté (Caley & Hone 2004).

1.3.4. **Conclusion**

Une population peut donc constituer un réservoir si son taux de reproduction de base est supérieur à 1, impliquant un taux de transmission et une taille de population suffisants pour permettre à l'agent de persister (Palmer 2013). Ces concepts théoriques se heurtent cependant à la complexité de systèmes infectieux dans des populations dont il est difficile de connaître avec précision tous les paramètres requis pour évaluer leur statut épidémiologique. La complexité s'accroit dans les systèmes multi-hôtes où plusieurs populations interagissent et peuvent constituer une communauté réservoir (Lloyd-Smith, Cross, et al. 2005; Nugent 2011).

L'identification du réservoir d'un agent pathogène est pourtant capitale pour mettre en place des mesures de gestion et de lutte efficaces (Delahay et al. 2001; Corner 2006).

La tuberculose bovine, maladie à enjeux sanitaires et économiques importants à travers le monde, illustre bien cette problématique. Elle est en effet causée par un agent multi-hôtes circulant chez les bovins, la faune sauvage et l'homme et est capable de survivre dans l'environnement. Sa gestion requiert donc de comprendre quels sont les mécanismes épidémiologiques qui conditionnent son maintien dans chacun des contextes où elle est présente.

2. CARACTÉRISTIQUES DE MYCOBACTERIUM BOVIS

2.1. Généralités

La tuberculose bovine (TB) est causée par *Mycobacterium bovis*, une bactérie aérobie, acido-alcoolo résistante, intracellulaire obligatoire, à croissance lente appartenant au complexe *Mycobacterium tuberculosis*. Ce complexe, très homogène sur le plan génétique, comprend de nombreuses bactéries dont la plupart sont pathogènes pour les animaux mais aussi pour l'homme. *M. bovis* est l'espèce du complexe *Mycobacterium tuberculosis* capable de s'adapter au plus large spectre d'hôtes. Son réservoir initial est constitué par l'espèce bovine mais elle peut être transmise à de nombreux mammifères, y compris l'homme. Sa paroi cellulaire et sa croissance lente la rendent particulièrement résistante à l'intérieur des organismes mais également dans le milieu extérieur (Biet et al. 2005).

2.2. Pathogénie

La voie respiratoire est la voie d'entrée principale de *M. bovis*. La voie orale, et, de façon plus marginale, la voie transcutanée sont également possibles mais elles requièrent une dose infectante plus élevée. La transmission par contact direct via les aérosols est donc la plus efficace mais elle peut également avoir lieu par ingestion ou plus rarement par pénétration transcutanée de la bactérie. La transmission pseudo-verticale par le lait infecté de la mère ou les contacts rapprochés entre la mère et son jeune sont également possibles (Morris et al. 1994; Phillips et al. 2003; Biet et al. 2005; Corner et al. 2010).

Le tropisme respiratoire de la bactérie conduit le plus souvent à l'infection des voies aériennes supérieures. La pathogénie se caractérise par une première étape de primo infection dans laquelle les bactéries sont phagocytées par les macrophages. Une partie est détruite et une autre peut se multiplier et former une lésion initiale : le chancre d'inoculation. Des lésions peuvent se développer dans les nœuds lymphatiques suite au drainage lymphatique des bactéries. Chancre d'inoculation et adénopathie satellite forment le complexe primaire, dont la localisation révèle la voie d'entrée de l'agent infectieux. Ce complexe peut évoluer vers une guérison totale, une stabilisation, ou vers une dissémination voire une généralisation, entrainée par une prolifération bactérienne de proche en proche, faisant suite, généralement, à une baisse d'immunité de l'hôte. La tuberculose à *M. bovis* est une maladie chronique, le plus souvent d'évolution lente avec des périodes de latence plus ou moins longues (de quelques mois à plusieurs années chez les bovins) et des états infectieux de durée variable selon l'état immunitaire de l'hôte (Phillips et al. 2003; Biet et al. 2005; Benet 2012). La généralisation de l'infection donne lieu à une tuberculose secondaire et peut alors toucher

un ou plusieurs organes, on parle alors de tuberculose chronique d'organe. Les lésions le plus souvent caséeuses peuvent s'ouvrir sur une voie de drainage naturelle (tube digestif, bronche…) et donner ainsi des formes ouvertes (Benet 2012).

Bien que cette pathogénie soit caractéristique de l'infection à *M. bovis*, des variations peuvent exister selon les hôtes, notamment sur les voies de pénétration de la bactérie, la localisation et la sévérité des lésions. Celles-ci conditionnent les voies et les niveaux d'excrétion de la bactérie et donc la transmission potentielle à d'autres hôtes réceptifs (Biet et al. 2005; Corner 2006; Benet 2012)

Les matières infectieuses sont variées et dépendent de la voie d'infection et d'excrétion de l'individu : mucus trachéal, salive le plus souvent, fèces (en cas de lésions mésentériques ou d'ingestion d'aérosols contaminés), lait, urine, et plus rarement pus de lésions cutanées, constituent les principaux excrétas de *M. bovis* (Corner et al. 2010; Benet 2012).

2.3. Survie de M. bovis dans le milieu extérieur

M. bovis peut résister dans le milieu extérieur grâce à sa paroi cellulaire (Biet et al. 2005). Sa durée de survie dans l'environnement dépend du substrat et des conditions climatiques dans lesquels la bactérie se trouve. Elle est particulièrement sensible aux ultra-violets et donc à la lumière du soleil qui entrainent sa dessiccation. L'humidité, au contraire, favorise sa survie (Morris et al. 1994; Phillips et al. 2003; Fine et al. 2011).

Plusieurs études ont évalué la durée de survie de *M. bovis* dans différents substrats et différentes conditions. Ainsi, en Nouvelle-Zélande, *M. bovis* déposé en pâture a pu être retrouvé après seulement quelques jours, quelque soit la saison alors qu'en forêt, en hiver, sa survie a été prolongée jusqu'à 14 jours (Jackson et al. 1995). Dans un sol humide et ombragé, à 34°C, *M. bovis* a été ré isolé après 4 semaines (Duffield & Young 1984). Dans le Michigan, la bactérie a persisté jusqu'à 88 jours dans le sol et 21 jours dans l'eau dans des conditions correspondant à un hiver en France continentale. Pendant l'été (température moyenne de 20°C, faible précipitation et fort ensoleillement), la survie dans le sol a été réduite à 11 jours mais dans l'eau, dans ces conditions, *M. bovis* a persisté 58 jours, attestant que ce substrat est particulièrement protecteur et favorise la rémanence de bactéries viables. Dans le foin, la bactérie a résisté 26 jours en hiver et 0 jour en été (Fine et al. 2011).

Parce qu'ils sont à l'abri de la lumière, que la température y est douce et stable (entre 9°C et 24°C en région tempérée et des variations annuelles maximales de 11°C) et que le taux d'humidité y est élevé les terriers des blaireaux constituent un milieu privilégié pour la survie de *M. bovis* (Moore & Roper 2003). L'ADN de *M. bovis* a été détecté par PCR dans des terriers ayant hébergé des blaireaux infectés (Young et al. 2005; Courtenay et al. 2006).

Des études d'isolement bactérien sont encore nécessaires pour établir la durée de persistance de bactérie viable et infectieuse au sein des terriers

M. bovis peut également survivre dans les excrétas des animaux infectés. Dans les fèces de bovins contaminés, la bactérie persiste jusqu'à six mois pendant l'hiver et deux mois pendant l'été, selon la température et la concentration de l'agent pathogène (Phillips et al. 2003).

M. bovis a été cultivé à partir d'urine de blaireaux artificiellement infectés, après que celle-ci ait été laissée pendant 3 jours sur une pâture en été et 28 jours en hiver. Dans ces mêmes conditions, la bactérie a été retrouvée après 7 et 70 jours dans le mucus bronchique et 14 et 28 jours dans des fèces de blaireaux naturellement infectés, en été et hiver respectivement (Morris et al. 1994).

Dans les aérosols, *M. bovis* résiste bien au stress cellulaire induit par le contact avec l'air. En condition expérimentale, 94% des organismes survivent dix minutes après la nébulisation et la demi-vie a été estimée à 1,5 heures, confirmant l'efficacité de la voie de transmission respiratoire directe (Gannon et al. 2007).

Dans les carcasses d'animaux infectés, la durée de survie de *M. bovis* dépend de la vitesse de décomposition et de putréfaction et donc des conditions environnementales. Lorsque le cadavre est putréfié, *M. bovis* n'est plus retrouvé. Dans des cadavres de blaireaux, l'isolement a été possible jusqu'à 4 semaines après la mort de l'animal (Morris et al. 1994; Gallagher & Clifton-Hadley 2000).

La persistance de *M. bovis* en dehors des hôtes, que ce soit dans l'environnement, les excrétas ou les cadavres est donc d'une durée variable, dépendante des conditions climatiques mais qui apparaît compatible avec une voie de transmission indirecte par inhalation ou ingestion de substrats contaminés.

2.4. Diversité des souches de M. bovis et lien avec sa virulence

L'identification des différentes souches de *M. bovis* est réalisée par typage génétique grâce à des marqueurs polymorphes. Les spoligotypes et le typage par VNTR ("Variable Number Tandem Repeats") sont les deux méthodes couramment utilisées, la deuxième étant plus discriminante que la première (Kamerbeek et al. 1997; Roring et al. 2002; Haddad et al. 2004). Ces typages mis en œuvre en France dans la majorité des foyers de tuberculose bovine, chez les bovins et dans la faune sauvage ont mis en évidence une diversité importante des souches (161 spoligotypes différents isolés) mais une prédominance de deux

spoligotypes (SB 0120 et SB0121) et une relative homogénéité à l'échelle des départements (Haddad et al. 2001).

Cette discrimination entre souche permet d'établir des liens épidémiologiques entre individus ou populations partageant les mêmes souches. A échelle locale, la majorité des souches sont communes entre les bovins et les différentes populations sauvages infectées par *M. bovis* à travers le monde, attestant qu'il ne semble pas y avoir de spécificité d'hôtes pour ces souches (Haddad et al. 2001; Woodroffe et al. 2005; Olea-Popelka et al. 2005; Duarte et al. 2008; Gortazar, Torres, et al. 2011).

Aucun lien n'est pour l'instant établi entre le type de souche de *M. bovis* et la virulence mais peu d'investigations ont été entreprises, principalement du fait du temps très long requis pour la culture de *M. bovis* (Morris et al. 1994; Collins 2001). Cependant, par analogie avec ce qui est connu sur *Mycobacterium tuberculosis*, agent de la tuberculose humaine, ce lien est fortement suspecté (Gavier-Widén et al. 2009).

3. IMPORTANCE ET ENJEUX DE LA TUBERCULOSE DANS LA FAUNE SAUVAGE

3.1. Situation historique et actuelle de la tuberculose dans l'élevage bovin en Europe

La tuberculose bovine est une maladie cosmopolite. Jusqu'au début du 20ème siècle, elle était répandue dans de nombreux pays dans les cheptels bovins qui étaient sources d'infection pour l'homme par inhalation d'aérosols excrétés par des animaux infectés ou par l'ingestion de lait (Biet et al. 2005). Devant cet enjeu de santé publique, l'éradication de la tuberculose bovine a été un objectif majeur des organisations agricoles et des autorités publiques depuis près d'un siècle (Reviriego Gordejo & Vermeersch 2006). Suite aux contrôles mis en œuvre dans les cheptels bovins (surveillance et abattage des bovins infectés), aux mesures d'hygiène prises dans la filière lait (pasteurisation) et la filière viande (inspection en abattoir), l'incidence de cette zoonose a fortement diminué dans les pays développés (Biet et al. 2005). Par conséquent, dans les pays industrialisés, le risque zoonotique, a diminué et l'enjeu économique de la maîtrise de la tuberculose bovine est devenu prépondérant au cours des dernières décennies (Benet 2012).

En effet, le statut des pays vis-à-vis de la tuberculose bovine conditionne les échanges commerciaux internationaux, notamment en Europe (Reviriego Gordejo & Vermeersch 2006; Schiller et al. 2011). La législation réglementant le commerce des bovins

entre les pays membres de la communauté européenne requiert que les bovins vendus (sauf lorsqu'ils sont destinés directement à l'abattoir) à un autre pays membre aient fait l'objet d'un test de dépistage de la tuberculose bovine ou proviennent d'un pays ou d'une région qualifiée d'officiellement indemne de tuberculose bovine (Reviriego Gordejo & Vermeersch 2006). Les critères à remplir pour obtenir cette qualification sont les suivants : (i) le pourcentage de troupeaux bovins ayant été confirmés infectés par *M. bovis* ne doit pas excéder 0,1% par an sur tous les troupeaux pendant 6 ans consécutifs ; (ii) chaque bovin est identifié en accord avec la législation européenne en vigueur ; (iii) tous les bovins abattus font l'objet d'une inspection post-mortem à l'abattoir.

En Europe, l'Allemagne, l'Autriche, la Belgique, le Danemark, la Finlande, la France, le Luxembourg, la Norvège, les Pays-Bas, la Pologne, la République Tchèque, la Slovaquie, la Slovénie, la Suisse et la Suède et une partie de l'Italie sont reconnues officiellement indemnes de tuberculose (Figure 1) (Reviriego Gordejo & Vermeersch 2006; Hardstaff et al. 2013). L'Espagne, l'Irlande et la Grande Bretagne sont les trois pays dans lesquels la prévalence de tuberculose bovine est la plus élevée (1,3% ; 4,2 % et 11,5% en 2011, respectivement) (Munoz-Mendoza et al. 2013; Gormley & Corner 2013, DEFRA 2013). La tendance actuelle est à l'augmentation globale de la prévalence-troupeaux dans les pays de l'Union, y compris dans les pays officiellement indemnes (Schiller et al. 2011).

3.2. Enjeux liés à la présence de M. bovis dans la faune sauvage

La capacité de *M. bovis* à infecter un très large spectre d'hôtes et la cohabitation des espèces sauvages et domestiques ont favorisé l'émergence de la tuberculose bovine dans des populations sauvages (Daszak et al. 2000; Palmer et al. 2012). Outre l'impact écologique et les enjeux de conservation que la circulation de ce pathogène peut avoir dans les populations sauvages (Daszak et al. 2000; Michel et al. 2006; Gortázar et al. 2008), il existe un risque de constitution d'un réservoir de *M. bovis*. Si celui-ci est sympatrique des bovins, il peut être une source de contamination pour le compartiment domestique (transmission-retour). Un tel scénario rend alors l'éradication de la tuberculose dans le cheptel bovin très difficile à accomplir (Corner 2006; Gortázar et al. 2012; Palmer et al. 2012).

Différents pays, en Europe (Figure 1) mais aussi en Amérique, en Afrique et en Océanie font face à cette situation de réservoir de tuberculose bovine installée dans la faune sauvage qui complique l'assainissement des troupeaux bovins (Corner 2006; Nugent 2011; Gortázar et al. 2012; Miller et al. 2013; De Garine-Wichatitsky et al. 2013)

Dans ce contexte, il est important de bien connaitre la situation épidémiologique de la faune sauvage. Pourtant, la déclaration d'animaux sauvages infectés par *M. bovis* n'est pas obligatoire sauf dans quelques pays du nord de l'Europe (Gortázar et al. 2012). La

décision de surveiller la tuberculose bovine dans la faune sauvage est souvent prise tardivement, à la suite de la détection parfois fortuite d'animaux sauvages infectés ou en réponse à une réémergence ou à la persistance de foyers bovins (Boadella et al. 2011a; Rivière et al. 2012). De plus, les modalités de la surveillance, le plus souvent événementielle, associées à la performance limitée des tests diagnostiques disponibles pour les espèces sauvages, à la latence de l'infection et à la mauvaise corrélation entre lésions et infection sont mal adaptées à la détection précoce de l'infection dans la faune sauvage (Hermoso de Mendoza et al. 2006; Rivière et al. 2012; Miller & Sweeney 2013; Hars et al. 2013). Dans ces conditions, l'absence de cas positifs ne signifie pas forcément l'absence de l'infection et lorsque celle-ci est rapportée, le réservoir sauvage peut déjà être constitué (Anderson et al. 2013; Miller & Sweeney 2013), ce qui montre la difficulté de connaître la situation épidémiologique avec les méthodes utilisées actuellement.

Dans certains pays d'Europe dont la France, des populations sauvages infectées par *M. bovis* ont été détectées sans que leur rôle épidémiologique ne soit bien établi (Figure 1). Dans ce contexte, il est difficile d'affirmer si ces cas ont la potentialité de devenir des réservoirs pérennes et dans quelle mesure ils représentent une menace pour l'assainissement des cheptels bovins (Gortázar et al. 2012).

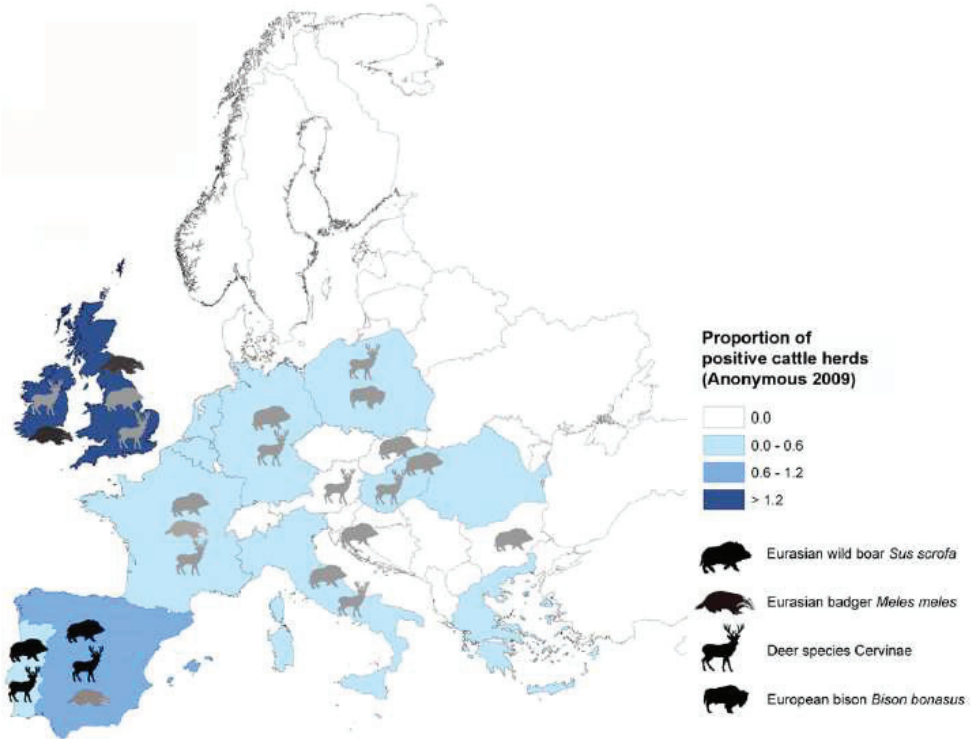


Figure 1 : situation des pays d'Europe vis-à-vis de l'infection à *M. bovis* chez les bovins et dans la faune sauvage Les populations constituant un: réservoir avéré apparaissent en noir et celles ayant un rôle épidémiologique inconnu apparaissent en gris (Sources : Gortazar et al. 2012 et Anonymous, 2009).

En parallèle des mesures prises dans la filière bovine, il semble donc capital d'améliorer la compréhension de l'épidémiologie de la tuberculose dans la faune sauvage dans le but de mettre en œuvre des mesures efficaces visant à limiter l'impact de l'infection à *M. bovis* dans les populations sauvages, en termes d'assainissement des cheptels, de conservation et de santé publique.

3.3. Situation en France

3.3.1. **Chez les bovins**

Lorsque la lutte organisée contre la tuberculose bovine a débuté en 1955 en France, la prévalence de l'infection des troupeaux s'élevait à environ 25%. Le dépistage des animaux infectés par tuberculination systématique et périodique, l'inspection des carcasses à l'abattoir, les mesures de protection des élevages indemnes et l'élimination des animaux puis des troupeaux infectés a permis de faire baisser progressivement mais notablement la prévalence de la tuberculose bovine jusqu'au seuil des 0,1%. La France a ainsi obtenu le statut de pays officiellement indemne de tuberculose en 2001. La prévalence a ensuite continué à baisser mais de manière ralentie jusqu'en 2004. Depuis 2005, cependant, on observe une recrudescence de l'infection avec une augmentation particulière entre 2009 et 2010, conduisant en 2013 à se rapprocher de la valeur seuil de prévalence permettant de prétendre au statut indemne de l'Union Européenne (Figure 2). Cette augmentation du nombre de foyers au niveau national est essentiellement imputable à la dégradation de la situation dans un nombre limité de départements, la Dordogne la Côte d'Or et les Pyrénées Atlantiques (source : DGAl) (Figure 3).

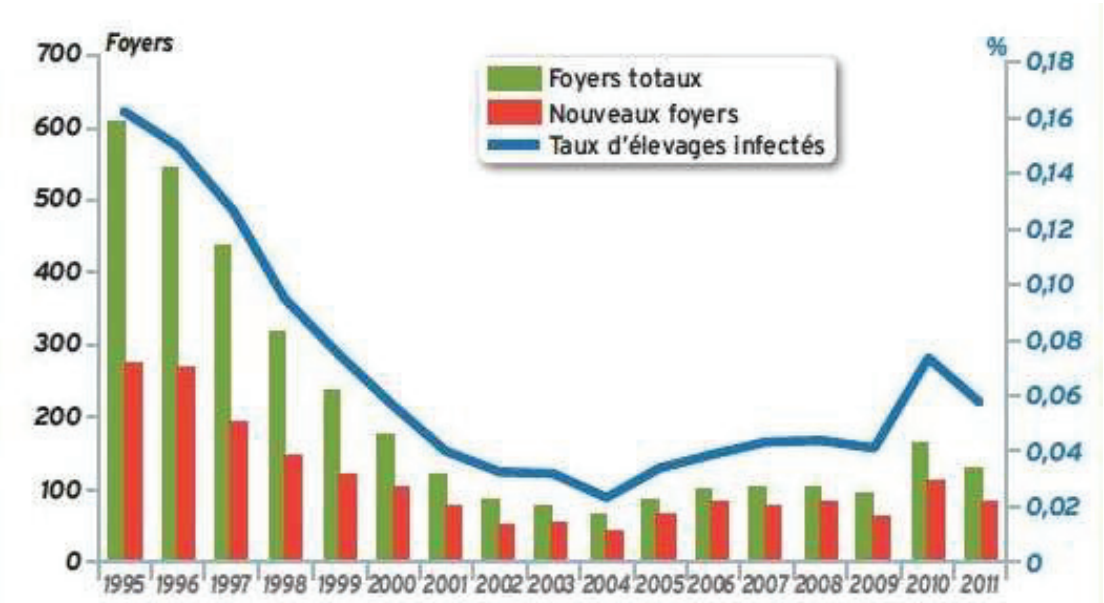


Figure 2 : évolution des foyers de tuberculose bovine détectés chaque année de 1995 à 2010 (Source : DGAl).

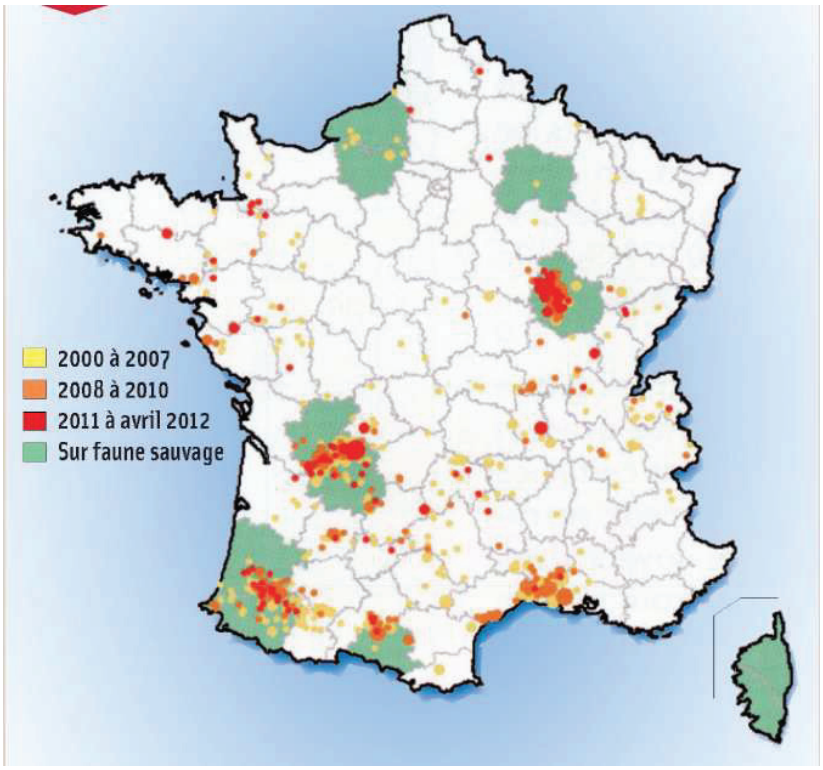


Figure 3 : répartition spatiale et temporelle des foyers bovins en France entre 2000 et 2012 et répartition des départements où des cas de tuberculose bovine ont été détectés dans la faune sauvage (dans le département de la Haute-Marne il s'agit de sangliers infectés provenant d'un parc de chasse) (source : DGAL).

Dans ces départements, le renforcement de la surveillance par les acteurs mieux sensibilisés (vétérinaires, éleveurs) a permis de révéler des foyers non détectés jusque là mais laissant l'infection circuler à bas-bruit (ANSES 2011). En outre, ces départements sont caractérisés par une forte proportion de troupeaux allaitants dont la conduite d'élevage prédispose à des facteurs de risque vis-à vis de la tuberculose bovine (taille importante des cheptels, séjour prolongé en pâturage et morcellement des pâtures, difficulté des contentions des animaux pour le dépistage, longévité des vaches allaitantes comparativement aux vaches laitières) (ANSES 2011).

Les investigations épidémiologiques conduites dans les foyers de tuberculose bovine révèlent une part prépondérante du voisinage et de l'introduction comme origines présumées de l'infection. La contamination par la faune sauvage est rapportée comme étant à l'origine de 5% des cas sans qu'il soit toutefois possible de la démontrer avec certitude. A noter que la résurgence et une origine inconnue sont citées dans respectivement 6% et 18% des cas, ceux-ci pouvant potentiellement être liée à une cause environnementale et de façon indirecte à la faune sauvage (Fediaevsky et al. 2010).

3.3.2. **Dans la faune sauvage**

- **Modalités de surveillance**

Types de surveillance

Jusqu'à 2011, il n'existait pas en France de système de surveillance de la tuberculose bovine dans la faune sauvage, homogène et standardisé sur le territoire. La détection d'animaux sauvages tuberculeux se faisait par le biais du réseau national de surveillance événementielle de la mortalité de la faune sauvage : le réseau SAGIR qui repose sur des observateurs de terrain (chasseurs, techniciens de fédération de chasse, agents de l'office national et de la faune sauvage) et a pour principal objectif de déterminer les causes de mortalité des animaux sauvages (Lamarque et al. 2000). La tuberculose chez le gibier est également surveillée par les chasseurs à l'occasion de l'éviscération des animaux tués à la chasse (surveillance événementielle) (Rivière et al. 2012).

Dans certains départements où la prévalence chez les bovins est particulièrement élevée et/ou des cas d'animaux sauvages infectés ont été mis en évidence, des programmes de surveillance active (ou programmée) dans la faune sauvage ont été mis en œuvre. Dans ce cas, un échantillonnage est planifié dans le but d'évaluer la prévalence. Ce type de surveillance a été mise en œuvre dans la forêt de Brotonne-Mauny en Seine-Maritime, et dans les départements de la Côte d'Or, de la Dordogne, des Pyrénées Atlantiques et de la Corse.

Depuis 2011, un dispositif de surveillance national, le réseau Sylvatub, a été mis en place permettant une surveillance, événementielle ou programmée selon le niveau de

risque du département, harmonisée et étendue à tout le territoire (Tableau 1) (Rivière et al. 2012).

Tableau 1 : volets de surveillance de la tuberculose bovine dans la faune sauvage à appliquer en fonction du niveau de risque (le niveau 1 correspond au risque le moins élevé) estimé selon le protocole de Sylvatub (Source : Note de service DGAL/SDSPA/N2011-8214)

Volets de surveillance	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
Surveillance des cervidés et des sangliers porteurs de lésions suspectes par l'examen initial de la venaison	X	X	X
Surveillance des sangliers, des cervidés et des blaireaux prélevés par SAGIR	X	X	X
Renforcement du réseau SAGIR		X	X
Surveillance des cadavres de blaireaux signalés sur les routes		X	X
Surveillance active des blaireaux en zone infectée		X	X
Surveillance active sur les cerfs et les sangliers tués à la chasse			X

Biais inhérents à la surveillance d'une maladie dans la faune sauvage

Qu'il soit événementiel ou programmé, chaque dispositif de surveillance de la faune sauvage a ses contraintes et ses biais, liés par exemple aux méthodes d'échantillonnage (prélèvements réalisés sur les périodes de chasse donc répartis sur certains mois de l'année, ciblant pour la plupart uniquement certaines strates de la population) ou bien à l'éco-éthologie des espèces cibles (activité nocturne, hibernation, migrations…). Par exemple, dans le cadre du réseau SAGIR sont collectés pour analyse uniquement les animaux morts, mieux repérés dans la nature s'ils sont de taille importante, mais de poids suffisamment modéré pour être facilement transportés par les agents du réseau (les grands cervidés collectés par SAGIR sont peu nombreux) et en état d'être analysés entraîne un biais de sélection. Par ailleurs, si un nombre plus important d'animaux est collecté dans une zone géographique donnée, cela peut être lié à une mortalité anormale, éventuellement due à un agent pathogène, mais également à d'autres facteurs tels qu'une meilleure sensibilisation des acteurs locaux de la zone, comme pour tout dispositif événementiel (Rivière et al. 2012).

Lors de la mise en place d'un protocole de surveillance programmée, il est nécessaire de calculer *a priori* la taille de l'effectif à échantillonner afin de pouvoir estimer un taux de prévalence avec une précision définie ou respecter une probabilité de détection déterminée. Pour cela, il faut pouvoir estimer la taille globale de la population cible, ce qui est souvent délicat pour les populations d'animaux sauvages dont les estimations d'effectifs peuvent comporter une part importante d'imprécision. De plus, la taille de l'échantillon doit

être raisonnable pour garantir la faisabilité de l'étude, en termes de moyens économiques, humains et techniques pour effectuer les prélèvements et les analyses. Un compromis est donc nécessaire entre le protocole d'échantillonnage idéal pouvant être préconisé par les épidémiologistes et les difficultés pratiques inhérentes à la collecte des animaux et/ou à la réalisation des prélèvements (Fromont & Rossi 2000).

Enfin, afin d'assurer la représentativité d'un échantillon par rapport à une population cible, l'échantillonnage devrait être réalisé de manière aléatoire. Or, dans le cas d'études réalisées sur des animaux sauvages, il est difficile, voire impossible, d'obtenir une répartition aléatoire des individus prélevés (Fromont & Rossi 2000): la population étudiée est d'une part souvent méconnue et difficilement accessible et, d'autre part, les techniques d'échantillonnage (animaux chassés, animaux retrouvés morts, animaux facilement accessibles dans le biotope environnant, ...) induisent la plupart du temps un biais de sélection qui conduit à choisir préférentiellement certains individus par rapport à d'autres, et donc à sur- ou sous- représenter certaines strates de la population, selon l'âge, le sexe, etc. L'échantillon ne peut alors plus être considéré comme représentatif de la population et l'extrapolation ainsi que l'interprétation des résultats obtenus deviennent délicats. Les biais de sélection peuvent ainsi avoir un impact sur l'estimation de la prévalence (sur- ou sous-représentation de certaines strates de la population par rapport au risque étudié), sur la précision de l'estimation dans chacune de ces strates et sur la détection d'une infection (sélection d'animaux peu exposés à la maladie). La surveillance de la faune sauvage peut également être confrontée à des biais de mesure, les tests diagnostiques étant rarement adaptés aux animaux sauvages et pouvant ainsi conduire à des erreurs par défaut (faux négatifs) ou des erreurs par excès (faux positifs). Dans la mesure du possible, les biais doivent être identifiés et les résultats de la surveillance être corrigés *a posteriori* (Fromont & Rossi 2000)

Cependant, dans la majorité des cas, ces biais sont difficilement quantifiables et les niveaux d'infection ne sont pas corrigés ce qui conduit à interpréter les résultats avec prudence.

Méthodes diagnostiques

Les méthodes diagnostiques utilisées en France sur les espèces sauvages incluent de façon systématique l'examen post-mortem et l'isolement de *M. bovis* par mise en culture d'un ensemble de nœuds lymphatiques, qui constitue la méthode de référence présentant une spécificité de 100% (Zanella, Durand, et al. 2008; Collins 2011). La sensibilité est cependant mois élevée, elle dépend de la charge bacillaire des tissus mis en culture, de la qualité des prélèvements (plus ou moins dégradés) et de l'étape de décontamination qui peut diminuer le nombre de bactéries viables (Payne et al. 2013). Selon les programmes de surveillance, ces méthodes peuvent être complétées par la coloration de Ziehl-Nielsen qui révèle le caractère acido-alcoolo résistant de *M. bovis*, par un examen histologique, afin de mettre en évidence des lésions évocatrices de tuberculose et/ou par une PCR (Polymérase

Chain Reaction) réalisée en général sur le même pool de tissus que la culture. Cette dernière a l'avantage d'être un outil plus rapide pouvant être utilisé sur des prélèvements de plus mauvaise qualité, elle est cependant moins spécifique car pouvant détecter d'autres espèces du complexe *Mycobacterium tuberculosis* comme par exemple *Mycobacterium. microti* (Hénault et al. 2006; Payne et al. 2013).

Un résumé des caractéristiques des méthodes diagnostiques utilisées pour la recherche de *M. bovis* en France dans la faune sauvage figurent dans le Tableau 2.

Le génotypage des souches de *M. bovis* isolées à l'aide du spoligotypage et du profil VNTR, déjà présentés précédemment permet ensuite de discriminer les différentes souches entre elles constituant ainsi un outil d'épidémiologie moléculaire permettant de retracer les liens épidémiologiques entre les individus ou les groupes d'animaux infectés(Serraino et al. 1999; Woodroffe et al. 2005; Zanella, Durand, et al. 2008; Gortazar, Torres, et al. 2011).

Tableau 2 : caractéristiques des méthodes diagnostiques de *M. bovis* utilisées dans la faune sauvage en France (d'après Maeder 2008)

Méthode diagnostique	*Sensibilité*	*Spécificité*	*Rapidité*	*Coût (euros HT)*
Examen post-mortem	+/-	+/-	0,5 à quelques heures	ND*
Histopathologie	++	+/-	5-7 jours	ND*
Coloration de Zhiel-Nielsen	+/-	+/-	3-24h	5-8
Culture	++/+++	++++	> 1 mois	30
PCR	+++	+++	24h	36

* non disponible

- **Les différentes situations épidémiologiques mises en évidence**

La surveillance événementielle et programmée a permis de révéler la présence de cas groupés d'infection dans la faune sauvage chez différentes espèces : le cerf élaphe (*Cervus elaphus*), le sanglier (*Sus scrofa*), le blaireau (*Meles meles*), le chevreuil (*Capreolus capreolus*) et le renard roux (*Vulpes vulpes*). Ainsi, des cas sauvages ont été identifiés en Normandie dans la forêt de Brotonne-Mauny, en Côte d'Or, Dordogne et Charente, dans les Landes et les Pyrénées Atlantiques, dans l'Ariège et en Corse (Figure 3 et Tableau 3). Ces localisations coïncident avec la présence concomitante ou récente de foyers bovins mais il existe cependant un biais car la surveillance de la faune sauvage a été accrue préférentiellement dans des régions où sont survenus (ou surviennent) des foyers bovins (Hars et al. 2010; ANSES 2011; Hars et al. 2012).

A cette superposition spatiale, s'ajoute un partage des mêmes souches de *M. bovis* déterminées à partir des spoligotypes et des profils VNTR. Ce constat démontre le lien épidémiologique existant entre les foyers bovins et les cas sauvages sans pour autant que le sens de la transmission puisse être déterminé (Zanella, Durand, et al. 2008; Hars et al. 2010; Payne et al. 2013).

En dehors de ce constat, les situations épidémiologiques impliquant des populations sauvages en France ne se ressemblent pas (Hars et al. 2010). Elles diffèrent par les espèces infectées, leurs niveaux d'infection et celui des troupeaux bovins alentours ainsi que par le contexte paysager (Tableau 3).

A ce jour, le rôle épidémiologique joué par ces différentes populations est mal connu, à l'exception des sangliers et des cerfs de la forêt de Brotonne-Mauny. Dans cette forêt en effet, la surveillance programmée depuis 2001 ainsi que les mesures mises en place et leurs effets ont permis de poser des hypothèses sur le statut des hôtes dans le contexte épidémiologique particulier de cette forêt. Ces hypothèses se sont d'abord fondées sur le niveau d'infection et le tableau lésionnel. Le cerf présentait en 2001 une prévalence de 14% qui a atteint 23% en 2005 et en 2007 (Figure 4) et des lésions ouvertes, souvent disséminées en faveur d'une excrétion importante de *M. bovis* et donc d'un rôle majeur de cette espèce dans la transmission de l'infection. Le sanglier a présenté des lésions moins fréquentes et généralement plus localisées et stabilisées en dépit d'un taux d'infection élevé (Figure 4) (Zanella, Duvauchelle, et al. 2008; Hars et al. 2010). Sur la base de ces observations et de travaux de modélisation (Zanella et al. 2012), plusieurs mesures ont alors été mises en œuvre : ramassage des viscères, arrêt de l'agrainage à poste fixe, abattage total de la population de cerfs (à partir de 2005-06), supposée jouer un rôle majeur dans l'entretien de la TB, compte-tenu de son tableau lésionnel, et réduction des densités de sanglier. Les résultats de ces mesures ont été dans les deux populations, une baisse progressive et, pour le sanglier, régulière, de la prévalence jusqu'à un niveau très faible (moins de 1%) (Figure 4).

Le dernier foyer bovin à proximité de la forêt remonte à 2006 et sur les dix années de surveillance, seuls un blaireau, un chevreuil et un renard ont été trouvés positifs à *M. bovis* (Hars et al. 2010; ANSES 2011).

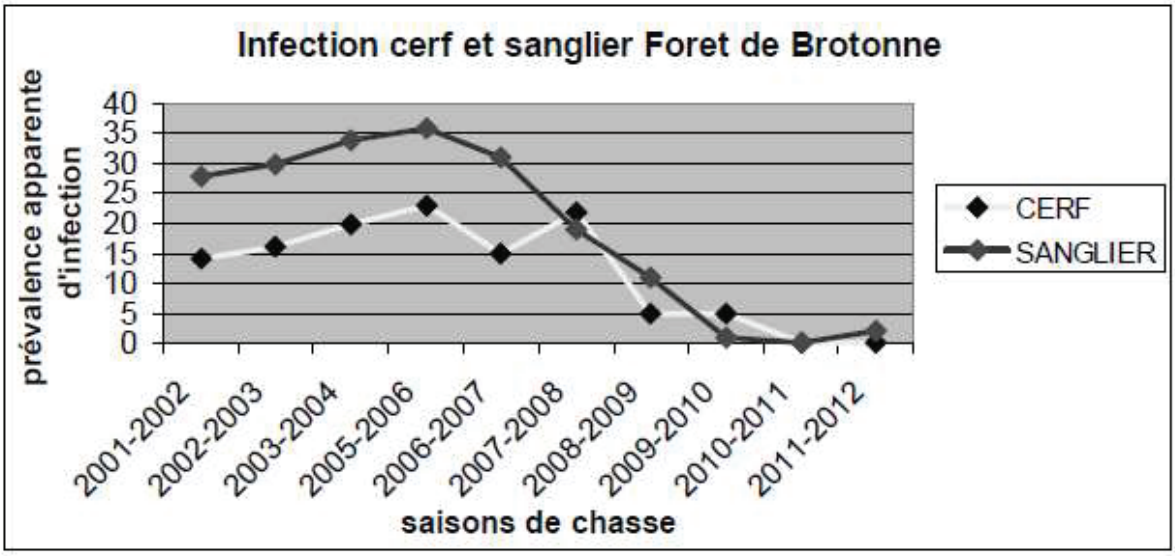


Figure 4 : évolution de la prévalence apparente d'infection chez le cerf et le sanglier en forêt de Brotonne-Mauny entre 2001 et 2012 (source : Hars et al. 2013)

Ainsi, l'ensemble de ces éléments ont conduit à considérer le cerf comme un réservoir de l'infection à *M. bovis* et le sanglier comme un hôte de liaison car incapable de maintenir l'infection lorsque sa source de contamination, constituée par la population de cerfs, a été tarie.

La forêt de Brotonne-Mauny est le seul site où, à ce jour, un véritable réservoir sauvage de *M. bovis* a été révélé en France. Sa constitution a sans doute été favorisée par le contexte géographique très particulier car la forêt est circonscrite par des barrières telles que la Seine et l'autoroute, limitant les échanges de populations et formant une entité individualisée. En revanche, cette configuration a probablement diminué le risque de transmission-retour aux bovins (Hars et al. 2010).

La spécificité de chaque situation illustrée par le Tableau 3 ne permet cependant pas d'extrapoler les conclusions tirées en forêt de Brotonne à d'autres situations en France, en termes de composition de la communauté d'hôtes et de sa capacité à entretenir l'infection d'une part, et en terme de risque de transmission-retour aux bovins d'autre part.

Ainsi, en Dordogne, en Côte d'Or et dans les Pyrénées Atlantiques, où des cas groupés de TB dans la faune sauvage ont été détectés, les espèces atteintes, le niveau de prévalence chez les bovins et le type de paysage contrastent avec la situation de la forêt de Brotonne (Tableau 3). Dans ces régions, l'aptitude des populations sauvages à être réservoir et leur rôle éventuel dans la transmission-retour aux bovins ne sont pas connus (Hars et al. 2010; ANSES 2011).

Tableau 3 : description des situations épidémiologiques où des cas infectées par *M. bovis* ont été détectées dans des populations sauvages libres en France : espèces impliquées, taux d'infection, caractéristiques des lésions, type de paysage et situation chez les bovins. (D'après Zanella, Duvauchelle, et al. 2008; Richomme et al. 2010; Reveillaud 2011; Hars et al. 2012; Hars et al. 2013 et données DGAL)

Localisation (n° département)	***Espèces impliquées***	***Années de surveillance***	***prévalence d'infection (%) (Nb culture M. bovis+ / Nb analysés)***	***Lésions (Fréquence[a] / Type /localisation préférentielle)***	***Paysage Type d'élevage dominant***	***Foyers bovins à proximité***
Forêt de Brotonne-Mauny (76-27)	Cerf Sanglier Blaireau Renard Chevreuil	2001-2011 2001-2011 2001-2011 2001-2011 2001-2011	15,6% (72/462) 17,6% (222/1263) 1,0% (1/103) 0,6% (1/ 160) 0,2% (1/425)	+++/ ouvertes caséeuses v/NL mésentériques +++/ fermées caséocalcaires / NL céphaliques	Massif forestier individualisé et circonscrit de 82 km^2	Dernier foyer en 2006
Côte d'Or (21)	Cerf Sanglier Blaireau Renard chevreuil	2002-2011 2003-2011 2009-2011 2009-2011 2004-2006	1[b] ; (0 ???/487) 6,3% (47/744) 5,6% (49/878) 3,2% (2/62) 0% (0/63)	/ouvertes/ généralisée +++/Fermées caséocalcaires / NL céphaliques +/Fermées nodulaires/ NL céphalique et thoracique Pas de lésion	Bocage Zone coalescente de 2000 km^2 Elevage allaitant	97 foyers incidents entre 2005 et 2010
Dordogne (24) et Charente (16)	Cerf Sanglier Blaireau Renard Chevreuil	2005-07 ; 2010-11 2005-07 ; 2010-11 2005-07 ; 2010-11 2005-07 ; 2010-11 2005-07 ; 2010-11	1[b] ; (0/ 269) 1,0% (4/390) 13,3% (29/218) [c] 0% (0/35) 1[b] ; (0/198)	/ouvertes/ généralisée +++/ Fermées caséocalcaires / céphaliques ++ /fermées nodulaires sf 1 forme généralisée/ céphalique et thoracique[d] ++++/ ouverte / poumon	Bocage 3 zones distinctes totalisant environ 1600 km^2 Elevage allaitant	120 foyers incidents entre 2005 et 2010
Pyrénées Atlantiques (64) et Landes (40)	Sanglier	2005-07 ; 2009-10	2[b] ; 2,8% (6/213)	?	Bocage 5 cantons + 21 communes Elevage allaitant	46 foyers incidents entre 2005 et 2010
Corse (2A et 2B)	Sanglier	2002-03 ; 2006-08	5[b] ; 4.0% (4/99)	ND / ND / NL céphaliques, thoraciques et mésentériques	Montagne, maquis, forêt. Elevage extensif	12 foyers incidents entre 2005 et 2010
Ariège (09)	Cerf Sanglier	2010-11 2010-11	0% (0/91) 0.7% (1/140)		Elevage allaitant	12 foyers incidents entre 2005 et 2010

[a] Nombre d'individus avec lésion/ nombre d'animaux infectés : + :0-20% ; ++ :20-50% ; +++ :>50%
[b] détection par surveillance événementielle
[c] Les résultats positifs correspondant à des PCR positives
[d] Un blaireau a présenté une forme généralisée et un autre une tuberculose miliaire au niveau du poumon

3.4. Diversité des communautés-hôtes sauvages de M. bovis dans le monde

Nous proposons dans ce paragraphe de décrire différentes situations dans lesquelles l'infection circulant initialement chez les bovins a été transmise dans des populations sauvages constituant parfois un réservoir sauvage pouvant retransmettre *M. bovis* aux bovins. Cette revue ne se veut pas exhaustive mais vise à apporter des éléments de compréhension des mécanismes épidémiologiques et notamment des facteurs de risque de constitution de réservoir sauvage qui feront l'objet de la partie suivante

3.4.1. **Exemples hors de l'Europe**

- **Aux Etats-Unis,**

des cas sporadiques de tuberculose bovine ont été rapportés sur des cerfs de Virginie (*Odocoileus virginianus)* dans différents Etats du nord est des Etats-Unis, mais c'est en 1995 qu'un réservoir de l'infection a été mis en évidence dans l'état du Michigan chez cette espèce. Les cerfs de Virginie se sont contaminés originellement auprès des bovins. Des travaux de modélisation datent cette contamination autour de 1955, alors que le Michigan comptait 30% des bovins infectés des Etats-Unis et que les densités de cerfs de Virginie était très élevée (31 cerfs/ km^2), probablement au-dessus de la taille critique pour la constitution de réservoir. La transmission-retour aux bovins a été fortement suspectée suite à la découverte de foyers bovins uniquement dans la zone où la présence de cerfs de Virginie infectés était avérée (Miller & Sweeney 2013; Palmer 2013).

L'infection est restée circonscrite sur une zone de 1500 km^2 avec une prévalence 10 fois supérieure au cœur de cette zone qu'en périphérie. Le développement de la maladie a été favorisé par l'affouragement hivernal des cervidés entraînant d'importantes concentrations d'animaux, la densité ayant atteint 19 à 23 animaux au km^2, favorisant la transmission intraspécifique (Schmitt et al. 1997; O'brien 2002). Le partage de l'habitat et du fourrage entre les bovins, élevés de façon extensive dans cette région, et les cerfs a été un mode de transmission interspécifique objectivé par des études expérimentales (Palmer, Waters & Whipple 2004; Palmer, Waters, Ave, et al. 2004; Brook et al. 2013; Berentsen et al. 2013).

La prévalence d'infection qui a atteint 4,9% des cerfs était, en 2010, descendue à 1,7% suite à un arrêt de l'affouragement et une réduction de la moitié des effectifs (Miller & Sweeney 2013).

Les cerfs ont également été une source d'infection pour des carnivores sauvages comme le coyote (*Canis latrans*), le raton laveur (*Procyon lotor*) ou l'ours brun

(*Ursus arctos*), qui se sont contaminés par voie orale à l'occasion de consommation de carcasses infectées (Bruning-Fann et al. 2001). Les prévalences élevées atteintes notamment chez le coyote (jusqu'à plus de 50%) sont révélatrices de la circulation de *M. bovis*, les coyotes ont d'ailleurs été utilisés comme sentinelles de l'infection (Berentsen et al. 2011). Néanmoins, ces populations de carnivores sont considérées comme des culs de sac épidémiologiques car elles n'excrètent pas le bacille et ont donc un rôle mineur dans sa transmission.

Des wapitis (*Cervus canadensis*) infectés ont également été périodiquement détectés mais à une prévalence apparente très basse de 0,3% (O'brien et al. 2006).

La tuberculose bovine a également été dépistée chez des sangliers sur une île de l'archipel d'Hawaï dans un foyer multi hôtes impliquant également des bovins et des cervidés. La prévalence a atteint 20% chez le sanglier puis a été réduite à 3,2% pour atteindre 1% grâce à la mise en place d'abattage des bovins infectés et des populations de sangliers. Aujourd'hui le risque de transmission entre bovins et sangliers est quasi-nul, l'élevage des bovins se faisant uniquement dans une île où les sangliers sont absents (Miller et Sweeney, 2013).

- **Au Canada,**

dans le parc national Wood Buffalo (Alberta), *M. bovis* a probablement été introduit par un troupeau infecté de bisons des plaines (*Bison bison bison*) en 1925 (Joly & Messier 2004; Miller & Sweeney 2013). La tuberculose est aujourd'hui enzootique chez le bison des bois (*Bison bison athabascae*) avec des prévalences ayant atteint des niveaux très élevés (entre 21% et 49% selon les années et les méthodes diagnostiques), et ce, malgré une baisse importante du nombre d'individus (12000 à 5000). La circulation de *M. bovis* est pour l'instant cantonnée à la population de bisons mais ce réservoir constitue une menace pour les bovins et d'autres espèces sauvages de la région (Nishi et al. 2006; Wobeser 2009).

Dans la région du parc national de Mont-Riding (Manitoba), un foyer de tuberculose bovine a impliqué des wapitis, des cerfs de Virginie et onze troupeaux de bétail. Toutes ces espèces hébergeaient un spoligotype unique de *M. bovis*, différent de ceux trouvés dans le reste du Canada, attestant d'une circulation du pathogène dans un système multi-hôtes incluant les 3 espèces. L'hypothèse de transmission interspécifique par le partage d'aliments (fourrage) est la plus probable. Un louveteau (*Canis lupus*) a également été trouvé positif à *M. bovis*. Si le wapiti a été considéré comme un réservoir, le rôle du cerf de Virginie fut moins clair bien qu'il n'ait pas semblé jouer un rôle majeur dans le maintien de l'infection comme dans le Michigan. Les densités plus faibles observées au Canada peuvent expliquer cette différence de statut (Wobeser 2009). Les mesures de gestion et de lutte telles qu'une surveillance accrue de la faune sauvage et des bovins, une extension de la période de chasse pour réduire les densités, l'installation de clôtures autour des sites de stockage du fourrage,

l'interdiction de l'agrainage et du brûlis (afin d'améliorer l'habitat de la faune dans le parc) ont été mises en place (Nishi et al. 2006; Wobeser 2009; Miller & Sweeney 2013).

- **En Nouvelle-Zélande,**

le phalanger renard (*Trichosurus vulpecula)*, espèce introduite à partir de l'Australie, s'est probablement contaminé auprès de bovins dans les années 1960-70 avant la période d'éradication de la maladie. Nugent (2011) émet cependant l'hypothèse d'une contamination originelle à partir de têtes de cerfs élaphes (eux-mêmes infectés à partir des bovins), laissées en grand nombre dans la nature par les chasseurs entre les années 1960 et 1994, date à laquelle cette pratique a été arrêtée. La tuberculose s'est ensuite développée chez le phalanger qui est devenu un réservoir principal, responsable de transmission-retour de l'infection chez les animaux domestiques (Morris et al. 1994; Nugent 2011).

La prévalence moyenne de *M. bovis* chez cette espèce est de 5% mais elle est très variable en fonction des zones, pouvant atteindre 32% localement, l'agrégation spatiale de l'infection étant marquée dans ces populations (Morris et al. 1994; Ryan et al. 2006). D'autre part, les densités atteignent fréquemment plus de 300 individus par km^2 (Nugent 2011). Les phalangers vivent dans des nids et sont solitaires mais ont des contacts rapprochés avec leurs congénères lors de la reproduction, d'agression ou entre la mère et ses jeunes (Porphyre et al. 2008a). Les nids constituent, en outre, un substrat favorable à la survie de la bactérie (Jackson et al. 1995). La transmission intraspécifique a donc lieu lors de ces interactions, par transmission pseudo-verticale ou par utilisation consécutive des nids. Des travaux de modélisation ont souligné l'importance de ces réseaux de contacts sur la transmission de la TB et de la densité sur la potentialité de cette espèce à être réservoir (R_0>1) (Barlow 2000; Porphyre et al. 2008a).

Les phalangers sont très sensibles à la tuberculose bovine, l'évolution étant le plus souvent mortelle dans cette espèce. Leur comportement en phase terminale de la maladie est modifiée : ils se dispersent en dehors de leurs domaines vitaux, ne sont plus capables de grimper aux arbres, vagabondent en pleine journée et n'ont plus peur des autres animaux. Ce comportement anormal favorise les contacts et donc la transmission de la maladie avec les autres espèces sensibles, notamment les bovins, qui peuvent avoir des contacts rapprochés avec ces phalangers très excréteurs puisqu'à un stade avancé de l'infection (Morris et al. 1994; Ryan et al. 2006).

Les furets (*Mustela furo*), également introduits, semblent être selon le contexte démographique des hôtes réservoirs ou des hôtes de liaison. Les contacts avec les phalangers sont en effet nécessaires à l'entretien de l'infection chez ces animaux mais dans certaines conditions de forte densité, l'infection peut être entretenue, indépendamment des autres espèces et ils contribuent à l'assemblage de la communauté d'hôtes réservoir (Caley & Hone 2005). Ils sont d'autre part considérés comme des hôtes vecteurs spatiaux transmettant l'infection entre les populations-hôtes vivant en forêt et les zones d'élevage, représentant ainsi

une source d'infection pour les bovins (Nugent 2011). Les campagnes d'abattage des furets ont en effet conduit à une baisse de l'incidence chez les bovins vivant à proximité, prouvant le rôle de cette espèce dans la transmission de la tuberculose aux espèces domestiques (Ryan et al. 2006).

Le cerf élaphe n'est pas considéré en Nouvelle-Zélande, comme un réservoir. Il peut cependant être hôte vecteur spatial et temporel de l'infection du fait de sa longévité et de son comportement spatial et être à l'origine de nouveaux foyers (Ryan et al. 2006; Nugent 2011).

Chez le sanglier, la prévalence de TB peut atteindre 100% dans des zones où la maladie est présente mais elle décline rapidement après que l'abondance des phalangers, à partir desquels ils se contaminent, principalement par nécrophagie, ait été réduite (Nugent et al. 2002; Nugent 2011). Le sanglier, dont les lésions, de type caséocalcaires sont circonscrites aux amygdales et aux nœuds lymphatiques céphaliques, se montre en effet incapable de maintenir l'infection en l'absence d'une transmission récurrente des phalangers (Nugent et al. 2002). Son rôle dans ce pays serait ainsi limité à un hôte de liaison, vecteur spatial en raison de son domaine vital étendu, qui le conduit à propager l'infection entre des populations éloignées de phalangers. Il peut également contribuer au maintien de l'infection lorsque les densités de phalangers sont plus faibles que le seuil critique permettant à cette espèce d'être seule réservoir, illustrant ainsi la complexité de la configuration seuil de différentes populations permettant la constitution d'une communauté d'hôtes réservoir (Nugent 2011).

Les méthodes de lutte contre la tuberculose bovine dans la faune sauvage en Nouvelle-Zélande sont fondées sur le maintien des densités de phalangers à un niveau suffisamment bas pendant une durée minimale de 5 ans. La vaccination orale (BCG) pour les phalangers a également été développée en complément au contrôle des populations (Ryan et al. 2006) mais l'abattage des populations demeurent la principale action de lutte (Nugent *com. pers*.)

- **En Australie,**

la tuberculose était présente dans les années 1960 chez les bovins et chez le buffle d'eau (*Bubalus bubalis*) qui constituait un réservoir sauvage dans le nord du pays avec des prévalences de lésions pulmonaires de 25%. Parallèlement, des prévalences d'environ 20% étaient observées chez les sangliers, avec des lésions non généralisées cantonnées aux ganglions céphaliques, laissant supposer une excrétion du bacille très faible à nulle (Corner et al. 1981). L'éradication de la tuberculose bovine chez les buffles, par élimination totale des troupeaux, a été entreprise en 1985 (population réduite de 20 buffles/km^2 à 0,1 buffle/km^2). Elle a eu pour effet d'entraîner la quasi-disparition de la maladie chez les sangliers, chez lesquels la prévalence est passée de 19 % dans les années 1970 à 0,25 % en 1992, mettant en évidence que le sanglier était dans ce contexte un hôte de liaison, voire un cul-de-sac épidémiologique (McInerney et al. 1995). La densité de sangliers avait alors été estimée à 11

animaux /km². Il est intéressant de noter que si la population de buffles d'eau a constitué un réservoir de la tuberculose bovine, elle n'a pas été impliquée dans la transmission et le maintien de l'infection chez les bovins, chez lesquels elle était par ailleurs enzootique, du fait de l'absence d'interaction entre les deux espèces (Corner 2006). Le phalanger est également présent en Australie, cependant, les populations naturelles ne se sont pas infectées, probablement en raison d'une densité beaucoup plus faible qu'en Nouvelle–Zélande (Radunz 2006).

- **En Afrique du Sud,**

la tuberculose bovine a été introduite par des bovins importés d'Europe aux 18ème et 19ème siècles. Les contacts entre bétail et faune sauvage ont conduit à la contamination de plusieurs espèces sauvages : la maladie a d'abord été mise en évidence chez le buffle (*Syncerus caffer*) de plusieurs parcs nationaux (parc du Kruger, parc de Hluluwe et réserve d'Umfolozi). Le buffle est un réservoir de l'infection arborant des prévalences lésionnelles de 10 à 30%, pouvant atteindre plus de 50% dans certaines zones. Il peut en outre propager la tuberculose sur de vastes territoires en l'absence de bovins. Le comportement social et la taille des troupeaux (250 individus en moyenne, pouvant aller jusqu'à 1000) favorisent la transmission intra-troupeau de l'infection. Les buffles tuberculeux, affaiblis, sont préférentiellement capturés, notamment par les lions (*Panthera leo*) qui sont alors très exposés à l'infection lorsque la prévalence chez les buffles est élevée, posant des problèmes de conservation de l'espèce. Il est difficile de trancher sur le rôle de réservoir ou hôte de liaison du lion même s'il semble bien que les interactions individuelles au sein des groupes sociaux peuvent être à l'origine d'une transmission intra-spécifique horizontale et verticale et donc d'un entretien de l'infection en dehors de contact avec d'autres espèces. Les autres prédateurs, comme le léopard (*Panthera pardus*), le guépard (*Acinonyx jubatus*), la hyène (*Crocuta crocuta*) sont moins exposés que le lion car le buffle ne constitue pas leur proie principale. Ils s'infectent plutôt en consommant des carcasses, tout comme les omnivores opportunistes que sont les phacochères (*Phacochoerus africanus*), potamochères (*Potamochoerus larvatus*), les babouins (*Papio hamadryas*) et les ratels (*Mellivora capensis*) qui ne semblent pas jouer un rôle dans la persistance de la maladie. (Michel et al. 2006; De Garine-Wichatitsky et al. 2013).

Le grand koudou (*Tragelaphus strepsiceros*), en revanche, apparaît comme réservoir potentiel de l'infection. Une souche de *M. bovis* différente de celle circulant chez le buffle a été isolée chez cette espèce. Certains auteurs pensent que dans certaines zones, l'infection des grands koudous a été antérieure à celle des buffles et qu'elle a pu constituer une source de contamination pour ceux-ci. En outre, les grands koudous semblent plus sensibles à l'infection par *M. bovis* que les autres espèces sympatriques, présentant des signes cliniques (lymphadénites des nœuds lymphatiques du cou et de la tête avec fistulisation) (Michel et al. 2006).

D'autres pays d'Afrique subsaharienne, comme la Tanzanie, l'Ouganda ou la Zambie présentent des communautés d'hôtes impliquant des buffles, des herbivores et des carnivores opportunistes. Le buffle ressort le plus souvent comme l'espèce la plus apte à maintenir *M. bovis* mais d'autres espèces comme le cob de Leche (*Kobus leche Kafuensis*) en Zambie sont suspectées d'avoir un rôle important dans la communautés d'hôtes et notamment dans la retransmission aux bovins (Kalema-Zikusoka et al. 2005; Munyeme et al. 2010; Clifford et al. 2013; De Garine-Wichatitsky et al. 2013).

3.4.2. En Europe

- **En Espagne,**

pays non officiellement indemne de tuberculose, l'infection est surtout présente dans les régions du centre et du sud du pays, avec des prévalences s'élevant chez les bovins à 5-6%. (Munoz-Mendoza et al. 2013). Dans les populations de sangliers et de cerfs élaphes, la prévalence dans les régions du sud atteint en moyenne 42% chez les sangliers et 14% chez les cerfs mais elle atteint sur certains sites jusqu'à 100% et 50% chez les deux espèces respectivement (Vicente et al. 2006; Gortázar et al. 2008). Des lésions de tuberculose généralisée sont observées dans environ 60% des cas chez le sanglier et dans 57 à 70% des cas chez le cerf (Vicente et al. 2006; Martín-Hernando et al. 2007; Martín-Hernando et al. 2010). Ces situations épidémiologiques sont rencontrées dans des contextes de gestion cynégétique particuliers dans lesquels les animaux vivent dans des grands enclos de chasse, en l'absence de bovins et où les densités peuvent atteindre 90 sangliers/ km^2 et 69 cerfs/ km^2 mais également dans le parc national de la Doñana où les bovins sont présents mais les sangliers et cerfs ne sont pas parqués (Gortázar et al. 2008; Gortazar, Vicente, et al. 2011). L'existence de facteurs locaux d'agrégation que constituent les points de nourrissage et les points d'eau artificiels ou naturels dans un climat aride, sont un facteur majeur de risque de transmission (Vicente et al. 2007; Gortazar, Vicente, et al. 2011). Dans ces conditions, cerfs et sangliers sont capables, de façon indépendante, de maintenir la tuberculose à de fortes prévalences sans contact récent (plusieurs dizaines d'années) avec des bovins. Ces populations sont donc considérées comme des réservoirs de l'infection (Gortazar et al. 2005; Vicente et al. 2006; Naranjo et al. 2008; Gortazar, Vicente, et al. 2011)

La proximité et le nombre de parcs de chasse ainsi que la prévalence chez le sanglier et le cerf sont associés à l'infection chez les bovins, orientant vers une transmission-retour probable entre populations sauvages et bovins (Rodríguez-Prieto et al. 2012; Martínez-López et al. 2013).

Dans cette même région du sud de l'Espagne, le daim européen (*Dama dama*) fait également parti de la communauté d'hôtes sauvages, particulièrement dans le parc de la Doñana. La prévalence est plus faible que celle du cerf et du sanglier, probablement en raison d'une moindre exposition. En revanche, les individus infectés présentent un tableau lésionnel

sévère. Dans l'état actuel des connaissances, le daim ne semble pas jouer un rôle majeur dans le maintien de l'infection (Gortázar et al. 2008; Martín-Hernando et al. 2010; Gortazar, Vicente, et al. 2011).

Enfin, une enquête sérologique a mis en évidence dans cette même région une circulation de la tuberculose chez le blaireau européen (*Meles meles*, appelé blaireau dans la suite du texte), le renard roux (*Vulpes vulpes*) et le lynx pardelle (*Lynx pardinus*), qui sont considérés comme des hôtes de liaison ou des culs de sac épidémiologiques (Martín-Atance et al. 2006; Gortazar, Vicente, et al. 2011).

Des essais de vaccination orale du sanglier sont en cours et sont conduits en parallèle à la mise au point d'appâts vaccinaux adaptés à cette espèce (Garrido et al. 2011).

Le nord-ouest de l'Espagne présente une situation très différente. Dans les Asturies et en Galice, les populations de sangliers sont beaucoup moins touchées par la tuberculose que dans le sud (2,6% de prévalence chez le sanglier dont 17% présentant des lésions), probablement en lien avec des densités beaucoup plus faibles, des pratiques cynégétiques moins à risque, un climat plus humide et une prévalence bovine plus faible (Munoz-Mendoza et al. 2013). En revanche, le blaireau, plus abondant dans cette région que dans le sud (Sobrino et al. 2008a), est infecté à hauteur de 6 et 7% avec de rares lésions macroscopiques (Balseiro et al. 2011). Une association spatiale a été trouvée entre les terriers et les fermes infectées mais le rôle de l'espèce dans l'épidémiologie de la maladie n'est pas encore connu (Balseiro et al. 2013).

- **Dans les îles britanniques,**

la prévalence de tuberculose bovine dans le cheptel bovin est la plus élevée d'Europe : elle a atteint, en 2011, une prévalence troupeau 11,5% (DEFRA 2013) au Royaume-Uni et 4,2 % en Irlande (Gormley & Corner 2013). Localement dans le sud-ouest de l'Angleterre, cette prévalence s'élevait à 24% la même année (DEFRA 2013). Dans ces pays, les premiers blaireaux trouvés infectés par *M. bovis* remontent aux années 1970 mais la présence antérieure de l'infection chez cette espèce est suspectée (Gormley & Corner 2013; Atkins & Robinson 2013).

La tuberculose est enzootique dans les populations de blaireaux du sud-ouest de l'Angleterre où les densités sont très élevées (entre 10 à 30 blaireaux adultes / km^2) (Hutchings et al. 2002; Roper 2010) et en Irlande, où les densités sont plus faibles (2-3 blaireaux adultes / km^2) (Byrne et al. 2012a)**.** Dans chacune de ces régions, la prévalence atteint respectivement 16% et 36% mais elles peuvent varier localement (Bourne 2007; Murphy et al. 2010)**.**

Le blaireau a depuis été identifié comme un réservoir de l'infection, responsable de transmission-retour aux bovins sur la base du partage des souches de *M. bovis* entre bovins et blaireaux au sein d'une même unité géographique (Woodroffe et al. 2005;

Olea-Popelka et al. 2005) et sur la baisse de l'incidence bovine constatée après avoir fait drastiquement baisser la population de blaireaux (Bourne 2007). De plus, en Irlande, la prévalence se maintient à 15% dans des populations de blaireaux se trouvant dans des zones où la prévalence bovine est très faible (Gormley & Corner 2013).

De nombreuses études ont montré que les blaireaux vivant autour des fermes, avaient de nombreux contacts, principalement indirects, avec les bovins en pâture et dans les bâtiments d'élevage (Garnett et al. 2002; Tolhurst et al. 2009; Böhm et al. 2009; Drewe et al. 2013). Le blaireau pouvant excréter *M. bovis* par le mucus trachéal, l'urine et les fèces (Corner et al. 2010), ces interactions représentent des occasions de transmission indirecte de la bactérie (Hutchings & Harris 1997; Hutchings & Harris 1999; Drewe et al. 2013).

Les études de transmission intraspécifique de *M. bovis* chez les blaireaux ont mis en évidence que la dynamique de l'infection ne répondait pas à un modèle simple de densité-dépendance. Le comportement social et territorial de l'espèce qui vit en groupes familiaux de plusieurs individus sur un territoire centré autour d'un terrier principal engendre une asymétrie des contacts intraspécifiques d'où il résulte une hétérogénéité de la dynamique d'infection. Celle-ci se propage ainsi plus rapidement à l'intérieur des groupes qu'entre groupes (Delahay et al. 2000a; Böhm et al. 2008; Woodroffe et al. 2009).

Des campagnes d'abattage visant à faire baisser les densités des populations de blaireaux ont été conduites au Royaume-Uni et en Irlande depuis les années 1980 (Bourne 2007; ANSES 2011). Les résultats furent mitigés du fait du phénomène de dispersion observée chez les individus survivants ce qui a contribué à propager l'infection en périphérie des zones d'abattage où l'incidence chez les bovins a augmenté (Donnelly et al. 2006; Bourne 2007; Jenkins et al. 2010; Riordan et al. 2011). En Irlande, les résultats des mesures d'abattage ont été globalement positifs, peut-être du fait d'une densité plus faible de blaireaux et d'une meilleure prise en compte des barrières géographiques (Griffin et al. 2005; Bourne 2007; Olea-Popelka et al. 2009).

Aujourd'hui un vaccin injectable BCG est déployé dans des zones pilotes , des opérations d'abattage ont été poursuivies et l'accent est mis sur les mesures de biosécurité des élevages (Ward et al. 2010; Aznar et al. 2011; Judge et al. 2011; Robinson et al. 2012).

En dehors du blaireau, d'autres espèces ont été trouvées infectées au Royaume-Uni parmi lesquelles des petits carnivores (hermine *Mustela erminea* et renard roux), des rongeurs et des cervidés. La prévalence s'élève à 1% chez le cerf élaphe et le chevreuil, à 3% chez le renard tandis que chez le daim et le muntjac (*Muntiacus reevesi*), elle atteint 4 à 5%. Une analyse de risque de transmission de la TB par les cervidés aux bovins prenant en compte la densité (plus de 10 individus / km^2 pour chacune des espèces), leur capacité d'excrétion et leur contact potentiel avec les bovins sur les pâtures a résulté en un risque inférieur à celui posé par les blaireaux, concluant que leur rôle dans la transmission-retour aux bovins étaient

probablement mineur par rapport à celui du blaireau. Ces espèces sont donc considérées actuellement comme des hôtes de liaison (Delahay et al. 2007; Ward et al. 2009).

3.5. Synthèse et conclusion

La description de ces situations illustre tout d'abord la diversité des communautés d'hôtes de populations sauvages capable d'héberger, de transmettre et de maintenir *M. bovis*. Diversité des espèces qui composent la communauté d'hôtes mais également diversité des rôles que ces populations peuvent jouer dans la transmission et le maintien de l'infection. On constate ainsi qu'une même espèce (ou deux espèces proches) peut, dans un contexte, avoir un rôle de réservoir alors qu'elle ne sera que qu'hôte de liaison voire cul de sac épidémiologique dans une autre situation (Tableau 4). On peut citer ainsi l'exemple du cerf (cerf de Virginie ou cerf élaphe), considéré comme réservoir dans le Michigan, en Espagne ou en forêt de Brotonne en France, qui ne tient en Angleterre ou en Nouvelle-Zélande qu'un rôle mineur dans le maintien de l'infection. De même pour le sanglier, réservoir de la tuberculose bovine dans le sud de l'Espagne, n'est qu'un hôte de liaison, vecteur de l'infection dans d'autres communautés-hôtes.

Nous remarquons que le statut épidémiologique des populations a, la plupart du temps, été établi de façon empirique, suite à l'évolution de la situation en réponse à des actions de lutte ou au constat d'une circulation autonome de l'infection en l'absence de bovins. Dans ces conditions, il peut être admis que les conditions théoriques de constitution d'un réservoir aient été remplis (R_0 >1 et taille critique de la population dépassée) (Lloyd-Smith, Cross, et al. 2005; Palmer 2013). La modélisation a toutefois permis parfois de mieux comprendre et explorer ces aspects (Smith 2001).

La diversité des hôtes observés illustre la capacité d'adaptation à un très large spectre d'hôtes dont fait preuve *M. bovis*. Les bovins étant l'hôte originel de *M. bovis*, il est cohérent que les espèces sauvages appartenant à la famille des bovidés ou proches sur le plan phylogénique comme les buffles, les bisons ou les cervidés, soient des espèces aptes à jouer le rôle de réservoir (De Garine-Wichatitsky et al. 2013). On constate cependant que des espèces très éloignées des bovidés comme le blaireau ou le phalanger peuvent également maintenir l'infection de façon autonome. Enfin, les carnivores stricts étant au bout de la chaine trophique, s'infectent à la faveur de leur régime alimentaire mais restent le plus souvent des culs de sac épidémiologiques (ANSES 2011).

Ensuite, il apparaît qu'outre la réceptivité et la sensibilité intrinsèque propre à l'espèce, un certain nombre de facteurs de risque, agissant souvent de façon combinée, peuvent contribuer à faciliter l'hébergement de *M. bovis* au sein d'une population ou d'une

communauté de populations sauvages puis permettre sa pérennisation. Ainsi, chaque combinaison de ces facteurs de risque entraine une situation épidémiologique différente, certaines pouvant conduire à l'émergence puis à la persistance de *M. bovis*, si les conditions sont réunies pour permettre l'entretien de l'infection au sein de la ou des populations-hôtes (Nugent 2011). Dès lors, le statut d'une population au sein d'un système multi-hôtes de *M. bovis* est un concept dynamique évoluant selon l'assemblage des facteurs de risque présents dans une situation donnée (Palmer et al. 2012; De Garine-Wichatitsky et al. 2013). Il est donc capital de connaître ces facteurs de risque et de comprendre comment ils influencent la constitution de réservoirs sauvages de tuberculose bovine.

Tableau 4 : description de différentes communautés d'hôtes sauvages de *M. bovis* à travers le monde : statut épidémiologique des populations et rôle dans la transmission-retour aux bovins

Pays (région)	***Communauté-hôtes***	***Statut épidémiologique***	***Transmission-retour aux bovins***
Nouvelle-Zélande	phalanger-renard	**Hôte Réservoir**	Oui
	Furet	**Hôte de liaison**, vecteur spatial **Hôte réservoir** en cas de forte densité	Oui
	Cerf	**Hôte de liaison,** vecteur spatial et temporel	Non
	Sanglier	**Hôte de liaison,** vecteur spatial, amplificateur	Non
Australie	Buffle d'eau	**Hôte Réservoir**	Non car pas d'interface avec les bovins
	Sanglier	**Hôte de liaison** ou **cul de sac épidémiologique**	Non
Canada (parc national de Mont-Riding)	Wapiti	**Hôte Réservoir**	Oui
	Cerf de Virginie	**Hôte de liaison**	Non
Canada (parc de Wood buffalo (Alberta)	Bison	**Hôte Réservoir**	Non car pas d'interface avec les bovins
USA (Michigan)	Cerf de Virginie	**Hôte Réservoir**	Oui
Afrique du Sud	Buffle	**Hôte Réservoir**	Oui
	Grand koudou	**Hôte Réservoir**	?
	Lion	**Hôte de liaison Hôte Réservoir ?**	Non
	Autres espèces carnivores nécrophages	**Hôte de liaison** ou **cul de sac épidémiologique**	Non
Espagne (Estremadure et Andalousie)	sanglier	**Hôte Réservoir**	Oui (supposée)
	cerf	**Hôte Réservoir**	Oui (supposée)
	daim	**Hôte de liaison ?**	?
	carnivores	**Cul de sac,**	Non
Espagne (Asturies et Galice)	blaireau	**Hôte de liaison ?**	?
	sanglier	**Hôte de liaison ?**	?
Angleterre et Irlande	blaireau	**Hôte Réservoir**	Oui
	cervidés	**Hôte de liaison**	Non
France (forêt de Brotonne)	cerf	**Hôte Réservoir**	Non car très faible interface entre avec les bovins
	sanglier	**Hôte de liaison**	Non
France (Côte d'Or)	cerf	**?**	?
	sanglier	**?**	?
	blaireau	**?**	?
France (Dordogne)	Cerf	**?**	?
	chevreuil	**?**	?
	sanglier	**?**	?
	blaireau	**?**	?

4. FACTEURS DE RISQUE DE PERSISTANCE DE LA TUBERCULOSE DANS LA FAUNE SAUVAGE ET DE TRANSMISSION-RETOUR AUX BOVINS

La transmission de *M. bovis* à l'interface entre la faune sauvage et la faune domestique est donc déterminée par des processus biologiques, écologiques et anthropologiques (De Garine-Wichatitsky et al. 2013).

Nous proposons une synthèse des facteurs de risque connus, issus de l'étude des systèmes multi-hôtes de *M. bovis* dans le monde, exposés dans le paragraphe précédent. Ces facteurs peuvent agir et interagir à la fois sur l'émergence du réservoir, sa pérennisation, sur le risque de transmission-retour aux cheptels domestiques et enfin sur l'extension spatiale de la maladie. Il est souvent difficile de mettre en évidence les phénomènes d'émergence de la TB dans la faune sauvage du fait d'un manque ou d'une faible surveillance, de la latence de la maladie et des performances imparfaites des tests diagnostiques (Miller & Sweeney 2013). De ce fait, la TB est déjà souvent installée dans les populations sauvages lorsqu'elle est détectée.

Sur le plan théorique, nous avons mentionné dans le paragraphe 1.3.3. qu'il existait une taille critique de la population permettant l'installation d'un pathogène et une taille critique permettant sa persistance (Lloyd-Smith, Cross, et al. 2005). Dans les faits, cette distinction est rarement établie et les facteurs de risque d'émergence de la TB sont le plus souvent confondus avec ceux de sa persistance.

En revanche, nous avons souligné dans la partie qui suit les facteurs promouvant l'entretien et la persistance autonome de l'infection au sein d'une population (facteur de risque de constitution d'un réservoir) ainsi que la transmission interspécifique, notamment vers les bovins. Les facteurs de risque d'extension spatiale et d'amplification de l'infection sont également indiqués.

4.1. Facteurs de risque liés à l'hôte

- **Comportement de l'espèce**

Comportement social

Chez les espèces vivant en groupes sociaux, les contacts directs entre individus appartenant aux mêmes groupes sont beaucoup plus fréquents et rapprochés qu'entre individus de groupes différents (Kjær et al. 2008; Cowled & Garner 2008; Conner et al. 2008; Böhm et al. 2009; Gortazar, Torres, et al. 2011). De plus, le type d'interactions entre membres du groupe (olfaction, toilette mutuelle, soins parentaux etc..) sont souvent propices à la transmission de la tuberculose (Cowled & Garner 2008; Conner et al. 2008). En conséquence, la transmissibilité de l'infection à l'intérieur des groupes est très supérieure à la transmissibilité entre groupes. Le grégarisme favorise donc la persistance de la tuberculose au sein des groupes sociaux.

On retrouve ce trait de comportement social chez de nombreuses espèces sauvages réceptives à la tuberculose comme le cerf, le buffle d'Afrique, le sanglier et le blaireau. Il en résulte une hétérogénéité dans la dynamique de l'infection. Il a en effet été démontré chez ces espèces, que les individus provenant d'un groupe infecté avaient plus de risque d'être tuberculeux qu'un individu issu d'un groupe indemne (Delahay et al. 2000a; Cross et al. 2004; Blanchong et al. 2007; Woodroffe et al. 2009; Gortazar, Torres, et al. 2011).

Comportement spatial

Outre la structure sociale, le comportement spatial des espèces sauvages influence la propagation de l'infection (Blanchong et al. 2007 ; Cowled &Garner 2008). Les groupes sociaux se caractérisent par un regroupement spatial qui se traduit soit par un territoire stable comme chez le blaireau, soit par des déplacements saisonniers comme chez les cervidés ou les buffles. La sédentarité de certaines espèces, conjuguée au grégarisme peut avoir pour effet de renforcer l'agrégation spatiale de l'infection, comme cela a été montré chez le blaireau (Delahay et al. 2000a) la taille des territoires influençant le degré d'agrégation.

Au contraire, les migrations saisonnières des cervidés ou des buffles favorisent la propagation spatiale de la maladie sur de grandes distances (Cross 2005; Conner et al. 2008). La dynamique des groupes lors de ces déplacements saisonniers peuvent réunir des troupeaux de façon ponctuelle et ainsi les connecter d'un point de vue épidémiologique (Conner et al. 2008). L'extension spatiale de l'infection et la connexion entre groupes différents peut aussi avoir lieu lors de la reproduction et lors de la dispersion des jeunes.

Comportement territorial et sexuel

Certains comportements sont susceptibles de propager l'infection entre groupes, d'autant plus que les interactions sont de nature à transmettre *M. bovis*. Chez le blaireau par exemple, le marquage territorial se traduit par des dépôts de fèces et d'urine dans des latrines situées aux limites du territoire. Chez les individus infectés, ces excrétas sont potentiellement infectés et peuvent donc être une source de contamination pour d'autres individus réceptifs (Hutchings & Harris 1999; Drewe et al. 2013).

Les comportements agressifs entre mâles pour la défense du territoire ou lors du rut représentent également des opportunités de transmission de *M. bovis* intraspécifiques et peuvent aboutir à une différence de niveau d'infection entre mâles et femelles (Joly & Messier 2004; Michel et al. 2006; Conner et al. 2008; Jenkins et al. 2012).

- **Régime et comportement alimentaire**

Les carnivores et les nécrophages sont particulièrement exposés à l'infection par voie orale ou respiratoire par la consommation de carcasses infectées (Gortazar, Vicente, et al. 2011). Chez les carnivores réceptifs à *M. bovis*, il est reconnu que cette source de contamination est prépondérante, comme pour le furet en Nouvelle-Zélande, le coyote, l'ours le raton-laveur et le loup aux Etats-Unis, le renard roux en Europe, la hyène, le phacochère ou le lion en Afrique (Bruning-Fann et al. 2001; Delahay et al. 2002; Michel et al. 2006; Nugent 2011; Hars et al. 2012).

Les individus d'espèces omnivores opportunistes comme le blaireau ou le sanglier peuvent également être très exposés lors de nécrophagie. En Nouvelle-Zélande par exemple, la consommation par les sangliers de carcasses infectées de phalangers est une source importante d'infection chez cette espèce (Nugent 2011). De plus, la consommation de carcasses infectées peut conduire à une amplification importante de l'infection si elle est consommée par plusieurs individus comme c'est souvent le cas (Nugent 2011). Le comportement alimentaire prédateur et nécrophage expose donc à une contamination à partir d'autres populations infectées. Il conduit à une transmission de la TB le plus souvent interspécifique et peut être l'occasion d'une amplification de l'infection.

Chez le sanglier et le blaireau, l'importance des vers de terre dans leur régime alimentaire (Baubet & Brandt 2003; Cleary et al. 2011) peut représenter un facteur de risque vis-à vis de la tuberculose bovine. En effet, recherchant les lombrics en fouillant la terre avec le museau ou le groin, ces espèces se trouvent particulièrement exposées à une contamination par voie respiratoire si des bactéries viables sont présentes dans le sol.

A l'inverse, s'ils sont infectés et excréteurs, ils peuvent aussi contaminer l'environnement et transmettre par voie indirecte l'infection à d'autres individus. Le fait que les pâtures soient un milieu particulièrement riche en vers de terre (Kruuk 1979 ; Baubet et al.

2009) les rendent attractives pour ces espèces et de ce fait, favorise le contact indirect avec les bovins.

Parce qu'ils ont le même régime alimentaire que les bovins, les herbivores et particulièrement les « brouteurs » comme les cerfs (par contraste avec les cueilleurs que sont par exemple les chevreuils) sont plus enclins à partager les ressources avec ceux-ci et donc à transmettre ou à se contaminer auprès des bovins (Palmer, Waters, Ave, et al. 2004; Berentsen et al. 2013).

- **Densité et dynamique de population des hôtes**

Dans une population homogène, la tuberculose bovine est une maladie densité-dépendante, des travaux empiriques ou théoriques ont en effet montré le lien ainsi que l'effet de la densité, sur la persistance de *M. bovis* dans des populations d'ongulés sauvages (Smith 2001; Ward & Smith 2012; Boadella et al. 2012; Vicente et al. 2013).

La densité d'une population influe sur le taux de contact intraspécifique et par voie de conséquence sur le taux de reproduction de base (R_0) (Caley & Hone 2004; Gortázar et al. 2006). C'est donc un des déterminants de la persistance de l'infection.

Nous avons exposé précédemment le concept de taille critique de la population (cf. § 1.3.3.), nécessaire à l'entretien d'un agent pathogène (Haydon et al. 2002; Lloyd-Smith, Cross, et al. 2005). Il est difficile de déterminer la valeur seuil en dessous de laquelle l'infection ne peut persister d'une part à cause de la structure spatiale et démographique hétérogène de la population et d'autre part à cause de la variabilité du taux de transmission liée à la chronicité de la tuberculose et à des états excréteurs transitoires (Lloyd-Smith, Cross, et al. 2005; Vicente et al. 2013).

Les différentes expériences en France ou à l'étranger présentées dans le paragraphe précédent fournissent cependant des éléments pouvant orienter sur cette taille critique mais il est délicat de les extrapoler totalement à d'autres contextes où d'autres facteurs de risque peuvent intervenir (Lloyd-Smith, Cross, et al. 2005; ANSES 2011). Toutefois, même s'il est difficile de les quantifier avec exactitude, les fortes densités et notamment lorsqu'elles sont supérieures à la capacité de charge du milieu, semblent représenter un risque important de constitution de réservoir comme en témoignent la situation du cerf de Virginie dans le Michigan, du sanglier et du cerf dans le sud de l'Espagne, du phalanger en Nouvelle-Zélande ou encore du blaireau au Royaume-Uni. Pour ces deux dernières espèces, cependant, des études ont mis en lumière que l'hétérogénéité des contacts pouvait compliquer la relation entre densité et prévalence et que celle-ci n'était pas forcément linéaire, faisant appel à des modèles fréquence-dépendants (Barlow 2000; Smith 2001; Böhm et al. 2008; Porphyre et al. 2008a; Woodroffe et al. 2009).

D'autre part, la dynamique d'une population, c'est-à-dire, la vitesse à laquelle elle se renouvelle peut également influencer la persistance de la TB au sein d'une population. Ainsi, une espèce comme le sanglier présente une forte prolificité et généralement une durée de vie courte en zones chassées, ce qui entraine un fort taux de renouvellement de la population (Servanty et al. 2009). Or, ce turn-over important de la population permet d'alimenter rapidement le pool d'individus sains, ce qui, pour une maladie chronique comme la tuberculose, favorise sa persistance (Lloyd-Smith, Cross, et al. 2005; Vicente et al. 2013). Chez les espèces ayant une plus longue espérance de vie, comme le cerf, la latence de la maladie associée à cette caractéristique contribue à faire perdurer l'infection sur de longues périodes (Nugent 2011). De plus, chez toutes les espèces, l'exposition augmentant avec l'âge de l'animal, la probabilité d'infection est plus élevée chez les animaux âgés que chez les jeunes (O'brien 2002; Zanella, Durand, et al. 2008; Gavier-Widén et al. 2009; Vicente et al. 2013; Delahay et al. 2013).

Ainsi, la structure démographique d'une population peut avoir un impact sur son aptitude à faire perdurer l'infection à *M. bovis*.

- **Réceptivité et sensibilité de l'hôte *à M. bovis***

Outre la proximité phylogénétique avec les bovins qui peut prédisposer à une plus grande réceptivité et sensibilité des hôtes, comme c'est le cas pour les buffles, les bisons ou les cerfs (ANSES 2011; De Garine-Wichatitsky et al. 2013), d'autres déterminants interviennent conférant à des espèces parfois très éloignées des bovins une réceptivité et/ou une sensibilité élevée.

Nous avons vu que le sanglier, était non seulement très exposé de par son régime alimentaire mais se montrait également très réceptif à l'infection, conduisant souvent cette espèce à arborer des prévalences très élevées (Nugent et al. 2002; Gortázar et al. 2008; Hars et al. 2012). Par sa grande réceptivité, cette espèce est donc capable d'amplifier l'infection en augmentant rapidement le nombre d'individus tuberculeux au sein de sa population (Nugent et al. 2002; Nugent 2011). Cependant, une grande réceptivité n'entraine pas forcément un rôle déterminant dans la transmission intraspécifique et interspécifique car si la population est peu sensible et développe peu de lésions ouvertes et disséminées, le niveau d'excrétion de la bactérie sera faible et les contacts peu efficaces pour la transmission (Corner 2006).

Ainsi, chez le sanglier, on trouve des populations *a priori* peu excrétrices comme en Australie, en Nouvelle-Zélande ou en forêt de Brotonne en France (McInerney et al. 1995; Nugent et al. 2002; Zanella, Duvauchelle, et al. 2008) qui contrastent avec celle d'Espagne du Sud, qui présente des lésions très fréquentes et très sévères favorisant une excrétion élevée et donc un rôle majeur dans la transmission intraspécifique et interspécifique (Vicente et al. 2006; Naranjo et al. 2008; Martín-Hernando et al. 2007).

Du fait de sa forte sensibilité à *M. bovis* induisant des lésions sévères, la population de cerfs de la forêt de Brotonne a constitué un source d'infection pour le sanglier et a contribué à maintenir l'infection, lui conférant ainsi un rôle de réservoir (Zanella, Duvauchelle, et al. 2008; Hars et al. 2010).

La forte sensibilité est donc un déterminant majeur de la persistance et de la capacité à transmettre l'infection et tous les facteurs qui l'influencent peuvent avoir un impact sur la capacité d'une population ou d'un individu à maintenir la TB.

Ainsi, dans les populations de sangliers du sud de l'Espagne, des marqueurs génétiques ont été trouvés associés à une résistance à la progression de la maladie lors d'infection à *M. bovis*, attestant de l'existence de déterminants génétiques de la sensibilité à l'infection, à l'échelle populationnelle (Acevedo-Whitehouse et al. 2005). Ce constat a également été fait chez le buffle d'Afrique (le Roex et al. 2013). En outre, l'âge de l'animal peut apparaitre comme un facteur de risque à l'échelle individuelle dans certaines populations. Chez le sanglier, en Espagne, les lésions sont plus sévères chez les juvéniles comparativement aux adultes, ce qui peut représenter un risque supplémentaire de dispersion de l'infection, cette catégorie pouvant contribuer de façon exacerbée à la transmission et à la persistance de l'infection (Lloyd-Smith, Schreiber, et al. 2005; Martín-Hernando et al. 2007; Boadella et al. 2012). A l'inverse, dans certaines populations, comme les bisons au Canada ou les buffles d'Afrique, la survie des individus infectés âgés est moindre que celles des jeunes (Joly & Messier 2004).

La réponse immunitaire à l'infection par *M. bovis* peut, comme pour d'autres pathogènes, être altérée par le stress, un mauvais état général (Corner 2006 ; Rhyan & Spraker, 2010), ou la co-infection par d'autres agents pathogènes (parasites par exemple) (Ezenwa et al. 2010). Une baisse d'immunité aura alors pour conséquence d'augmenter la sensibilité des individus à l'infection (Vicente et al. 2013).

4.2. Facteurs de risque liés à la relation hôte-pathogène

- **Infection, expression clinique et excrétion**

La relation hôte-pathogène commence lorsque l'agent pénètre dans l'organisme de l'hôte. Elle concerne ensuite la pathogénie qui résulte de la voie d'infection, de la dose infectante et de la réponse immunitaire de l'hôte, en lien avec sa réceptivité que nous venons de voir. La localisation des lésions reflète la voie de contamination, qui est, comme nous l'avons vu précédemment, le plus souvent liée au comportement social et alimentaire des individus. La sévérité et la dissémination des lésions témoignent de la sensibilité de la

population ou de l'individu (cf. *supra*). Elles conditionnent le niveau et les voies d'excrétion de *M. bovis*, facteur-clé dans la capacité de transmission du bacille (Corner 2006).

Dans les paragraphes suivants, nous détaillons l'état de ces connaissances pour trois espèces sauvages : le cerf, le sanglier et le blaireau.

Chez le cerf

La fréquence et la nature des lésions observées chez le cerf de Virginie aux Etats-Unis ou le cerf élaphe en Nouvelle-Zélande et en Europe attestent d'une forte sensibilité de cette famille à l'infection par *M. bovis*. La proportion d'individus infectés présentant des lésions macroscopiques dépasse 70% et les lésions sont majoritairement de type caséeuses voire purulentes (Lugton et al. 1998; Palmer, Waters & Whipple 2004; Johnson et al. 2008; Zanella, Duvauchelle, et al. 2008; Martín-Hernando et al. 2010). Des études histologiques ont montré une charge bacillaire élevée et une faible encapsulation des lésions, signifiant une forte capacité d'excrétion de la bactérie (Johnson et al. 2008; Martín-Hernando et al. 2010).

La localisation des lésions est variable selon les populations. En Angleterre et aux Etats-Unis, les localisations préférentielles sont les nœuds lymphatiques de la tête et le thorax (nœuds lymphatiques et poumons), signes d'une contamination probable par voie respiratoire (Brien et al. 2001; Palmer, Waters & Whipple 2004; Delahay et al. 2002; Delahay et al. 2007; Johnson et al. 2008). En France, en revanche, les cerfs infectés de la forêt de Brotonne ont présenté des lésions plus fréquentes sur les nœuds lymphatiques mésentériques, davantage en faveur d'une contamination par voie orale ou d'une généralisation de l'infection (Zanella, Duvauchelle, et al. 2008). Dans le sud de l'Espagne enfin, dans le parc de la Doñana, près de la moitié des cerfs infectés ont présenté des lésions généralisées, avec des localisations préférentielles dans les nœuds lymphatiques rétropharyngiens, iléocaecaux et mésentériques (Martin-Hernando et al. 2010).

Une dose infectante de $4x10^5$ cfu (colony forming units) inoculée expérimentalement au niveau des amygdales a permis l'infection, le développement de lésions disséminées de cerfs de Virginie et la transmission de l'infection des cerfs inoculés à des veaux (Palmer, Waters, Ave, et al. 2004).

Au regard de la nature et de la fréquence des lésions, le cerf apparaît donc comme ayant une forte capacité à excréter *M. bovis*. La bactérie a d'ailleurs été retrouvée sur des écouvillons oropharyngés, trachéaux, nasaux et de façon plus anecdotique dans les urines et les fèces (Lugton et al. 1998; Palmer, Waters, Ave, et al. 2004; Johnson et al. 2008). En outre, leur carcasse s'avère être particulièrement infectante pour les nécrophages (Johnson et al. 2008; Zanella, Duvauchelle, et al. 2008).

Chez le sanglier

Chez le sanglier, dans les populations les plus touchées, en forêt de Brotonne, en Espagne ou en Nouvelle-Zélande les lésions sont majoritairement localisées aux nœuds lymphatiques de la tête et secondairement au poumon (Nugent et al. 2002; Martín-Hernando et al. 2007; Zanella, Duvauchelle, et al. 2008). En Espagne, le nœud lymphatique mandibulaire est le plus fréquemment lésé alors qu'en France, c'est le nœud lymphatique rétropharyngien (Martín-Hernando et al. 2007; Zanella, Duvauchelle, et al. 2008). En Espagne, les lésions sont toutefois plus fréquentes que ce qui a été observé dans la forêt de Brotonne (83% *vs* 58%). La même tendance est rapportée concernant la sévérité des lésions : elles sont plus grosses, moins stabilisées et plus disséminées en Espagne qu'en France. En Espagne, les lésions les plus sévères sont observées chez les juvéniles (Gortazar et al. 2003; Martín-Hernando et al. 2007) alors qu'en forêt de Brotonne, il n'y a pas de différence de sévérité des lésions entre les juvéniles (moins de 1 an) et les adultes (plus de 1 an) (Zanella, Duvauchelle, et al. 2008). Au regard de cette pathogénie, il apparaît que la voie d'infection chez cette espèce peut être respiratoire ou digestive. Martin-Hernando et al. (2007) font l'hypothèse d'une entrée du germe par la muqueuse orale et les amygdales puis d'une dissémination par les nœuds lymphatiques mandibulaires. La dose infectante n'est pas connue.

Même si les lésions sont plus fréquentes dans les nœuds lymphatiques céphaliques, il a été montré en Espagne, que la charge bacillaire, révélée par la coloration de Zhiel-Nielsen, était plus élevée dans les poumons (Martin-Hernando et al. 2007). En conséquence, l'excrétion et donc la transmission aux autres individus auraient lieu principalement par voie aérienne (Martín-Hernando et al. 2007; Zanella, Duvauchelle, et al. 2008). En Espagne, une excrétion salivaire et fécale a également été mise en évidence (Gortazar et al. 2003 ; Martin-Hernando et al. 2007). Etant donné le différentiel de gravité des lésions, cette transmissibilité serait plus importante pour les populations d'Espagne, effectivement considérée comme un réservoir, que celle de la forêt de Brotonne, considérée comme un hôte de liaison (Naranjo et al. 2008; Zanella, Duvauchelle, et al. 2008).

Chez le blaireau

Les blaireaux infectés par *M. bovis* ne développent des lésions que dans une minorité de cas, entre 20% et 40% en Angleterre et dans une proportion plus faible en Irlande, en Espagne et en France (Jenkins et al. 2008; Murphy et al. 2010; Balseiro et al. 2011; Payne et al. 2013). Les lésions se localisent principalement dans la cavité thoracique (nœuds lymphatiques et poumons) suivis des nœuds lymphatiques céphaliques puis périphériques et enfin de la cavité abdominale où les reins et le foie sont les organes les plus fréquemment lésés. Une généralisation des lésions est rarement observée (Gallagher & Clifton-Hadley 2000; Jenkins et al. 2008; Murphy et al. 2010; Balseiro et al. 2011; Payne et al. 2013). Les lésions sont rarement liquéfiées ou calcifiées et peu de bacilles sont visibles au niveau des

granulomes microscopiques (Corner et al. 2010). Les voies d'infection principales déduites de ces observations seraient donc en premier lieu la voie respiratoire, puis les morsures que les mâles s'infligent couramment lorsqu'ils défendent leur territoire (Jenkins et al. 2008; Corner et al. 2010; Jenkins et al. 2012). L'infection primaire par la voie orale est beaucoup moins probable étant donnée la sensibilité des mycobactéries au pH acide de l'estomac des blaireaux (Corner et al. 2010).

Une infection expérimentale de seize blaireaux par inoculation intrabronchique de 2,5 x10^4 cfu de *M. bovis* a résulté, après 24 semaines, en l'infection de quinze individus qui présentaient des lésions au niveau de la cavité thoraciques et des nœuds lymphatiques hépatiques et mésentériques, deux d'entre eux présentaient également des lésions plus disséminées (Corner, Costello, et al. 2008).

Les voies d'excrétion sont multiples : le blaireau peut excréter *M. bovis* par les voies respiratoire (aérosols, mucus trachéal), digestive (fèces), urinaire (urine) et par les exsudats de lésions cutanées (Corner et al. 2010). Le niveau d'excrétion dépend de la sévérité des lésions. Dans les stades avancés de la maladie, les niveaux d'excrétion peuvent atteindre 10^5-10^6 cfu/ml dans le mucus trachéal, 10^2-10^5 cfu/ml dans l'urine et 10^2-10^5 cfu/g dans les fèces (Gallagher et al. 1998). Dans des populations de blaireaux d'Angleterre où l'infection est enzootique, des blaireaux, qualifiés de « superexcréteurs » peuvent excréter par différentes voies simultanément ou consécutivement. La saison apparait comme un déterminant du passage du stade d'exposé (c'est-à-dire fournissant un résultat positif au test sérologique) à celui d'excréteur (Delahay et al. 2013). Cependant, la capacité d'excrétion de *M. bovis* ne semble pas réservée aux blaireaux se trouvant à un stade avancé de la maladie et une excrétion intermittente pour les blaireaux sans lésion visible serait possible. Des lésions microscopiques, mises en évidence par des méthodes histologiques décrites sur différents organes, principalement au niveau du poumon, des nœuds lymphatiques et des reins pourraient être à l'origine de cette excrétion (Gallagher & Clifton-Hadley 2000; Jenkins et al. 2008; Gavier-Widén et al. 2009; Murphy et al. 2010).

La présence d'une femelle infectée dans un groupe est associée à la détection de jeunes infectés au sein de ce même groupe social, ce qui est en faveur d'une transmission pseudo-verticale (Delahay et al. 2000a; Tomlinson et al. 2013).

- **Modification du comportement**

Les modifications comportementales dues à l'infection par un agent pathogène consistent le plus souvent en un changement du comportement spatial de l'animal infecté, soit en une restriction des mouvements ou au contraire une amplification des mouvements (Gudelj & White 2004). Les modifications comportementales induites par l'infection à *M. bovis* sont décrites chez le phalanger et le blaireau et semblent rentrer dans cette deuxième catégorie.

Ainsi, les phalangers, lorsqu'ils sont en phase terminale de l'infection, à laquelle ils sont très sensibles, deviennent désorientés, se dispersent en dehors de leur territoire habituel et perdent leur peur naturelle des bovins, ce qui accroit les risques de transmission entre ces deux espèces, et ce, d'autant plus que ces phalangers à un stade avancé de la maladie, excrètent d'avantage de bacilles (Morris et al. 1994).

En Angleterre, des études ont montré que les blaireaux tuberculeux avaient une occupation de l'espace atypique marquée par un domaine vital plus étendu que les blaireaux non infectés (50% plus grand), un temps passé plus important en dehors de leur terrier principal et utilisaient davantage des terriers secondaires. Ces modifications comportementales pourraient être dues à l'infection elle-même, à l'affaiblissement des animaux infectés et au rejet par le reste du groupe (Cheeseman & Mallinson 1981; Garnett et al. 2005; Weber et al. 2012). En lien probable avec ces modifications de comportement, il a été démontré que les blaireaux tuberculeux avaient 2,09 fois plus de risque d'être mordus par leur congénère que les blaireaux sains (Jenkins et al. 2012).

Les modifications comportementales induites par l'infection à *M. bovis* favorisent donc, chez certaines espèces, la transmission intraspécifique et interspécifique.

4.3. Facteurs géographiques

- **Influence du climat**

Influence sur la survie de M. bovis

Les températures tempérées, l'absence d'ensoleillement et un fort taux d'humidité constituent des conditions favorables à une survie prolongée de *M. bovis* dans l'environnement (cf. § 2.3.). Les biotopes offrant ce type de conditions représentent donc un risque accru pour la transmission indirecte de *M. bovis* en augmentant le temps pendant lequel l'environnement s'il a été contaminé, pourra être infectant. Miller et al. (2007) suggèrent que dans le Michigan, les sous-bois fournissant ces conditions, sont favorables à la persistance environnementale de *M. bovis.* Cette hypothèse a également été avancée par Vicente et al. (2007) pour expliquer l'association trouvée entre la proportion de forêts de chênes et une prévalence lésionnelle plus élevée chez les sangliers et les cerfs dans le sud de l'Espagne.

Influence sur la condition corporelle des animaux

Le type d'habitat et les conditions climatiques qui règnent dans un écosystème déterminent les ressources du milieu pour les espèces qui y vivent. Le niveau et la qualité des ressources varient spatialement mais aussi temporellement, en fonction des saisons. Cette

richesse du milieu influe sur l'état corporel des populations et a, par conséquent, un impact sur leur résistance aux infections comme la tuberculose bovine (Joly & Messier, 2004). Dans le sud de l'Espagne par exemple, les cas de tuberculose généralisée chez le sanglier sont associés aux années les plus sèches, les auteurs expliquant que le risque de sous-nutrition est plus élevé, ce qui influe sur la compétence immunitaire (Vicente et al. 2013)

Influence sur l'agrégation et le déplacement des animaux

Dans les écosystèmes arides comme dans le sud de l'Espagne ou en Afrique du sud, les points d'eau constituent des facteurs d'agrégation locale pouvant être partagés entre différentes populations appartenant parfois à la faune sauvage et à la faune domestique, .favorisant ainsi les contacts intraspécifiques et interspécifiques. En outre, en Afrique du Sud, pendant la période de sécheresse, les animaux peuvent parcourir de grande distance à la recherche de points d'eau, ce qui peut contribuer à l'extension spatiale de l'infection (Vicente et al. 2007; Gortázar et al. 2008; Munoz-Mendoza et al. 2013; De Garine-Wichatitsky et al. 2013).

- **Influence de la structure paysagère**

Les interactions entre faune sauvage et domestique peuvent être favorisées par des structures paysagères propices au chevauchement entre les niches écologiques des populations sauvages et les zones d'élevage. Ceci est particulièrement visible dans les paysages bocagers formant des mosaïque de forêts et de pâtures, qui augmentent les interfaces entre les populations sauvages et domestiques et par conséquent, augmentent le risque de transmission interspécifiques des pathogènes multi-hôtes (Vourc'h et al. 2008).

La distance à une zone protégée et le pourcentage de couvert forestier sur les pâtures sont les deux variables d'habitat prédisant le mieux la présence des élans (*Alces alces*) sur les pâtures au Canada (Brook & McLachlan 2009). En Angleterre, White et al. (1993) ont montré une corrélation positive entre le nombre de dépôts d'urine par des blaireaux et la fragmentation du paysage, les blaireaux urinant préférentiellement aux frontières entre milieux différents, lisières, barrières ou clôtures qu'ils rencontrent. Ces sites sont aussi privilégiés pour les latrines qui marquent les limites de leur territoire (Hutchings et al. 2002). Sachant que l'urine et les fèces sont des voies d'excrétion de *M. bovis* chez le blaireau, les habitats fragmentés augmenteraient le risque de contamination environnementale (White et al. 1993). Les paysages fragmentés sont donc propices à l'interface entre bovins et faune sauvage et ainsi à des interactions potentiellement contaminantes entre les deux compartiments.

La tuberculose bovine peut également émerger et se maintenir à l'intérieur d'une unité géographique circonscrite et isolée, comme cela a été le cas dans la forêt de Brotonne en France. Dans ce cas, les interactions sont nombreuses entre populations à l'intérieur de la population, ce qui favorise la persistance dans l'entité géographique et peut amplifier le

niveau d'infection, mais rares avec les populations extérieures, limitant la propagation de l'infection (Hars et al. 2010).

D'autres facteurs paysagers peuvent promouvoir l'agrégation des animaux et donc accroître le taux de contact au sein d'une population ou entre populations. Dans le Michigan, Miller et al. (2007) ont ainsi montré que les forêts déciduales, les zones humides forestières et la présence de petits lacs représentent des facteurs de risque pour les agrégats d'infection chez le cerf de Virginie. Ces types de milieu fournissent en effet un couvert végétal, une disponibilité de nourriture et de d'eau qui favorise l'abondance et l'agrégation des populations.

4.4. Facteurs anthropogéniques

- **Influences des pratiques cynégétiques**

Facteurs d'agrégation locale et augmentation des densités

Nous avons vu que l'augmentation des densités au-dessus d'un certain seuil, souvent supérieur à la capacité de charge du milieu était associée à un accroissement du risque d'émergence et de maintenance de la tuberculose bovine au sein d'une communauté d'hôtes sauvages. De ce fait, toute pratique cynégétique entrainant une augmentation des densités favorisera l'installation de réservoir sauvage. Plusieurs pratiques ont ainsi été reconnues comme « à risque » : le nourrissage et l'affouragement du gibier sont clairement associés à une augmentation de prévalence chez le gibier, que ce soit chez le cerf de Virginie dans le Michigan ou chez le cerf élaphe et le sanglier dans le sud de l'Espagne (Palmer, Waters & Whipple 2004; O'brien et al. 2006; Vicente et al. 2007; Castillo et al. 2011). La transmission de *M. bovis* par le partage d'aliments a en effet été mise en évidence chez les cerfs de Virginie (Palmer, Waters, Ave, et al. 2004). Ces pratiques constituent non seulement des facteurs d'agrégation locale augmentant les contacts intergroupes et interspécifiques, mais leur impact sur la prolificité de certaines espèces, notamment les sangliers, contribuent également à augmenter les densités à l'échelle populationnelle (Acevedo et al. 2007; Conner et al. 2008; Gortazar, Vicente, et al. 2011).

En Espagne, l'apport artificiel d'eau a également été identifié comme favorisant l'agrégation locale entre différentes espèces et ainsi la transmission de *M. bovis* (Vicente et al. 2007 ; Castillo et al. 2011 ; Gortazar, Vicente, et al. 2011).

L'existence de parcs de chasse clôturés dans lesquels le gibier, nourri artificiellement est surabondant peut influencer la résistance des individus à la tuberculose

bovine en diminuant la variabilité génétique des hôtes (Gortazar, Vicente, et al. 2011). En outre, la gestion des parcs de chasse pour le tourisme cynégétique donne souvent lieu à l'introduction ou au déplacement d'animaux, représentant un risque supplémentaire de voies d'entrée pour l'infection (Gortazar, Vicente, et al. 2011; Miller & Sweeney 2013).

En Espagne, la présence de parcs de chasse à proximité des fermes est associée à l'occurrence de foyers bovins, attestant de la pression d'infection qu'ils peuvent exercer sur le compartiment domestique même lorsque les animaux sont parqués (Rodríguez-Prieto et al. 2012).

Recyclage des matières contaminantes

Lorsque des carcasses infectées d'animaux tués à la chasse sont laissées sur place, elles constituent une source potentielle de contamination pour les espèces nécrophages. Nous avons vu que *M. bovis* pouvait persister dans des carcasses infectées plusieurs semaines (Morris et al. 1994), certaines espèces, comme les cerfs étant particulièrement à risque du fait de la charge bactériologique de leurs lésions (Johnson et al. 2008; Martín-Hernando et al. 2010). Des travaux de modélisation ont montré qu'en forêt de Brotonne, la consommation de viscères infectés serait la voie principale de transmission de *M. bovis* entre les différents hôtes sauvages (sangliers et cerfs), (Zanella et al. 2012). En Nouvelle-Zélande, la pratique de décapiter les cerfs et de laisser les têtes sur place est supposée être à l'origine de la contamination des phalangers dans les années 1960 (Nugent 2011).

Influence sur la dynamique de population

Nous avons vu précédemment comment le renouvellement rapide des populations pouvait favoriser la persistance de la tuberculose au sein d'une population. En supprimant une partie de la population, souvent des animaux jeunes, la chasse augmente ce taux de renouvellement, notamment chez le sanglier, et accentue encore cet effet (Vicente et al. 2013).

- **Influence des pratiques d'élevage**

Nous nous focalisons dans cette partie sur les pratiques d'élevage ayant une influence sur les interactions bétail-faune sauvage. Les pratiques à risque pour la transmission entre bovins ne sont pas traitées.

Le premier facteur prédisposant aux interactions entre bovins et populations sauvages est le degré de superposition entre le domaine vital de ces dernières et les sites d'élevages. La composition paysagère joue un rôle important dans ce partage de l'habitat (cf. *supra*) mais la conduite d'élevage l'influence également. La mise en pâture des bovins les expose davantage aux contacts directs ou indirects avec les espèces sauvages par rapport à l'élevage en bâtiment, avec un risque augmentant avec le temps de mise à l'herbe. En cela,

l'élevage de bovins allaitants apparait plus à risque que l'élevage laitier et le risque est plus élevé encore pour l'élevage extensif comme il peut être pratiqué aux Etats-Unis ou dans certaines régions d'Afrique où la superposition des habitats est plus étendue à la fois spatialement et temporellement (Brook & McLachlan 2009; Brook et al. 2013; De Garine-Wichatitsky et al. 2013). Aux Etats-Unis, le partage du fourrage mis à disposition du bétail est supposé être la voie de transmission principale entre les populations sauvages et domestiques (Brook et al. 2013). Une étude expérimentale a d'ailleurs démontré que des cerfs de Virginie infectés pouvaient effectivement transmettre l'infection à des veaux par le biais d'aliments (Palmer, Waters, Ave, et al. 2004). En outre, l'apport d'aliments et d'eau aux bovins offre aux populations sauvages partageant les mêmes habitats une ressource supplémentaire qu'ils utilisent d'autant plus qu'elle leur est accessible (Berentsen et al. 2013).

Dans les îles britanniques, de nombreuses études ont mis en évidence des pratiques d'élevages amenant les blaireaux à fréquenter les pâtures et les bâtiments et ainsi à entrer en contact avec les bovins. Que ce soit en bâtiment ou en pâture, l'attractivité repose majoritairement sur l'accès à des aliments pour les blaireaux. En pâture, la supplémentation en aliment a été montrée comme particulièrement à risque, lorsqu'elle est pratiquée au sol mais aussi dans des mangeoires (Ward et al. 2010). Dans les bâtiments, des études utilisant la vidéosurveillance ont montré que les blaireaux fréquentaient les sites de stockage et les stabulations en présence de vaches (Garnett et al. 2002; Tolhurst et al. 2009; Judge et al. 2011). Cette utilisation des pâtures et des bâtiments par les blaireaux représente un risque élevé de transmission aux bovins car les blaireaux peuvent contaminer par leurs excrétas des substrats (aliments, mangeoires, stabulations, pâtures) avec lesquels les bovins sont fortement en contact.

Le surpâturage peut également constituer une pratique à risque dans la mesure où la consommation d'herbe souillée par les déjections de blaireaux que les bovins évitent lorsqu'ils ont suffisamment d'herbe à disposition, augmente lors de surpâturage. De plus, lorsque l'herbe est rase, les bovins vont ingérer plus de terre dans laquelle les bacilles résistants sont susceptibles de se trouver (Hutchings & Harris 1997).

4.5. Synthèse et conclusion

Cette revue montre qu'il existe de multiples facteurs de risque de transmission de l'infection par *M. bovis* à l'intérieur ou entre population(s), pouvant favoriser la persistance de l'infection, son extension spatiale ou la transmission-retour aux bovins (Tableau 5). Il est très délicat de hiérarchiser l'importance de ces facteurs car leur identification relève de configurations particulières, souvent uniques, et leurs effets peuvent se potentialiser ou au contraire être antagonistes. Enfin, ces facteurs peuvent évoluer dans le temps et dans l'espace.

Néanmoins, cette revue met en exergue que la transmissibilité de *M. bovis* repose d'abord sur la capacité des hôtes à s'infecter et à excréter *M. bovis*, cette capacité étant elle-même conditionnée par leur réceptivité et leur sensibilité vis-à-vis du bacille ainsi que par leur comportement alimentaire et social. Le niveau d'infection d'une population doit donc prendre en compte ces différents aspects qui influencent la transmissibilité. Une prévalence élevée n'est pas toujours associée à un risque élevé si la population est, par exemple, très réceptive mais peu excrétrice et donc peu apte à transmettre l'infection (Haydon et al. 2002; Corner 2006). Ensuite, la transmissibilité de *M. bovis* dépend du niveau et du type d'interactions entre ces hôtes. Pour que l'infection soit entretenue et pérennisée, ils doivent interagir de façon efficace pour la transmission, c'est-à-dire que la durée, la fréquence et la nature des contacts doivent permettre à un hôte sensible de « rencontrer » une dose infectante de *M. bovis* (Corner 2006 ; Nugent 2011). Selon les situations, ces interactions pourront être intraspécifiques ou interspécifiques, directes ou indirectes. Or nous venons de voir que de nombreux facteurs tels que l'éthologie et la densité des hôtes, les caractéristiques géographiques, les pratiques d'élevage ou les pratiques cynégétiques influencent les interactions. En outre, en dehors des interactions comportementales, la plupart de ces contacts sont sous-tendus par le partage de l'habitat et des ressources naturelles ou artificielles.

Considérant l'importance de la transmission indirecte dans le système multi-hôtes, les facteurs influant la survie de *M. bovis* dans le compartiment abiotique interviennent dans l'entretien du cycle épidémiologique de la bactérie. Ces facteurs incluent essentiellement les caractéristiques géographiques mais peuvent varier temporellement selon les saisons.

Enfin, l'importance des facteurs diffère suivant que l'on considère le risque à l'intérieur d'une seule population-hôte ou au sein d'une communauté de populations-hôtes, que l'on se place à une échelle locale ou régionale ou que l'on s'intéresse plus spécifiquement au risque de transmission vers le compartiment domestique.

Ainsi, à chacun de ces niveaux, le recensement et l'estimation des facteurs de risque fournissent des éléments-clé pour l'évaluation du statut épidémiologique des populations-hôtes, de la capacité de la communauté d'hôtes à être réservoir et à retransmettre l'infection aux bovins.

Tableau 5 : effet qualitatif de différents facteurs sur le risque de persistance, de transmission interspécifique, de transmission-retour aux bovins, d'extension spatiale et d'amplification de l'infection à *M. bovis* dans la faune sauvage

	Persistance	***Transmission interspécifique***	***Transmission-retour aux bovins***	***Extension spatiale***	***Amplification***
Comportement social	+++ (grégarisme)			+ (dispersion, reproduction)	
Comportement spatial	++ (Agrégation si stabilité géographique)			+++ (si grand domaine vital)	
Comportement territorial	++	+	+		
Régime alimentaire	+	++	++		+++ (nécrophagie)
densité	+++	++	++		++
Dynamique de population	++				+
Réceptivité	++				+++
Sensibilité	+++	+++	+++	+	+++
Modification comportementale	+	+	+	+	
Climat	++	++	++	+	+
Paysage	+	++	++	+	+
Pratiques cynégétiques	+++	+++	+	+	++
Pratiques d'élevage		+	+++		

5. MESURES DE GESTION DE LA TUBERCULOSE BOVINE DANS LA FAUNE SAUVAGE

A la lumière des expériences étrangères décrites précédemment, les mesures de gestion et de lutte contre la tuberculose bovine dans la faune sauvage consistent, à limiter, quand cela est possible, les facteurs de risque identifiés. Il n'est pas possible d'agir sur ceux inhérents au comportement de l'hôte et il est difficile d'agir sur les facteurs géographiques (climat, paysage); il est en revanche possible de mettre en œuvre des stratégies visant à limiter les interactions en intervenant sur les densités (réduction des densités par abattage), les pratiques cynégétiques (interdiction du nourrissage artificiel, ramassage des viscères) ou les pratiques d'élevage (augmentation de la biosécurité). Il est également possible d'agir sur la sensibilité des individus vis-à-vis de *M. bovis* en améliorant sa réponse immunitaire grâce à la vaccination (O'brien et al. 2006; Buddle et al. 2011; Boadella et al. 2012; De Garine-Wichatitsky et al. 2013; Miller & Sweeney 2013)

L'efficacité de ces stratégies repose sur une évaluation préalable des facteurs les plus prégnants dans le maintien de l'infection et/ou de leur transmission aux bovins ainsi qu'une connaissance du statut épidémiologique des populations en cause afin de cibler au mieux les stratégies de lutte (White et al. 2008; Nugent 2011; Palmer et al. 2012; Barron et al. 2013).

Cependant l'application de ces mesures, de par les modifications qu'elles entrainent, peuvent se heurter à des considérations éthiques et écologiques (abattage ou éradication de populations) et se trouver au centre de conflits d'intérêts (intérêts cynégétiques *vs* intérêts agricoles par exemple). La réussite de ces stratégies nécessite donc leur accompagnement et leur acceptation par les acteurs concernées (Hars et al. 2013; Miller et al. 2013).

6. PROBLÉMATIQUE : CRÉATION D'UN RÉSERVOIR SAUVAGE ET TRANSMISSION DE *M. BOVIS* AUX BOVINS, QUEL RISQUE POUR LA CÔTE D'OR ?

Nous avons vu qu'en France, les cas de *M. bovis* dans la faune sauvage (hors faune sauvage captive) ont toujours été détectés à proximité de foyers récents ou concomitants de tuberculose bovine. L'identification et la discrimination des différentes souches de *M. bovis* a de plus montré que bovins et populations sauvages infectées partageaient les mêmes souches, attestant du lien épidémiologique qui existe entre le compartiment domestique et le compartiment sauvage (Hars et al. 2010; ANSES 2011; Payne et al. 2013).

Ces faits, associés à la connaissance des situations étudiées à l'étranger est largement en faveur d'une contamination de la faune sauvage à partir des bovins en France. Cependant, même si la révélation de cette contamination est relativement récente, il est difficile de savoir depuis quand elle date, car, comme nous l'avons exposé précédemment, les modalités de surveillance et la pathologie de *M. bovis* dans la faune sauvage ne permettent pas la détection d'une circulation de l'infection à bas bruit (Hermoso de Mendoza et al. 2006; Rivière et al. 2012; Miller & Sweeney 2013) et il est possible que l'infection ait circulé sans avoir été détectée pendant un certain temps.

En outre, comme nous l'avons mentionné dans les tableaux 3 et 4, la France, à l'instar d'autres pays comme l'Espagne, comporte différentes configurations de systèmes multi-hôtes dans lequel *M. bovis* circule actuellement. En dehors de la forêt de Brotonne, le statut épidémiologique des différentes populations dans les autres communautés d'hôtes n'est pas connu et, si certaines espèces sont communes, les contextes géographiques, démographiques, zootechniques et cynégétiques sont multiples, de même que la prévalence et l'évolution spatio-temporelle de l'infection chez les bovins. Or, nous avons vu l'importance que la présence de ces facteurs a dans l'émergence et la maintenance de la tuberculose dans la faune sauvage et comment chaque assemblage de facteurs peut résulter en une situation unique. La connaissance des effets de chacun des facteurs de risque que nous venons d'étudier nous permet d'identifier ceux qui ont pu entrainer l'émergence et/ou la persistance de l'infection dans la faune sauvage et d'évaluer quelles sont les populations sauvages ayant les rôles les plus importants dans l'entretien et la transmission de l'infection. Ces deux étapes sont des pré requis nécessaires pour cibler les mesures de gestion et de lutte efficaces visant à maîtriser la tuberculose bovine dans la faune sauvage et à limiter le risque de transmission-retour aux bovins.

Nous avons choisi ici de nous focaliser sur la configuration épidémiologique rencontrée en Côte d'Or. Dans ce département, où l'incidence bovine est l'une des plus

élevées actuellement en France avec la Dordogne, plusieurs populations d'espèces sauvages font l'objet de programme de surveillance et ont été trouvées infectées par *M. bovis* : le cerf, le sanglier, le blaireau et, de façon plus marginale, le renard. Sur la base des expériences acquises dans d'autres pays ou ailleurs en France, il est établi que les trois premières espèces citées ont la capacité d'être des réservoirs de *M. bovis* pouvant retransmettre l'infection aux bovins (cf. Tableau 4). Qu'en est-il en Côte d'Or ? A ce jour, la question reste ouverte car la cohabitation de ces trois populations forme une communauté d'hôtes de *M. bovis* inédite ou tout du moins non décrite dans un contexte géographique, démographique, zootechnique et cynégétique particulier. Le rôle de chacune de ces populations et de leur assemblage au sein d'une communauté d'hôtes, dans la persistance de la TB est donc à déterminer.

De plus, si, dans l'état actuel des connaissances, la transmission-retour de *M. bovis* des populations sauvages vers les bovins n'a pas été démontrée en France, la suspicion est cependant très forte en Côte d'Or pour certains élevages, notamment lors de recontamination rapide après assainissement et lorsque les autres causes sont écartées par l'enquête épidémiologique (source DDPP21 ; Fediaevsky et al. 2010). Dans ce contexte, et compte-tenu de l'enjeu majeur que constitue la maîtrise de l'infection pour la filière bovine, l'évaluation du risque de cette transmission-retour est cruciale.

Notre premier objectif a donc été d'évaluer, dans la configuration particulière de la Côte d'Or, les facteurs de risque pouvant permettre aux différentes populations-hôtes sauvages de maintenir l'infection à *M. bovis*. Parmi les facteurs de risque étudiés, nous nous sommes intéressés à ceux, qui, d'après l'état des connaissances déjà acquises, sont les plus récurrents et semblent avoir un impact important sur la persistance de l'infection (cf. *supra*). Ainsi, nous avons étudié la capacité de chacun des hôtes sauvages à s'infecter et à excréter le bacille. Puis nous avons estimé la densité des trois populations sauvages concernées puisque ce paramètre déterminant majeur du taux de contact intraspécifique et interspécifique est un facteur clé dans la constitution d'un réservoir. Enfin, nous avons pris la mesure des interactions entre les populations sauvages infectées et les bovins afin d'estimer le risque que ces populations présentent pour la transmission-retour aux bovins sachant que ces contacts peuvent aussi donner lieu à une transmission des bovins vers la faune sauvage.

Associées à la description des facteurs géographiques et des pratiques d'élevage, les réponses apportées à ces objectifs devaient permettre de fournir des éléments permettant d'une part d'établir le statut épidémiologique de chacune de des populations, d'autre part d'évaluer le risque que l'ensemble de ces populations constituent une communauté d'hôtes sauvages réservoir. Ils ont également permis d'estimer le risque de transmission-retour des populations sauvages infectées vers les bovins.

Nous nous sommes placés ici dans une approche qualitative de l'évaluation de ces risques fondée cependant sur l'estimation chiffrée de certains facteurs, afin qu'ils puissent être objectivés et comparés avec d'autres situations.

Finalement, une fois le risque de persistance de *M. bovis* et de transmission-retour aux bovins évalués, l'objectif était de proposer des actions de gestion et de lutte qui seraient les plus adéquates pour réduire le risque de persistance de la tuberculose bovine dans la faune sauvage et pour limiter le risque de transmission entre les populations sauvages infectées et les bovins en Côte d'Or. Elles devaient permettre de cibler les populations et les facteurs de risque jouant un rôle majeur sur lesquels une action est possible.

Chapitre 2

Etude du rôle des populations sauvages dans le système multi-hôtes de M. bovis et risque de transmission entre populations sauvages et bovins en Côte d'Or

Dans cette partie, nous avons étudié successivement certains des facteurs intervenant dans le risque de maintenance de la TB dans les populations-hôtes sauvages et dans la transmission-retour aux bovins.

En premier lieu, nous décrivons, de façon bibliographique, le contexte géographique et agricole en termes d'élevage bovin ainsi que la situation épidémiologique bovine de la Côte d'Or.

Puis, à partir de données disponibles, issues de la surveillance programmée mise en œuvre dans ce département dans la faune sauvage, nous avons étudié le niveau d'infection des différentes populations-hôtes sauvages.

Nous rapportons ensuite les résultats de travaux expérimentaux réalisés dans le cadre de cette thèse sur l'excrétion de *M. bovis* par les blaireaux et les sangliers.

Une estimation du niveau de densité de la population des blaireaux de Côte d'Or a également été réalisée. Nous l'avons complétée, pour les autres espèces, par le traitement de données disponibles sur les tableaux de chasse et les indices kilométriques d'abondance.

En dernier point, nous avons investigué le niveau de contact entre les populations-hôtes sauvages (blaireaux et sangliers en particulier) et les bovins par une étude expérimentale utilisant le suivi télémétrique et la vidéosurveillance.

1. CONTEXTE GÉOGRAPHIQUE ET IMPORTANCE DE L'ÉLEVAGE BOVIN EN CÔTE D'OR

La Côte d'Or, quatrième département en France par sa superficie (8763 km2) appartient à la Bourgogne, région à fort ancrage agricole, que ce soit par la surface et la population active dédiées à cette activité ou par le poids économique. Les principaux secteurs de production agricoles sont l'élevage bovin viande, la culture de céréales et la viticulture (Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt 2013a).

Nous avons décrit dans les paragraphes qui suivent le paysage et le climat de Côte d'Or, compte-tenu de l'impact sur l'épidémiologie de la tuberculose dans la faune sauvage que peuvent avoir ces facteurs géographiques (cf. chapitre 1). Puis nous nous sommes intéressés à la filière bovine, pour laquelle l'enjeu lié à la gestion de la tuberculose bovine est de premier plan. Les détails de cette gestion chez les bovins et l'évolution de la situation épidémiologique dans les cheptels vis-à-vis de l'infection à *M. bovis* sont traités dans un second paragraphe.

1.1. Contexte géographique

1.1.1. **Climat**

La Côte d'Or est caractérisée par un climat océanique semi-continental. La partie occidentale du département est marquée par une pluviométrie importante (environ 1 m d'eau par an) (Figure5) tandis que le sud et l'est, plus secs, subissent d'avantage l'influence continentale et méditerranéenne (Vaucoulon & Chiffaut 2004).

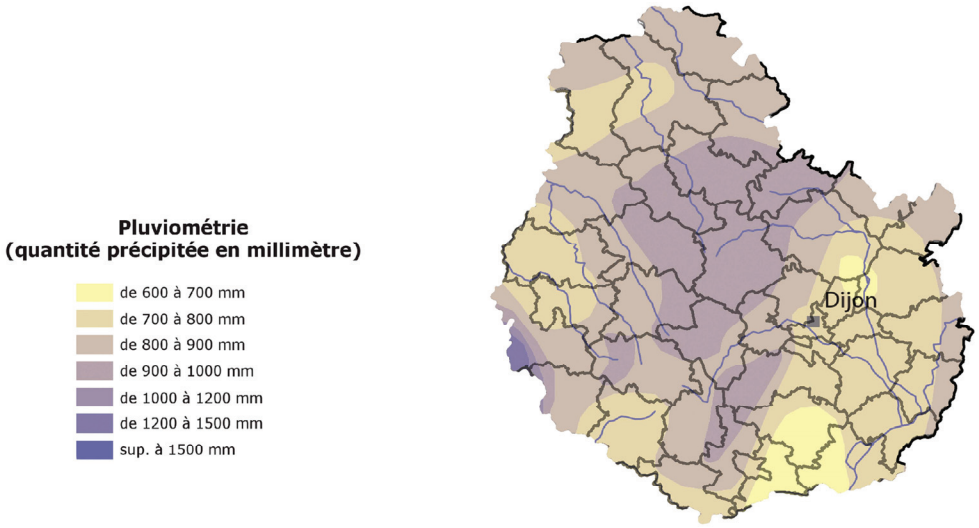


Figure 5 : pluviométrie annuelle de la Côte d'Or (Source : Bourgogne Nature 2011)

1.1.2. **Paysages**

On trouve en Côte d'Or différentes entités paysagères naturelles caractérisées par plusieurs types de sous-sols puis modelés par les activités humaines principalement agricoles. Les plateaux et les côtes calcaires couvrent les 2/3 du département depuis le Châtillonnais au nord où dominent les forêts et les paysages mixtes (cultures/forêt) jusqu'à la Côte dijonnaise, où se trouvent les grands vignobles. Le sud-ouest du département, la plaine de Saône est marquée par des plaines argileuses et des vallées alluviales où les cultures et les paysages mixtes sont dominants (Figures 6 et 7). A l'est, sur les contreforts du Morvan, le sous-sol est siliceux et le paysage est de type bocager. Ce paysage bocager est retrouvé dans l'Auxois qui se caractérise typiquement par des plateaux calcaires affleurant au sommet de collines, porteuses généralement de petites forêts de feuillus. Les pentes douces marneuses supportent le plus souvent des pâtures bordées par des haies et se terminent dans les vallées alluviales, où sont également présentes des prairies humides utilisées en pâturage ou pour le fourrage (Vaucoulon & Chiffaut 2004). L'activité agricole dominante de l'Auxois est l'élevage.

Au sud de l'Auxois, avant la Côte dijonnaise, se trouve la vallée de l'Ouche, marquée par une vallée profonde formant un relief couvert de massifs forestiers principalement constitués de feuillus. La forêt est donc le paysage dominant, les prairies bocagères et les cultures étant limitées aux vallées humides de l'Ouche et de ses affluents. Dans la continuité au sud de la vallée de l'Ouche, les Hautes Côtes formées par un massif de calcaire jurassien au relief accidenté sont couvertes à l'ouest par de larges forêts mixtes. Les cultures et les vignobles occupent le versant est du massif (DDT 2010).

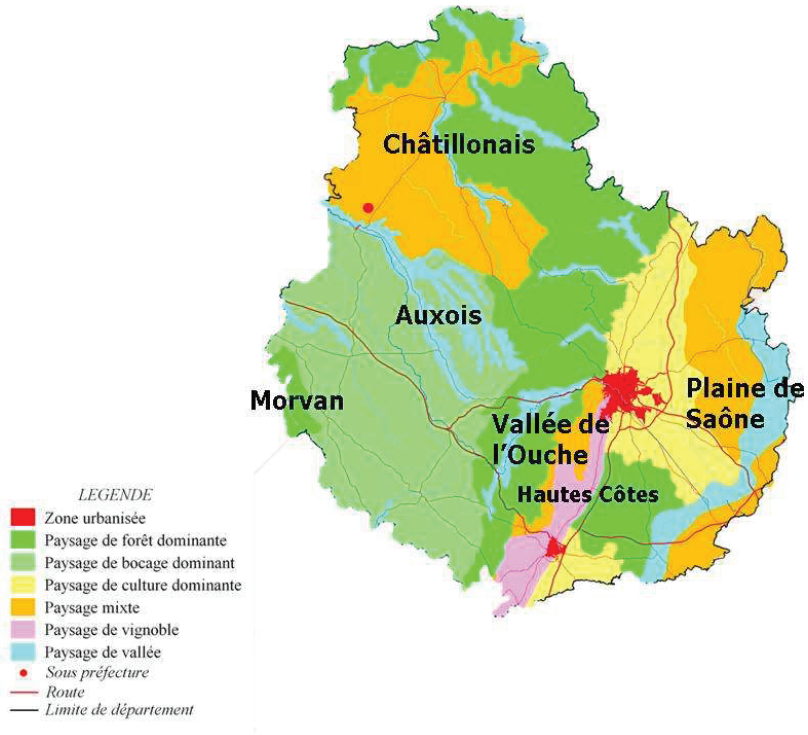


Figure 6 : les différents types de paysages présents en Côte d'Or (Source :DREAL Bourgogne/SDD/GVI 2011)

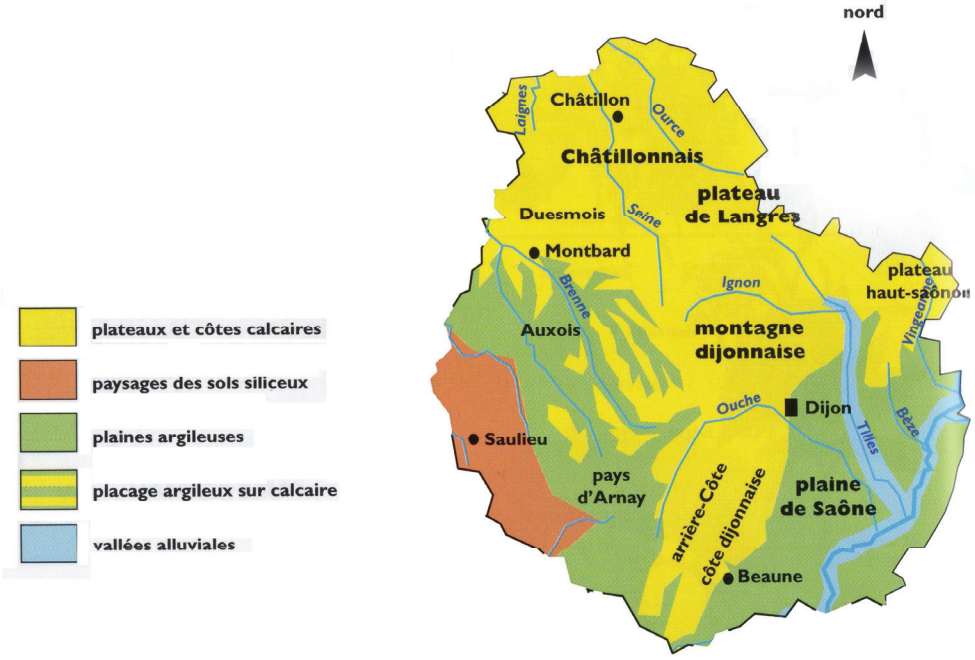


Figure 7 : les différents types de sol de la Côte d'Or (Source : Vaucoulon & Chiffaut 2004)

1.2. Elevage bovin

La surface agricole utilisée en Côte d'Or est de 470 501 ha, soit 53% de la surface totale du département (Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt 2013b). On dénombre 76 000 vaches nourrices et 16 000 vaches laitières. L'élevage allaitant concerne 1200 exploitations, la majorité d'entre elles étant situées dans les cantons de l'ouest du département en Auxois et dans le Morvan) (Figure 8) (Source : chambre d'agriculture de Côte d'Or).

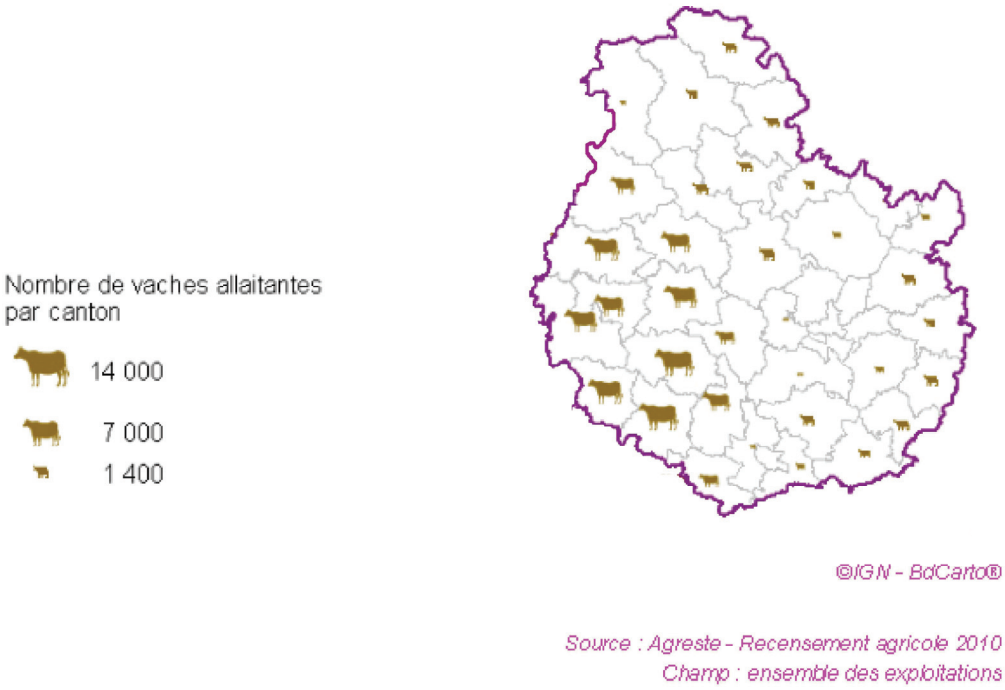


Figure 8 : nombre de vaches allaitantes par canton en Côte d'Or en 2010 (source : Agreste, Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt)

La filière bovin viande est donc prédominante en Côte d'Or avec un système de production orienté majoritairement vers la production de broutards (veau mâle qui se nourrit de lait maternel et d'herbes jusqu'à son sevrage vers l'âge de 7 à 9 mois). Ces animaux sont vendus entre 6 et 10 mois pour être engraissés dans d'autres régions ou à l'étranger (source : Institut de l'élevage 2012). Les exploitations bovines allaitantes dégagent un chiffre d'affaires annuel de 80 millions d'euros (Source : chambre d'agriculture de Côte d'Or).

Notons que l'élevage allaitant, notamment de type naisseur concentrent plusieurs facteurs de risque vis-à-vis de la tuberculose. Le séjour prolongé en pâturage peut accroître le risque de contact avec d'autres troupeaux par contigüités des parcelles, d'autant plus quand celles-ci sont très morcelées comme c'est le cas en Côte d'Or. La difficulté de contention des animaux est plus importante pour les vaches allaitantes qui n'ont pas l'habitude d'être

manipulées contrairement aux vaches laitières, ce qui peut rendre les opérations de prophylaxie plus délicates et ainsi influencer la qualité du dépistage. Enfin, contrairement à l'élevage laitier (dont les vaches sont réformées entre cinq et huit ans), les vaches allaitantes sont conservées plus longtemps dans les élevages, avec un âge de réforme entre sept et quinze ans (globalement, 70% sont réformées à moins de 10 ans d'âge et 30% au delà), elles sont donc exposées plus longtemps à l'infection (ANSES 2011).

1.3. Conclusion

Une grande partie de la Côte d'Or est donc couverte par un paysage alternant forêt, pâtures et cultures. Cette fragmentation paysagère plus marquée encore dans le bocage, en Auxois et Morvan, où la densité d'élevages bovins est forte, favorise les contacts entre populations sauvages et domestiques. La combinaison de ce type de paysage avec l'abondance des bovins constitue un facteur de risque pour les interactions entre bovins et populations sauvages.

De plus, l'habitat est propice pour différentes espèces réceptives à la tuberculose. Ainsi, les lisières, les terrains pentus et les sous-sols minéraux sont privilégiés par les blaireaux pour établir leur terrier (Sleeman et al. 2009; Reid et al. 2012). D'autre part, l'existence de grands massifs forestiers est favorable aux populations de grands gibiers.

En Auxois et dans la vallée de l'Ouche, la pluviométrie annuelle élevée, dépassant le mètre d'eau par an, associée à la présence de plusieurs vallées alluviales et d'un sous-sol majoritairement argileux engendre une forte humidité du sol et le maintien des nappes phréatiques tout au long de l'année. Cette caractéristique est favorable à la rémanence de *M. bovis* dans l'environnement puisque l'humidité est une des conditions de la survie prolongée de la bactérie dans le compartiment abiotique (Phillips et al. 2003).

2. SITUATION ÉPIDÉMIOLOGIQUE DES BOVINS EN CÔTE D'OR

2.1. Gestion de la tuberculose bovine

Dans la majorité des départements français, le succès de la lutte contre la tuberculose bovine a permis d'espacer voire de stopper le dépistage en élevage, la surveillance reposant uniquement sur l'inspection des carcasses à l'abattoir. Le dépistage par prophylaxie en élevage est pratiqué dans une minorité de départements à un rythme variable selon le niveau de risque (rythme quadriennal, triennal ou biennal ou annuel) (Fediaevsky et al. 2010).

En Côte d'Or, la reprise des prophylaxies a eu lieu en 2002 suite à la détection de plusieurs foyers en 2002 (Figure 9). Depuis 2009, la prophylaxie est réalisée annuellement sur les bovins de plus de 12 mois sur l'ensemble du département. Alors que les autres départements pratiquent l'intradermo-tuberculination simple (IDS), le test de dépistage utilisé en première intention en Côte d'Or est l'intradermo-tuberculination comparée (IDC) en raison d'une fréquence élevée de réactions atypiques observées historiquement dans ce département (Fediaevsky et al. 2010).

En cas d'infection confirmée, l'assainissement est mis en place par abattage total ou par abattage partiel (dérogation à la réglementation nationale).

En 2012, le coût total de la gestion de la tuberculose en Côte d'Or (incluant le coût des prophylaxies, des analyses, de la police sanitaire, de la gestion des foyers, des abattages diagnostiques et de gestion de la faune sauvage) était estimé à 8 029 000€ (Source : DDPP21).

2.2. Evolution des foyers

L'évolution du nombre de foyers incidents en Côte d'Or depuis 2002 met en évidence une nette augmentation à partir de 2007 et un pic en 2010 (45 foyers) (Figure 9). Il est toutefois difficile de déterminer si ces tendances résultent d'une augmentation de la prévalence réelle ou d'une amélioration de la détection (en 2010, une modification du protocole de la surveillance entrainant l'abattage de tous les animaux douteux à l'IDC a été mise en place).

Depuis 2010, le protocole est le même chaque année et l'incidence annuelle est plus comparable. Celle-ci est stabilisée à une vingtaine de foyers par an (Figure 9).

Cependant, le nombre de recontaminations (nouvelle infection après qu'un élevage ait été assaini et requalifié suite à une première infection) est en augmentation, atteignant en 2013 43% du nombre total de foyers et incluant un élevage infecté pour la $4^{ème}$ fois. (Figure 9) (Source : DDPP21).

Dans ces cas de résurgence, les enquêtes épidémiologiques ne permettent pas toujours d'identifier l'origine de la contamination Les hypothèses émises peuvent alors s'orienter vers une source de contamination environnementale incluant le compartiment abiotique (sol, eau,..) dans lequel *M. bovis* persisterait, ainsi que la faune sauvage (Fediaevsky et al. 2010; Hars et al. 2012).

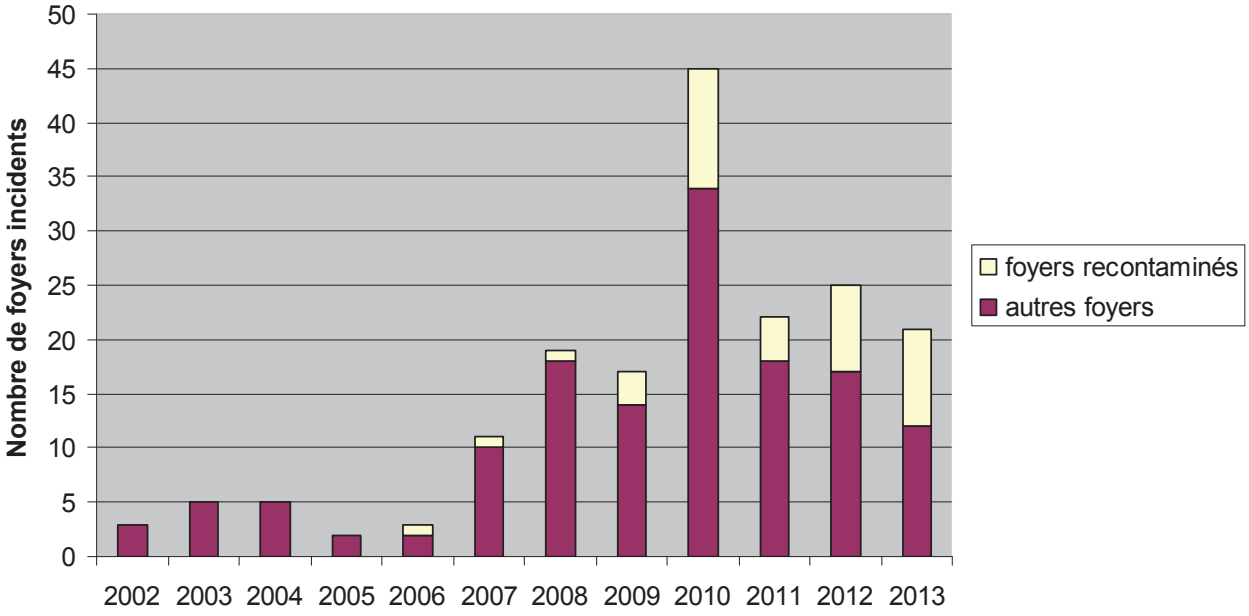


Figure 9: évolution du nombre de foyers de tuberculose bovine en Côte d'Or entre 2002 et 2013 (Source : DDPP 21)

On observe une relative stabilité géographique de l'infection qui s'étend sur une zone d'environ 2500 km^2 à l'ouest du département (Figure 10). Au sein de celle-ci, on distingue deux entités épidémiologiques correspondant à deux souches différentes de *M. bovis* l'une circulant plutôt au nord de la zone (spoligotype SB0120, profil VNTR 5 5 4 3 11 4 5 6) et l'autre au sud (spoligotype SB0134, profil VNTR 6 4 5 3 6 4 3 6). Une circulation conjointe des deux souches est observée au centre de la zone (Figure10). Les foyers se répartissent de façon hétérogène : ils sont plus nombreux dans la zone nord et au sein de celle-ci, ils se concentrent dans certaines vallées (Figures 10 et 11). Quelques foyers ont été détectés dans le reste du département mais les enquêtes épidémiologiques ont révélé des liens épidémiologiques avec la zone infectée (Source DDPP21).

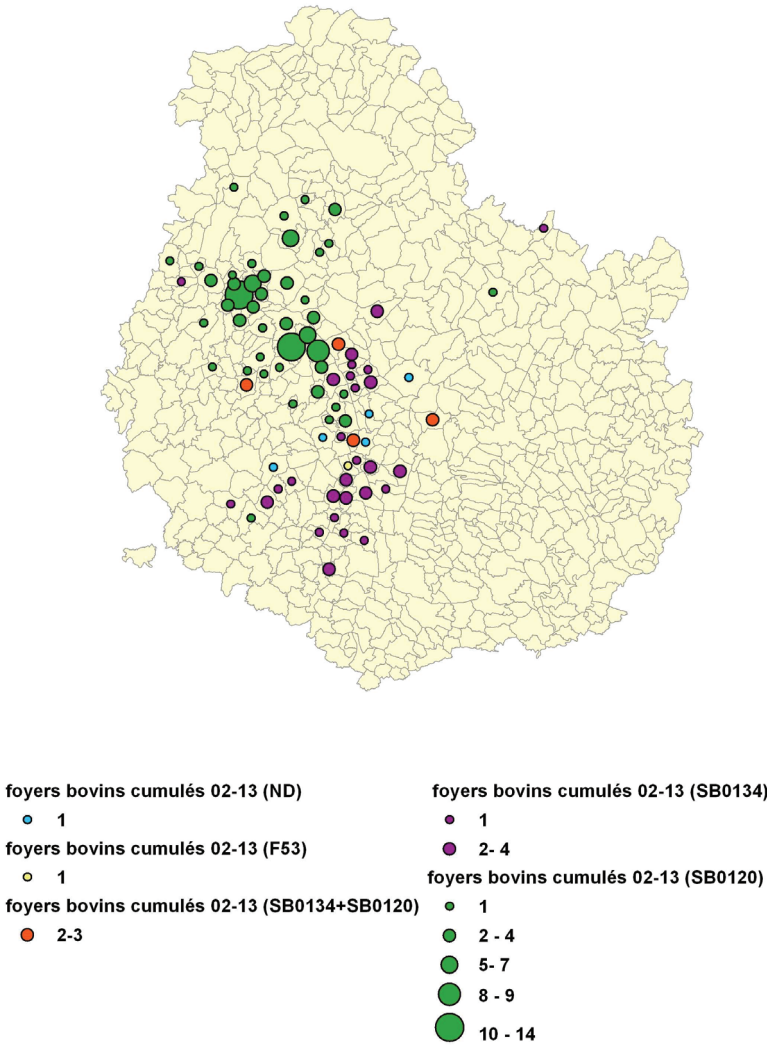


Figure 10 : répartition par commune des foyers bovins cumulés entre 2002 et 2013 en Côte d'Or. Les souches de *M. bovis* identifiées sont indiquées entre parenthèse (ND : non déterminé) (Source : DDPP21)

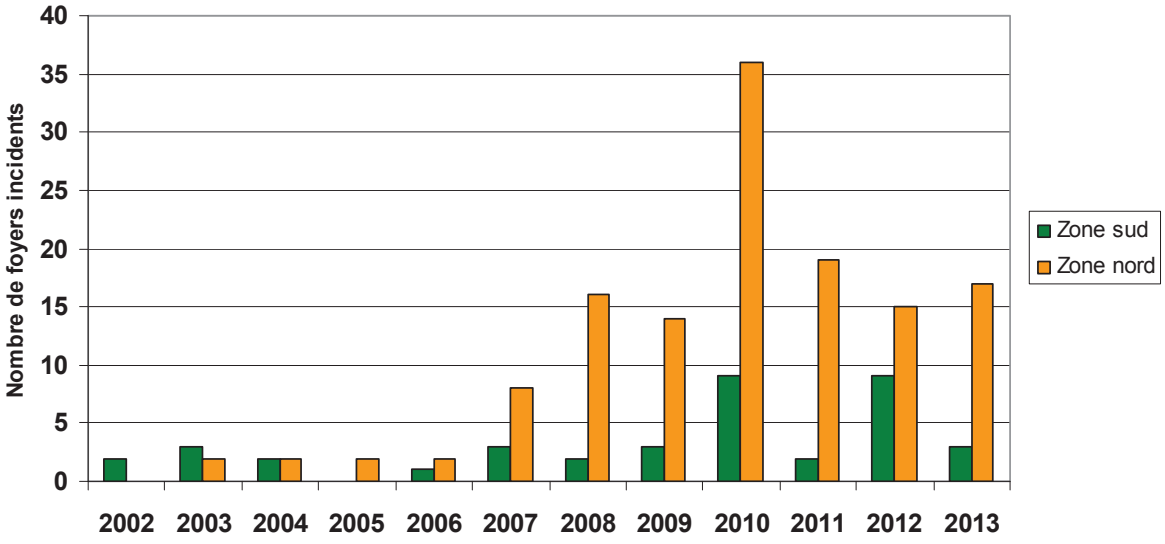


Figure 11 : évolution du nombre de foyers de tuberculose bovine en dans la partie nord et la partie sud de la zone infectée de Côte d'Or entre 2002 et 2013 (Source : DDPP 21)

3. NIVEAU D'INFECTION DE *M. BOVIS* DANS LA FAUNE SAUVAGE EN CÔTE D'OR

Nous avons souligné dans le premier chapitre que la relation hôte-pathogène était essentielle pour comprendre le rôle de chacune des populations dans le système multi-hôtes de *M. bovis* puisqu'elle informe sur des facteurs intrinsèques telles que la réceptivité, la sensibilité et apporte ainsi des éléments d'évaluation du risque de persistance et de transmission de la TB. Nous avons décrit, à partir de données bibliographiques, les modes d'infection, l'expression clinique et la capacité d'excrétion de trois espèces : le cerf, le sanglier et le blaireau, qui sont présentes dans le système multi-hôtes de la Côte d'Or. Cependant, nous avons mis en exergue que des variations vis-à-vis du statut épidémiologique pouvaient exister au sein d'une même espèce.

L'objectif est donc ici d'évaluer le niveau d'infection, c'est-à-dire le nombre d'animaux atteints et chez ceux-ci, l'ampleur et la nature des lésions.

Mon travail a consisté à traiter les données récoltées depuis plusieurs années par les services vétérinaires. Les informations disponibles incluaient les lieux (communes) et la date à laquelle les animaux ont été abattus, ce qui nous a permis d'explorer les tendances des niveaux d'infections sur le plan spatial et temporel.

La réapparition de foyers bovins depuis 2002 ainsi que la découverte d'une biche infectée par *M. bovis* tuée à la chasse en janvier 2003 a conduit à la mise en œuvre d'une surveillance programmée (active) de la tuberculose dans la faune sauvage à partir de 2003-2004 afin d'évaluer dans quelle mesure la faune sauvage était touchée par la TB. Cette surveillance a concerné les espèces *a priori* réceptives à *M. bovis* présentes en Côte d'Or : le cerf, le chevreuil, le sanglier, et les petits carnivores (renards et mustélidés, incluant le blaireau). Des ragondins ont également été analysés. La coordination des programmes de surveillance était assurée par les services vétérinaires avec l'aide de l'ONCFS et les acteurs de terrain furent les chasseurs, les piégeurs et des vétérinaires praticiens. Les analyses ont été réalisées au laboratoire départemental de Côte d'Or (LDCO) et au laboratoire national de référence (LNR).

L'échantillonnage et les méthodes diagnostiques ont évolué au fil des années, en fonction de la situation épidémiologique, des objectifs de la surveillance et des connaissances acquises sur l'épidémiologie de la tuberculose chez les espèces concernées.

A partir de 2012, les protocoles appliqués ont suivi la procédure de Sylvatub, réseau national de surveillance de la tuberculose dans la faune sauvage que nous avons présenté dans le chapitre 1. Dans la classification interne de ce réseau, la Côte d'Or a été placée en niveau de risque maximum (niveau 3) entrainant la poursuite d'une surveillance programmée de la

faune sauvage chez les cerfs, sangliers et blaireaux et une modification des méthodes diagnostiques.

Nous avons traité les niveaux d'infection espèce par espèce en suivant l'ordre chronologique de la détection des premiers cas : cerf, sanglier puis blaireau. En dernier lieu nous avons rapporté les résultats de la surveillance entreprise sur les espèces ayant *a priori* un rôle moins important dans le système multi-hôtes (chevreuils, renards et ragondins). A chaque fois, nous avons détaillé la méthodologie et les résultats par année et par zone géographique.

3.1. Protocole commun à toutes les espèces surveillées

3.1.1. **Echantillonnage**

Chez toutes les espèces, l'échantillonnage a été stratifié par zone géographique. Au sein de l'aire de répartition des foyers bovins détectés depuis 2002 formant une zone coalescente, composée de l'Auxois, de la vallée de l'Ouche et d'une partie des Hautes Côtes, deux « sous-zones » ont été définies selon des critères épidémiologiques (circulation de deux souches différentes de *M. bovis*) et des critères paysagers puisque la vallée de l'Ouche et le versant ouest des Hautes Côtes sont beaucoup plus forestiers que l'Auxois, caractérisé par un paysage bocager (cf. *supra*). En raison du continuum forestier entre la vallée de l'Ouche et ce versant des Hautes Côtes et considérant que les populations de gibier pouvaient facilement circuler entre ces deux zones, nous les avons regroupées dans la même strate géographique pour le calcul des prévalences (Figure 12).

Le reste du département a également été échantillonné d'une part afin de surveiller une éventuelle propagation de l'infection dans la faune sauvage en dehors de la zone d'infection bovine et d'autre part pour investiguer le niveau de contamination de la faune sauvage autour des quelques foyers bovins détectés en dehors de l'Auxois et de la vallée de l'Ouche.

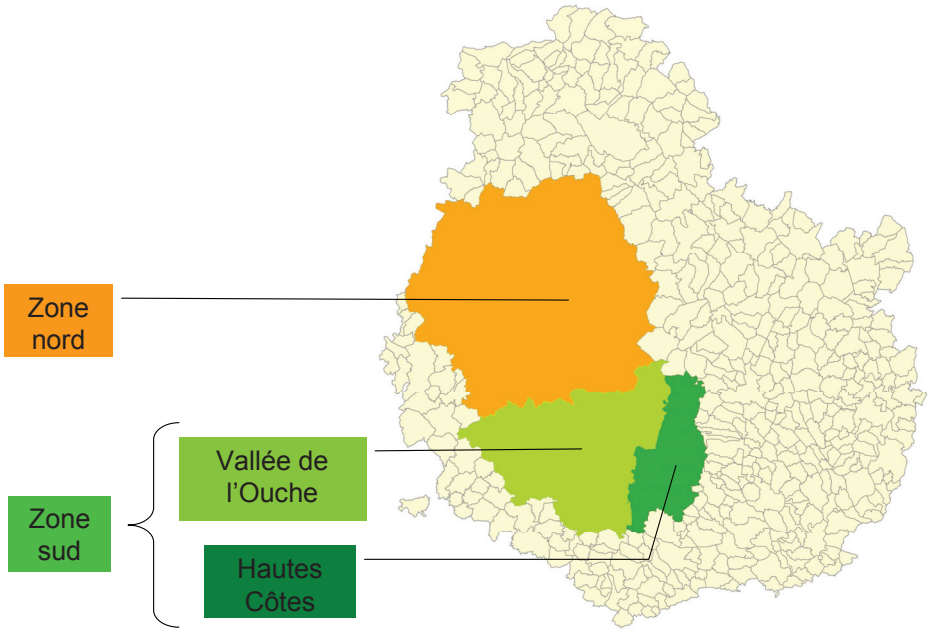


Figure 12 : répartition des différentes zones d'échantillonnage au sein de la zone infectée de Côte d'Or pour la surveillance de la tuberculose dans la faune sauvage

Pour le grand gibier (cerfs, sangliers et chevreuils), cette surveillance repose sur la collaboration d'environ 80 sociétés de chasse identifiées et coordonnées par la DDPP 21 (Direction départementale de la protection des populations de la Côte d'Or, anciennement Direction des services vétérinaires), qui mettent les carcasses ou une partie de celles-ci (tête, trachée et poumon) à disposition d'un vétérinaire vacataire chargé des inspections et des prélèvements. La période de prélèvement a donc lieu pendant la saison de chasse tous les ans entre octobre et février chaque année.

Les blaireaux analysés sont issus du piégeage encadré par arrêté préfectoral, réalisé par des piégeurs agréés et coordonné par les lieutenants de louvèterie qui appliquent le protocole établi par la DDPP21. La période de piégeage s'étend généralement de mars à septembre. Les cadavres entiers sont acheminés au LDCO pour analyse. Ils sont le plus souvent congelés pour régulariser leur flux d'arrivée au laboratoire.

3.1.2. **Méthodes diagnostiques**

3.1.2.1.Inspection des carcasses et histologie

- **Grand gibier**

Le vétérinaire vacataire réalise l'inspection des carcasses ou des organes, note les lésions macroscopiques le cas échéant, et prélève les tissus soumis à analyse.

- **Blaireau**

L'examen post-mortem du cadavre, réalisé jusqu'en 2008 par un vétérinaire vacataire, a ensuite été pratiqué au LDCO partir de 2009.

- **Pour toutes les espèces**

L'examen macroscopique des tissus est focalisé sur les nœuds lymphatiques (céphaliques, thoraciques, mésentériques et périphériques chez le blaireau) ainsi que sur les organes thoraciques. Chaque nœud lymphatique est incisé pour un examen interne. Des incisions sont également pratiquées dans le poumon, et pour le blaireau, dans le foie et les reins. Le médiastin, la plèvre et le péricarde sont également inspectés si ces organes sont présents sur la carcasse.

Si des lésions sont détectées, elles font fait l'objet d'une coloration de Ziehl et, si la taille des lésions est supérieure à 5 mm, elles sont envoyées au laboratoire d'histopathologie de Lyon pour examen microscopique et ainsi préciser la nature des lésions (évocatrices de tuberculose ou pas). Si la taille est inférieure à 5 mm, le prélèvement est gardé en priorité pour être analysé en culture et en PCR.

3.1.2.2.Préparation des prélèvements pour la culture et la PCR

Les cultures et les PCR sont réalisées sur des pools de nœuds lymphatiques composés des nœuds lymphatiques céphaliques (mandibulaires et rétropharyngiens) et thoraciques (médiastinaux et trachéobronchiques). Si une lésion est observée sur un autre organe, elle est analysée séparément.

Afin de préparer l'échantillon analysé par culture ou par PCR, 2 à 5g de tissu prélevés sont mélangés avec une solution à 4% de H_2SO_4, pendant 10 minutes puis neutralisés avec une solution de soude à 6% afin de décontaminer le tissu. Si le prélèvement est trop dégradé, le temps de contact avec la solution de H_2SO_4 est étendu à 20 minutes afin de diminuer son taux de contamination.

3.1.2.3.Culture

La culture est considérée comme la méthode de référence pour le diagnostic de l'infection à *M. bovis* dans la faune sauvage (Hénault et al. 2006; Zanella, Durand, et al. 2008; Collins 2011). Elle a donc été pratiquée de façon systématique chaque année de surveillance sur chaque animal.

Le LDCO a suivi le protocole établi par le laboratoire national de référence (NF U 47-104) pour l'isolement de *M. bovis*.

Après décontamination (voir paragraphe précédent), le surnageant est ensemencé sur trois milieux différents, Löwenstein-Jensen, Colestos et Colestos avec osséine.

Les milieux sont incubés à 37°C +/- 3°C pendant trois mois et examinés toutes les deux semaines. Les détails du protocole de la culture figurent en annexe 1.

3.1.2.4.PCR

Les PCR ont été pratiquées de façon systématique en plus de la culture à partir de 2008 et jusqu'en 2011. Dans le dispositif Sylvatub, la PCR est en effet uniquement réalisée sur les lésions évocatrices de tuberculose (Note de service DGAL/SDSPA/N2011-8214).

Après extraction et purification de l'ADN, les PCR sont faites en utilisant un coffret commercial (LSI taqvet *Mycobacterium tuberculosis* complex 2 wells), ciblant la séquence IS 6110, présente chez toutes les espèces du complexe *M. tuberculosis*. Les détails du protocole de la PCR figurent en annexe 2.

3.1.2.5.Typage des souches

Lorsqu'une mycobactérie est isolée par culture au LDCO, elle est envoyée au laboratoire national de référence (LNR, ANSES Maisons-Alfort) pour confirmation et identification de la souche.

Les souches sont génotypées au moyen de deux techniques: le spoligotypage et l'analyse VNTR. Le protocole suivi pour le spoligotypage est celui développé par Kamerbeek et al. (1997). L'analyse des profils VNTR, fondée sur l'amplification par PCR de séquences répétées sur certains locus permet d'avoir des marqueurs génétiques très spécifiques des différentes souches(Skuce et al. 2005). Les loci utilisés ont été les suivants : 2165 (ETR A), 2461 (ETR B), 577 (ETR C), 580 (ETR D), 2163 a (11a), 2163 b (11b), 3232 et 4052 (QUB26). Elle est considérée comme la méthode la plus discriminante pour différencier les souches de *M. bovis* (Roring et al. 2002; Zanella, Durand, et al. 2008).

3.1.2.6.Analyses statistiques

La culture étant la méthode de référence et la seule pratiquée de façon systématique et standardisée au cours des années de surveillance, la prévalence de l'infection a été estimée à partir des résultats de culture. Malgré l'absence probable de représentativité des échantillons inhérents aux biais de l'échantillonnage en faune sauvage (cf. chapitre1), nous avons calculé l'intervalle de confiance à 95% pour chaque valeur de prévalence. Compte-tenu du manque de sensibilité et de spécificité de la culture (cf. chapitre 1) et des biais d'échantillonnage, nous parlons de prévalence apparente. Les animaux trouvés en surveillance événementielle n'ont pas été intégrés dans le calcul de la prévalence et sont indiqués à part. Les prévalences ont ainsi été calculées pour chaque année de surveillance (saison de chasse pour le gibier et campagne de piégeage pour les blaireaux) par strate géographique (parties nord et sud de la zone infectée et reste du département).

Nous avons comparé les taux d'infection entre année et entre zone à l'aide du test de Chi 2 d'indépendance ou du test de Fisher.

Dans les paragraphes suivants, nous rapportons les méthodes spécifiques et les résultats pour chaque espèce (cerf, sanglier, blaireau, autres espèces) entre 2003 et 2013.

3.2. Niveau d'infection chez le cerf

Le cerf est la première espèce sauvage chez laquelle *M. bovis* a été isolée en Côte d'Or. Cette détection a eu lieu dans le cadre de l'inspection d'une trentaine de grands cervidés dans une société de chasse en vallée de l'Ouche en 2002-2003 suite à la réémergence de foyers bovins en 2002.

La méthodologie et les résultats présentés dans les paragraphes suivants se rapportent à la surveillance programmée mise en œuvre à partir de la saison de chasse suivante (2003-2004).

3.2.1. **Matériel et méthode**

3.2.1.1.Echantillonnage

La première zone ciblée a correspondu à la vallée de l'Ouche (zone sud), où a été découverte la première biche infectée. Les Hautes Côtes (zone sud), dont les massifs forestiers sont contigus avec la vallée de l'Ouche ont été échantillonnées à partir de 2004-2005. Le nord de la zone d'infection bovine a été inclus dans le programme de surveillance mais la taille de l'échantillon a été limitée par la faible densité des cerfs dans cette zone. Des prélèvements ont également été réalisés dans le reste du département, soit suite à la détection d'un foyer bovin, soit dans le but de surveiller si la tuberculose se propageait dans la population de cerfs à l'extérieur de la zone d'infection bovine.

3.2.1.2.Méthodes diagnostiques

Le détail des méthodes diagnostiques pratiquées chaque année figure dans le tableau 6. A noter qu'en dérogation au protocole national Sylvatub effectif à partir de 2011-2012, (qui établit que seuls les cerfs présentant des lésions doivent être prélevés et analysés) tous les cerfs, y compris ceux ne présentant pas de lésions macroscopiques, ont été prélevés et analysés en PCR et en culture même après 2011 .Cette décision a été prise par la DDPP21, qui souhaitait augmenter la sensibilité de la détection, suite à la découverte de nouveaux cas positifs en 2011.

Tableau 6 : protocole suivi pour la surveillance programmée de la tuberculose chez le cerf entre 2003 et 2013. (VO : vallée de l'Ouche ; HC : Hautes Côtes)

Année	***Echantillonnage Zone : taille échantillon***	***Méthodes diagnostiques***				
		Inspection	***Zhiel***	***Histo***	***PCR***	***Culture***
2003-04	***Zone sud*** (VO) :**110** ***Reste du département*** : **85** Prélèvements si lésions uniquement	poumons et NL Ceph, TB, Med[a]	Sur lésions	Sur lésions	non	Systématique sur pool de NL[a] et lésions
2004-05	***Zone sud*** (VO+HC) : **28+25**	poumons et NL Ceph, TB, Med[a]	Sur lésions	Sur lésions	non	Systématique sur pool de NL[a] et lésions
2005-06	***Zone sud*** (VO+HC) : **25+19** ***Zone nord*** : **11**	poumons et NL Ceph, TB, Med[a]	Sur lésions	Sur lésions	non	Systématique sur pool de NL[a] et lésions
2006-07	***Zone sud*** (VO+HC) **27+12** ***Zone nord*** **10** ***Reste du département*** : **11**	poumons et NL Ceph, TB, Med[a]	Sur lésions	Sur lésions	non	Systématique sur pool de NL[a] et lésions
2007-08	***Zone sud*** (VO+HC) : **22+15** ***Zone nord*** : **9** ***Reste du département*** : **5**	poumons et NL Ceph, TB, Med[a]	Sur lésions	Sur lésions	non	Systématique sur pool de NL[a] et lésions
2008-09	***Zone sud*** (VO+HC) : **27+9** ***Zone nord*** : **5** ***Reste du département*** : **2**	poumons et NL Ceph, TB, Med[a]	Sur lésions	Sur lésions	Systématique sur pool de NL[a] et lésions	Systématique sur pool de NL[a] et lésions
2009-10	***Zone sud*** (VO+HC) : **23+7** ***Zone nord*** : **11** ***Reste du département*** : **11**	poumons et NL Ceph, TB, Med[a]	Sur lésions	Sur lésions	Systématique sur pool de NL[a] et lésions	Systématique sur pool de NL[a] et lésions
2010-11	***Zone sud*** (VO+HC) : ***11+15*** ***Zone nord*** : **18** ***Reste du département*** : **86**	poumons et NL Ceph, TB, Med[a]	Sur lésions	Sur lésions	Systématique sur pool de NL[a] et lésions	Systématique sur pool de NL[a] et lésions
2011-12	***Zone sud*** (VO+HC) : **66+70**	poumons et NL Ceph, TB, Med[a]	Sur lésions	Sur lésions	Systématique[b] sur pool de NL[a] et lésions[b]	Systématique sur pool de NL[a] et lésions
2012-13	***Zone sud*** (VO+HC) : **51+113**	poumons et NL Ceph, TB, Med[a]	Sur lésions	Sur lésions	Systématique[b] sur pool de NL[a] et lésions	Systématique sur pool de NL[a] et lésions

[a] nœuds lymphatiques céphaliques, trachéobronchiques, médiastinaux. L'inspection et les prélèvements étaient parfois partiels lorsqu'un des tissus concernés n'étaient pas laissés à disposition du vétérinaire par les chasseurs

[b] dérogation au protocole sylvatub

3.2.2. **Résultats**

La biche infectée découverte en janvier 2003 avait été abattue sur la commune de Châteauneuf dans la vallée de l'Ouche. Elle présentait une tuberculose généralisée avec des lésions ouvertes purulentes au niveau du thorax, de l'abdomen et des mamelles (Figure 13). L'examen histologique a conclu en la présence de lésions très évocatrices de tuberculose et *M. bovis* a été isolé en culture. Les programmes de surveillance mis en œuvre à partir de la saison suivante (2003-2004) n'ont détecté aucun animal positif (quelle que soit la méthode diagnostique utilisée) jusqu'en 2011-2012 où un cerf adulte provenant des Hautes Côtes et présentant une tuberculose généralisée a été trouvé positif en PCR et en culture. Trois autres individus (dont deux abattus sur une commune très proche du cerf confirmé positif et un présentant des lésions pulmonaires) étaient positifs en PCR, mais n'ont jamais pu être confirmés en culture.

Suite à ces résultats, l'objectif d'échantillonnage sur la zone de la vallée de l'Ouche et des Hautes Côtes a été augmenté l'année suivante. En 2012-2013, deux cerfs (dont l'un présentait des lésions mésentériques mais non évocatrices de tuberculose) des Hautes Côtes ont été détectés positifs par culture. En dehors du plan de surveillance, un cerf trouvé moribond dans une pâture en vallée de l'Ouche a été analysé. Il présentait une tuberculose généralisée et s'est révélé positif en PCR et en culture.

Pour tous ces animaux positifs en culture, le spoligotype déterminé, SB0134 et le profil VNTR 6 4 5 3 6 4 3 6, correspond à la souche circulante chez les foyers bovins de la vallée de l'Ouche. Le tableau 7 détaille les résultats par année et par zone échantillonnée.

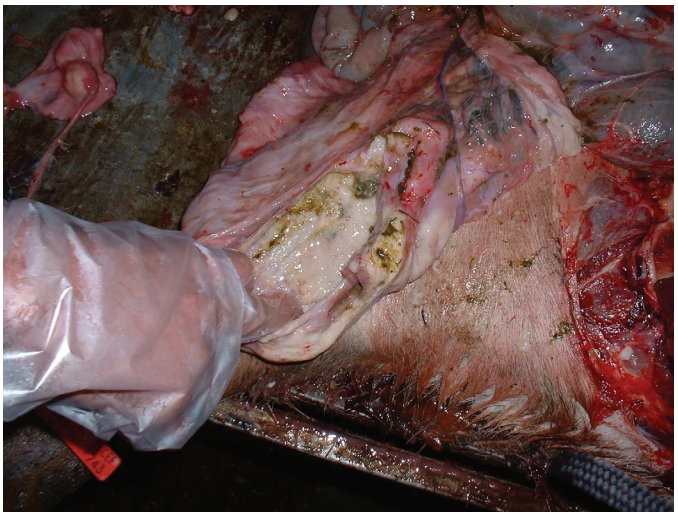


Figure 13 : lésion pulmonaire purulente sur une biche infectée par *M. bovis* (Photo : Stéphane Barbier)

Tableau 7 : résultats de la surveillance programmée et événementielle de la tuberculose chez le cerf entre 2003 et 2013 dans les zones sud et nord de l'aire d'infection et dans le reste du département (Source : DDPP21)

Année	***Zone***	***Résultats***			
		Nb Lésions[a] +/ N	***Nb PCR +/ N***	***Nb Culture + / N; prévalence apparente [IC 95%]***	***Spoligotype Profil VNTR***
2003-04	***Zone sud***	0 /110		0/110 **0% [0-3,3%]**	
	Reste du département	0/85		0/85 ; **0% [0-4,2%]**	
2004-05	***Zone sud***	0/53		0/53 ; **0% [0-6,7%]**	
2005-06	***Zone sud***	0/44		0/44 ; **0% [0-8,0%]**	
	Zone nord	0/11		0/11 ; **0% [0-28,5%]**	
2006-07	***Zone sud***	0/39		0/39 ; **0% [0-9,0%]**	
	Zone nord	0/10		0/10 ; **0% [0-30,8%]**	
	Reste du département	0/11		0/11 **0% [0-28,5%]**	
2007-08	***Zone sud***	0/37		0/37 ; **0% [0-9,5%]**	
	Zone nord	0/9		0/9 ; **0% [0-33,6%]**	
	Reste du département	0/5		0/5 ; **0% [0-52,2%]**	
2008-09	***Zone sud***	0/36	0/36	0/36 ; **0% [0-9,7%]**	
	Zone nord	0/5	0/5	0/5 ; **0% [0-52,2%]**	
	Reste du département	0/2	0/2	0/2 ; **0% [0-84,2%]**	
2009-10	***Zone sud***	0/30	0/30	0/30 ; **0% [0-11,6%]**	
	Zone nord	0/11	0/11	0/11 ; **0% [0-28,5%]**	
	Reste du département	0/11	0/11	0/11 **0% [0-28,5%]**	
2010-11	***Zone sud***	0/26	0/26	0/26 **0% [0-13,2%]**	
	Zone nord	0/18	0/18	0/18 ; **0% [0-18,5%]**	
	Reste du département	0/86	0/86	0/86 ; **0% [0-4,2%]**	
2011-12	***Zone sud***	1/116	4/116	1/116 ; **0,9% [0-4,7%]**	SB0134 6 4 5 3 6 4 3 6
2012-13	***Zone sud***	0/164 +1[b]	0/164 + 1[b]	2/164 ; **1,2% [0,1-4,3%] + 1[b]**	SB0134 6 4 5 3 6 4 3 6
Total 2003-13	***Zone sud***	1/655+1[b]	4/372+ 1[b]	3/655;**0,5% [0-1,3%] + 1[b]**	SB0134 6 4 5 3 6 4 3 6
	Zone nord	0/ 64	0/34	0/64 ; **0% [0-5,6%]**	
	Reste du département	0/200	0/99	0/200 ; **0% [0-1,8%]**	

[a] lésions évocatrices de tuberculose
[b] surveillance événementielle

3.2.3. **Discussion**

- **Méthodologie**

La prévalence d'isolement de *M. bovis* sur l'ensemble des 10 années de surveillance dans le massif de la vallée de l'Ouche et des Hautes Côtes s'élève à environ 0,5% et aucun cerf positif n'a été mis en évidence ni par culture ni par PCR, dans le nord de la zone infectée comme dans le reste du département. Les derniers isolements sont récents puisque les quatre individus positifs ont été détectés au cours des deux dernières années. Cependant, on constate que les tailles d'échantillon étaient beaucoup plus grandes ces deux dernières années que les précédentes (Tableau 7). De ce fait, il est possible que l'infection ait circulé sous le seuil de détection permis par la taille de l'échantillon jusqu'à 2011 où son augmentation a nettement amélioré la sensibilité de la surveillance. En outre, le protocole tel qu'il a été instauré en Côte d'Or n'a pas inclus l'examen ni le prélèvement systématique des nœuds lymphatiques mésentériques, qui sont pourtant, d'après l'expérience de la forêt de Brotonne, des sites préférentiels de lésions tuberculeuses chez le cerf (Zanella, Duvauchelle, et al. 2008) et sont d'ailleurs indiqués dans le protocole de Sylvatub. Ceci a pu faire baisser la sensibilité de la surveillance.

La culture est très spécifique de *M. bovis*, mais elle peut manquer de sensibilité, notamment sur les prélèvements paucibacillaires. La sensibilité de la PCR dépend également de la charge bacillaire du tissu analysé. De plus, la mise en pool des nœuds lymphatiques dilue le nombre de mycobactéries et diminue encore la sensibilité (Hars et al. 2012; Payne et al. 2013). Ainsi, en l'absence de lésions et donc sur des prélèvements paucibacillaires, la probabilité d'avoir assez de bacilles pouvant donner des résultats positifs à la fois par PCR et par culture est plus faible, ce qui peut expliquer la discordance entre les résultats de PCR et de culture. On constate ainsi que les cerfs ayant eu une tuberculose généralisée, donc présentant des tissus très riches en bacilles ont fourni des résultats positifs à la fois en PCR et en culture. En revanche, deux cerfs ne présentant pas de lésion, analysés en 2011-12 ont été trouvés positifs en PCR et pas en culture. Or l'un d'entre eux provenait de la même commune que le cerf positif en culture la même année. Dans un tel contexte, ce résultat PCR+ / culture – pourrait être interprété comme un résultat positif.

- **Aspects lésionnels et niveau d'infection**

La première biche découverte en 2003 et deux des quatre cerfs confirmés positifs par culture par la suite présentaient une tuberculose généralisée avec des lésions purulentes ouvertes. Ce résultat, concordant avec les lésions trouvées chez les cerfs de la forêt de Brotonne et dans d'autres pays, atteste de la forte sensibilité de cette population de cerfs et de la grande capacité d'excrétion de *M. bovis* des individus atteints (Lugton et al. 1998; Johnson et al. 2008; Zanella, Duvauchelle, et al. 2008; Martín-Hernando et al. 2010). La présence d'une mammite purulente, très peu décrite jusqu'à présent, observée sur la biche trouvée infectée en 2003 laisse envisager une excrétion de *M. bovis* par le lait et donc une possible transmission pseudo-verticale.

Même si le nombre d'individu positifs est très faible, on constate sur ce petit effectif une bonne corrélation lésions/infection puisque trois cerfs sur les quatre infectés étaient porteurs de lésions, comme ce qui a été par ailleurs décrit chez cette espèce en forêt de Brotonne ou en Espagne (Zanella, Duvauchelle, et al. 2008; Martín-Hernando et al. 2010).

Le niveau d'infection est en revanche très inférieur à celui rapporté dans les sites où cette espèce est considérée comme un réservoir. En forêt de Brotonne, la prévalence s'élevait en 2006 à 24% tout âge confondu et à 32% chez les adultes avant l'éradication de la population de cerfs (Zanella, Durand, et al. 2008; Hars et al. 2010). Dans le sud de l'Espagne, elle est en moyenne de 14% mais atteint localement 50% (Gortazar, Vicente, et al. 2011).

Au Royaume-Uni, où le cerf est considéré comme un hôte de liaison, le niveau d'infection dans la zone d'enzootie bovine du sud ouest de l'Angleterre, est estimé à 1,02% ([0.12-3.64%] IC95%) et est donc plus comparable à celui de la Côte d'Or (Delahay et al. 2007).

Dans la partie nord de la zone d'infection, les analyses n'ont pas mis en évidence d'individu infecté mais la taille d'échantillon n'a pas permis d'éliminer la possibilité d'une circulation à bas bruit de l'infection. Dans le reste du département, l'échantillon plus conséquent réalisé sur les 10 années témoigne d'une prévalence inférieure à 1.8%. Il faut néanmoins tenir compte de l'hétérogénéité de cet échantillonnage qui a ciblé quelques communes à l'extrême nord du département et au centre –est (zones forestières avec de fortes densités de grands cervidés).

3.3. *Niveau d'infection chez le sanglier*

Le sanglier a fait l'objet d'une surveillance programmée à partir de 2003-2004, suite à la découverte de la biche infectée de 2003 en vallée de l'Ouche.

3.3.1. **Matériel et méthodes**

Comme pour le cerf, la zone d'infection bovine a été prioritairement ciblée mais une surveillance dans la zone indemne a également été réalisée. Celle-ci a notamment été renforcée en 2009-2010 et 2010-2011 après une augmentation notable de la prévalence en 2008-2009 chez le sanglier et suite à la suspicion de foyers bovins dans l'est du département (zone de Longchamp et Lamarche sur Saône). Le nombre de sangliers échantillonnés a également été augmenté dans les Hautes Côtes en 2011-12 et 2012-13 suite à la détection de sangliers positifs dans cette zone alors qu'aucun n'avait été mis en évidence les années précédentes. Aucune stratification n'a été faite sur l'âge et le sexe des sangliers, mais la donnée étant disponible, nous avons exploré la répartition de l'infection entre les deux sexes et trois classes d'âge : moins de 1 an (jeune), entre 1 et 2 ans (subadultes), plus de 2ans (adultes).

Le détail des échantillons et des méthodes diagnostiques par année figure dans le tableau 8.

Tableau 8 : protocole suivi pour la surveillance programmée et événementielle de la tuberculose chez le sanglier entre 2003 et 2013 (VO : Vallée de l'Ouche ; HC : Hautes Côtes)

Année	***Echantillonnage Zone (taille échantillon)***	***Méthodes diagnostiques***				
		Inspection	***Zhiel***	***Histo***	***PCR***	***Culture***
2003-04	***Zone sud*** (VO) : **54**	poumons et NL Ceph, TB, Med[a]	Sur lésions	Sur lésions	non	Systématique sur pool de NL[a] et lésions
2004-05	***Zone sud*** (VO) : **20**	poumons et NL Ceph, TB, Med[a]	Sur lésions	Sur lésions	non	Systématique sur pool de NL[a] et lésions
2005-06	***Zone sud*** (VO) : **22** ***Zone nord*** : **10**	poumons et NL Ceph, TB, Med[a]	Sur lésions	Sur lésions	non	Systématique sur pool de NL[a] et lésions
2006-07	***Zone sud*** (VO+HC) : **30+5** ***Zone nord*** : **18** ***Reste du département*** (2 vallées) *:* **5**	poumons et NL Ceph, TB, Med[a]	Sur lésions	Sur lésions	non	Systématique sur pool de NL[a] et lésions
2007-08	***Zone sud*** (VO+HC) : **54+13** ***Zone nord*** : **34**	poumons et NL Ceph, TB, Med[a]	Sur lésions	Sur lésions	non	Systématique sur pool de NL[a] et lésions
2008-09	***Zone sud*** (VO+HC) : **96+11** ***Zone nord*** : **53** ***Reste du département*** : **13**	poumons et NL Ceph, TB, Med[a]	Sur lésions	Sur lésions	Systématique sur pool de NL[a] et lésions	Systématique sur pool de NL[a] et lésions
2009-10	***Zone sud*** (VO+HC) : **103+14** ***Zone nord*** : **86** ***Reste du département*** : **162**	poumons et NL Ceph, TB, Med[a]	Sur lésions	Sur lésions	Systématique sur pool de NL[a] et lésions	Systématique sur pool de NL[a] et lésions
2010-11	***Zone sud*** (VO+HC) : **64+21** ***Zone nord*** : **87** ***Reste du département*** : **217**	poumons et NL Ceph, TB, Med[a]	Sur lésions	Sur lésions	Systématique sur pool de NL[a] et lésions	Systématique sur pool de NL[a] et lésions
2011-12	***Zone sud*** (VO+HC) : **71+47** ***Zone nord*** : **72**	poumons et NL Ceph, TB, Med[a]	Sur lésions	Sur lésions	Sur lésions[b]	Systématique sur pool de NL[a] et lésions
2012-13	***Zone sud*** (VO+HC) : **55+77** ***Zone nord*** : **102**	poumons et NL Ceph, TB, Med[a]	Sur lésions	Sur lésions	Sur lésions[b]	Systématique sur pool de NL[a] et lésions

[a] nœuds lymphatiques céphaliques, trachéobronchiques, médiastinaux. L'inspection et les prélèvements étaient parfois partiels lorsqu'un des tissus concernés n'étaient pas laissés à disposition du vétérinaire par les chasseurs

[b] application du protocole sylvatub

3.3.2. **Résultats**

La répartition des animaux analysés entre 2003-2004 et 2012-2013 montre une forte concentration des prélèvements sur quelques communes au cœur de la vallée de l'Ouche et des Hautes Côtes, qui correspondent à une entité de massifs forestiers continus (la partie est de la zone sud étant séparée de ces massifs par l'autoroute A6). La répartition est plus homogène en zone nord dans l'Auxois, les sites les plus concernés par les foyers bovins ayant été privilégiés (Figure 14).

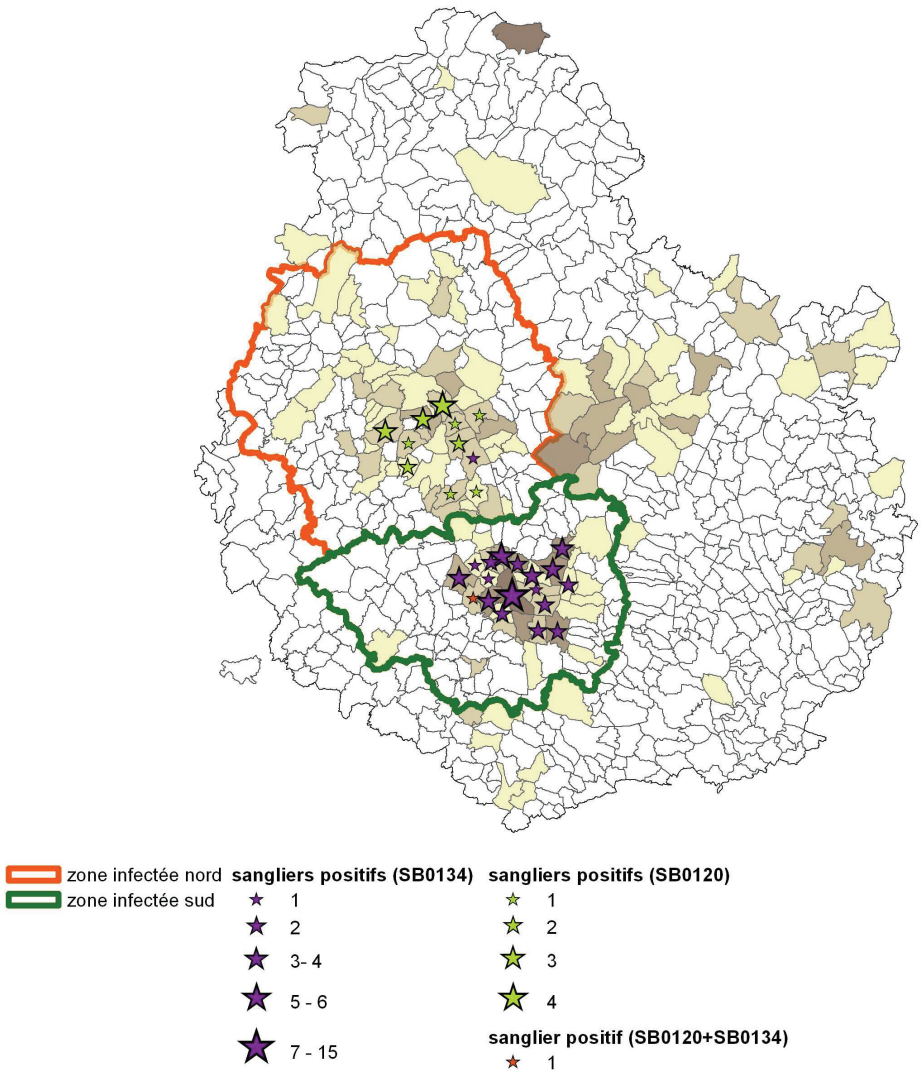


Figure 14 : nombre de sangliers analysés et nombre de sangliers positifs *M. bovis* par culture (spoligotypes identifiés) par commune entre 2003 et 2013

La réalisation des prélèvements d'organes sur le terrain n'a pas toujours permis d'obtenir tous les échantillons requis par le protocole. Un quart des prélèvements n'était constitué que d'un seul site ganglionnaire, le plus souvent pulmonaire.

Soixante dix pour cent des sangliers confirmés positifs par culture ont présenté des lésions. Entre 2004 et 2011, la valeur prédictive positive de la présence de lésions était de 47%, attestant d'une mauvaise corrélation entre la présence de lésions et l'infection.

Sur ces sangliers tuberculeux, les lésions sont préférentiellement localisées au niveau des nœuds lymphatiques céphaliques (48% des lésions observées entre 2004 et 2011) puis des nœuds lymphatiques thoraciques et du poumon. Les autres localisations sont très rares, elles concernent le foie et les nœuds lymphatiques axillaires. La présence d'un seul site lésé est majoritaire. Neuf sangliers (12% des sangliers positifs) ont présenté des lésions sur plus de deux sites, pouvant attester d'une dissémination de l'infection. La majorité des lésions sont de type caséocalcaires. Des lésions caséeuses et des abcès ont été plus rarement observés et sont le plus souvent associées aux formes généralisées. La prévalence lésionnelle a été maximale en 2008-09 où elle s'est élevée 16%.

La prévalence apparente calculée à partir des résultats de culture a varié entre 0% à 15,3% en zone sud et entre 0% et 5,9% dans la zone nord (Tableau 9 ; Figure 15). Sur les 13 années de surveillance, la prévalence dans la partie sud de la zone infectée (7,1% [5,4-9,2%] IC 95%) est plus élevée que dans la partie nord (4,0% [2,4-6,1%] IC 95%) (test du Chi2, $p < 0,01$) (Tableau 9). En vallée de l'Ouche et Hautes Côtes, on observe une augmentation de la prévalence entre 2006-2007 et 2008-2009 (test de Fisher : $p = 0,02$) et une tendance à la baisse entre 2011-12 et 2012-13 (test du Chi2, $p = 0,05$).

En 2011-12 et 2012-13, nous avons observé une tendance à l'augmentation du nombre de cas dans les Hautes Côtes par rapport aux années précédentes.

Dans le reste du département, aucun sanglier n'a été confirmé positif par culture (Figure 15). Cependant, cinq sangliers ont été trouvés positifs par PCR, tous dans la même zone à Lamarches/Saône-Longchamp, à l'est du département. *M. bovis* n'a jamais pu être isolé sur ces prélèvements et il a été conclu que ces sangliers étaient des faux positifs.

La répartition des sangliers ayant présenté des lésions n'est pas différente significativement entre mâles et femelles et entre les différentes catégories d'âge. En revanche, on observe un niveau d'infection plus élevé chez les sangliers âgés entre 1 et 2 ans (Chi2, $p=0,02$) par rapport aux autres classes d'âge.

Le génotypage des souches isolées sur les sangliers a révélé une association spatiale avec les souches circulant chez les bovins de la même zone géographique à l'exception d'un sanglier tué dans la vallée de l'Ouche, porteur de la souche SB0120, présente jusqu'ici uniquement dans la partie nord de la zone infectée (cf. Figures 10 et 14).

Tableau 9 : résultats de la surveillance programmée de la tuberculose chez le sanglier entre 2003 et 2013 dans la partie sud et la partie nord de zone infectée et dans le reste du département (Source : DDPP21)

Année	***Zone***	***Résultats***			
		Nb Lésions[a] +/ N	***Nb PCR +/ N***	***Nb Culture + / N ; prévalence apparente [IC 95%]***	***Spoligotype Profil VNTR***
2003-04	***Zone sud***	2/54		1/54 **1,8% [0-9,9%]**	SB0134 6 4 5 3 6 4 3 6
2004-05	***Zone sud***	1/20		1/20 **5,0% [0,1-24,9%]**	SB0134 6 4 5 3 6 4 3 6
2005-06	***Zone sud***	0/22		0/22 ; **0% [0-15,4%]**	SB0134 6 4 5 3 6 4 3 6
	Zone nord	0/10		0/10 ; **0% [0-30,8%]**	SB0120 5 5 4 3 11 4 5 6
2006-07	***Zone sud***	0/35		0/35 ; **0% [0-10,0%]**	SB0134 6 4 5 3 6 4 3 6
	Zone nord	0/18		0/18 ; **0% [0-18,5%]**	SB0120 5 5 4 3 11 4 5 6
	Reste du département	0/5		0/5 ; **0% [0-52,2%]**	
2007-08	***Zone sud***	5/67		4/67 ; **6,0% [1,6-14,6%]**	SB0134 6 4 5 3 6 4 3 6
	Zone nord	1/34		2/34 ; **5,9% [0,7-19,7%]**	SB0120 5 5 4 3 11 4 5 6
2008-09	***Zone sud***	17/111	10/111	17/111 ; **15,3% [9,2-23,4%]**	SB0134 6 4 5 3 6 4 3 6
	Zone nord	4/56	1/56	3/56 **5,3% [1,1-14,9%]**	SB0120 5 5 4 3 11 4 5 6
	Reste du département	3/9	0/9	0/9 ; **0% [0-33,6%]**	
2009-10	***Zone sud***	6/117	3/117	6/117 ; **5,1% [1,9-10,8%]**	SB0134 6 4 5 3 6 4 3 6
	Zone nord	5/110	3/110	3/110 ; **2,7% [0,6-7,8%]**	SB0120 5 5 4 3 11 4 5 6
	Reste du département	9/138	1/138	0/138 ; **0% [0-2,6%]**	
2010-11	***Zone sud***	6/85	4/85	7/89 ; **7,9% [3,2-15,5%]**	SB0134 6 4 5 3 6 4 3 6
	Zone nord	7/100	3/100	4/100 ; **4,0% [1,1-9,9%]**	SB0120 5 5 4 3 11 4 5 6
	Reste du département	5/204	4/204	0/204 ; **0% [0-1,8%]**	
2011-12	***Zone sud***	7/118 +1[b]	7/7[c]	14/118 **11,9% [6,6-19,1%]** +1[b]	SB0134 6 4 5 3 6 4 3 6
	Zone nord	2/72	2/2[c]	3/72 **4,2% [0,9-11,7%]**	SB0120 5 5 4 3 11 4 5 6
	Reste du département	1/207	1/1[c]	0/207 **0% [0-1,8%]**	
2012-13	***Zone sud***	9/132	4/9 [c]	5/132 **3,8% [1,2-8,6%]**	SB0134 6 4 5 3 6 4 3 6 SB0120[d] 5 5 4 3 11 4 5 6

Année	Zone	Résultats			
		Nb Lésions[a] +/ N	Nb PCR +/ N	Nb Culture + / N ; prévalence apparente [IC 95%]	Spoligotype Profil VNTR
	Zone nord	11/102	5/10 [c]	5/102 **4,9% [1,6-11,1%]**	SB0120 5 5 4 3 11 4 5 6
	Reste du département	0/200		0/200 **0% [0-1,8%]**	
Total 2003-2013	Zone sud	53/770+1[b]	17/113[c]	55/770 **7,1% [5,4-9,2%]** +1[b]	
	Zone nord	30/502	7/266[c]	20/502 **4,0% [2,4-6,1%]**	
	Reste du département	18/763	5/351[c]	**0/ 763 0% [0-0,5%]**	

[a] lésions macroscopiques évocatrices de tuberculose
[b] surveillance événementielle
[c] PCR réalisé uniquement sur les sangliers présentant des lésions (procédure sylvatub)
[d] un sanglier porteur de la souche SB0120 détecté dans la vallée de l'Ouche

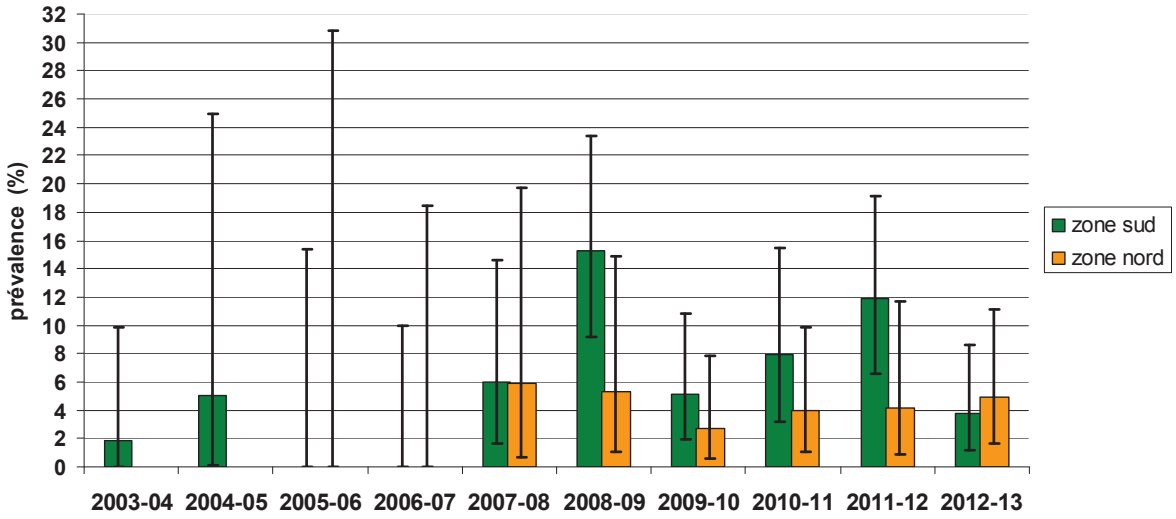


Figure 15 : évolution de la prévalence apparente de *M. bovis* (isolé par culture) chez le sanglier entre 2003 et 2013 dans la zone sud et la zone nord de l'aire infectée de Côte d'Or. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance à 95%.

3.3.3. **Discussion**

- **Méthodologie**

En zone sud, l'absence de prélèvements en dehors du massif forestier formée par la vallée de l'Ouche et les Hautes Côtes n'a pas permis de connaître le niveau d'infection dans les populations situées à l'est de l'autoroute A6 qui constitue probablement une autre population, ayant peu d'échange avec celle de ce massif.

Entre 2004-2005 et 2007-2008, la taille réduite des échantillons a fourni des résultats peu précis. Ainsi, l'absence de détections en 2005-2006 et en 2006-2007 signifie que

l'infection a pu circuler chez le sanglier avec une prévalence inférieure à 10%. La mise en évidence de sangliers tuberculeux entre 2003 et 2004 puis à nouveau 2007-2008 est d'ailleurs en faveur d'une présence continue de l'infection que le protocole n'aurait pas permis de détecter pendant deux années consécutives à cause de tailles réduites d'échantillons.

Le recrutement des sangliers pour les analyses a parfois été orienté par l'observation de lésions lors de l'ouverture de la carcasse, les sangliers porteurs de lésions visibles ont probablement été surreprésentés par rapport aux autres. Cependant, étant donné le pourcentage assez faible de sangliers à lésions sur la totalité des animaux inspectés (environ 6%) et la discrétion de ces lésions, nous pouvons supposer que ce biais de recrutement n'a probablement pas eu trop d'impact sur l'exactitude des résultats. Le fait d'avoir des prélèvements partiels (absence de certains organes prévus dans le protocole) dans 75% des cas a pu également influencer la performance de la surveillance en faisant baisser la sensibilité.

La faible charge bacillaire supposée dans les prélèvements sans lésion visible, associée à la mise en pool des nœuds lymphatiques et au processus de décontamination des prélèvements a pu diminuer la sensibilité de la culture. En conséquence les résultats de prévalence pourraient être sous-estimés.

Les résultats positifs en PCR dans la région de Lamarches s/Saône et Longchamps ont été attribués à un manque de spécificité de la PCR ciblant la séquence IS 6110 ne pouvant discriminer *M. bovis* des autres mycobactéries du complexe *tuberculosis*. En particulier, l'infection à *M. microti* a été fortement suspectée. Cette bactérie a d'ailleurs été identifiée en 2012-2013 sur un sanglier ayant obtenu un résultat positif en PCR tué en zone nord, témoignant de sa circulation chez les sangliers dans cette région.

- **Aspects lésionnels et niveau d'infection**

La prévalence lésionnelle a été faible en dehors de l'année 2008-2009 en zone sud où elle était comparable à ce qui est rapporté en forêt de Brotonne (15%) également en 2008-09 alors que la prévalence d'infection était dans cette forêt de 11%+/- 6%.

La mauvaise corrélation entre la présence des lésions et l'isolement de *M. bovis* constatée en Côte d'Or est concordante avec ce qui a été observée en forêt de Brotonne (Maeder 2008; Zanella, Durand, et al. 2008).

La localisation et la nature des lésions sont également en accord avec l'expérience de la forêt de Brotonne où les lésions sont majoritairement uniques, situées dans le nœud lymphatique rétropharyngien et de nature caséocalcaire (Zanella, Duvauchelle, et al. 2008). La présence de lésions disséminées et ouvertes comme cela est observé de façon fréquente dans le sud de l'Espagne est rare, en accord, là aussi avec les sangliers infectés de la forêt de Brotonne (Vicente et al. 2006; Martín-Hernando et al. 2007; Zanella, Duvauchelle, et al. 2008).

Les résultats montrent une augmentation de la prévalence d'infection en vallée de l'Ouche et Hautes Côtes entre 2007-08 et 2008-2009 où elle a atteint 15% suivi d'un maintien à un niveau compris entre 5 et 10% jusqu'en 2012 puis d'une baisse significative en 2012-2013 faisant passer la prévalence apparente sous la barre des 4% (Figure 15). Il est délicat, à partir de ce résultat brut de fournir une explication à cette évolution. Nous pouvons émettre l'hypothèse d'une exposition bovine accrue, d'une structure de l'échantillon surreprésentant les animaux les plus lésés ou d'une augmentation de la densité (constatée cette même année, cf. paragraphe 5). Afin de les confirmer ou les infirmer, il serait nécessaire de mettre en perspective cette évolution temporelle de l'infection des sangliers avec ces différents facteurs de risque (âge, évolution de la densité des sangliers et de la prévalence des bovins), variables qui pourraient être intégrées dans une analyse multivariée (Vicente et al. 2013). De plus, nous constatons que la prévalence de la tuberculose chez les sangliers de la zone nord est globalement significativement plus faible que celle de la zone sud alors même que la prévalence chez les bovins est plus élevée (cf. paragraphe 2). Là encore, nous pouvons émettre une hypothèse sur le rôle de la densité, plus élevée en zone sud qu'en zone nord, mais une analyse plus approfondie serait requise pour le vérifier.

Nous avons trouvé que la prévalence d'infection était plus élevée chez les animaux âgés entre 1 et 2 ans, or dans la majorité des études, les animaux les plus âgés sont les plus atteints en lien avec une exposition plus longue (Vicente et al. 2006; Zanella, Durand, et al. 2008; Vicente et al. 2013). En revanche, nous n'avons pas détecté de différences de la prévalence lésionnelle entre les catégories d'âge. Ce résultat contraste avec ceux d'Espagne où les animaux jeunes ont les lésions les plus sévères (Martín-Hernando et al. 2007) mais est concordant avec ceux de la forêt de Brotonne (Zanella, Duvauchelle, et al. 2008).

Aucun sanglier infecté n'a été détecté en dehors de la zone d'infection bovine et les résultats ont montré un partage des souches entre les sangliers infectés et les foyers bovins, suggérant un lien épidémiologique entre les 2 espèces.

Une exception a toutefois concerné un sanglier porteur d'une souche SB0120 dans la vallée de l'Ouche en 2012-2013 (Tableau 9) en dehors de la zone de circulation de cette souche, ce qui pose la question de la source de contamination de ce sanglier. Les foyers bovins les plus proches où ce spoligotype a été identifié sont localisés sur des communes situées à une dizaine de kilomètres mais de l'autre côté de l'autoroute A38. Plusieurs hypothèse peuvent être émises pour expliquer ce résultat : des bovins d'élevages foyers SB0120 ont pu pâturer dans cette zone de la vallée de l'Ouche ou des déplacements de sangliers de part et d'autre de l'autoroute (des passages sont possibles à certains endroits) ont pu survenir.

3.4. Niveau d'infection chez le blaireau

Cette partie, complétée par l'étude des niveaux d'infection dans d'autres populations de blaireaux en France a fait l'objet d'une publication (Annexe 3) :

Payne A., Boschiroli M.L., Gueneau E., Moyen J.L., Rambaud T., Dufour B., Gilot-Fromont E., Hars J.,. Bovine tuberculosis in Eurasian badgers (*Meles meles*) in France. *Eur J Wildl Res,* 2013, **59**, 331-339

La surveillance de la tuberculose chez le blaireau a démarré comme sur le cerf et le sanglier en 2003-2004, après la découverte de la première biche trouvée infectée. La tuberculose chez le blaireau n'avait jamais été mise en évidence chez cette espèce en France sauf sur un individu dans la forêt de Brotonne en 2006. Jusqu'en 2009, l'échantillon de faible effectif de blaireaux analysés constituait une strate de l'échantillonnage visant à détecter l'infection chez les carnivores incluant d'autres mustélidés et le renard. A partir de 2009, suite à l'observation de populations importantes vivant à proximité d'exploitations foyers et connaissant la situation des îles britanniques où le blaireau est un réservoir de *M. bovis*., un protocole permettant une surveillance plus sensible a été mis en place.

3.4.1. **Matériel et méthodes**

En 2004, un premier objectif d'échantillonnage a été fixé à 25 blaireaux analysés, mais aucun animal n'a été examiné au cours de cette période. En 2005, le protocole de surveillance prévoyait l'analyse de 30 carnivores répartis comme suit : 10 renards, 10 blaireaux et 10 autres mustélidés. Selon les années, cet échantillonnage fut stratifié ou non entre la partie nord et la partie sud de la zone infectée.

A partir de 2009, les animaux prélevés ont été concentrés en zone nord, surtout sur deux communes où la majorité des blaireaux ont été piégés par un éleveur ayant subi un foyer cette même année. La meilleure organisation des opérations de piégeage l'année suivante a permis de mieux équilibrer l'échantillonnage entre les deux parties de la zone infectée et le reste du département. Cependant, le piégeage reposant sur la motivation d'acteurs bénévoles, l'échantillonnage est resté dépendant de l'activité des piégeurs, plus ou moins intense selon les communes, entrainant une hétérogénéité spatiale. En 2012, suite aux préconisations de l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) (ANSES 2011), une zone de surveillance englobant les communes comprise dans un rayon de 5 km autour de la zone infectée a été définie avec un objectif de cinq blaireaux analysés par commune. En 2013, enfin, la surveillance a été renforcée dans la zone infectée, notamment autour des foyers bovins ayant connu des recontaminations.

Les méthodes diagnostiques ont consisté en l'examen post-mortem de la carcasse entière, réalisé jusqu'en 2008 par un vétérinaire vacataire, puis une culture sur un pool de nœuds lymphatiques et sur les lésions si elles étaient présentes. A partir de 2009, la taille de l'échantillon fut nettement augmentée et tous les cadavres à analyser ont été acheminés au laboratoire départemental qui procédait à l'examen post-mortem, aux prélèvements des nœuds lymphatiques et organes lésés le cas échéant, pour PCR (systématique jusqu'à 2011) et mise en culture.

Le détail de l'échantillonnage et des méthodes diagnostiques par année figurent dans le tableau 10. Pour l'année 2013, nous avons fait figurer l'échantillon réalisé jusqu'au mois de juin uniquement (les prélèvements et les analyses s'étant déroulés jusqu'en septembre) pour des raisons de disponibilité des résultats.

Tableau 10 : protocole suivi pour la surveillance programmée de la tuberculose chez le blaireau entre 2003 et 2013. (VO : vallée de l'Ouche ; HC : Hautes Côtes)

Année	***Echantillonnage Zone : taille échantillon***	***Méthodes diagnostiques***				
		Inspection	***Zhiel***	***Histo***	***PCR***	***Culture***
2005	***Zone sud*** *(VO) :* **9**	Carcasse entière	non	non	non	En cas de lésions visibles sur pool de NL[a] et lésions
2006	***Zone sud*** *(VO) :* **10**	Carcasse entière	non	non	non	Systématique sur pool de NL[a] et lésions
2007	***Zone nord*** : **23**	Carcasse entière	non	non	non	Systématique sur pool de NL[a] et lésions
2008	***Zone sud*** *(VO) :* **1** ***Zone nord*** : **3**	Carcasse entière	non	non	non	Systématique sur pool de NL[a] et lésions
2009	***Zone sud*** *(VO) :* **14** ***Zone nord*** : **258**	Carcasse entière	Sur lésions	Sur lésions	Systématique sur pool de NL[a] et lésions	Systématique sur pool de NL[a] et lésions
2010	***Zone sud*** *(VO) :* **76** ***Zone nord*** : **225** ***Reste du département*** : **253**	Carcasse entière	Sur lésions	Sur lésions	Systématique sur pool de NL[a] et lésions	Systématique sur pool de NL[a] et lésions
2011	***Zone sud*** *(VO) :* **77** ***Zone nord*** : **268** ***Reste du département*** : **8**	Carcasse entière	Sur lésions	Sur lésions	Systématique sur pool de NL[a] et lésions	Systématique sur pool de NL[a] et lésions
2012	***Zone sud*** (VO+HC) : **38+14** ***Zone nord*** : **181** ***Reste du département*** : **524**	Carcasse entière	Sur lésions	Sur lésions	Sur lésions [b]	Systématique sur pool de NL[a] et lésions
2013[c]	***Zone sud*** (VO+HC) : **5+21** ***Zone nord*** : 1**87** ***Reste du département*** : **74**	Carcasse entière	Sur lésions	Sur lésions	Sur lésions [b]	Systématique sur pool de NL[a] et lésions

[a] nœuds lymphatiques céphaliques, trachéobronchiques, médiastinaux (et périphériques à partir de 2011).
[b] application du protocole sylvatub
[c] pour 2013, nous ne présentons pas l'ensemble de l'échantillonnage réalisé mais uniquement l'échantillon réalisé jusqu'en juin pour des raisons de disponibilité des résultats

3.4.2. **Résultats**

Aucun blaireau n'a été détecté positif avant 2009 mais le protocole mis en œuvre alors était très peu sensible. A partir de 2009, la surveillance a été nettement renforcée chez cette espèce tant en terme de taille de l'échantillon qu'au niveau des méthodes diagnostiques, ces deux facteurs augmentant nettement la sensibilité de la détection. De ce fait, nous choisissons de ne traiter par la suite que les résultats mis en évidence à partir de 2009.

L'échantillonnage réalisé depuis 2009 montre une répartition des prélèvements couvrant les trois quart du département, le sud-est ayant été très peu échantillonné. Les communes les plus prélevées se situent dans les vallées de la zone nord où la prévalence chez les bovins est la plus élevée (Figure 16). La taille et la répartition de l'échantillon n'ont pas été homogènes ni spatialement, ni temporellement (Tableau 10 et Figure 16).

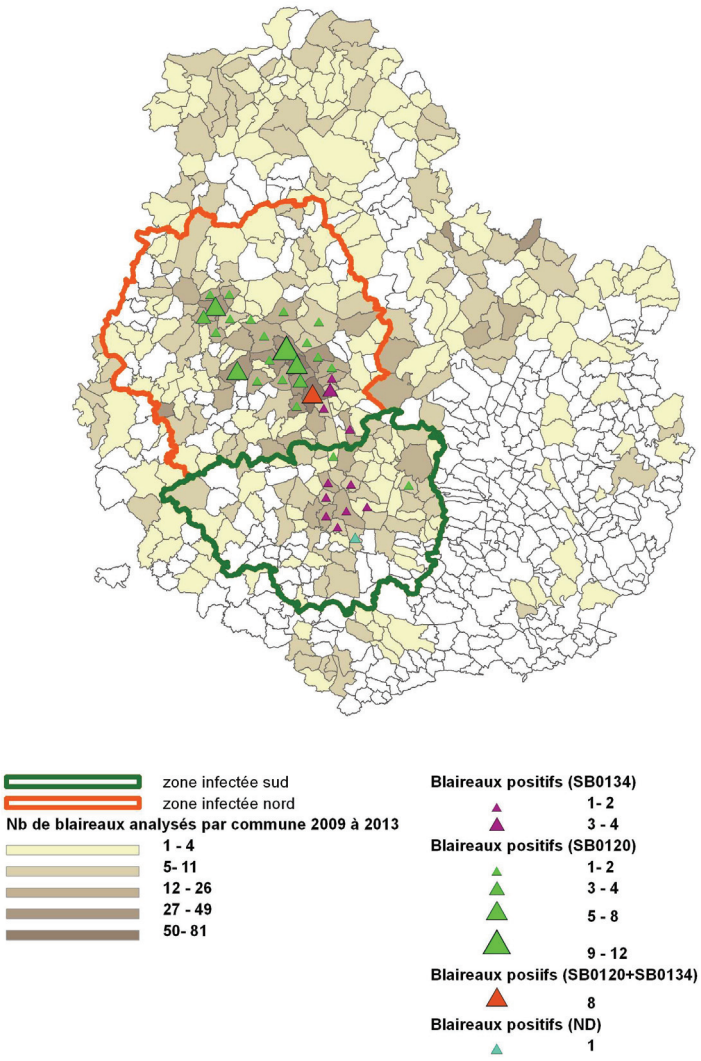


Figure 16 : nombre de blaireaux analysés et nombre de blaireaux positifs *M. bovis* par culture (spoligotypes identifiés ; ND : non déterminé) par commune entre 2009 et 2013

Sur l'ensemble des blaireaux autopsiés, seuls 2.4% ont présenté des lésions macroscopiques évocatrices de tuberculose en zone nord et 0,7% en zone sud (Tableau 11). Parmi les blaireaux ayant présenté des résultats positifs en culture, 9,4% avaient des lésions visibles. La plupart des lésions étaient localisées dans les nœuds lymphatiques céphaliques et se présentaient sous forme de petits nodules caséeux et/ou caséocalcaires. Les autres sites lésés observés chez les blaireaux infectés ont été le nœud lymphatique poplité (un blaireau), la glande salivaire (un blaireau) et le poumon (un blaireau). Ce dernier animal est le seul à avoir présenté un stade avancé de la maladie avec un abcès et une fibrose pulmonaire ainsi qu'un état cachectique.

Aucun blaireau positif n'a été détecté en dehors de la zone d'infection bovine (Figure 16). Au sein de celle-ci, on constate que la population de blaireaux est globalement plus infectée au nord qu'au sud (Chi2, p= 0,02) (Tableau 11; Figure 17). La répartition géographique des animaux positifs tend à montrer une concentration de cas positifs dans certaines vallées et dans certaines communes de la zone nord (Figure 16), la prévalence ayant atteint localement 27%, sur trois ans, dans l'une d'entre elles.

Au cours des cinq années de surveillance, la prévalence est restée stable en zone sud, compte-tenu des fluctuations d'échantillonnage, variant entre 1,8 et 6.5%. En zone nord, la prévalence s'est maintenue entre 4% et 6% puis elle a significativement augmenté entre 2012 et 2013 jusqu'au niveau de 11.8% (Chi2, p=0,02).

A l'exception d'un cas, tous les blaireaux infectés partageaient la même souche de *M. bovis* que les bovins et les sangliers de la même zone. L'exception concerne un blaireau piégé à Urcy en zone sud (Hautes Côtes) qui était porteur de la souche SB0120, circulant habituellement en zone nord.

Tableau 11 : résultats de la surveillance programmée de la tuberculose chez le blaireau entre 2009 et 2013 dans la partie sud et la partie nord de zone infectée et dans le reste du département (Source : DDPP21)

Année	***Zone échantillonnée***	***Résultats***			
		Nb Lésions[a] +/ N	***Nb PCR +/ N***	***Nb Culture + / N ; prévalence [IC 95%]***	***Spoligotype Profil VNTR***
2009	***Zone sud***	0/14	0/14	0/14 **0% [0-23.2%]**	
	Zone nord	4/258	25/258	16/258 **6,2% [3.6-9,9%]**	SB0120 5 5 4 3 11 4 5 6
2010	***Zone sud***	0/76	2/76	3/76 **3,9% [0,8-11,1%]**	SB0120 5 5 4 3 11 4 5 6
	Zone nord	2/225	11/225	14/225 **6,2% [3,4-10,2%]**	SB0134 6 4 5 3 6 4 3 6
	Reste du département	0/253	0/253	0/253 **0% [0-1,4%]**	
2011	***Zone sud***	1/77	2/77	5/77 **6,5% [3,2-8,5%]**	SB0134 6 4 5 3 6 4 3 6
	Zone nord	9/268	14/268	14/268 **5,2% [2,9-8,6%]**	SB0120 5 5 4 3 11 4 5 6
	Reste du département	0/8	0/8	0/8 **0% [0-37,1%]**	
2012	***Zone sud***	0/52		2/52 **3,8% [0,5-13,2%]**	SB0134 6 4 5 3 6 4 3 6 SB0120[c] 5 5 4 3 11 4 5 6
	Zone nord	4/181	1/4 [b]	8/181 **4,4% [1,9-8,5%]**	SB0120 5 5 4 3 11 4 5 6
	Reste du département	13/524	0/13 [b]	0/524 **0% [0-0,7%]**	
2013[d]	***Zone sud***	1/56	1/1 [b]	1/56 **1,8% [0-9,5%]**	SB0134 6 4 5 3 6 4 3 6
	Zone nord	2/187	2/2 [b]	22/187 **11,8% [7,5-17,2%]**	SB0120 5 5 4 3 11 4 5 6
	Reste du département	0/74		0/74 **0% [0-4,9%]**	
Total 2009-2013	***Zone sud***	2/275		11/275 **4,0% [2,0-7,0%]**	
	Zone nord	21/877		74/877 **8,4% [6,7-10,5%]**	
	Reste département	13/859		0/859 **0% [0-0,4%]**	

[a] lésions macroscopiques évocatrices de tuberculose
[b] PCR réalisé uniquement sur les blaireaux présentant des lésions (procédure sylvatub)
[c] un blaireau piégé dans les Hautes Côtes sur la commune d'Urcy, porteur de la souche SB0120
[d] résultats non définitifs

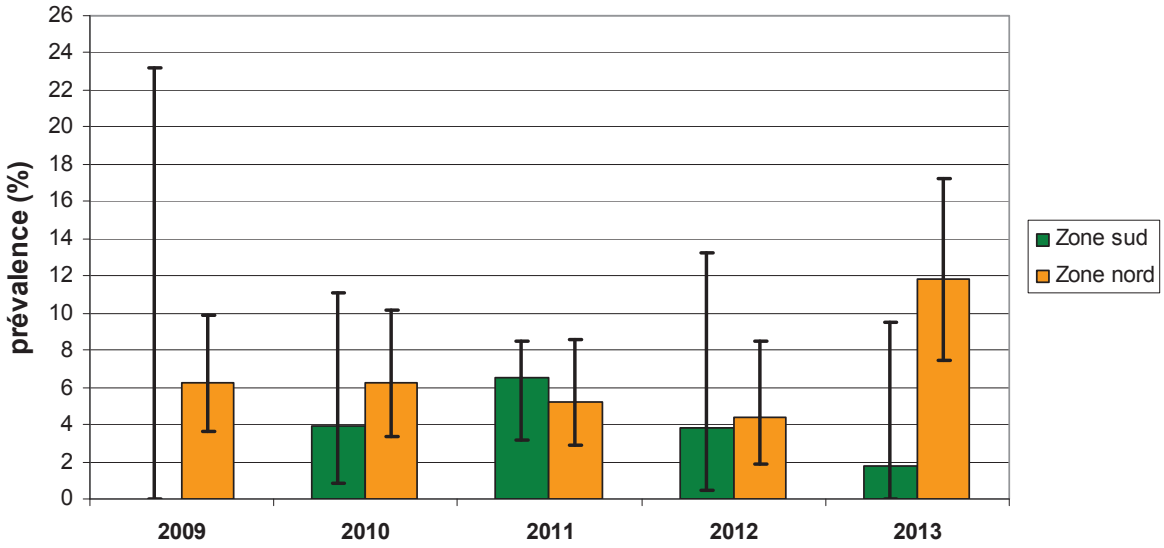


Figure 17 : évolution de la prévalence apparente d'infection à *M. bovis* (isolé par culture) chez le blaireau entre 2009 et 2013 dans la partie sud et la partie nord de la zone infectée (Source : DDPP21).

3.4.3. **Discussion**

- **Méthodologie**

Les variations dans l'échantillonnage ont été induites par le contexte épidémiologique, humain et les objectifs de la surveillance fixés par la DDPP21. Ainsi, en 2009, les animaux prélevés ont été concentrés sur quelques communes en zone nord. Puis, l'échantillonnage a été mieux réparti mais, le piégeage reposant sur la motivation d'acteurs bénévoles, l'échantillon est resté dépendant de l'activité des piégeurs, plus ou moins intense selon les communes, entrainant une hétérogénéité spatiale. En 2012, suite aux préconisations de l'ANSES (ANSES 2011), 524 blaireaux ont été prélevés en zone indemne provenant principalement de la zone de surveillance périphérique à la zone infectée. L'absence de cas détectés dans cette zone est en faveur d'une circulation de la tuberculose circonscrite à l'aire d'infection bovine. Au vu de ces résultats, il a été décidé en 2013 d'alléger la surveillance en zone indemne y compris à la périphérie de la zone infectée pour accentuer la surveillance sur les communes les plus touchées en terme de prévalence bovine et notamment là où des recontaminations avaient eu lieu, ces sites se trouvant dans la partie nord. Cette orientation de l'échantillonnage sur les secteurs les plus infectés pourrait expliquer l'augmentation de prévalence observée en 2013 en zone nord.

Il est possible que le temps limité dédié à l'autopsie dans la présente étude (moins de 30 minutes) et la sélection des tissus examinés n'aient pas permis de détecter toutes les lésions. Par exemple, jusqu'en 2011, les nœuds lymphatiques périphériques (poplités, préscapulaires et axillaires) n'étaient pas examinés alors qu'ils représentent un site préférentiel pour les lésions liées aux morsures entre congénères (Corner et al. 2010; Jenkins et al. 2012). De plus, il a été montré qu'un protocole détaillé d'autopsie, examinant

minutieusement un grand nombre de tissus, doublait quasiment la sensibilité de l'autopsie (Crawshaw et al. 2008).

La différence entre le nombre de blaireaux trouvés positifs par PCR et par culture pourrait être expliquée, en l'absence de lésions visibles dans la majorité des cas, par des échantillons paucibacillaires entrainant une probabilité faible d'obtenir un résultat positif à la fois en culture et en PCR. La faible charge bacillaire associée à la mise en pool des nœuds lymphatiques et au processus de décontamination des prélèvements a pu comme pour les autres espèces, diminuer la sensibilité de la culture. En conséquence les résultats de prévalence pourraient être sous-estimés.

- **Aspects lésionnels et niveau d'infection**

La proportion de lésions visibles chez les blaireaux infectés (9,4%) est plus faible que ce qui a été observé au Royaume-Uni où 20% à 40% des blaireaux infectés ont montré des lésions macroscopiques (Gallagher & Clifton-Hadley 2000; Jenkins et al. 2008) et en Irlande où Murphy et al. (2010) ont trouvé des lésions visibles chez 12,1% des blaireaux analysés provenant d'une large zone couvrant 16 comtés. Ce résultat est en revanche concordant avec la situation du nord de l'Espagne (Asturies et Galice principalement) où seul un blaireau sur les 121 analysés a montré une lésion macroscopique (Balseiro et al. 2011). En Dordogne/Charente, autre région de France où des cas groupés de blaireaux infectés ont été mis en évidence, la prévalence lésionnelle est plus élevée : entre 2010 et 2011, 40% des blaireaux positifs par PCR étaient porteurs des lésions macroscopiques (Reveillaud 2011; Payne et al. 2013).

Les localisations des lésions sont cohérentes avec les précédentes études conduites au Royaume-Uni et en Irlande, la cavité thoracique (poumon et nœuds lymphatiques) et les nœuds lymphatiques céphaliques étant les sites les plus fréquemment touchés, suivis des nœuds lymphatiques périphériques et de la cavité abdominale (viscères et nœuds lymphatiques mésentériques) (Gallagher & Clifton-Hadley 2000; Bourne 2007; Jenkins et al. 2008; Murphy et al. 2010; Corner et al. 2010). Comme en Angleterre, en Irlande et en Dordogne/Charente, la présence d'une seule lésion visible chez un individu est l'observation la plus fréquente. Aucune lésion n'a été détectée sur les reins, alors que cela a été rapporté en Angleterre et en Espagne. En revanche, à notre connaissance, les lésions de la glande salivaire n'ont été décrites qu'une seule fois sur un individu (Cooke 2000; Gallagher & Clifton-Hadley 2000; Bourne 2007; Sobrino et al. 2008b; Corner et al. 2010; Murphy et al. 2010; Balseiro et al. 2011; Payne et al. 2013). Les caractéristiques des lésions sont les mêmes que celles observées au Royaume-Uni et en Espagne bien que la minéralisation semble être plus fréquente qu'au Royaume-Uni (Corner et al. 2010). Aucune tuberculose généralisée n'a été détectée et seul un blaireau examiné a présenté une lésion ouverte, alors que des formes généralisées et ouvertes sont rencontrées au Royaume-Uni et qu'un tel cas a été décelé en Dordogne/Charente (Gallagher & Clifton-Hadley 2000; Corner et al. 2010; Payne et al. 2013).

A l'inverse des sangliers, la prévalence est plus élevée en zone nord qu'en zone sud, ce qui est cohérent avec une exposition à la source de contamination bovine plus importante au nord qu'au sud. Ce résultat doit également être mis en perspective avec un différentiel éventuel de densité entre les 2 zones, pouvant influer sur les contacts intraspécifiques et un différentiel de paysage pouvant influencer les contacts interspécifiques avec les bovins.

Le niveau de prévalence est bien inférieur à celui trouvé dans la zone d'infection bovine en Angleterre : la prévalence évaluée par culture au cours du RBCT (randomised badgers culling trial), conduit entre 1998 et 2006 était en effet comprise entre 1,6% et 37,2% avec une moyenne de 16,6% (Bourne 2007). En Irlande, une étude dans laquelle, quatre pools constitués de nœuds lymphatiques et d'autres organes (tête, thorax, périphérie et abdomen), étaient analysés par animal, par culture a mis en évidence une prévalence de 36,3% (Murphy et al. 2010).

En Côte d'Or, l'échantillonnage conséquent réalisé en zone de surveillance (en 2012 essentiellement) semble montrer de façon assez robuste que, jusqu'à maintenant, l'infection reste circonscrite à la zone d'infection bovine chez le blaireau. Les communes situées en dehors de cette aire mais ayant connu des foyers bovins ont été intensément échantillonnés et aucun blaireau positif n'y a été mis en évidence. Ce résultat contraste avec la situation de l'Irlande où la présence de blaireaux infectés dans des zones où la tuberculose n'a pas été observée en élevage depuis 6 ans, a été estimée à environ 15% (ANSES 2011; Gormley & Corner 2013). Ainsi, même s'il faut tenir compte de la différence de pression de surveillance entre les différents sites, on constate que les blaireaux infectés sont restés spatialement distribués à proximité des foyers bovins et que certains sites semblent agréger des forts niveaux d'infection tant chez les bovins (élevages recontaminés) que chez les blaireaux. Il serait cependant nécessaire de mieux objectiver ces « agrégats d'infection » par des analyses plus poussées comme des analyses de cluster par exemple. En Angleterre, en Irlande et en Espagne, cette association spatiale entre foyers bovins et blaireaux infectés a été démontrée (Olea-Popelka et al. 2005; Woodroffe et al. 2005; Balseiro et al. 2013).

Enfin, comme pour les cerfs et les sangliers, la quasi-totalité des spoligotypes et des profils VNTR trouvés sont communs aux blaireaux et aux bovins au sein d'un même secteur géographique. La circulation des deux souches SB0120 et SB0134 a été mise en évidence chez des blaireaux piégés sur une même commune où ces deux souches ont aussi été isolées sur des bovins. Ces résultats évoquent, comme chez le sanglier, un lien épidémiologique très étroit entre blaireaux et bovins. Ils suggèrent que les deux espèces appartiennent au même groupe d'infection et que *M. bovis* se transmet entre les deux espèces. Les mêmes conclusions ont été tirées en Espagne, au Royaume-Uni et en Irlande bien que dans ces pays, les spoligotypes sont plus diversifiés et circulent aussi de façon indépendante chez le blaireau (Olea-Popelka et al. 2005; Jenkins et al. 2007; Woodroffe et al. 2005; Furphy et al. 2012; Balseiro et al. 2013). Une exception concerne un blaireau piégé sur le secteur des

Hautes Côtes porteur de la souche SB0120 circulant dans la partie nord. Très peu d'élevages sont présents sur cette zone essentiellement forestière. Le foyer bovin le plus proche se trouve à Lantenay où la souche SB0120 a effectivement été mise en évidence en 2006 mais la distance de plus de 10 km et l'autoroute séparant les deux communes rend peu probable une contamination de blaireau auprès des bovins sur cette commune (sous réserve que les bovins infectés ne pâturaient pas plus à proximité). En revanche, la découverte en 2013 dans le secteur de la vallée de l'Ouche d'un sanglier également porteur de cette souche pose la question d'une éventuelle transmission interspécifiques entre sanglier et blaireau.

3.5. Niveau d'infection chez les autres espèces

Trois autres espèces sauvages largement présentes dans le département, le chevreuil, le renard et le ragondin, ont fait l'objet d'une surveillance de la tuberculose en Côte d'Or, dans le but de détecter une éventuelle infection ainsi de considérer leur éventuelle place dans le système multi-hôtes de *M. bovis* en Côte d'Or.

3.5.1. **Matériel et méthode**

Chez le chevreuil, une surveillance programmée de l'infection a été entreprise. Cependant la taille de l'échantillon a été petite (47 individus en zone sud et 8 en zone nord) et la surveillance a été conduite sur trois saisons de chasse seulement entre 2005 et 2011 (Tableau 12). Les méthodes diagnostiques étaient les mêmes que celles pratiquées sur le cerf et le sanglier : prélèvements par un vétérinaire des nœuds lymphatiques céphaliques et thoraciques sur les parties de carcasses laissées par les chasseurs puis PCR et culture sur pool de ces nœuds lymphatique (et sur lésion séparément le cas échéant) (Tableau 12).

Le renard a été inclus dans la surveillance programmée englobant tous les carnivores entre 2004 et 2008. A partir de la mise en place de la surveillance renforcée du blaireau en 2009, les renards n'ont plus été ciblés dans la surveillance active et l'échantillon a été constitué de façon opportuniste et événementiel par des renards piégés dans le cadre du piégeage des blaireaux, morts sur la route ou récoltés par le dispositif SAGIR. Les méthodes diagnostiques sont les mêmes que celles pratiquées sur le blaireau (Tableau 13). Aucun renard n'a été analysé en 2013.

Enfin, 27 ragondins ont été analysés entre 2009 et 2011, tous piégés dans la zone infectée. Les carcasses ont été inspectées au laboratoire puis les nœuds lymphatiques céphaliques et thoraciques mis en pool pour culture.

Tableau 12 : protocole suivi pour la surveillance programmée de la tuberculose chez le chevreuil entre 2005 et 2012

Année	***Echantillonnage Zone : (taille échantillon)***	***Méthodes diagnostiques***				
		Inspection	***Zhiel***	***histo***	***PCR***	***Culture***
2004-06 et 2010-2011	***Zone sud* : 47**	poumons et NL Ceph, TB, Med[a]	Sur lésion	Sur lésion	oui	Systématique sur pool de NL[a] et lésions
	***Zone nord* : 8**	poumons et NL Ceph, TB, Med[a]	Sur lésion	Sur lésion	oui	Systématique sur pool de NL[a] et lésions

[a] nœuds lymphatiques céphaliques, trachéobronchiques, médiastinaux

Tableau 13 : protocole suivi pour la surveillance programmée de la tuberculose chez le renard entre 2005 et 2012

Année	***Echantillonnage Zone : (taille échantillon)***		***Méthodes diagnostiques***				
			Inspection	***Zhiel***	***histo***	***PCR***	***Culture***
2005-08	***Zone sud* : 17**	Carcasse entière	non	non	non		Systématique sur pool de NL[a] et lésions
	***Zone nord* : 5**	Carcasse entière	non	non	non		Systématique sur pool de NL[a] et lésions
2009-12	***Zone sud* : 7[b]**	Carcasse entière	Sur lésions	Sur lésions	Systématique sur pool de NL[a] et lésions sauf en 2012		Systématique sur pool de NL[a] et lésions
	***Zone nord* : 32[b] +1[c]**						
	***Reste du département* : 5 [b] +1[c]**						

[a] nœuds lymphatiques céphaliques, trachéobronchiques, médiastinaux
[b] Echantillon opportuniste : renards piégés par erreur dans le cadre du piégeage des blaireaux
[c] renard récolté par le réseau SAGIR

3.5.2. **Résultats**

Aucun chevreuil n'a été détecté positif ni en PCR ni en culture et aucune lésion n'a été observée.

Deux renards ont été trouvés positifs en culture dans la partie nord. La souche identifiée était SB0120. Un autre renard, ramassé par le réseau SAGIR sur une commune limitrophe de la zone infectée, a fourni une PCR positive non confirmée par culture (Tableau 14).

Tous les ragondins testés se sont avérés négatifs.

Tableau 14 : résultats de la surveillance de la tuberculose chez le renard entre 2005 et 2012 dans la partie sud et la partie nord de zone infectée et dans le reste du département (Source : DDPP21)

Année	Zone échantillonnée	Résultats			
		Nb Lésions[a] +/ N	Nb PCR +/ N	Nb Culture + / N ; prévalence [IC 95%]	Spoligotype Profil VNTR
2005-08	Zone sud	0/17		0/17	
	Zone nord	0/5		0/5	
2009-12	Zone sud	0/7	0/7	0/7	
	Zone nord	1/33	0/32	2/33	SB0120 5 5 4 3 11 4 5
	Reste du département	0/6	1/5	0/6	
Total 2005-12	Zone sud	0/24	0/7	0/24 **0% [0-14,2%]**	
	Zone nord	1/38	0/32	2/38 **5,3% [0,6-17,7%]**	SB0120 5 5 4 3 11 4 5
	Reste du département	0/6	1/5	0/6	

3.5.3. **Discussion**

Le chevreuil est une espèce réceptive à *M. bovis*. Des cas de tuberculose chez le chevreuil ont été décrits en Suisse, en Angleterre et en Allemagne, en Espagne et en Italie (Delahay et al. 2002; Dondo et al. 2009). En Angleterre, la prévalence par isolement de la bactérie varie selon les enquêtes de 1,2 % ([0,6-2,1%] IC95%) à 2,6% ([1,05-5,29%] IC95%) (Delahay et al. 2002; Delahay et al. 2007). En France, un chevreuil a été trouvé infecté en forêt de Brotonne sur les 425 analysés dans le cadre de la surveillance programmée réalisée dans cette forêt depuis 2001 et en Dordogne, trois chevreuils ont également été trouvés positifs (Hars et al. 2012, Reveillaud com. pers.).

Dans tous les cas, le tableau lésionnel était très sévère, montrant une tuberculose généralisée disséminée à un grand nombre d'organes (nœuds lymphatiques céphaliques organes du thorax et de l'abdomen) avec des lésions de types abcédées et caséeuses (Delahay et al. 2007; Dondo et al. 2009; Reveillaud 2011). Ainsi, la faible prévalence constatée chez le chevreuil dans des sites où la pression d'infection est forte, associée à la sévérité des lésions chez les individus atteints semblent attester d'une faible réceptivité ou d'une faible exposition (en raison de son comportement alimentaire cueilleur et non brouteur) mais d'une grande sensibilité de cette espèce à la tuberculose.

En Côte d'Or, du fait de sa taille réduite, l'échantillonnage n'a pas permis une surveillance très sensible. Cependant, étant donné que les chevreuils infectés présentent la plupart du temps d'importantes lésions, il est probable que les chasseurs auraient détecté les

carcasses suspectes lors de l'ouverture de la carcasse. On peut donc en conclure que la population de chevreuils de Côte d'Or a probablement été très peu touchée par l'infection.

Le renard est également connu comme étant réceptif à *M. bovis*, se contaminant à la faveur de son régime alimentaire carnivore et nécrophage (Delahay et al. 2002). Dans les zones où les blaireaux sont infectés, le partage des terriers avec ces derniers peut aussi être une source d'infection (Delahay et al. 2002). En Angleterre, la prévalence en zone enzootique de tuberculose bovine a été estimée par isolement bactérien à 1,2% ([0,6-2,1%] IC95%) à 4,5% ([2,5-7,3%] IC95%) selon les études (Delahay et al. 2002; Delahay et al. 2007). Dans le sud de l'Espagne, une enquête sérologique a mis en évidence une séroprévalence de 3% et 11% selon les années (Martín-Atance et al. 2006). Ces valeurs sont comparables avec le résultat trouvé en Côte d'Or même si le faible nombre de renards testés n'a pas fourni un résultat très précis. Comme dans les autres pays, le tableau lésionnel est fruste avec aucune lésion macroscopique détectée (Delahay et al. 2007). Comme d'autres carnivores, le renard est considéré comme un cul de sac épidémiologique, assez exposé du fait de son régime alimentaire mais peu sensible et donc peu excréteur de la bactérie. Aucune étude n'a cependant étudié de façon précise les capacités d'excrétion chez les renards infectés en recherchant *M. bovis* dans les excrétas potentiels.

Enfin les ragondins n'ont jamais été décrits comme pouvant être réceptifs à *M. bovis*. Cinquante huit ragondins ont également été analysés en Dordogne et aucun n'a été trouvé positif (Reveillaud 2011). Il semble donc que cette espèce ne soit pas impliquée dans le système multi-hôtes de *M. bovis*.

4. CAPACITÉ D'EXCRÉTION DE *M. BOVIS* PAR LES BLAIREAUX ET LES SANGLIERS

La prévalence d'infection mesurée dans une population indique la présence et l'ampleur de l'infection au sein de cette population à un moment donné. Cependant, si cette prévalence doit être prise en compte, elle n'est pas suffisante pour juger de la capacité d'une population à être réservoir (Haydon et al. 2002). Les niveaux et les voies d'excrétion de l'agent pathogène doivent également être évalués car nous avons vu dans le chapitre 1 qu'ils conditionnaient l'efficacité de la transmissibilité directe et indirecte de l'infection entre un individu infecté et un individu réceptif (Corner 2006). La localisation et la sévérité des lésions, que nous avons traitées dans la partie précédente, sont des indicateurs des voies et des niveaux d'excrétion (Delahay et al. 2001; Corner 2006; Zanella, Duvauchelle, et al. 2008). Ainsi, la présence de lésions ouvertes purulentes et étendues entraine probablement un niveau d'excrétion plus élevé que des lésions caséocalcaires circonscrites. Cependant, la pathogénie complexe de la tuberculose, la variabilité de la réponse immunitaire de chaque hôte et la sensibilité des méthodes d'examen post-mortem peuvent rendre l'interprétation plus complexe. Ainsi, en Angleterre et en Irlande, les blaireaux infectés par *M. bovis* porteurs de lésions macroscopiques sont minoritaires mais ne sont pas considérés comme les seuls ayant la capacité d'excréter, les blaireaux porteurs de lésions microscopiques non détectées par une autopsie de routine peuvent en effet également excréter (Jenkins et al. 2008; Gavier-Widén et al. 2009). Cette capacité d'excrétion ne peut alors être objectivée qu'en recherchant *M. bovis* directement dans les excrétas d'animaux infectés.

En outre, si de telles études ont pu déjà être conduites sur cerfs, sangliers et blaireaux dans d'autres situations, elles ne sont pas forcément extrapolables à d'autres populations même si l'espèce est commune, en raison de différences de facteurs intrinsèques (facteurs génétiques, structure de la population) ou extrinsèques (contexte géographique et démographique) (cf. chapitre 1).

Cette partie a donc pour objectif de déterminer les voies et les niveaux d'excrétion de *M. bovis* par les sangliers et les blaireaux infectés de Côte d'Or, facteur qui sera pris en compte pour évaluer d'une part le risque de constitution de réservoir par ces populations et, d'autre part, pour estimer le risque de transmission aux bovins. Lorsque ce travail a débuté en 2011, aucun cerf positif n'avait été détecté depuis 2003, cette espèce n'a donc pas été incluse dans cette étude.

J'ai mis en place et coordonné le protocole de cette étude dans le cadre de la thèse. Les prélèvements (sauf pour les sangliers cf. *infra*) et les analyses ont été réalisés au laboratoire départemental de Côte d'Or (LDCO) (par l'équipe en charge des analyses

vétérinaires) et à l'INRA (Institut national de recherche agronomique) de Dijon (par une stagiaire de Master 1, Céline Fossot et une doctorante, Elodie Barbier). Le laboratoire national de référence pour la tuberculose animale (LNR, ANSES Maisons-Alfort) a également collaboré et a réalisé une partie des analyses (cf. *infra*).

4.1. Matériel et méthode

4.1.1. **Echantillonnage**

4.1.1.1.Sangliers

Les sangliers ont été prélevés au cours de la saison de chasse 2011/2012. Comme pour les blaireaux l'échantillon a été constitué des animaux prélevés dans le cadre de la surveillance programmée. Cependant, tous n'ont pas fait l'objet de prélèvements pour analyse d'excrétas, soit en raison de la mauvaise qualité de conservation de la carcasse, soit par manque de moyens humains. Parmi ces animaux, l'analyse des excrétas a porté sur ceux ayant fourni un résultat positif en PCR et/ou en culture, soit au total 7 animaux.

4.1.1.2.Blaireaux

Les prélèvements ont été réalisés au cours de la campagne de piégeage 2011. Les animaux prélevés étaient issus du même échantillonnage que ceux de la surveillance programmée, exposé dans la partie précédente. Ainsi, environ 300 blaireaux analysés au LDCO et provenant de la zone infectée ont fait l'objet de prélèvements d'excrétas. Les analyses ont ensuite été réalisées sur les blaireaux ayant fourni un résultat positif en PCR et/ou en culture. Au total 25 blaireaux ont été inclus dans l'analyse.

4.1.2. **Prélèvements**

4.1.2.1.Sangliers

Les sangliers ont été prélevés sur le terrain par un vétérinaire (le vétérinaire dédié aux prélèvements de gibier dans le cadre de la surveillance programmée ou moi-même) ou un assistant. Les prélèvements avaient lieu le lundi sur des animaux chassés au cours du week-end précédent. Trois prélèvements étaient réalisés :

- la glande salivaire;
- un écouvillon laryngé;
- un écouvillon trachéal.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, ces prélèvements n'ont pas été réalisés de façon systématique et les écouvillons ont été effectués de façon plus inconstante par rapport à la glande salivaire en raison de l'état de conservation ou de l'absence de trachée ou de manque de temps de l'opérateur.

Ces prélèvements étaient ensuite acheminés rapidement en frais au LDCO qui les congelait avant analyse.

4.1.2.2.Blaireaux

Les prélèvements ont été effectués au LDCO lors de l'examen post-mortem. Sur chaque animal, étaient réalisés :

- un prélèvement de 2 à 5g de glande salivaire;
- un écouvillonnage trachéal réalisé sur toute la longueur de la trachée après ouverture de celle-ci;
- un prélèvement d'urine directement dans la vessie au moyen d'une pipette stérile. Si celle-ci était vide, un morceau de rein (5g) était prélevé;
- un prélèvement de 2 à 5g de fèces pris dans le rectum.

Ces prélèvements ont été conservés par congélation avant d'être analysés. Une partie des analyses a été réalisée au LDCO et une autre partie à l'INRA de Dijon (Pôle microbiologie environnementale et risque sanitaire).

4.1.3. **Préparation pour la PCR**

4.1.3.1.Fèces

Pour chaque animal, une première étape de lyse (lyse mécanique, thermique et chimique) était pratiquée à l'INRA sur 2g de fèces (Ranjard et al. 2003). Après centrifugation, le lysat récupéré était purifié par précipitation des protéines avec de l'acétate de potassium. Puis, à partir de 1ml de ce lysat, l'ADN était extrait et purifié à l'aide du kit MagVet (LSI, France) utilisé sur un automate d'extraction King Fischer 96 (Thermo Scientific, France). La quantité d'ADN extraite était ensuite mesurée par dépôt et migration sur gel d'agarose et comparaison à une gamme étalon.

En fonction de la quantité ainsi obtenue, différentes dilutions (1 ng/µL, 5 ng/µL et 10 ng/µL) ont été réalisées afin de rechercher le meilleur compromis entre une concentration suffisante d'ADN et une limitation de la quantité des composés pouvant inhiber les réactions de PCR.

4.1.3.2.Glandes salivaires et rein

Ces prélèvements ont été préparés de la même façon que les tissus (pool de nœuds lymphatiques et tissus lésés) analysés par PCR pour connaître le statut infectieux des animaux. (cf. paragraphe 3.1.2.2. et annexe 1). Ainsi, 2 à 5g de tissu prélevés ont été mélangés avec une solution à 4% de H_2SO_4, pendant dix minutes puis neutralisés avec une solution de soude à 6%, afin de décontaminer le tissu. Si le prélèvement était trop dégradé, le temps de contact avec la solution de H_2SO_4 était étendu à vingt minutes afin de diminuer son taux de contamination. L'ADN était ensuite extrait l'aide du kit MagVet (LSI, France) comme décrit pour les fèces (utilisation du King Fisher).

4.1.3.3.Urine

Aucune décontamination n'a été pratiquée sur l'urine. Après une lyse chimique et mécanique, l'ADN a été extrait des échantillons prélevés l'aide du kit MagVet (LSI, France) comme décrit précédemment (utilisation du King Fisher).

4.1.3.4.Ecouvillons trachéaux et laryngés

Les écouvillons ont été immergés dans une solution de PBS (Phosphate Buffered Saline) afin de mettre le prélèvement en phase liquide. Les étapes étaient ensuite les mêmes que pour l'urine : lyse chimique et mécanique puis extraction et purification de l'ADN comme décrit précédemment (utilisation du King Fisher).

4.1.4. **PCR**

Trois PCR différentes ont été réalisées (Tableau 15).

- PCR ciblant la séquence IS*6110*, spécifique des bactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) mais des séquences homologues sont également retrouvées dans d'autres bactéries du sol non tuberculeuses (Huard et al. 2003). Le nombre de copies de cette séquence dépend de la souche de *M. bovis*, cette donnée n'est pas connue pour les souches présentes en Côte d'Or mais dans la plupart des cas documentés, cette séquence est monocopie (ML Boschiroli com. pers.). L'extraction a été réalisée au LDCO avec le kit commercial LSI (kit LSI taqvet *Mycobacterium tuberculosis* complex 2 wells) sur tous les excrétas sauf les fèces. Il n'a en effet pas été jugé pertinent de tester les fèces, potentiellement très riches en mycobactéries, avec cette PCR du fait de son manque de spécificité sur les matrices environnementales.

- PCR ciblant la séquence IS*1561*, présente chez tous les membres du MTBC sauf *M. microti* (Huard et al. 2003). Cette séquence se trouve en une seule copie dans le

génome de *M. bovis* (ML Boschiroli, com. pers.).Elle a été réalisée à l'INRA de Dijon sur tous les excrétas.

- PCR ciblant la séquence RD4, présente chez tous les membres du MTBC sauf chez *M. bovis* (Huard et al. 2003). Cette PCR a été modifiée par l'INRA de Dijon pour cibler la séquence encadrant cette zone délétée chez *M. bovis* (Elodie Barbier, com. pers.). La séquence visée se trouve *a priori* en une seule copie dans le génome de *M. bovis* (Elodie Barbier, com. pers.). Elle a été réalisée à l'INRA de Dijon sur les fèces uniquement.

Ces trois PCR sont des PCR TaqMan en temps réel qui présentent une meilleure spécificité que la PCR classique tout en limitant les risques de contamination car les produits de PCR ne sont pas manipulés après la phase d'amplification comme par exemple sur une PCR nichée (Blieux 2011). La quantification est réalisée à partir de la valeur des Ct (« cycle threshold », nombre de cycles d'amplification seuil), par comparaison à une gamme étalon. Cependant, seules les PCR réalisées à l'INRA (IS*1561* et RD4) ont pu fournir des résultats quantitatifs, le LDCO ne disposant pas de gamme étalon et n'étant pas habilité à rendre un résultat autre que qualitatif (présence ou absence de détection de l'ADN à partir d'une valeur seuil des Ct de 40).

La composition du mélange réactionnel et le détail du protocole (cycle de dénaturation, durée et température des cycles de PCR) utilisés pour les différentes PCR figurent en annexe 2 et 4.

Pour chaque PCR, 5 µL de solution d'ADN extrait des différents échantillons ont été utilisés. La quantité d'ADN est rapportée par gramme pour les fèces et par puits de PCR (qui contiennent chacun 5 µL de solution d'ADN) pour les autres excrétas.

4.1.5. **Typage génétique des souches**

A partir de l'ADN extrait à partir des excrétas (à l'exception des fèces), un spoligotypage a été réalisé au LNR selon le même protocole que celui réalisé sur les souches isolées des tissus (cf. paragraphe 3.1.2.5.).

Une synthèse du protocole figure dans le tableau 15.

Tableau 15 : préparation des échantillons et PCR réalisés sur les excrétas analysés

	Blaireau		***Blaireau et sanglier***	
	Fèces	***Urine***	***Ecouvillon trachéal ou laryngé***	***Glande salivaire et reins[a]***
Préparation à la PCR	***1**-lyse* ***2**-extraction et purification de l'ADN* ***3**-quantification de l'ADN et dilution*	***1**-lyse* ***2**-extraction et purification de l'ADN*	***1**-mise en solution avec PBS* ***2**-lyse* ***3**-extraction et purification de l'ADN*	***1**-décontamination* ***2**-lyse* ***3**-extraction et purification de l'ADN*
PCR réalisé (Quantification : O/N)	*IS*1561 *(O)* *RD4 (O)*	*IS*6110 *(N)* *IS*1561 *(O)*		
Spoligotypage	*non*	*oui*		

[a] pour le blaireau uniquement en l'absence d'urine dans la vessie

4.2. Résultats

4.2.1. **Sangliers**

Par application de la procédure Sylvatub (Note de service DGAL/SDSPA/N2011-8214 cf. paragraphe 3.1.2.4.), seuls les sangliers présentant des lésions visibles avaient fait l'objet d'une PCR, tous ces sangliers ayant présenté des lésions ont été positifs en culture (Tableau 16). Sur les dix huit sangliers positifs en culture seuls sept sangliers avaient subi des prélèvements d'excrétas. Sur ces sept sangliers, un seul a été analysé sur les trois excrétas avec les deux PCR comme prévu par le protocole. Un autre animal a fait l'objet de toutes les analyses excepté la PCR IS*1561* sur les glandes salivaires. Pour les cinq autres, les analyses ont été partielles (Tableau 16).

M. bovis a été détecté sur l'un des excrétas pour trois sangliers, l'un sur la glande salivaire, un autre dans le mucus trachéal et un dans le mucus laryngé. Le résultat est concordant entre la PCR IS*6110* et IS*1561* pour six analyses sur les sept où elles ont été réalisées sur le même excréta. L'analyse discordante concerne le mucus laryngé pour lequel la PCR est positive en PCR IS*6110* et négative en PCR IS*1561* mais le typage génétique confirme le résultat positif. Le résultat quantitatif fourni sur la glande salivaire fait état d'environ 10^2 copies par puits de PCR. Enfin, tous les spoligotypes trouvés sur les ADN provenant d'excréta sont en accord avec les spoligotypes identifiés sur les souches isolées par culture sur les tissus (Tableau 16).

Tableau 16 : statut infectieux et résultats de la détection de *M. bovis* dans les excrétas des sangliers

Id sanglier	INFECTION			EXCRETION						
				Glande salivaire		Mucus laryngé		Mucus trachéal		
	Lésions visibles	*Résultat PCR*	*Résultat culture (spoligotype)*	IS *6110*	IS*1561* : nb copies/puit PCR[a]	IS *6110*	IS*1561* : nb copies/puit PCR[a]	IS *6110*	IS*1561* : nb copies/puit PCR[a]	Spoligotype (excréta ayant permis l'identification)
146	*NL RP*[b]	Pos	*Pos (SB0120)*	*Neg*	*Non réalisé*	*Non réalisé*	*Non réalisé*	*Non réalisé*	*Non réalisé*	*Neg*
199	*NL RP*[b]	Pos	*Pos (SB0120)*	*Neg*	*Non réalisé*	*Non réalisé*	*Non réalisé*	*Non réalisé*	*Non réalisé*	*Neg*
246	*NL RP*[b]	Pos	*Pos (SB0134)*	*Pos*	*101*	*Neg*	*Neg*	*Non réalisé*	*Non réalisé*	*SB0134 (glande salivaire)*
293	*non*	*Non réalisé*[c]	*Pos (SB0134)*	*Neg*	*Non réalisé*	Pos	*Neg*	*Neg*	*Neg*	*SB0134 (mucus laryngé)*
294	*non*	*Non réalisé*[c]	*Pos (SB0134)*	*Neg*	*Non réalisé*	*Non réalisé*	*Non réalisé*	*Non réalisé*	*Non réalisé*	Neg
382	*non*	*Non réalisé*[c]	*Pos (SB0134)*	*Neg*	*Non réalisé*	*Non réalisé*	*Non réalisé*	*Non réalisé*	*Non réalisé*	Neg
494	*NL ceph*	Pos	*Pos (SB0134)*	*Neg*	*Neg*	*Neg*	*Neg*	*Neg*	*Neg*	*SB0134 (mucus trachéal)*

[a] calculé à partir de la valeur la plus basse de Ct parmi les valeurs obtenues pour les différentes dilutions
[b] NL RP: nœuds lymphatiques rétropharyngiens
[c] application de la procédure Sylvatub

4.2.2. **Blaireaux**

Sur les vingt huit blaireaux dont le statut infectieux pour *M. bovis* était positif en PCR et/ou culture, vingt sept ont été prélevés pour analyse des excrétas et vingt cinq ont pu être soumis à toutes les analyses prévues au protocole (deux blaireaux n'ayant pas été testés à l'INRA et donc n'ayant pas été analysés en PCR *1561* ni testés sur les fèces).

Quatorze blaireaux ont fourni un ou plusieurs résultats positifs aux différentes analyses. Cinq d'entre eux avaient un statut infectieux positif en culture et en PCR sur les pools ganglionnaires analysés dans le cadre de la surveillance, cinq étaient positifs en culture et négatifs en PCR et quatre étaient positifs en PCR et négatifs en culture (Tableau 17). Les résultats des PCR IS*6110* et IS*1561* réalisées sur les glandes salivaires, le mucus trachéal et l'urine concordent dans 93% des cas (70/75 analyses). Les résultats discordants font toujours état d'un résultat positif en PCR IS*6110* et négatif en PCR IS*1561*. Cependant, dans ces cas, les résultats positifs de la PCR IS*6110* sont tous confirmés par le typage génétique réalisé sur l'ADN issu de ce même excréta (Tableau 17). Celui-ci a fourni un résultat positif permettant l'identification du spoligotype sur sept blaireaux et un résultat partiel, identifiant *M. bovis* sans pouvoir déterminer le spoligotype, dans cinq cas. Ce typage a parfois fourni un résultat positif ou partiel alors qu'aucune PCR réalisée sur les excrétas n'avait détecté *M. bovis* (Blaireaux 809 et 947). Le spoligotype trouvé sur ces ADN est identique à celui obtenu sur la souche isolée par culture sur pool de nœuds lymphatiques ou lésions (lorsque celle-ci a pu être cultivée), sauf dans un cas (blaireau 944). Sur ce blaireau la souche isolée par culture est de spoligotype SB0120 alors que celui trouvé sur l'ADN issu des glandes salivaires est SB0134. Un blaireau (Bl 761) a fourni un résultat positif (sur au moins une des deux PCR réalisée pour chaque excréta) sur les quatre excrétas testés, un autre a été détecté positif sur trois excrétas (glandes salivaires, urine et fèces). Cinq blaireaux ont présentés deux excrétas positifs, le plus souvent, mucus trachéal et fèces. Enfin, six blaireaux ont montré un résultat positif sur un seul excréta (Figure 18). Les fèces sont le plus fréquemment positifs avec une occurrence de sept blaireaux, puis l'urine (six blaireaux) et enfin le mucus trachéal et la glande salivaire (cinq blaireaux) (Figure 18).

Sur les fèces, les résultats sont concordants entre les PCR IS*1561* et RD4 sur vingt trois blaireaux sur vingt cinq. Les nombres de copies, donnés à titre indicatif, varient fortement entre les deux systèmes de détection utilisés (Tableau 17) : de $2{,}85.10^4$ à $2{,}07.10^6$ pour la PCR IS*1561* et de $2{,}16x10^2$ à $7{,}20x10^2$ pour la PCR RD4. Dans l'urine, le nombre de copies par puits de PCR est compris entre 5 et 1917. Enfin, dans le mucus trachéal, le nombre de copie par puits de PCR a été quantifié à 76 et 176 pour les 2 blaireaux trouvés positifs avec la PCR IS*1561* (Tableau 17).

Tableau 17 : statut infectieux et résultats de la détection de *M. bovis* dans les excrétas de blaireaux ayant fourni au moins un résultat positif

Id blaireau	INFECTION			EXCRETION								
				Glande salivaire		Mucus trachéal		Urine		Fèces		
	Lésions visibles: localisation	Résultat PCR	Résultat culture (spoligotype)	IS 6110	IS1561 : nb copies/puit PCR[a]	IS 6110	IS1561 : nb copies/puit PCR[a]	IS 6110	IS1561 : nb copies /puit PCR[a]	IS1561: nb copies/g[a]	RD4 : nb copies/g[a]	Spoligotype (excréta ayant permis l'identification)
597	non	Neg	**Pos (SB0134)**	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	**$2,85x10^4$**	Neg	**SB0134 (mucus trachéal)**
608	non	Neg	**Pos (SB0120)**	Neg	Neg	**Pos**	**176**	Neg	Neg	**$1,75x10^5$**	**$2,52x10^2$**	**SB0120 (mucus trachéal)**
671	non	Neg	**Pos (SB0120)**	Neg	Non réalisé	Neg	Non réalisé	Non réalisé	Non réalisé	Non réalisé	Non réalisé	**Partiel[b] (glande salivaire)**
719	non	Neg	**Pos (SB0134)**	Neg	Neg	Neg	Neg	**Pos**	**1917**	**$2,94x10^5$**	**$2,16x10^2$**	**SB0134 (urine)**
761	**glande salivaire**	**Pos**	**Pos (SB0134)**	**Pos**	Non réalisé	**Pos**	**76**	**Pos**	**61**	**$2,95x10^5$**	**$2,52x10^2$**	Neg
809	non	**Pos**	**Pos (SB0134)**	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	**SB0134 (glande salivaire)**
813	non	**Pos**	Neg	**Pos**	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	**SB0120 (glande salivaire)**
850	non	Neg	**Pos (SB0120)**	Neg	Neg	Neg	Neg	**Pos**	**5**	Neg	Neg	Neg
890	non	**Pos**	**Pos (SB0120)**	Neg	Neg	Neg	Neg	**Pos**	**9**	Neg	Neg	**SB0120 (urine)**
930	non	**Pos**	**Pos (SB0120)**	Neg	Neg	**Pos**	Neg	Neg[c]	Neg[c]	**$2,08x10^5$**	Neg	**Partiel[b] (mucus trachéal)**
934	non	**Pos**	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	**Partiel[b] (urine)**
944	non	**Pos**	**Pos (SB0120)**	**Pos**	Neg	Neg	Neg	Pos[c]	Neg	**$2,07x10^6$**	**$7,20x10^2$**	**SB0134 (glande salivaire)**
947	non	**Pos**	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	**Partiel[b] (glande salivaire)**
956	non	**Pos**	Neg	Neg	Neg	**Pos**	Neg	Neg	Neg	**$5,57x10^5$**	**$3,60x10^2$**	**Partiel[b] (mucus trachéal)**

[a] calculé à partir de la valeur la plus basse de Ct parmi les valeurs obtenues pour les différentes dilutions
[b] profil partiel : identification de *M. bovis* mais pas du spoligotype
[c] analyse réalisé sur un échantillon de rein

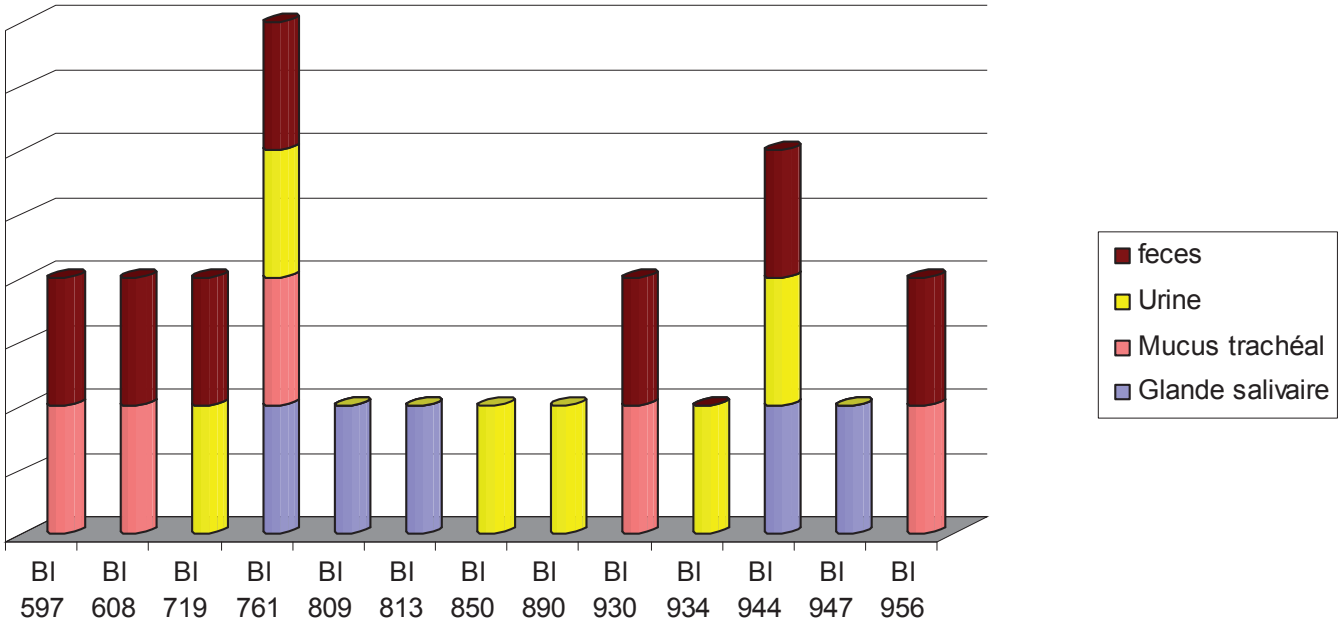


Figure 18 : excrétas ayant fourni un résultat positif à au moins l'une des PCR ou par typage génétique par blaireau analysé

4.3. Discussion

➢ Méthodologie

Cette étude est la première décrite à utiliser trois PCR, ciblant des séquences génétiques différentes, sur des prélèvements biologiques pour la recherche de *M. bovis* dans les excrétas de blaireaux et de sangliers.

Les performances individuelles de chaque PCR utilisées sur ce type de prélèvement et suivant ce protocole ne sont pas connues. Une précédente étude avait évalué la sensibilité et la spécificité de la PCR IS*6110* sur des échantillons de tissus issus d'animaux de différentes espèces (cerfs, chevreuils, sangliers et blaireaux) provenant de la forêt de Brotonne, lors du pic de prévalence en 2006, à respectivement 81,5% et 98,1% (Hénault et al. 2006). La PCR ciblant la séquence IS*1561* a été testée sur des microcosmes de sol préalablement inoculés avec une quantité connue de bactéries. Les résultats montrent un seuil de détection de l'ordre de 10^3 *M. bovis* / g sol et un rapport de 10^2 entre la quantité inoculée et la quantité détectée par la PCR (E. Barbier com. pers.).

De par l'aptitude conjointe des PCR à discriminer *M. bovis* et grâce à la confirmation réalisée par le typage génétique, nous pouvons faire l'hypothèse d'une bonne spécificité du diagnostic.

Les quantités de copies trouvées par les PCR quantitatives sont plus difficilement interprétables. Pour les fèces de blaireaux, la PCR RD4 fournit des quantités de

l'ordre de 10^2, voire des résultats négatifs quand les résultats de PCR IS*1561* sont positifs avec des quantités d'ADN détectés de l'ordre de 10^4 à 10^5. Considérant que ces deux séquences seraient monocopies dans le génome de la bactérie et sachant que l'ADN analysé avec la PCR RD4 a été extrait selon un mode opératoire différent des autres PCR, *a priori* moins efficace (ce constat a pu être fait auparavant sur d'autres échantillons en quantifiant l'ADN extrait), il est probable que cette méthode d'extraction ait généré une quantité plus limitée d'ADN, baissant ainsi la sensibilité de la PCR RD4.

D'autre part, il n'y a pas eu de test expérimental préalable sur ce type de substrat comparant une quantité inoculée connue à la quantité retrouvée en PCR. De ce fait, les chiffres fournis ne peuvent pas être interprétés en valeur absolue mais peuvent en revanche être comparés entre différents blaireaux sur les mêmes excrétas.

Les limites méthodologiques sont donc importantes pour ce qui concerne les résultats quantitatifs de cette étude.

- **Excrétion chez le sanglier**

Les contraintes logistiques ont conduit à ne pouvoir analyser qu'un faible effectif de sangliers et de ne tester les excrétas que partiellement. A partir de ces analyses partielles réalisées sur sept animaux, trois d'entre eux ont présenté un résultat positif sur un excréta différent pour chacun: glande salivaire, mucus trachéal et mucus laryngé, tous confirmés par le typage génétique.

La qualité médiocre des prélèvements a probablement contribué à diminuer la sensibilité des PCR. Contrairement aux blaireaux, les sangliers n'ont pas été prélevés directement à l'ouverture de la carcasse mais sur des parties de la carcasse découpées par les chasseurs et laissées à température ambiante pendant un à deux jours avant la réalisation du prélèvement.

Chez les sangliers, il a été montré en Espagne que le poumon était l'organe contenant le plus de bacilles, même en l'absence de lésions macroscopiques. En conséquence, l'excrétion d'aérosols peut survenir par voie respiratoire via le nez et la bouche (Martín-Hernando et al. 2007), ce qui est cohérent avec les voies d'excrétion que nous avons mises en évidence ici. L'infection de la glande salivaire par *M. bovis* a déjà été décrite en Espagne sur des sangliers présentant par ailleurs une tuberculose généralisée disséminée à de nombreux organes y compris abdominaux. L'analyse histologique avait révélé des lésions ouvertes sur le conduit salivaire, rendant l'excrétion salivaire très probable (Gortazar et al. 2003). Dans notre étude cependant, le vétérinaire ayant réalisé le prélèvement n'écarte pas la possibilité que la glande salivaire puisse avoir été contaminée par le nœud lymphatique rétropharyngien (qui présentait des lésions caséeuses fortement évocatrices de tuberculose) au moment du prélèvement. Ce résultat qualitatif et le résultat quantitatif qui lui est associé doivent donc être pris avec beaucoup de prudence et demandent à être confirmés.

Nous n'avons pas pu tester ici l'excrétion fécale. Celle-ci est fortement suspectée en Espagne du fait de la fréquence des lésions mésentériques (Martin-Hernando et al. 2007). En Côte d'Or, les organes abdominaux ne sont pas inspectés par un vétérinaire et aucune lésion macroscopique n'a été rapportée par les chasseurs mais cette surveillance événementielle est probablement très peu sensible. De plus, l'excrétion fécale pourrait également survenir lors d'ingestion d'aérosols. La recherche de *M. bovis* dans les fèces serait donc pertinente à mener en Côte d'Or, car cette voie d'excrétion représente un risque important de contamination environnementale par les sangliers.

Ces premiers résultats suggèrent une potentialité d'excrétion par les sangliers par la voie orale ou nasale, sans écarter l'hypothèse d'autres voies qui n'ont pas été testées. Afin de mieux déterminer les voies majoritaires et les niveaux d'excrétion de *M. bovis* chez cette espèce, d'autres études plus complètes et sur de plus grands effectifs doivent être conduites.

- **Excrétion chez le blaireau**

Nous observons que *M. bovis* a été détecté dans les excrétas de plus de la moitié des blaireaux dont le statut infectieux était positif en PCR et ou/culture. On constate que des blaireaux PCR+/culture- ont été confirmés positifs par le typage génétique de leur excréta (Tableau 17) et que la prise en compte des résultats de culture seuls sous-estiment la prévalence.

L'excrétion par les fèces, le mucus trachéal et l'urine a déjà été décrite au Royaume-Uni, y compris sur des blaireaux ne présentant pas de lésions visibles comme c'est le cas ici (Gallagher & Clifton-Hadley 2000; Gavier-Widén et al. 2009; Corner et al. 2010). La capacité d'excrétion de *M. bovis* ne semble donc pas réservée aux blaireaux se trouvant à un stade avancé de la maladie (Gallagher & Clifton-Hadley 2000; Jenkins et al. 2008; Gavier-Widén et al. 2009). Des lésions microscopiques pourraient être à l'origine de cette excrétion. De telles lésions ont été mises en évidence par des méthodes histologiques sur différents organes, principalement le poumon, les nœuds lymphatiques. Les lésions au niveau du tube digestif sont très rares et l'excrétion fécale serait plutôt le résultat d'ingestion d'aérosols (Gallagher & Clifton-Hadley 2000; Gavier-Widen et al. 2001; Corner et al. 2010; Corner et al. 2012). La durée et le niveau d'excrétion resteraient cependant liés à la sévérité des lésions (Gallagher & Clifton-Hadley 2000; Corner et al. 2010).

Nos résultats indiquent que sept blaireaux sur treize excrèteraient *M. bovis* par au moins deux voies différentes. Ce critère a été retenu pour qualifier ces blaireaux de « super-excréteurs » en Angleterre, bien que dans ces cas, la détection de *M. bovis* dans les excrétas aient été réalisée par culture (Delahay et al. 2000a; Delahay et al. 2013). Sur des études longitudinales menées à Woodchester Park, où la TB est enzootique chez les blaireaux et la densité de la population très élevée (20-30 blaireaux / km^2), la prévalence de tels blaireaux « super-excréteurs » et celle de blaireaux qualifiés « d'excréteurs » a varié selon les

années de 0% à 5% avec une répartition hétérogène de ces cas, agrégés spatialement. L'âge (incidence de l'excrétion plus élevée chez les adultes) et la saison (risque accru au printemps) sont des facteurs liés à cette capacité d'excrétion (Delahay et al. 2013). Les voies les plus fréquemment excrétrices étaient le mucus trachéal (53% des excréteurs), le pus des blessures et les fèces (39% des excréteurs) et enfin l'urine (37% des excréteurs), cette répartition étant cohérente avec nos résultats (mais nous n'avons pas testés le pus des blessures) (Delahay et al. 2000a; Delahay et al. 2013). En Irlande, Corner et al. (2012) ont mis en évidence une excrétion urinaire sur 5 blaireaux parmi 44 infectés et une excrétion fécale sur 2/53 blaireaux infectés. En outre, l'excrétion fécale accompagnait toujours l'excrétion urinaire, ce qui n'est pas le cas dans notre étude (Figure 18).

Les résultats positifs trouvés sur la glande salivaire attestent de l'excrétion possible des blaireaux par cette voie. Pourtant, elle n'a jamais été mise en évidence dans d'autres pays et seule une étude rapporte des lésions granulomateuses localisées sur la glande salivaire chez un individu (Cooke 2000). Dans la présente étude, un blaireau présentait également une lésion de la glande salivaire sans que d'autres sites présentant des lésions macroscopiques n'aient été mis en évidence, écartant *a priori* une contamination de voisinage à partir des nœuds lymphatiques voisins. En plus de la PCR, une culture avait été effectuée sur la lésion de la glande salivaire, conformément au protocole de surveillance programmée. Le résultat positif confirme dans ce cas que des bacilles viables de *M. bovis* infectaient la glande salivaire rendant l'excrétion salivaire probable.

Chez des blaireaux présentant une tuberculose clinique avec des lésions miliaires, Gallagher et al. (1998) ont mis en évidence par culture, un nombre de bactéries allant de 75. 10^3 à 200.10^3 cfu (colony forming unit) /ml dans le mucus bronchique, de l'ordre de 200.10^3 cfu/ml dans l'urine et 68 à 10^3 cfu/g de fèces. En Irlande, Corner et al. (2012) ont détecté une concentration de *M. bovis* dans les urines inférieure à 100 cfu/mL. Comme nous l'avons souligné, nos résultats quantitatifs sont difficilement interprétables. De plus, la comparaison entre toutes ces études réalisées en Angleterre ou en Irlande et nos résultats doivent être faits avec précaution du fait de la différence de méthodologie. En effet, dans ces études, *M. bovis* a été détectée et quantifiée par bactériologie, ce qui implique que les bacilles dénombrées étaient viables dans les prélèvements. Ici, c'est l'ADN qui est détecté, la méthode est donc probablement plus sensible car moins dépendante de l'état de dégradation des prélèvements mais le nombre de copies détecté n'est pas équivalent à un nombre de bactéries viables et donc potentiellement infectantes (Courtenay et al. 2006). A titre de comparaison, avec la PCR ciblant la même séquence RD4 que nous avons utilisée ici pour les fèces, Sweeney et al. (2007) ont quantifié de l'ordre de 10^6 copies de gènes par gramme de fèces prélevés dans des latrines en zone d'enzootie en Angleterre.

L'un des blaireaux (Bl 944) présentait un spoligotype identifié dans l'ADN issu du mucus trachéal (SB0134) différent du spoligotype révélé par la bactériologie sur pool de nœuds lymphatiques (SB0120). Ce résultat traduirait une co-infection par 2 souches

différentes de *M. bovis,* ce qui a déjà été décrit chez le blaireau en Irlande et chez le sanglier, le cerf et le daim en Espagne (Gortazar, Torres, et al. 2011; Furphy et al. 2012) et pourrait être la conséquence d'infections successives. Une erreur de traçabilité du laboratoire ne peut être totalement écartée mais cet animal provenait d'une commune où ces deux souches circulent chez les blaireaux. Dans un tel contexte, l'hypothèse d'une co-infection serait donc envisageable.

Nos résultats semblent donc attester d'une capacité d'excrétion de *M. bovis* par la population de blaireaux de Côte d'Or par les voies trachéale, fécale, urinaire et salivaire, cette dernière ayant très peu décrite auparavant. La méthodologie ne permet pas de quantifier le niveau d'excrétion et rend la comparaison délicate avec d'autres études utilisant la culture. Néanmoins, dans le contexte d'un niveau d'infection moins élevé par rapport à l'Angleterre et à l'Irlande, il semble que certains blaireaux tuberculeux ne présentant par forcément de lésions visibles puissent excréter *M. bovis*, potentiellement par différentes voies simultanées.

4.4. Synthèse et conclusion générale sur les niveaux d'infection et sur l'excrétion chez les espèces sauvages réceptives à M. bovis *en Côte d'Or*

- La mise en perspective des résultats d'infection et d'excrétion a mis en lumière que la culture utilisée comme méthode diagnostique de référence pour établir le niveau d'infection sous-estimait la prévalence réelle puisque des animaux culture-/PCR+ ont été confirmés porteur de *M. bovis* par le typage génétique de leurs excrétas.

Afin de mieux caractériser la pathogénie de *M. bovis* dans les populations de blaireaux et de sangliers de Côte d'Or et de mieux comprendre leur voie d'infection et leur capacité à excréter, il serait pertinent de procéder à des analyses histologiques sur tous les animaux infectés, sur un maximum d'organes possibles.

- La surveillance conduite en dehors de la zone d'infection bovine centrée sur l'Auxois et la vallée de l'Ouche n'a pas révélé de cas positifs chez ces espèces sauvages. En outre, à l'exception d'un sanglier et d'un blaireau, les souches trouvées chez les individus infectées sont les mêmes que celles des foyers bovins survenus à proximité. Nous avons donc constaté une superposition spatiale en un lien épidémiologique entre les foyers bovins et les cas sauvages.

Une différence de niveau de prévalence a été observée entre la zone sud et la zone nord. Chez le cerf et le sanglier, la prévalence était plus élevée en zone sud qu'en zone nord alors que le différentiel inverse a été constaté chez le blaireau.

- **Chez le cerf**, un premier cas positif, représentant le premier cas de tuberculose mis en évidence dans la faune sauvage dans ce département avait été détecté en 2003 puis trois cas positifs ont été détectés entre 2011 et 2013 tous abattus dans la partie sud de la zone infectée La prévalence calculée entre 2003 et 2013 s'élevait à 0,5% [0-1,3%]. La plupart des cerfs infectés présentaient des lésions ouvertes et disséminées.

Cette faible prévalence associée à la présence et à la sévérité des lésions bien corrélées à l'infection suggèrent en Côte d'Or une exposition et/ou une réceptivité moindre des cerfs à *M. bovis* mais une plus forte sensibilité par rapport aux autres espèces présentes. Cette forte sensibilité est retrouvée dans d'autres populations de grands cervidés où ils sont considérés comme réservoirs sauvages de tuberculose, comme dans le Michigan, le sud de l'Espagne ou en forêt de Brotonne. Nous n'avons pas fait d'analyse d'excrétion sur cette espèce mais la nature des lésions ne fait pas de doute sur sa capacité importante à excréter la bactérie. Le niveau de prévalence observé en Côte d'Or est inférieur aux situations où le cerf est considéré comme réservoir (prévalences supérieures à 20% en forêt de Brotonne et en Espagne, 5% dans le Michigan) (Schmitt et al. 1997; Hars et al. 2010; Gortazar, Vicente, et al. 2011). Cependant, leur forte sensibilité et la charge bacillaire élevée, décrite dans la bibliographie (cf. chapitre 1, paragraphe 4.2.) des lésions peuvent leur conférer un rôle potentiellement important dans la transmissibilité de la bactérie et donc dans son cycle épidémiologique Le fait que les trois cas positifs aient été découverts ces deux dernières années pourrait également signifier que la situation épidémiologique est en train d'évoluer dans cette population. La poursuite de la surveillance est donc capitale. Le niveau de densité de la population de cerfs doit être également considéré.

- **Chez le sanglier**, la prévalence dans la zone sud entre 2003 et 2013 était de 7,1% [5,4-9,2%] et variait selon les années entre 0 et 15,3%. Dans la zone nord, elle a varié entre 0 et 5,9% avec une moyenne sur les dix années de 4,0% [2,4-6,1%]. Soixante dix pour cent des sangliers positifs par bactériologie ont présenté des lésions, le plus souvent de type caséocalcaires, localisées sur les nœuds lymphatiques céphaliques**.**

Les résultats de la recherche de *M. bovis* par PCR dans les excrétas de sangliers infectés sont en faveur d'une capacité d'excrétion respiratoire et orale**.** Il serait néanmoins nécessaire de compléter ces premiers résultats par d'autres analyses, afin de les confirmer et de pouvoir interpréter les niveaux d'excrétion.

A la lumière de ces résultats épidémiologiques, les prévalence d'infection et lésionnelle s'avèrent moins élevées, et la nature des lésions moins sévère que dans la population de sangliers du sud de l'Espagne (prévalence de 50% et jusqu'à 100% localement) (Naranjo et al. 2008). Le type de lésions observé chez le sanglier est plus proche de ce qui a été rapporté en forêt de Brotonne, même si lors du pic d'infection ayant eu lieu dans cette forêt en 2006, la prévalence lésionnelle et la prévalence d'infection y étaient supérieures. Dans le contexte de la forêt de Brotonne, le sanglier a été considéré comme un hôte de liaison,

incapable de maintenir seul la tuberculose mais pouvant jouer un rôle dans le système multi-hôtes (Zanella, Duvauchelle, et al. 2008; Hars et al. 2010). Le facteur démographique doit néanmoins être pris en compte pour compléter l'évaluation du rôle épidémiologique de la population en Côte d'Or.

- **Chez le blaireau,** la prévalence calculée entre 2009 et 2013 était de 4,0% [2,0-7,0%] en zone sud où elle a varié de 0 à 6,5%, et de 8,4% [6,7-10,5%] en zone nord où le niveau d'infection a évolué entre 4,4 et 11,8% selon les années. Seuls 9,4% des blaireaux infectés (diagnostic établi par culture) ont présenté des lésions macroscopiques discrètes et localisées le plus souvent aux nœuds lymphatiques céphaliques.

Les résultats de la recherche de *M. bovis* par PCR dans les excrétas de blaireaux infectés attestent d'une capacité d'excrétion respiratoire, salivaire, fécale, et urinaire.

Même s'il existe une importante hétérogénéité spatiale et qu'il faut tenir compte d'un manque de sensibilité de la culture, il semble que la prévalence (d'infection et lésionnelle) chez le blaireau est inférieure à ce qui est observé dans les zones d'enzootie en Angleterre et en Irlande où elle dépasse souvent les 20% et peut atteindre plus de 40% (Bourne 2007; Corner et al. 2012). De plus, en Irlande, l'infection circule chez le blaireau en dehors des zones d'infection bovine (ANSES 2011; Gormley & Corner 2013), ce qui n'a pas été mis en évidence à ce jour en Côte d'Or. Pour autant, même en l'absence de lésions macroscopiques, certains blaireaux infectés seraient capables d'excréter *M. bovis* par les fèces, l'urine, les sécrétions bronchiques et la salive. D'autres investigations sont nécessaires pour confirmer l'excrétion de bacilles viables mais ce constat attesterait d'une aptitude à transmettre l'infection qui doit être prise en compte pour l'évaluation du statut épidémiologique de cette population.

- **Le renard et le chevreuil** ont fait l'objet d'une surveillance allégée par rapport aux trois autres espèces. En zone nord, une prévalence de 5,3% [0,6-17,7%] a été trouvée chez le renard et aucun animal positif n'a été détecté en zone sud. Aucune lésion macroscopique n'a été mise en évidence chez cette espèce. Quelque soit la zone et la méthode diagnostique, aucun chevreuil positif n'a été détecté. Ces données sont en faveur d'un rôle mineur de ces espèces dans le système multi-hôtes mais elles demanderaient à être complétées pour conforter cette assertion.

Ces résultats ont permis de décrire la pathologie de la TB chez ces différentes populations et ont renseigné sur leur réceptivité, leur sensibilité et leur capacité d'excrétion. Ces facteurs de risque liés à la relation hôte-pathogène fournissent donc des premiers éléments essentiels pour évaluer la capacité des populations de sangliers, de blaireaux et de cerfs de Côte d'Or à constituer des réservoirs et à transmettre l'infection aux bovins. Ils sont néanmoins insuffisants et doivent être complétés par la connaissance de la densité et du niveau d'interaction avec les bovins.

5. DENSITÉ DES POPULATIONS DE CERFS, SANGLIERS ET BLAIREAUX EN CÔTE D'OR

Nous avons vu dans le chapitre 1 que la densité d'une population influe sur le taux de contact et par voie de conséquence sur le taux de reproduction de base (R_0) (Caley & Hone 2004; Gortázar et al. 2006). La densité intervient ainsi dans l'émergence et la persistance des maladies contagieuses, à partir du moment où un seuil de densité pour une population réceptive donnée est atteint. Ce seuil, varie selon la capacité des individus à s'infecter et à excréter (Haydon et al. 2002; Lloyd-Smith, Cross, et al. 2005; Ward & Smith 2012). La connaissance des niveaux de densité est donc un pré requis nécessaire à l'évaluation du risque de persistance de la tuberculose au sein des différentes populations. Dans un système multi-hôtes comme celui qui existe en Côte d'Or, ces niveaux de densité doivent également être appréhendés pour toutes les espèces présentes afin de juger du risque que la communauté d'hôtes devienne réservoir (Holt et al. 2003; Lloyd-Smith, Cross, et al. 2005).

Les méthodes d'estimation des densités des populations sauvages sont le plus souvent fondées sur un échantillonnage car il est impossible, sauf exception, de dénombrer une population entière en particulier pour les espèces vivant en milieu forestier (Wilson & Delahay 2001; Acevedo et al. 2007; Engeman et al. 2013). Dans ces échantillons, l'estimation peut ensuite reposer sur des méthodes directes de dénombrement des individus ou sur le recensement d'indices de présence des individus. Cette dernière méthode fournit des indices d'abondance (nombre d'individus) ou de densité (nombre d'individus par unité de surface) et reposent sur l'hypothèse que ces indices reflètent les niveaux réels d'abondance et de densité. La relation entre la valeur de ces indices et la valeur réelle n'est pas toujours connue mais ces données peuvent être utilisés en valeurs relatives, et permettre ainsi de connaitre l'évolution des densités dans le temps et dans l'espace si une même méthodologie est employée (Wilson & Delahay 2001; Wilson et al. 2003).

Dans la présente étude, notre objectif était de fournir une estimation des densités des trois principales populations sauvages prenant part au système multi-hôtes de *M. bovis* dans la zone infectée de Côte d'Or, soit les cerfs, les sangliers, et les blaireaux. Pour les deux premières espèces, nous avons utilisé et traité des données existantes de tableaux de chasse et, pour le cerf, dans la zone sud, des données existantes d'indices nocturnes d'abondance. Pour le blaireau, les données de densité étant très lacunaires, nous avons entrepris dans le cadre de cette thèse, une étude spécifique visant à déterminer la densité sur différents sites de la zone infectée.

5.1. Densité des populations de cerfs et de sangliers

5.1.1. **Matériel et méthode**

5.1.1.1. Site d'étude

Notre objectif étant de connaître les densités ou des indices de densités dans la zone infectée de Côte d'Or, nous avons récolté des données correspondant à ce site d'étude.

Le département est organisé depuis 2005 en treize unités de gestion cynégétique (UG), permettant une adaptation locale de la gestion du grand gibier. Leur découpage tient compte des massifs forestiers et des barrières artificielles telles que les autoroutes. Chacune d'elle est composée par des territoires de chasse dont l'usage est réservé à différentes sociétés de chasse. Au regard de notre objectif, nous avons ciblé trois UG (N° 5, 7 et 12), qui couvrent la majorité de la zone infectée et l'aire géographique où ont été trouvées les cas positifs de cerfs et de sangliers (Figure 19). L'UG n°5 comporte cent soixante territoires de chasse, l'UG n°7, cent dix neuf et enfin l'UG n°12 en comporte cent quatorze (sources : Fédération départementale des chasseurs de Côte d'Or -FDC21- et Direction départementale des territoires de Côte d'Or-DDT 21).

La partie ouest de la zone sud est séparée de l'UG n°5 par l'autoroute A6, il y a donc *a priori* très peu d'échange entre les populations de part et d'autre de cette autoroute, c'est pourquoi nous ne l'avons pas prise en compte. Nous avons également exclu les territoires de chasse se trouvant à l'extrême est de l'UG n°5 (Côtes) car ils ne se trouvaient pas dans la zone infectée et correspondaient à un type de paysage différent (vignobles). Les soixante douze territoires pris en compte couvraient ainsi la vallée de l'Ouche et les Hautes Côtes (Figure 19).

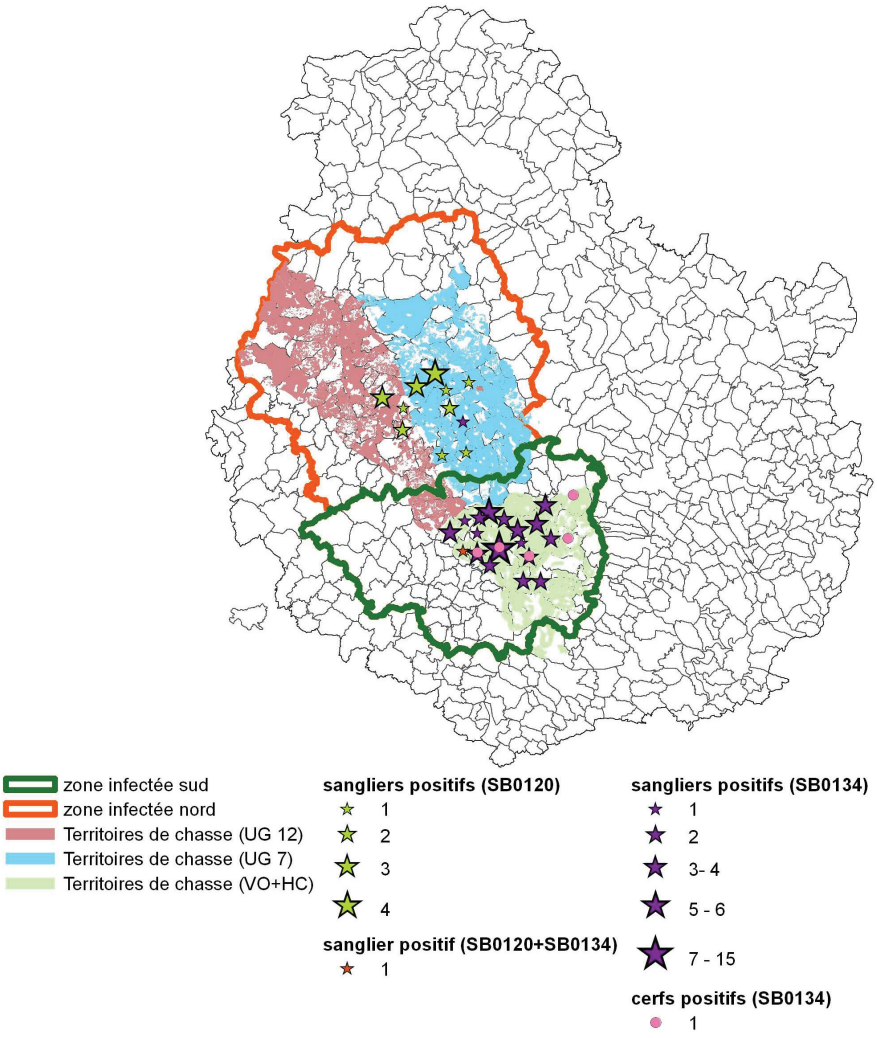


Figure 19 : localisation des unités de gestion cynégétiques, des sangliers et des cerfs positifs cumulés entre 2003 et 2013 (VO : vallée de l'Ouche ; HC : Hautes Côtes)

5.1.1.2.Indicateurs de densité

Nous avons utilisé des données issues des tableaux de chasse (nombre d'animaux abattus par saison de chasse par UG ou territoires de chasse) correspondant à la vallée de l'Ouche et aux Hautes Côtes pour la zone sud et des UG N°7 et 12 pour la zone nord.

De par l'accessibilité de cette donnée, les tableaux de chasse sont largement utilisés comme indices de densité ou d'abondance. Cette méthode souffre néanmoins de nombreux biais car elle dépend des modalités des pratiques cynégétiques (nombre de chasseurs, mode de chasse, existence ou non de plan de chasse) qui ont une grande influence sur les tableaux de chasse et qui peuvent varier dans le temps et dans l'espace (Nichols et al. 2001). De plus, la pression de chasse n'est pas équivalente pour toutes les catégories d'âge et

de sexe et le tableau de chasse n'est souvent pas représentatif de ces différentes catégories dans la population (Engeman et al. 2013).

En Côte d'Or, un plan de chasse qualitatif (c'est-à-dire établissant un quota de prélèvements pour différentes catégories d'âge et de sexe) existe pour le cerf depuis 1977 et pour le sanglier depuis la saison 2005-06. Pour chaque société et donc chaque territoire de chasse, un quota d'animaux à prélever est attribué chaque année lors de la commission technique locale (que l'on désigne par le terme « attributions »). Ces attributions se fondent sur le tableau de chasse réalisé l'année précédente (que l'on désigne par le terme « réalisations ») et sur d'éventuelles données supplémentaires renseignant sur la taille de la population (comptage, dégâts aux cultures). Elles peuvent en outre être orientées par des objectifs de gestion (visant le plus souvent à réduire les densités) dans le cadre d'impact important sur les cultures (ou les forêts pour les cervidés) ou dans le cadre de gestion sanitaire, ce qui a été le cas en Côte d'Or pour la tuberculose.

Le cerf est chassé à l'approche et à l'affût, sans chien, de début juin à l'ouverture de la chasse « au bois » (en octobre) puis il est chassé en battue, avec chiens, jusqu'à la fin de la saison de chasse.

Le sanglier est chassé à l'approche ou à l'affût, sans chien, de début juin à l'ouverture générale de la saison de chasse (mi-septembre ou fin septembre selon les années). Dans les secteurs où les dégâts sont importants, la chasse en battue (avec chiens) est possible dès mi-août sur autorisation préfectorale. Pendant toute la période de chasse au bois entre septembre et fin février, le sanglier est chassé en battue (avec chiens) (Source : FDC 21).

Pour estimer les densités des populations de cerfs et de sangliers, nous nous sommes fondés sur les tableaux de chasse (réalisations). Pour le cerf, nous les avons suivis depuis 2001-2002 (saison précédent la détection d'une biche infectée représentant le premier cas sauvage détecté en janvier 2003) jusqu'à la saison 2012-2013.

Pour le sanglier, nous disposions des données à partir de 2005-06, saison à partir de laquelle le plan de chasse a été appliqué pour cette espèce.

Nous avons calculé des indicateurs de densité en divisant les valeurs des réalisations par les surfaces des territoires de chasse concernées. Nous nous sommes placés à l'échelle de l'UG afin d'avoir une cohérence géographique et une gestion cynégétique homogène tout en conservant un échantillon suffisamment grand pour limiter les biais liés à des pratiques de chasse différentes entre territoires (Engeman et al. 2013).

Nous avons également représenté le nombre d'animaux attribués par km^2 dans chacune de ces entités géographiques afin de comparer les objectifs de gestion aux tableaux de chasse effectivement réalisés.

Pour le cerf, des comptages de nuit, avec éclairage au phare, sur des circuits fixes parcourus en voiture ont été réalisés chaque année sur le secteur des Hautes Côtes et de la vallée de l'Ouche. La fiabilité de la méthode de comptages des grands cervidés en voiture

comme indice relatif d'abondance a été validée par comparaison avec d'autres méthodes comme le marquage-capture-recapture avec laquelle la corrélation est très bonne (Van Laere et al. 2008; Garel et al. 2010). Ces circuits fixes parcourus en voiture, consistaient pour la vallée de l'Ouche à trois circuits totalisant environ 160 km et dans les Hautes Côtes, à quatre circuits représentant 230km. Ils ont été parcourus chaque année entre 2001 et 2013, à deux reprises en février-mars, soit après la chasse par les techniciens de la FDC 21. Les cerfs, biches et jeunes vus le long de ces circuits ont été comptabilisés pour chaque circuit lors des deux répétitions. Les valeurs maximales des comptages obtenues à l'issue des deux répétitions ont été retenues. L'indice kilométrique d'abondance (IKa, encore appelé indice nocturne d'abondance) a ensuite été obtenu en divisant ce chiffre par le nombre total de kilomètres parcourus pour chaque secteur. Afin de rester cohérent avec les tableaux de chasse, nous avons sommé les comptages réalisés sur les deux secteurs.

5.1.2. **Résultats**

5.1.2.1.Cerfs

Suite à la découverte de la biche tuberculeuse en janvier 2003, les attributions ont été augmentées aux deux saisons suivantes et les réalisations ont suivi cette tendance jusqu'à un pic de 1,3 cerfs par km^2 (Figure 20). L'évolution de l'IKa montre une baisse de la population dès 2004-2005 qui s'est poursuivie jusqu'en 2008-2009. L'effort de chasse a été maintenu en 2004-2005, ce qui a probablement contribué à faire baisser encore la population comme en a témoigné l'évolution de l'IKa. On observe ensuite une baisse régulière du tableau de chasse et de l'IKa jusqu'en 2008-2009, où les réalisations ont atteint 0,4 cerfs tirés /km^2 et l'IKa 0,3 cerfs observés/km. Puis, nous constatons une nouvelle augmentation jusqu'en 2011-2012 (la valeur de l'IKa, 1,35 cerfs observés/km était alors très proche de celle de 2002-2003). L'IKa de 2012-2013 a montré une nouvelle tendance à la baisse de la population (Figure 20).

On constate une très bonne corrélation entre l'évolution de l'IKa et celle des attributions-réalisations

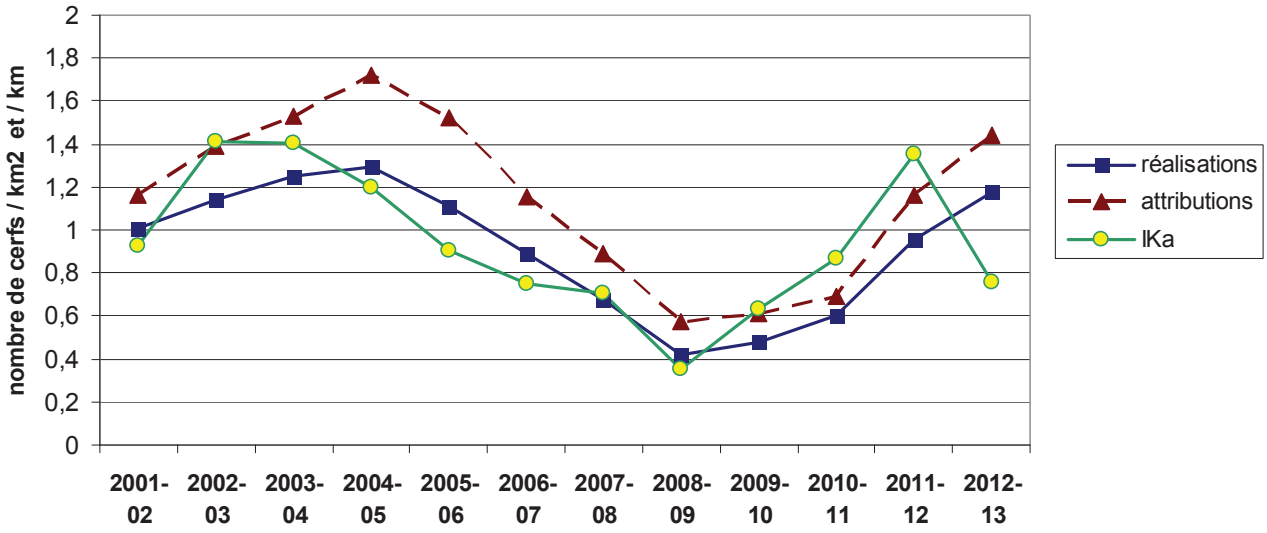


Figure 20 : évolution des tableaux de chasse et de l'IKa de cerfs en vallée de l'Ouche et Hautes Côtes entre 2001 et 2013 (Source FDC 21 et DDT 21)

Dans la partie nord de la zone infectée, au sein des UG n°7 et n°12, les tableaux de chasse indiquent des niveaux de densité environ 20 fois plus faibles que dans la partie sud, les réalisations n'ayant pas dépassé 0,07 cerfs / km^2 (Figures 21 et 22).

L'évolution temporelle a montré, dans les deux UG, une augmentation entre 2001 et 2005. Puis, pour l'UG n°7, les réalisations ont baissé de façon régulière, possiblement suite à des attributions plus fortes, jusqu'en 2010, année après laquelle une nouvelle augmentation des réalisations a été constatée (Figure 21). Dans l'UG n°12, les réalisations ont fluctué entre 0,03 et 0,06 cerfs tirés / km^2 (Figure 22).

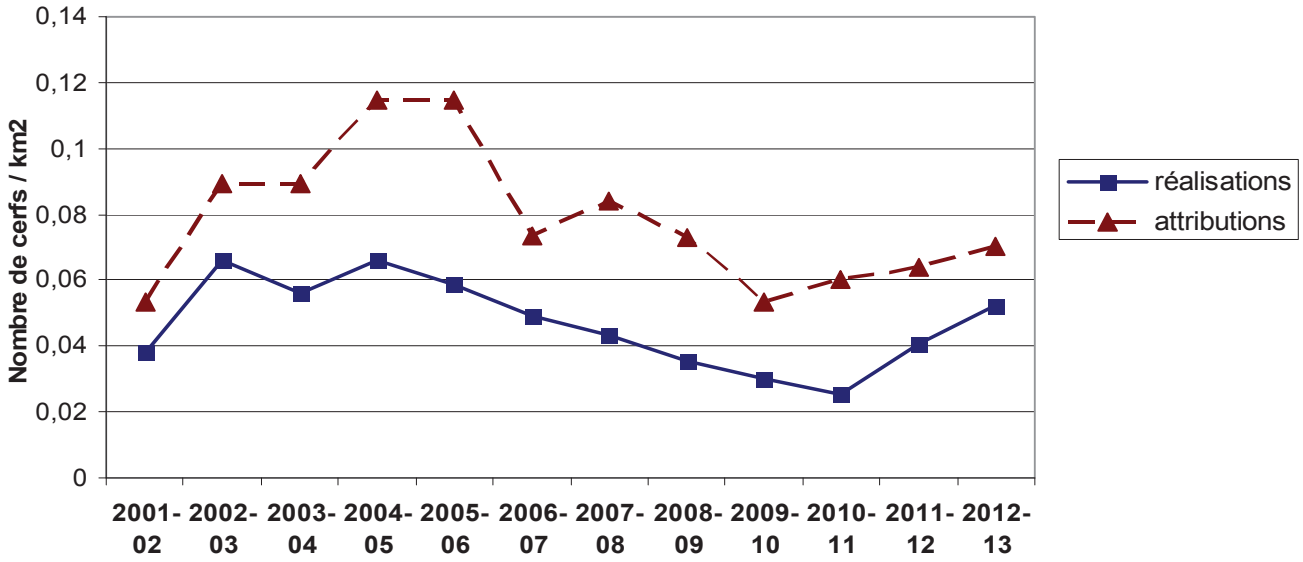


Figure 21 : évolution des tableaux de chasse sur l'unité de gestion cynégétique n°7 entre 2005 et 2013 (Source FDC 21 et DDT 21)

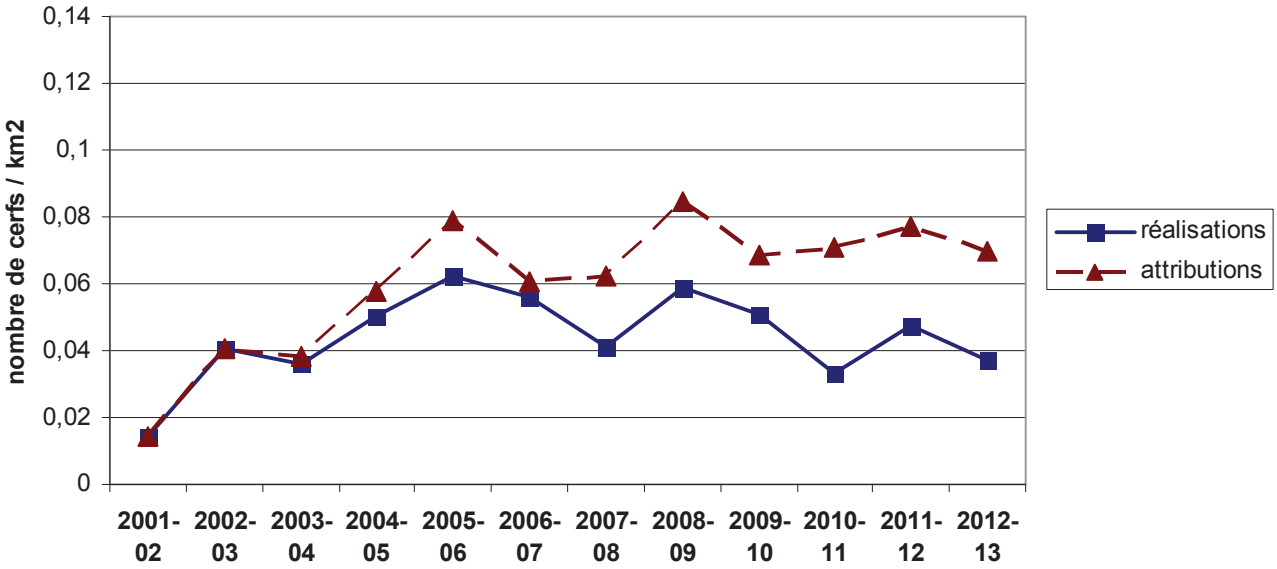


Figure 22 : évolution des tableaux de chasse de cerfs dans l'unité de gestion cynégétique n°12 entre 2005 et 2013 (Source FDC 21 et DDT 21)

La répartition qualitative des tableaux de chasse a montré une proportion plus importante de cerfs mâles adultes (coiffés) que des autres catégories (jeunes et biches).

5.1.2.2.Sangliers

En zone sud, les tableaux de chasse ont montré une nette augmentation du nombre de sangliers tirés par km^2 entre 2005-06 et 2012-2013 qui est passé de 1,3 à 3,5 sangliers tirés / km^2. Le maximum a été atteint en 2008-09 (3,6 sangliers / km^2). Les attributions ont été augmentées afin de réduire les densités dans le cadre de la gestion de la tuberculose chez cette espèce puisque les premiers sangliers infectés ont été trouvés en 2003-2004. Jusqu'en 2008-2009, l'augmentation des réalisations répond à cette hausse des attributions En revanche, à partir de 2009-2010, l'écart se creuse entre les attributions et les réalisations, attestant d'une possible stabilisation de la population (Figure 23).

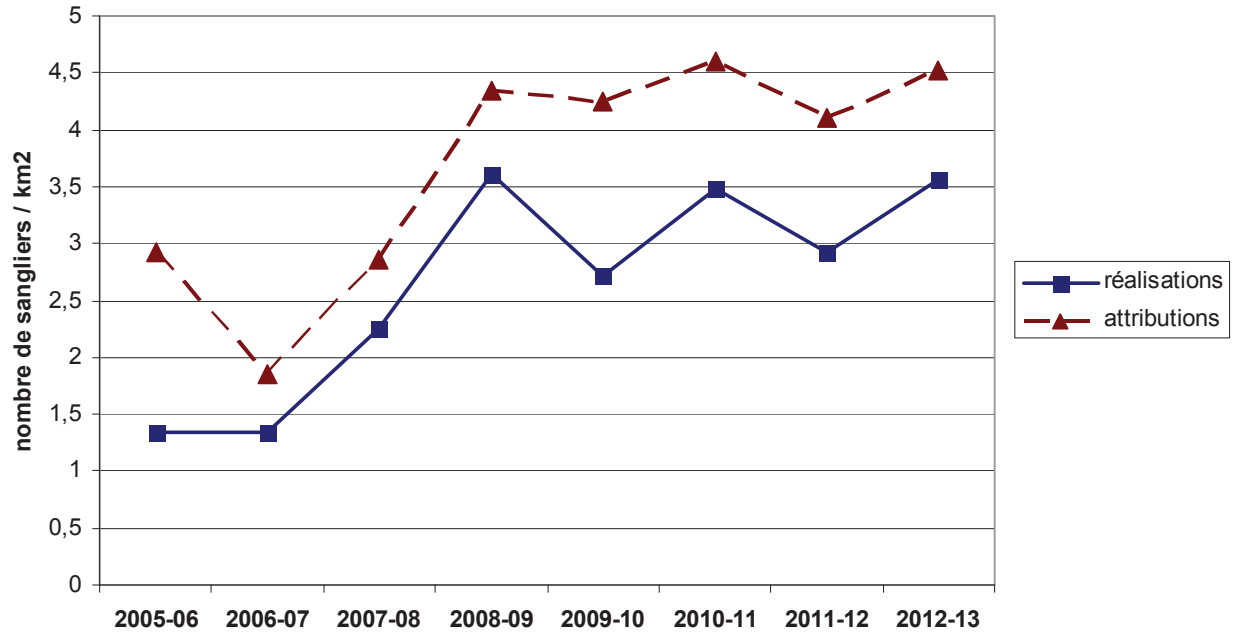


Figure 23 : évolution des tableaux de chasse de sangliers dans l'unité de gestion cynégétique n°5 entre 2005 et 2013 (Source FDC 21 et DDT 21)

En zone nord, les tableaux de chasse des deux UG indiquent des niveaux de densité environ 2 à 2,5 fois plus faibles que dans la zone sud, dépassant à peine les 1,5 sangliers tirés / km^2. Les attributions ont été augmentées après les premiers cas de sangliers tuberculeux détectés dans cette zone, en 2007-2008 (Figures 24 et 25).

Dans l'UG n°7, la baisse des réalisations malgré la hausse des attributions serait en faveur d'une stabilisation de la population voire d'une légère baisse (Figure 24).

Dans l'UG n°12, la population semble se stabiliser (Figure 25).

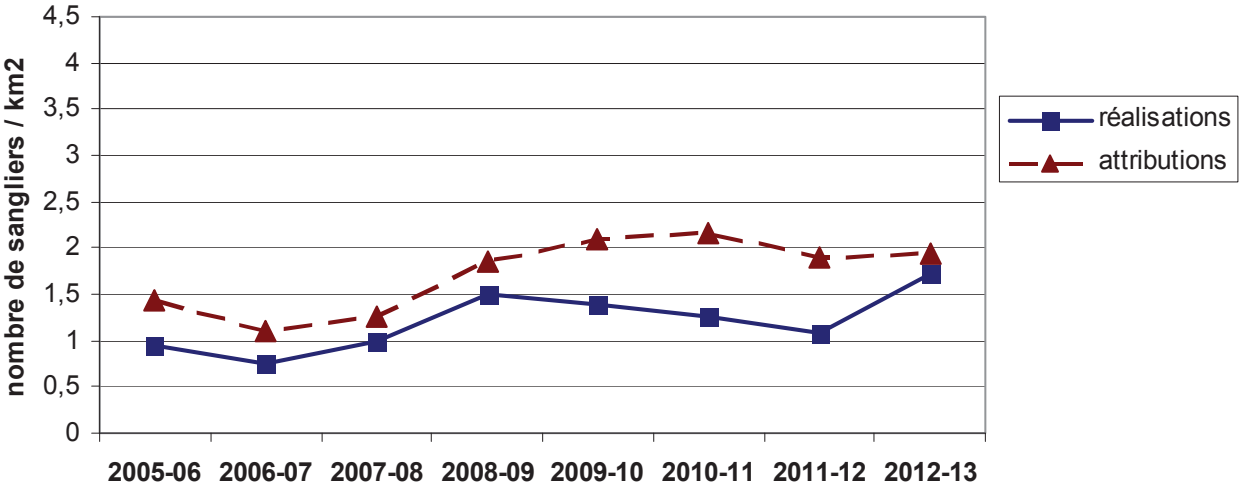


Figure 24 : évolution des tableaux de chasse de sangliers dans l'unité de gestion cynégétique n°7 entre 2005 et 2013 (Source FDC 21 et DDT 21)

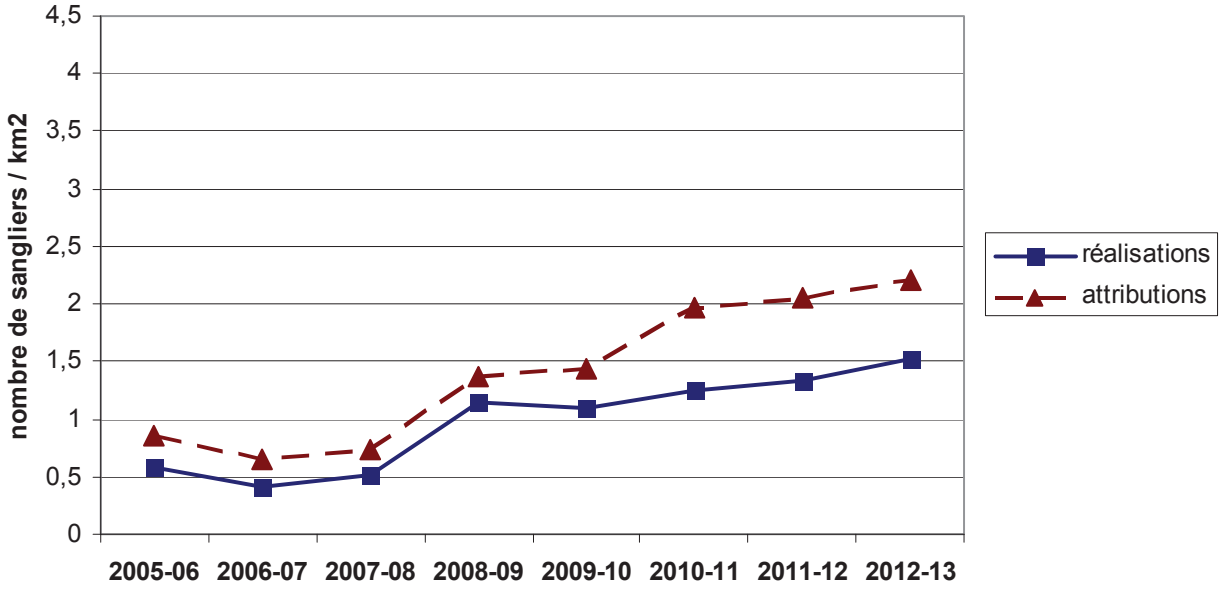


Figure 25 : évolution des tableaux de chasse de sangliers dans l'unité de gestion cynégétique n°12 entre 2005 et 2013 (Source FDC 21 et DDT 21)

La répartition de la catégorie des animaux tirés montrent, une proportion légèrement plus élevée de jeunes et de subadultes (moins de 60 kg) tirés que d'adultes (plus de 60 kg), dans un rapport qui varie peu selon les années et les UG d'environ 60% *vs* 40%, la catégorie qui est la moins chassée correspond aux laies de plus de 60 kg.

5.1.3. **Discussion**

- **Méthodologie**

L'hypothèse d'une relation linéaire entre le tableau de chasse et la taille réelle de la population chassée impliquerait que l'effort de chasse soit constant (Acevedo et al. 2007; Engeman et al. 2013). En Côte d'Or, la gestion des populations de cerfs et de sangliers sur la zone infectée s'est traduite par des attributions fluctuantes entre années orientées vers une intensification de l'effort de chasse suite aux découvertes d'animaux tuberculeux. De ce fait, il est difficile de déterminer dans quelle mesure les tableaux de chasse représentent la taille réelle de la population. En vallée de l'Ouche et Hautes Côtes, la confrontation avec les résultats des comptages réalisés pour le cerf a toutefois montré une bonne corrélation entre les deux indices. Les variations observées des réalisations pourraient alors bien refléter des variations de niveau de densité chez cette espèce dans cette zone. Il est cependant probable que les attributions et donc les réalisations aient été ajustées en fonction de l'évolution de cet indice.

- **Densité chez le cerf**

Sur la base des tableaux de chasse, la densité de cerfs en zone nord serait environ 20 fois moins élevée que celle de la zone sud. Le type de paysage et notamment l'absence de continuum forestier pourrait être une explication (Bruinderink et al. 2003). En conséquence de ce différentiel élevé de densité, il apparait que le risque de maintenance et de transmission-retour de la TB aux bovins doivent être distingué entre la zone nord et la zone sud chez cette espèce.

L'abondance des cerfs en vallée de l'Ouche et Hautes Côtes a pu être comparable à celle de Brotonne. En 2001, en effet, l'indice kilométrique d'abondance du cerf était de 1,4 dans la forêt de Brotonne. Puis, suite aux mesures prises pour réduire la taille de la population de cerfs de la forêt de Brotonne, l'IKa a baissé continuellement pour atteindre en 2007, une valeur inférieure à 0,2 cerfs observés / km. En vallée de l'Ouche et Hautes Côtes, cette valeur de 1,4 cerfs observés / km a été atteinte entre 2002 et 2004 puis de nouveau en 2011 (Figure 20). En revanche, les niveaux de prévalence observés en zone sud en Côte d'Or (0,5% sur les 10 années de surveillance) n'ont jamais atteint le niveau de la forêt de Brotonne (14% en 2001 23% en 2005-2006 et 2007-2008 (ANSES 2011).

Dans d'autres régions où le cerf intervient dans la communauté d'hôtes de *M. bovis*, les densités sont fournies en nombre d'animaux par km^2 ce qui rend la comparaison délicate avec nos résultats. Nous les rapportons cependant pour alimenter cette discussion.

En Espagne, où le cerf est capable de maintenir seul la tuberculose, les densités sont en moyenne de 20 cerfs / km^2 et il existe des facteurs d'agrégation, identifiés comme étant des facteurs de risque de l'infection chez le cerf (Vicente et al. 2007; Gortazar, Vicente, et al. 2011).

Dans le sud-ouest de l'Angleterre ou la TB est enzootique chez les bovins et chez le blaireau, les densités de populations de cerfs varient entre 1 et 30 individus par km^2 mais cette espèce apparait très peu atteinte (prévalence estimée à 1%) et elle est considérée comme un hôte de liaison (Delahay et al. 2007).

Enfin, sur un plan théorique, des travaux de modélisation ont estimé que la densité requise pour constituer un réservoir (R_0>1), en l'absence d'interaction avec d'autres espèces, était de 16 individus /km^2 pour un taux de transmission de 100% (Ward & Smith 2012).

Au travers de tous ces exemples, il apparaît clairement qu'il n'existe pas de valeur seuil figée qui permettrait à une population de cerf de pérenniser l'infection et que d'autres facteurs (intrinsèques à la population, géographiques, cynégétiques…) interviennent dans le risque de persistance. Les valeurs de prévalence trouvées chez le cerf (0% en zone nord et 0,5% en zone sud ; cf. paragraphe 3.2.) semblent attester d'une faible infection de

cette population. Mis en perspectives, ces deux résultats de densité et de prévalence, pour la zone nord, semblent peu compatibles avec un rôle important du cerf dans la persistance de l'infection. Les valeurs trouvées en zone sud, et notamment le niveau de densité assez élevé pourrait présenter un risque accru, à la lumière des autres expériences mais ces niveaux doivent être intégrées à une évaluation de risque multifactorielle.

- **Densité chez le sanglier**

Chez le sanglier, nous constatons également un contraste entre la zone sud et la zone nord mais de moindre importance que pour les cerfs, la population de la zone sud apparaissant deux fois plus dense que la zone nord.

Dans les années 2000, avant la réduction des densités des sangliers entreprise en forêt de Brotonne, les tableaux de chasse étaient de l'ordre de 4 à 5 sangliers abattus par km^2 et la population était estimée à 9-10 animaux par km^2 (ANSES 2011). Bien que la comparaison doive se faire avec prudence en raison des différences probables de pratique cynégétique et de configuration géographique entre les deux régions, il semble que ce niveau de densité en forêt de Brotonne soit très légèrement supérieur à celui rencontré dans la vallée de l'Ouche et Hautes Côtes (au maximum 3,6 sangliers tirés par km^2) et bien supérieur à celui de la zone nord (au maximum 1,7 .sangliers tirés par km^2). La prévalence estimée alors en forêt de Brotonne s'élevait à 28% ± 10% et cette population de sanglier a été considérée comme un hôte de liaison, incapable de maintenir seul la tuberculose sans une source de contamination probablement constituée par les cerfs (Hars et al. 2010; ANSES 2011).

Le sud de l'Espagne, comme nous l'avons déjà mentionné, présente un contexte très différent puisque les niveaux de densité (compris entre 1 et 90 sangliers par km^2) et le degré d'agrégation des sangliers y sont très élevés. Ceux-ci apparaissent comme des facteurs de risque majeurs d'augmentation de la prévalence qui peut atteindre 100% localement (42% en moyenne) et de constitution d'un réservoir pérenne (Acevedo et al. 2007; Vicente et al. 2007; Vicente et al. 2013).

En Océanie, la place du sanglier dans les systèmes multi-hôtes de l'Australie ou de la Nouvelle-Zélande s'est limitée à un rôle d'hôte de liaison ou même à un cul-de sac épidémiologique malgré des conditions de relative abondance de l'espèce (11 animaux par km^2 en Australie par exemple) (McInerney et al. 1995; Nugent et al. 2002; Nugent 2011).

A l'instar des cerfs, il est donc difficile de fournir une valeur de densité correspondant à un statut épidémiologique pour le sanglier et de savoir si les densités rencontrées en zone infectée de la Côte d'Or sont compatibles avec une persistance de l'infection dans cette population. Ce risque semble plus plausible en zone sud qu'en zone nord étant donné que les niveaux de densité et de prévalence (7% *vs* 4%, cf. paragraphe 3.3.) y sont plus élevés. Nous pouvons envisager là aussi de distinguer l'évaluation du risque de maintenance et de transmission-retour entre ces deux zones.

De la même façon que pour le cerf, il apparaît que des facteurs géographiques, cynégétiques ou de niveaux de contacts avec d'autres populations infectées interviennent dans le risque de persistance et qu'il est nécessaire de les mettre en perspective avec les éléments déjà évalués (niveau d'infection et capacité d'excrétion).

5.2. Densité des populations de blaireaux

Peu d'études quantitatives ont été réalisées sur l'état des populations de blaireaux en France (Bodin 2005; Ruette et al. 2007; Lebecel 2009; Rigaux & Chanu 2011).

En Côte d'Or, les seuls indicateurs de densité et d'abondance de blaireaux existant sont issus d'une enquête conduite par la Fédération régionale de chasse de Bourgogne en 1996 et du bilan des « carnets de bords » de l'ONCFS (un recueil du nombre de blaireaux vus morts sur la route par les agents de l'ONCFS). La première étude faisait état d'une densité de terriers de 0.33 / km^2 (Ruette et al. 2007; ANSES 2011). Le bilan des « carnets de bord » fait état de 595 blaireaux morts recensés entre 2001 et 2009, ce qui représente l'un des chiffres les plus élevés en valeur absolue en France par rapport aux autres départements (S. Ruette, com. pers). Cependant, ces études souffrent de nombreux biais méthodologiques difficilement quantifiables, tels que la pression d'observation non contrôlée, les éventuels effets du type de paysage traversé et du type de route emprunté et il est donc difficile de savoir dans quelle mesure ils sont des indicateurs fiables de l'abondance des populations de blaireaux (ANSES 2011).

Considérant l'importance de connaitre les densités de blaireaux pour l'évaluation du risque de constitution de réservoir de tuberculose par cette population, la mise en œuvre d'une étude spécifique a été décidée avec la collaboration avec le CNERA PAD (Centres nationaux d'étude et de recherche appliquée prédateurs animaux déprédateurs) de l'ONCFS. L'étude réalisée en 2012 était fondée sur une méthode nouvelle mise en œuvre pour la première fois en Dordogne en 2011 (Reveillaud 2011). Ses objectifs étaient d'estimer la densité de la population de blaireaux dans la zone infectée de Côte d'Or sur trois zones contrastées sur le plan paysager et sur le plan de l'intensité du piégeage effectué jusqu'alors.

Le protocole a été établi par Sandrine Ruette et Michel Albaret du CNREA PAD. J'ai participé à cette étude en collaborant sur le protocole (définition des sites d'étude notamment) et en coencadrant la stagiaire de master 2 (Julia Dolhem). Celle-ci a réalisé la majorité de la récolte des données ainsi qu'une partie du traitement des données, que le CNERA PAD a complété.

5.2.1. **Matériel et méthode**

5.2.1.1. Choix de la méthode

Le blaireau vit en groupes sociaux, partageant un même territoire (Delahay 2000b) et occupant un terrier commun, dit terrier principal pour le différencier de terriers secondaires, occupés de manière transitoire, par quelques individus du groupe. Sur le terrain, les terriers principaux ont un nombre de gueules plus élevé, en général plus de 5, et présentent des signes d'activités importants (déblaiement, coulées, latrines) (Macdonald et al. 1996). Dans les zones où les densités sont fortes, les estimations de densités sur de vastes territoires sont basées sur le dénombrement des terriers principaux (Schley et al. 2004; Newton-Cross et al. 2007). Cependant, dans les zones méditerranéennes ou boréales, les blaireaux vivent en petits groupes à des densités faibles (moins de 0,7 individus/km²) (Broseth et al. 1997; Kowalczyk et al. 2000; Rosalino et al. 2004; Lara-Romero et al. 2011). Dans ces régions, les terriers sont plus petits et la distinction entre terriers principaux et terriers secondaires, si elle existe, est difficile et il a été proposé d'estimer les densités à partir du dénombrement total des terriers sans distinction du type, principal ou secondaire (Lara-Romero et al. 2011).

Ces méthodes supposent que tous les terriers soient dénombrés de manière exhaustive, ce qui ne semble réalisable sur le terrain que pour de petits territoires d'étude. A plus vaste échelle, un échantillonnage doit être mis en place.

Les méthodes de « distance sampling », largement appliquées actuellement (Buckland et al. 2001) offrent un cadre théorique permettant d'estimer des densités, quand une certaine proportion d'objets restent non détectés. Ces méthodes ont été utilisées sur le blaireau par des comptages aux phares dans des milieux ouverts ou le long de transects parcourus à pied dans des zones de fortes densités en blaireaux et ont montré une bonne corrélation avec des méthodes d'échantillonnage exhaustif, de marquage, capture, recapture ou de simulation (Hounsome et al. 2005; Parrott et al. 2011).

Sur de petits territoires, les densités sont estimées en dénombrant d'une part le nombre de terriers principaux actifs (c'est-à-dire occupés l'année de suivi) et d'autre part en estimant la taille des groupes.

Nous avons construit notre protocole en le basant :

- d'une part sur une estimation de la densité en terriers « actifs » par distance sampling ;
- d'autre part, à partir du piégeage vidéographique sur un échantillon de ces terriers, par une estimation de la taille des groupes et de la proportion de différents types de terriers : avec reproduction (présence de jeunes), couple reproducteur sans jeunes (deux individus adultes sans jeunes) ou terrier occupé seulement temporairement et secondairement (un seul individu ou aucun individu au moment du piégeage vidéographique).

5.2.1.2.Site d'étude

Trois territoires d'environ 100 km² ont été sélectionnés pour leurs contrastes en termes de nombre de blaireaux piégés depuis 2009 et de paysage, l'objectif étant d'avoir une homogénéité de ces critères au sein d'une même zone mais une forte variance entre zones. Les zones A et B, situées dans l'Auxois, étaient très proches (distance minimale: 1,5 km) et présentaient un paysage bocager similaire mais étaient différentes en terme d'intensité du piégeage qui y a été mené depuis 2009 (Tableau 18 et Figure 26). Des abattages de blaireaux étaient en effet organisés par la DDPP 21 depuis 2009 autour des foyers bovins dans le cadre de la lutte contre la tuberculose. Entre 2009 et 2011, avant le début de l'étude, environ 4700 blaireaux ont été piégés sur l'ensemble du département (Source : DDPP 21). Il faut noter qu'une campagne de piégeage s'est déroulée d'avril à septembre 2012, soit pendant la phase de récolte de données de l'étude, y compris dans la zone A, non piégée auparavant.

La zone C, située dans les Hautes Côtes, est distante d'environ 20 km des zones A et B mais contrairement à ces zones, elle est majoritairement couverte de forêt (Tableau 18 et Figure 26).

Tableau 18 : caractéristiques des 3 zones sélectionnées pour l'estimation des densités de blaireaux (les surfaces sont exprimées en km^2)

Zone	A	B	C
Surface totale	103	112	97
Surface boisée	17	23	60
Surface pâturée et/ou cultivée	81	79	29
Pression du piégeage cumulée entre 2009 et 2011 (Nb blaireaux piégés/km^2)	0	4,4	0

5.2.1.3.Echantillonnage

L'échantillonnage était de type systématique c'est-à-dire avec des points de prospection répartis uniformément sur l'ensemble de chaque zone d'étude. A cet effet, cinquante points équidistants ont été placés sur chaque zone à l'aide d'une grille. A partir de chacun de ces points, une prospection exhaustive sur un rectangle de 800 mètres de long et 100 mètres de large (un transect) était prévue. Cependant, le positionnement des transects a été préférentiellement choisi dans les milieux les plus favorables à l'installation de terriers de blaireau, c'est-à-dire les lisières et les milieux boisés (Hammond 2001) (Figure 26).

Après avoir positionné ces transects, une stratification *a posteriori* a été réalisée sur le type de milieu à partir des données de Corine Land Cover 2006. Trois types de milieux ont ainsi été définis : les milieux boisés, les lisières que nous avons définies sur les limites entre milieu boisé et milieu ouvert par une bande de 30 mètres dans la partie boisée et de 10 m sur la zone ouverte. Enfin, la catégorie « autres milieux » correspond à tous les

milieux ouverts (surfaces agricoles, terres arables, prairies), inclut les bosquets d'une surface inférieure à 25 hectares et les haies entre cultures ou pâtures qui ne peuvent être identifiés sur Corine Land Cover. Les milieux anthropiques et hydriques déterminés sous Corine Land Cover ont été exclus, leurs surfaces n'entrant pas dans les calculs de densité. Nous avons également favorisé l'orientation des transects vers les milieux propices à la présence des terriers de blaireaux (bois, lisières et haies) pour réaliser les prospections.

Les transects ont été réalisés pas six observateurs différents entre mars et mai 2012. L'observatrice principale (stagiaire M2) s'est chargée de 71% des prospections sur les trois zones, l'observateur secondaire (agent du service départemental de l'ONCFS 21) en a effectué 10% sur la zone C uniquement, les quatre derniers participants (technicien FDC 21, deux autres agents de l'ONCFS et moi-même) se sont partagés les 20% restants à hauteur d'environ 5% par personne.

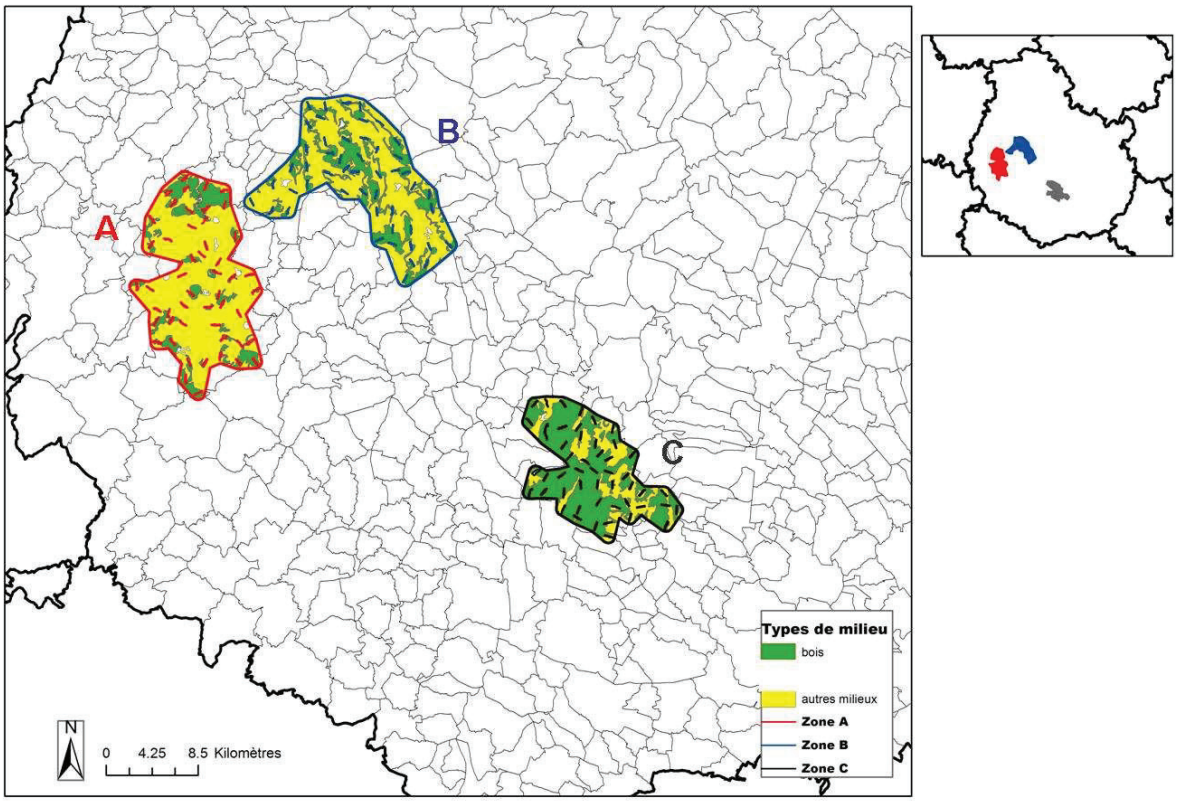


Figure 26 : localisation des trois zones échantillonnées pour déterminer la densité des blaireaux en Côte d'Or, et localisation des transects prospectés dans chaque zone

5.2.1.4. Récolte des données sur les transects

Lors de la prospection sur les transects, les coordonnées GPS des terriers observés ont été relevées, et la distance entre le transect et la localisation du terrier a été mesurée. L'observateur a déterminé si les terriers étaient actifs en relevant des indices de

présence frais (latrines, déblais, empreintes…). Différentes caractéristiques des terriers ont également été relevées (nombre de gueules, type de sol, pente…) afin de caractériser les terriers principaux, avec ou sans reproduction et les terriers secondaires.

5.2.1.5.Estimation des densités de terriers occupés

La densité de terriers occupés (Dto) a été estimée par la méthode du distance sampling. Cette méthode consiste tout d'abord à mesurer les distances objets-observateurs à partir d'un échantillon de transects ou points sélectionnés de manière aléatoire. L'objectif est d'échantillonner les distances objets-observateur depuis les transects ou points plutôt que d'envisager un dénombrement exhaustif des objets dans une zone donnée. Puis, une estimation de la probabilité de détection est réalisée à partir d'un histogramme des distances d'observation entre l'observateur et les objets à détecter, ici les terriers occupés (Buckland et al. 2001; Parrott et al. 2011).

L'histogramme des distances perpendiculaires entre le transect et les terriers occupés est utilisé pour modéliser une fonction de détection, décrivant la probablilité d'observer un terrier en fonction de la distance au transect. A partir de cette fonction on déduit la largeur de bande effective (ESW), qui est, par définition, la distance telle que le nombre d'observations faites au delà de cette distance égale le nombre d'observations manquées en-deçà de cette distance. Pour construire l'histogramme, un nombre détection minimum de 60 à 80 observations est recommandé (Hounsome et al. 2005).

Compte tenu du nombre faible de données, nous l'avons construite à partir de l'ensemble des données des trois zones en incluant les terriers principaux et secondaires occupés, même si nous pouvons penser que la probabilité de détection d'un terrier principal est supérieure à celle d'un terrier secondaire (nombre de gueules plus important, présence de déblais, de latrines…). De même, nous avons cumulé les données quel que soit le type de milieu pour construire la fonction de détection mais calculé un taux de rencontre (nombre de terriers détectés/km de transect parcouru) par type de milieu. La variance spatiale d'un transect à l'autre a ainsi été ignorée, sous estimant probablement la variance des estimations.

Les densités ont été estimées par type de milieu et par zone à partir du nombre de terriers occupés (principaux et secondaires confondus) rencontrés, divisés par la surface prospectée (nombre de kilomètres parcourus x 2 x largeur de bande effective estimée). Puis la densité par zone a été estimée en calculant la densité moyenne pondérée par les proportions de milieux dans chaque zone. Dans la catégorie « autres milieux», les bosquets et les haies ne représentaient qu'une faible proportion de surface. Malheureusement, nous ne disposions pas d'outils cartographiques pour quantifier la proportion de haies et bosquets dans « autres milieux ». .

Nous avons donc calculé les densités sous deux hypothèses :

- aucune correction sur l'estimation dans « autres milieux » (hypothèse haute) ;

- en supposant que la proportion de haies et bosquets dans « autres milieux » était la même sur toutes les zones et d'environ 10 %. En effet, dans une région de Bresse proche de la Côte d'Or et présentant une géographie assez comparable, les haies et bosquets ont été cartographiés à l'aide de la BdOrtho sur une surface de 900 km² et la proportion d'éléments arborés et de haies dans les « milieux autres » était d'environ 7% (Ruette et al. 2005), (hypothèse basse).

5.2.1.6. Estimation de la taille des groupes par piégeage vidéographique

Afin d'estimer la taille des groupes, des pièges vidéos infrarouge déclenchés automatiquement par le mouvement (modèle Trophy Cam Bushnell et modèle U-Way HCO) ont été installés sur les terriers actifs recensés au cours de la prospection sur les transects.

Le piégeage vidéo s'est déroulé du 19 avril au 26 juillet 2012. Selon la configuration du terrier, 1 à 3 appareils étaient installés par terrier et laissés en place entre 7 (zones A et C) et 10 nuits (zone B) consécutives.

Chaque vidéo déclenchée durait 30 secondes, temps jugé optimal pour dénombrer et identifier les individus, tout en préservant la charge des batteries. Afin de ne pas surestimer la taille du groupe, seul le nombre maximum d'individus vus par enregistrement a été retenu. La sortie des jeunes hors du terrier a lieu en avril, la période de suivi vidéo a donc permis de visualiser ces jeunes et de les distinguer des adultes par la taille. En revanche, il n'a pas été possible de différencier les mâles des femelles à cause du faible dimorphisme sexuel de cette espèce.

A partir des données vidéo récoltées, nous avons calculé :

- la moyenne sur chaque zone du nombre d'adultes par terrier (Nad) et du nombre de jeunes par portée (Nje) ;
- la proportion de terriers avec un couple (au moins deux individus adultes observés avec ou sans jeunes) (Ptad)
- la proportion de terriers où des jeunes ont été observés (Ptje)
- la proportion de terriers avec un seul adulte visualisé, interprété comme un possible terrier secondaire (Pts).

5.2.1.7. Estimation des densités de blaireaux

Pour chaque zone, les densités de blaireaux adultes et la densité de jeunes ont été calculées en appliquant la densité de terriers occupés (Dto) de chaque zone multiplié par la proportion de chaque type de terrier (avec couple Ptad, avec jeunes Ptje et avec un seul adulte

Pts) au nombre moyen d'individus (adultes Nad d'une part et jeunes Nje d'autre part) sur ces types de terrier, selon la formule suivante :

Densité en blaireaux adultes = Dto x [(Ptad x Nad) + (Pts x 1)]

Densité en jeunes = Dto x Ptje x Nje

5.2.2. **Résultats**

5.2.2.1. Densité en terriers occupés

Sur l'ensemble des 175 transects, 341,5 km ont été parcourus. La proportion de la zone couverte par l'échantillonnage (taux de sondage) a varié entre 2 et 3,7% selon les zones (Tableau 19).

Tableau 19 : caractéristiques des transects réalisés

Zone	***Période de Prospection***	***Longueur totale parcourue (km)***	***Taux de sondage (%)***	***Répartition dans les types de milieu (%)***			***Longueur moyenne des transects (± écart-type, km)***
				Bois	***Lisière***	***Autres milieux***	
A	29/02 au 27/03	99,5	2,60	44,4	8,5	47,2	1,99 ± 0,11
B	19/03 au 26/05	94,8	2,51	47,3	12,3	40,4	1,90 ± 0,10
C	28/02 au 23/05	98,7	3,68	61,3	8,6	30,1	1,97 ± 0,14
Total		**341,5**	2,69	47.5	9,1	43,4	**1,95**

Au total, quatre vingt cinq terriers ont été recensés, dont 48 % sur la zone A. Sur ces quatre vingt cinq terriers, soixante huit ont été retenus pour l'analyse, les dix sept autres ont été considérés comme inoccupés ou abandonnés en 2012.

Près d'un tiers des terriers ont été trouvés dans la catégorie « autres milieux », comprenant tous les milieux ouverts, hors bois et lisière (tels que définis précédemment) mais ils étaient alors toujours situés dans un bosquet ou une haie arbustive ou arborescente, en lisière entre deux cultures ou d'une culture avec une pâture.

La répartition spatiale des terriers sur les trois zones (Figure 27) montre que les distances moyennes entre deux terriers occupés (TO) les plus proches varient de 1 à 2 km selon les zones, avec d'importantes variations, certains TO étant distants de moins d'un kilomètre tandis que d'autres sont séparés de près de 5 km.

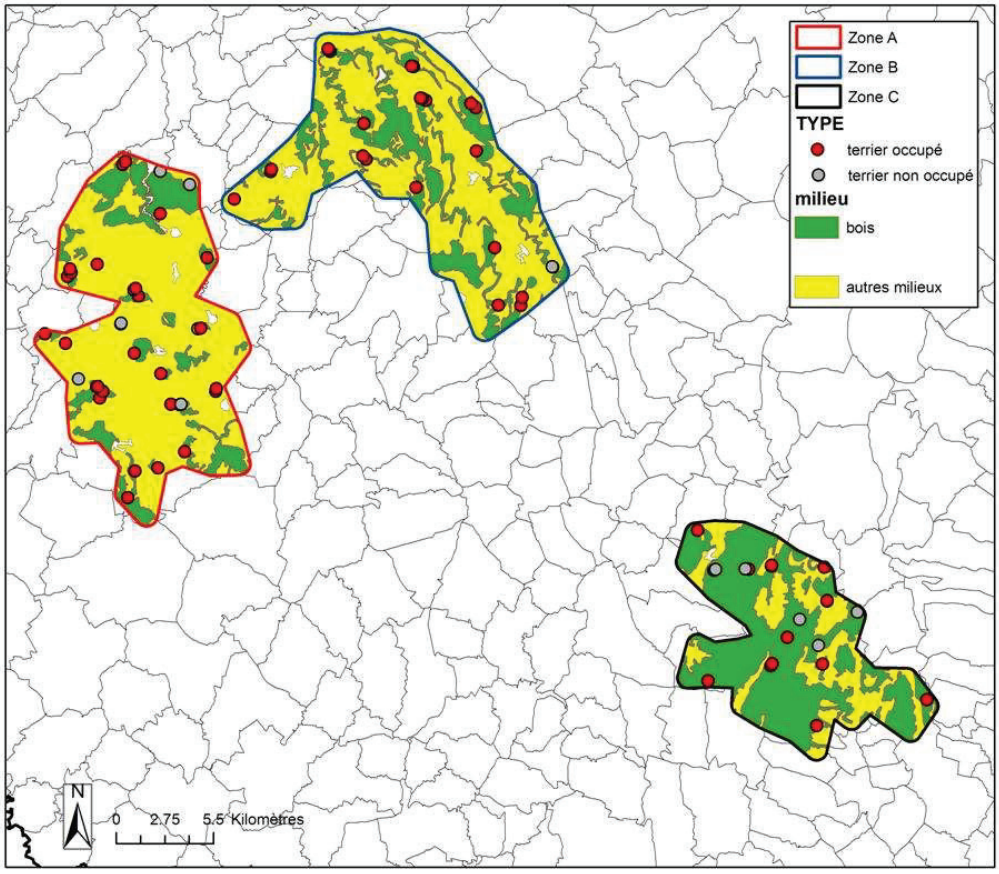


Figure 27 : répartition des terriers recensés par l'échantillonnage sur les trois zones d'étude

La fonction de détection la mieux ajustée a été modèle Hazard rate associé à un terme cosinus (adéquation du modèle aux données : chi² p = 0,97) (cf. annexe 5).

La largeur de bande effective (ESW) a été estimée à 16 m [8,5 ; 30,2] avec un coefficient de variation CV=32,7 %.

Les estimations de densité de terriers occupés varient de deux à près de onze TO/km² selon le type de milieu et la zone (Tableau 20). En zones A et B, les densités les plus fortes ont été observées en forêt alors qu'en zone C, elles étaient plus fortes en lisière. Les estimations étaient plus élevées en zone A par rapport aux zones B et C.

Tableau 20 : estimations de densité en terriers occupés D (TO/km²) par zone et par type de milieu en Côte d'Or en 2012.

Zone	Milieu	n	L (km)	n/L	D	CV (%)	Intervalle de confiance	
A	Bois	15	44,1	0,34	**10,63**	32,7	5,62	20,10
	Lisière	2	84,1	0,24	**7,44**	32,7	3,93	14,07
	Autres milieux	11	46,9	0,23	**7,33**	32,7	3,88	13,86
	Global	**28**			**2,84 - 7,94***			
B	Bois	15	44,9	0,33	**10,45**	32,7	5,53	19,78
	Lisière	2	11,7	0,17	**5,35**	32,7	2,83	10,11
	Autres milieux	3	38,3	0,08	**2,45**	32,7	1,30	4,63
	Global	**20**			**3,12 - 4,61***			
C	Bois	8	60,4	0,13	**4,14**	32,7	2,19	7,82
	Lisière	2	84,8	0,24	**7,37**	32,7	3,90	13,95
	Autres milieux	3	29,7	0,10	**3,15**	32,7	1,67	5,97
	Global	**13**			**3,20 - 4,03***			

*moyenne pondérée par les proportions de milieu sous deux hypothèses : basse : proportion de haies et bosquets dans « autres milieux »=10% - haute : pas de correction.

5.2.2.2. Estimation de la taille des groupes

Des pièges photographiques ont été posés sur quarante quatre TO considérés comme principaux (nombre de gueules supérieur à 5) et l'effort de piégeage est d'en moyenne de 1,8 pièges par terrier. Sur les quarante quatre terriers équipés, quatre n'ont pas pu être suivis par défaut du matériel. Sur les quarante terriers restants, onze n'ont fourni aucune image, quinze n'ont permis de filmer qu'un seul adulte, dix ont permis de mettre en évidence une portée (on supposera qu'il y avait donc un couple reproducteur) et dans quatre terriers, deux individus qu'on supposera constituer un couple étaient présents sans jeune (Tableau 21).

Tableau 21: résultats du piégeage vidéographique par zone échantillonnée

Zone	Terriers « lieux de reproduction »			Terrier sans reproduction			Panne	Non surveillés (TS*)	Total
	Couples avec jeunes	Couples sans jeunes	Total	1 adulte seul	Terrier sans individu	Total			
A	6	4	10	3	5	8	2	8	28
B	2	0	2	6	2	8	2	9	21
C	1	0	1	5	4	9	0	3	13
Total	**9**	**4**	**13**	**14**	**11**	**25**	**4**	**20**	**62**

*terrier secondaire

D'autre part, quatorze TO comportaient un couple (dans quatre cas, un jeune photographié alors qu'aucun adulte ou un seul adulte a été photographié), parmi lesquels dix ont produit au moins un jeune soit une reproduction pour 71 % des couples identifiés par

piégeage photographique. Dans deux terriers en zone A, quatre à cinq adultes ont été filmés alors que dans tous les autres un seul couple a été identifié avec un ou deux jeunes.

Les différences d'une zone d'étude à l'autre entre la proportion de terriers avec reproduction détectés parmi les TO ne sont pas significatives (test exact de Fisher's, p-value = 0,23).

L'estimation du nombre moyen d'adultes par terrier calculé sur quarante terriers est de **2,2 ± 1,0**.

La taille moyenne des portées calculée sur 10 terriers est de **1,8 ± 1,15**.

5.2.2.3. Estimation de la densité de blaireaux

Toutes zones confondues, les densités de blaireaux sont comprises entre 3,2 et 9,1 adultes / km^2 et 1,3 à 3,6 jeunes / km^2 (Tableau 22). Le manque de précision des résultats dû aux deux hypothèses émises sur la proportion de haies et de bosquet ne permet pas de constater de différence significative entre les trois zones. Néanmoins, nous observons que la population de la zone A (zone au paysage bocager très peu piégée) a tendance à être plus dense que celle des zones B (zone au paysage bocager fortement piégée) et C (zone au paysage forestier non piégée), tant en adultes qu'en jeunes.

Tableau 22 : densités moyennes (blaireaux/km²) des blaireaux en Côte d'Or dans les 3 zones échantillonnées

Zone	Densité en TO (/km²)	Proportion de :			Nombre moyen de		Densité en blaireaux adultes (/km²)	Densité en jeunes de l'année (/km²)
		terrier avec couple	terrier avec jeunes	terrier secondaire (Pts)	adultes par terrier (Nad)	jeunes par portée (Nje)		
A	2,8 – 7,9	0,35	0,25	0,38	2,2	1,8	**3,2 – 9,1**	**1,3 – 3,6**
B	3,1 – 4,6						**3,6 – 5,3**	**1,4 – 2,1**
C	3,2 – 4,0						**3,7 – 4,6**	**1,4 – 1,8**

5.2.3. **Discussion**

- **Méthodologie**

zones d'étude et méthode d'estimation

Cette méthode utilisée pour la première fois (une étude pilote avait juste été mise en œuvre l'année précédente en Dordogne) demanderait à être validée sur une zone où la densité est connue (recensement exhaustif de tous les terriers par exemple) ou en comparant ces résultats à ceux d'une autre méthode validée d'estimation des densités. Néanmoins, ils fournissent une première indication de l'abondance des populations de blaireaux et permettent la comparaison entre les différentes zones échantillonnées.

Afin d'avoir une estimation par type de milieu, il conviendrait d'augmenter les efforts de prospection pour améliorer l'échantillonnage en stratifiant *a priori* par type de milieu.

Les trois zones d'étude ont été choisies de manière à représenter trois types de zones fréquentes en Côte d'Or. Cependant, la représentativité des secteurs explorés dans chaque zone peut être discutée. Pour tenir compte de la répartition hétérogène des terriers, nous avons favorisé les milieux propices à leur présence (bois, lisières et haies) pour réaliser les prospections. Ce biais a pu être partiellement corrigé en pondérant les estimations de densités par milieu par la proportion de ces milieux identifiés dans Corine Land Cover. En revanche, nous avons surestimé la densité en terriers en milieux « autres », correspondant aux milieux ouverts. Une correction a été apportée en supposant que la proportion de haies et bosquets dans les milieux ouverts étaient de 10 % mais cette proportion reste une hypothèse à vérifier et de plus, elle est probablement variable d'une zone à l'autre. Il en a résulté une incertitude (selon l'hypothèse haute et l'hypothèse basse de la proportion de haies et de bosquets en milieu ouvert) dans les résultats des densités de terrier, répercutée sur la densité de blaireaux finale.

Les nombres de terriers observés étaient effectivement relativement faibles, ce qui a conduit à cumuler les trois zones pour pouvoir construire la fonction de détection et ainsi déterminer la largeur de bande efficace. De cette façon, nous avons considéré que la détectabilité était identique entre les zones mais surtout entre les types de milieu, alors qu'il est probable qu'elle était plus faible en milieu forestier.

Détermination du type de terrier et du nombre d'animaux par terrier

Nous n'avons obtenu aucune image sur onze terriers, ce qui, *a posteriori*, ne les placerait pas comme des terriers principaux tels que nous les avions identifiés lors de la prospection. Nous ne pouvons cependant pas totalement écarter l'effet possible du dérangement causé par l'installation de l'appareil qui a pu faire fuir les blaireaux de ces

terriers. Les blaireaux sont en effet sensibles au dérangement et leur odorat très fin leur permet de sentir les éventuelles odeurs laissées lors du passage de l'opérateur (Roper 2010). Dans ce contexte, sachant qu'il était impossible de couvrir toutes les gueules d'un même terrier avec le nombre d'appareils dont nous disposions et même si ceux-ci ont été préférentiellement placés sur les gueules qui semblaient les plus utilisées, il est possible que certains individus aient réagi au dérangement en empruntant d'autres sorties, voire en quittant momentanément le terrier, ce qui a pu résulter en une sous-estimation de la taille des groupes. De plus, pour chaque terrier, l'identification individuelle étant impossible, nous avons retenu le nombre maximum d'individus que nous voyions simultanément sur une image, ce qui a pu entrainer une sous-estimation de la taille des groupes.

.En outre, parmi les terriers, qualifiés *a priori* de terriers secondaires lors de la prospection, et par la suite non équipés de pièges vidéo, il a pu se trouver des terriers principaux. Cette possibilité constituerait un biais qui a pu conduire à sous-estimer les densités de terriers avec reproduction et donc de blaireaux dans les zones.

L'ensemble de ces éléments conduirait à une sous-estimation de la densité de blaireaux.

- **Niveau de densité observé**

Nous avons mis en évidence une densité comprise entre 3,2 et 9,1 blaireaux adultes / km^2 et entre 1,3 et 3,6 jeunes / km^2. Nous avons trouvé une taille moyenne de groupe de 2,2 ± 1,0 adultes et une taille de portée de 1,8 ± 1,15.

A titre de comparaison avec une autre zone concernée par la tuberculose, le même protocole a été appliqué en Dordogne dans le cadre de la thèse vétérinaire d'Edouard Reveillaud en 2011 (Reveillaud 2011) et les mêmes analyses appliquées ensuite par le CNERA PAD. Dans ce cas, la densité en terriers principaux occupés variait selon les zones de 0,5 à 0,7 par km^2. La taille moyenne des groupes était 2 adultes et 2 jeunes et la densité en blaireaux était de 1,5 à 4,5 blaireaux /km^2 et de 0,5 à 1,4 jeunes / km^2 (Ruette et al. données non publiées). Cette densité apparaît donc plus faible qu'en Côte d'Or bien que la taille de groupe soit similaire.

La taille de groupe que nous avons estimée est comparable à celle rapportée dans les Ardennes par Bodin (2005), où l'observation par affût de 6 groupes a permis de déterminer une taille moyenne de 2,8 ± 2,2 adultes et de 3,5 ± 2,8 individus en incluant les jeunes. Elle est légèrement supérieure à celle décrite par Do Linh San (2007) en Suisse qui a estimé une taille de groupes de 1,04 ± 0,71 adultes / km^2, 2,2 ± 1,5 individus / km^2 et une densité de terriers de 0,8 par km^2 conduisant à une densité de blaireaux de 1,8 individus par km^2.

La densité en individus est également supérieure aux densités rapportées dans le sud de l'Espagne, dans les pays scandinaves et dans les forêts d'Europe centrale, qui présentent les plus faibles densités européennes de blaireaux décrites (respectivement 0,16,

0,24-0,50 et 0,36 blaireaux/ km^2), bien que la taille de groupes dans ces régions soit proche de la valeur que nous avons trouvé ici (Broseth et al. 1997; Virgos & Casanovas 1999; Kowalczyk et al. 2000; Lara-Romero et al. 2011).

Au Royaume-Uni au contraire, les densités sont plus élevées que celles observées en Côte d'Or. Selon les régions, en Angleterre, les densités en terriers vont de 0,9 à 10,5 terriers/km^2, les tailles de groupe sont comprises entre 3,3 et 8,8 adultes par groupe et les densités de blaireaux varient de 5 à plus de 30 blaireaux par km^2, les densités les plus fortes étant rencontrées dans le Gloucestershire, au cœur de la zone enzootique de tuberculose bovine (Hutchings et al. 2002; Palphramand et al. 2007; Roper 2010; Byrne et al. 2012a).

En Irlande, les tailles de groupes sont comprises selon les sites et les méthodes de 1,8 à 5,9 blaireaux adultes et la densité en terriers principaux varient entre 0,34 et 2,27 terriers/km^2 (1,48 à 14,29 tous types de terriers confondus) (Feore & Montgomery 1999; Byrne et al. 2012a). Les densités en individus sont évaluées à 0,72 à 11,9 adultes par km^2 selon les régions (Feore & Montgomery 1999).

Au vu de cette revue européenne, nous constatons que la densité de blaireaux que nous avons estimée en Côte d'Or peut-être qualifiée de modérée à moyenne, avec un niveau intermédiaire entre les faibles densités d'Europe de l'Est, du nord et du sud et les densités élevées des îles britanniques. Nous constatons cependant que la différence avec les pays ayant un niveau de population plus bas provient davantage de la densité en terriers que de la taille des groupes qui est comparable. La composition des groupes mise en évidence en Côte d'Or est conforme à ce qui est le plus répandu ailleurs : un couple avec un ou deux jeunes (Byrne et al. 2012a). En revanche, en Angleterre, dans les régions les plus denses, la différence se fait à la fois sur la densité en terriers et sur la taille des groupes. Il en est de même en Irlande, bien que les valeurs observées soient plus proches de nos résultats que celles d'Angleterre.

- **Variations de densité entre zones : effet du paysage**

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence significative entre les trois zones, que ce soit pour le nombre de terriers avec reproduction ou la densité en terriers. Cependant, la tendance qui se dessine est celle d'une densité plus élevée dans la zone A, située en paysage fragmenté et très peu piégé par rapport aux deux autres zones (paysage similaire, intensément piégée et zone boisée non piégée) et cela pour la taille des groupes (plus de terriers avec couples et reproduction, deux terriers avec plus de deux adultes) comme pour la densité en terriers.

L'influence du paysage sur la densité de blaireaux a été démontrée par de nombreuses études. Les blaireaux privilégient la proximité de milieux ouverts et de pâtures et évitent les zones où les forêts sont totalement absentes (Kowalczyk et al. 2000). Dans les îles britanniques, Feore et Montgomery (1999) ont mis évidence que les densités les plus élevées se trouvaient dans les habitats avec des forêts interrompues par des terres agricoles. Dans ces régions, les terriers sont préférentiellement situés en lisière à moins de 300m d'une zone

ouverte. Ces études mentionnent également l'importance de la nature du sol dans la densité des terriers, les sols secs et faciles à creuser étant privilégiés (Feore & Montgomery 1999; Hammond 2001; Sleeman et al. 2009; Reid et al. 2012). Nos résultats sont cohérents avec ces études dans la mesure où le milieu forestier (zone C) semble moins dense en terriers que la zone A qui correspond au milieu privilégié par les blaireaux décrits dans cette littérature. Le sous-sol de l'Auxois est de type argileux avec des pentes marneuses, un substrat meuble facile à creuser pour les blaireaux alors que les forêts des Hautes Côtes sont sur un sol calcaire beaucoup plus dur (cf. paragraphe 1.1.2.).

L'effet du piégeage et le lien entre la densité et l'infection à *M. bovis* chez le blaireau seront discutés dans le chapitre 3.

6. CONTACT ENTRE POPULATIONS SAUVAGES ET BOVINS

Le niveau d'interactions entre le compartiment sauvage et domestique est un facteur clé pour évaluer la transmission interspécifique car il conditionne les possibilités de contacts contaminants (Corner 2006). Nous avons vu précédemment que cerfs, sangliers et blaireaux étaient capables d'excréter *M. bovis* par différentes voies et donc de contaminer l'environnement. Les bovins, quant à eux, peuvent excréter *M. bovis* par les aérosols et dans les fèces, même en l'absence de lésions macroscopiques (Phillips et al. 2003; Mccorry et al. 2005). Des études ont montré que les contacts directs étaient rares entre blaireaux et bovins (Böhm et al. 2009; Drewe et al. 2013) comme entre sangliers ou cerfs et bovins (Cooper et al. 2010; Kukielka et al. 2013). La bactérie étant capable de survivre plusieurs mois dans l'environnement et jusqu'à 6 mois dans les bouses des vaches dans certaines conditions climatiques (Phillips et al. 2003), la transmission interspécifique par contact indirect serait la plus probable, via l'inhalation ou la consommation de substrats contaminés par des excrétas (Hutchings & Harris 1999; Drewe et al. 2013; Kukielka et al. 2013).

Prendre la mesure du partage de l'habitat entre ces espèces sauvages et domestiques s'avère donc être un enjeu majeur pour l'évaluation du risque de transmission interspécifique à la fois dans le sens bovins vers les populations sauvages que pour la transmission-retour des populations sauvages vers les bovins. L'objectif était donc d'une part d'estimer l'intensité du contact indirect entre les populations sauvages et les bovins en Côte d'Or et d'autre part de caractériser ce contact et ainsi d'apporter des éléments permettant de limiter le risque de transmission. Pour cela, nous avons utilisé deux méthodologies : le suivi d'animaux sauvages au moyen de la télémétrie pour déterminer leur utilisation des pâtures et le suivi de sites au moyen de vidéosurveillance afin de connaître la fréquentation de sites d'élevage par la faune sauvage.

La récolte des données pour cette étude a constitué la majorité de mon travail de terrain.

6.1. Utilisation des pâtures par les sangliers et les blaireaux

Cette partie concernant l'utilisation des pâtures par les blaireaux a fait l'objet d'un article soumis à la revue European Journal of Wildlife Research (Annexe 6) :

Payne A., Ruette S, Millet L., Hars J., Dufour B., Gilot-Fromont E. Factors influencing the risk of indirect contact between badgers (*Meles meles*) and cattle in bovine tuberculosis infected area in France

Etant donné la faible prévalence observée à ce jour chez les cervidés dans ce département, nous avons focalisé notre étude sur les sangliers et les blaireaux. Au moyen de suivis télémétriques, nous avons cherché à déterminer dans quelle mesure ces deux populations utilisaient les habitats des bovins, à savoir les pâtures et quels facteurs influençaient cette utilisation. Dans les paysages bocagers et agropastoraux tels que ceux de Côte d'Or, les domaines vitaux de ces espèces englobent le plus souvent des milieux ouverts et des milieux forestiers. La distribution de ces deux types d'habitat peut influencer l'utilisation des pâtures qui dépend également des saisons et de la richesse du milieu en ressources alimentaires (Kruuk et al. 1979; Welander 2000; Calenge et al. 2002; Do Linh San et al. 2007; Palphramand et al. 2007). Nous avons posé comme hypothèse que la composition du paysage local pouvait avoir un effet sur l'utilisation des pâtures par ces animaux sauvages. En particulier, nous avons supposé pour les blaireaux que plus le terrier serait proche des pâtures, plus celles-ci seraient utilisées par les individus de ce terrier. Chez les sangliers, nous avons supposé que la proportion de pâture disponible était positivement corrélée à leur utilisation. A l'inverse, la disponibilité d'autres ressources alimentaires comme les cultures pourraient détourner les blaireaux et les sangliers de l'utilisation des pâtures. Les blaireaux connaissent un pic d'activité territoriale au début du printemps et en automne alors qu'ils ont une activité ralentie pendant les périodes les plus froides, ne sortant pas ou très peu de leur terrier lorsque les températures sont négatives (Kowalczyk et al. 2003a, Roper 2010). A l'échelle des saisons, les sangliers modifient leur déplacement et privilégient certains habitats en fonction des ressources alimentaires disponibles (glands, céréales) et de la chasse (Welander 2000; Calenge et al. 2002; Keuling et al. 2009; Saïd et al. 2011). En outre, les sangliers sont sensibles aux fortes chaleurs et sont dépendants physiologiquement des points d'eau (Bracke 2011). Nous avons donc supposé que l'utilisation des pâtures pouvait varier au fil du temps en fonction du rythme d'activité des animaux, de la disponibilité alimentaire et de la chasse mais aussi de la température et de la pluviométrie, qui sont variables d'un jour à l'autre.

Les vers de terre constituent pour les 2 espèces une des bases de leur régime alimentaire (Kruuk & Parish 1981; Baubet & Brandt 2003), or la disponibilité des lombrics est variable selon les saisons mais aussi sur un pas de temps journalier selon les conditions météorologiques. Blaireaux et sangliers sont deux espèces opportunistes et privilégient leur consommation de lombrics quand ceux-ci sont les plus accessibles, à savoir par temps doux et humide (Kruuk 1978; Baubet & Brandt 2003). Sachant que les pâtures contiennent une biomasse importante de lombricidés (Kruuk et al. 1979; Granval et al. 2000), nous avons supposé que des conditions de température et de pluviométrie favorables à la remontée des lombrics à la surface des pâtures pourraient favoriser l'utilisation de celles-ci par les blaireaux et sangliers. Nous avons donc, d'une part, cherché les effets de la température et de la pluviométrie indépendamment l'une de l'autre, et d'autre part, nous avons combiné ces variables pour voir si les conditions de pluviométrie et de température favorables à la remontée des lombrics à la surface, pouvaient favoriser l'utilisation des pâtures par le blaireau et le sanglier.

Enfin, l'utilisation de l'espace pouvant être différente entre mâles et femelles, nous avons également étudié l'effet du sexe sur l'utilisation des pâtures (Kowalczyk et al. 2003b; Do Linh San et al. 2007; Keuling et al. 2009; Saïd et al. 2011).

6.1.1. **Matériel et méthode**

J'ai mis en œuvre le dispositif de piégeage des animaux et j'ai coordonné les opérations de capture en effectuant les anesthésies, les prélèvements et la pose des colliers (que j'avais programmés auparavant). En plus d'un technicien mis à disposition par la FDC 21 pour le travail de terrain de cette thèse, un vétérinaire praticien (Stéphane Barbier), des agents du service départemental de l'ONCFS et des chasseurs et piégeurs ont participé aux manipulations des animaux. Une stagiaire de Master 2 (Lucile Millet), que j'ai coencadrée, a aidé au traitement des données.

6.1.1.1. Site d'étude et choix des lieux de capture

Le site d'étude correspond à la zone d'infection bovine de la Côte d'Or dans laquelle ont été détectés tous les cas positifs de blaireaux et de sangliers. Comme nous l'avons déjà présenté dès le paragraphe 3, nous pouvons distinguer au sein de cette zone 2 « sous-zones » : l'une au nord présentant un paysage bocager fragmenté dominé à 80% par le milieu ouvert, l'autre au sud, couverte à 60% par de la forêt mixte. En outre, nous avons vu qu'il existait un différentiel de densité entre ces deux secteurs : la partie nord est plus dense en bovins (cf. paragraphe 1) et *a priori* en blaireaux tandis que les sangliers sont plus abondants dans la partie sud (cf. paragraphe 5).

Les sites de capture pour les sangliers ont initialement été répartis en zone nord et zone sud. Cependant, après plusieurs mois de tentatives de capture infructueuses en zone

nord, nous avons décidé de nous focaliser sur la zone sud où la densité de sangliers est plus élevée. Au sein de cette zone, six sites de capture ont été choisis, présentant un degré plus ou moins important de fragmentation du paysage.

Afin de tester l'hypothèse que l'éloignement du terrier à la pâture influence l'utilisation de celle-ci par le blaireau, les terriers ont été choisis en fonction de leur distance à la pâture la plus proche dans le but d'obtenir un gradient de distances de 10 mètres à 500 mètres entre les différents individus. L'environnement des terriers comportait, pour certains, des exploitations bovines (dont l'une a été infectée trois fois). Trois sites dans la zone nord et quatre sites dans la zone sud ont été choisis, chacun comportant plusieurs terriers remplissant ces critères.

Les pâtures et les cultures du site d'étude ont été répertoriées à partir du registre parcellaire graphique 2011 et 2012 élaboré à partir des déclarations des exploitants agricoles, comprenant les caractéristiques spatiales de toutes les parcelles agricoles ainsi que leur utilisation entre mai de l'année N et mai de l'année N+1 (Source : DDT 21).

6.1.1.2.Données météorologiques et périodes

Nous avons collecté les données météorologiques sur la zone d'étude entre le 1er août 2011 et le 31 janvier 2013, correspondant à la période pendant laquelle s'est déroulée l'étude. Les températures minimales et maximales quotidiennes en degré Celsius et les précipitations quotidiennes en mm ont été fournies par deux stations automatiques de Météo France proches des sites de capture (en zone sud : 47.27N, 4.55E; en zone nord : 47.49N, 4.33E ; WGS 1984). Pour le blaireau, la température minimale a été retenue pour expliquer l'utilisation quotidienne des pâtures plutôt que la température moyenne ou maximale car elle correspond à la température nocturne et est donc plus déterminante sur l'activité des blaireaux, qui peuvent hiverner lorsque la température descend sous un certain seuil (Kowalczyk et al. 2003a). L'unité temporelle de suivi choisie pour les blaireaux étant la nuit (cf. *infra*), nous avons utilisé les données météorologiques du jour J pour chaque nuit entre le jour J et le jour J+1. Pour le sanglier, la température maximale nous a semblé plus pertinente car cette espèce est sensible aux températures élevées et la recherche d'abris ou de points d'eau peut influencer leur utilisation des pâtures (Bracke 2011). Les sangliers étant suivis également pendant la journée, l'unité temporelle de suivi choisie correspond à 24h (cf. *infra*), nous avons donc utilisé les données météorologiques récoltées pendant les 24h du jour J du suivi.

Ces données météorologiques ont été utilisées directement, mais elles ont également servi pour définir les nuits favorables à la remontée des lombrics à la surface du sol. D'après Kruuk & Parish (1981), les nuits favorables à la remontée des lombrics sont celles où la température maximale est comprise entre 8,5 et 14,5°C, la température minimale ne descend pas en dessous de 0°C et les précipitations sont soit supérieures à 2 mm dans les

dernières 72h, soit supérieures à 1 mm dans les dernières 24h, soit supérieures à 10 mm le jour ou la nuit même.

Pour chaque nuit pour les blaireaux et pour chaque 24h pour les sangliers, une variable « nuit à lombrics » (*NL*) codée en 0 (nuit non favorable) ou 1 (nuit favorable) a été créée pour toute la durée de l'étude. Le nombre de « nuits à lombrics » (*NbNL*) a été calculé par mois pour les besoins de l'analyse (Figure 28).

Le suivi télémétrique des blaireaux s'est déroulé entre début août 2011 et fin mai 2012. Le découpage des différentes classes de périodes (P1 à P4) a été choisi selon des critères d'homogénéité des conditions météorologiques, et pour correspondre aux différentes phases biologiques du blaireau (activité ralentie en hiver, mise-bas et allaitement en janvier-février ; activité territoriale accrue au printemps et automne) et aux différentes saisons zootechniques (vaches présentes sur les pâtures ou rentrées dans les bâtiments) (Figure 28).

Le suivi télémétrique des sangliers s'est déroulé d'août 2011 à janvier 2013. Compte-tenu du nombre d'animaux suivis, nous avons choisi de tester l'effet des saisons (été, automne, hiver et printemps) sans tenir compte de l'année, en distinguant dans le découpage les périodes chassées des périodes non chassées (Figure 28).

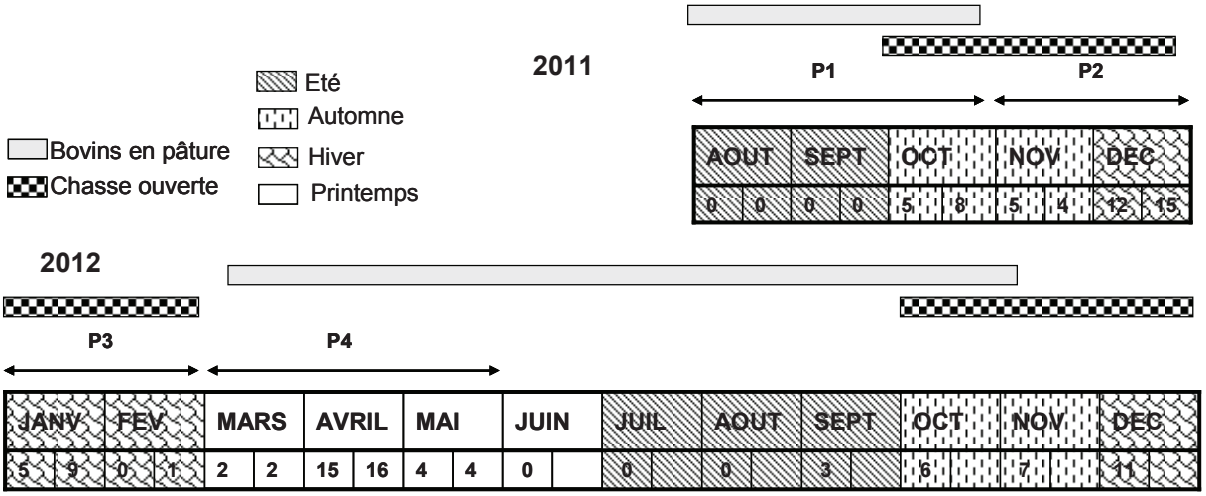


Figure 28 : définition et caractéristiques des périodes utilisées dans l'analyse. Pour les blaireaux, elles correspondent à P1 jusqu'à P4. Pour les sangliers, elles correspondent aux 4 saisons. Sous chaque mois, est indiqué le nombre de nuits à lombrics dans la zone sud (case gauche) et dans la zone nord (case droite).

6.1.1.3.Captures, équipement de colliers GPS et suivi télémétrique

Pour capturer les sangliers et les blaireaux, vingt quatre cages trappes et quatre pièges corral appâtés avec du maïs grain ont été disposés près des terriers et sur des lieux de passage (coulées, anciennes place d'agrainage).

Pour les blaireaux, la période de capture a commencé en août 2011 et s'est poursuivie jusqu'en février 2012, totalisant un effort de capture de 200 nuits-pièges. Pour les

sangliers, les captures, interrompues pendant la chasse, ont été prolongées jusqu'en septembre 2012, pour un effort de capture de 580 nuits-pièges.

Les sangliers pesant plus de 50 kg ont été anesthésiés par un mélange de xylazine (Rompun®) et de Zolazépam-Tilétamine (Zolétil®) à la dose de 4mg/kg pour chaque produit administré au moyen d'un lanceur hypodermique ou d'une perche (« jabstick ») (S. Rossi com. pers.). Une fois capturés, les blaireaux ont été anesthésiés à l'aide d'une sarbacane administrant un mélange de kétamine (Imalgène®) et de médétomidine (Domitor®) à la dose de 0,1ml/kg de chaque produit (Thornton et al. 2005).

Tous les individus étaient ensuite pesés, sexés et identifiés individuellement au moyen de boucles auriculaires numérotées. Pour les sangliers, l'âge a été déterminé en fonction de la formule dentaire (Matschke 1967).

Afin d'éviter que le port du collier ne gêne la croissance ou la prise de poids des animaux, nous avons cherché à équiper les individus les plus lourds et les plus âgés possible. Seuls les individus pesant au moins 10 kg pour les blaireaux et 60 kg pour les sangliers étaient équipés de colliers GPS. Le choix de l'animal à équiper a également été guidé par l'objectif du ratio équilibré entre mâles et femelles d'une part, et celui de n'avoir pas plus d'un individu équipé par groupe d'autre part.

Nous avons utilisé des colliers GPS de la marque LOTEK®, 10 modèles small wildcell pour les blaireaux (poids : 300g) et 6 modèles M5 (poids : 1 kg) complétés par 4 colliers de la marque SIRTRACK® (poids : 1kg) pour les sangliers. Ils comportaient un système de décrochage automatique programmé à l'avance permettant de récupérer le collier sans avoir à re-capturer l'animal. Le poids total du collier était inférieur à 3% du poids de l'animal.

Les blaireaux étant des animaux à activité essentiellement nocturne et restant dans leur terrier le reste du temps (Roper 2010), les colliers ont été programmés pour prendre un point GPS toutes les 30 minutes pendant la nuit (entre 19h et 8h), programmation que nous avons considérée comme meilleur compromis entre précision du suivi et durée totale de celui-ci, estimée théoriquement à 214 j en moyenne (134j dans le pire des cas et 305 j dans le meilleur des cas).

Les sangliers ayant une activité limitée la journée et se déplaçant principalement pendant la nuit (Keuling et al. 2009), les colliers ont été programmés pour prendre un point GPS toutes les 20 minutes entre 18h et 8h du matin et toutes les 2h entre 8h et 18h. La taille de la batterie supportée par l'animal permettait une fréquence de localisations plus importante que chez les blaireaux. Compte-tenu de cette programmation, la batterie des colliers LOTEK® devaient avoir une durée de vie comprise entre 240 et 1184 jours avec une moyenne de 441 jours. Pour les colliers SIRTRACK®, la durée de vie annoncée par le fabricant était de 8 mois.

6.1.1.4.Traitement des données de géolocalisation

Afin de traduire au mieux l'intensité du contact indirect par le niveau d'utilisation des pâtures nous avons choisi de travailler sur des estimateurs en valeurs absolues (et non sur des proportions) en se plaçant à 2 niveaux temporels et spatiaux.

Tout d'abord, pour chaque individu, nous avons calculé le nombre de localisations en pâture par nuit pour les blaireaux ou par 24h pour les sangliers. Cette variable reflète la durée passée par les individus sur les pâtures par nuit ou par 24h. Elle a en outre été choisie afin de tester si l'utilisation des pâtures pouvait dépendre de facteurs variables d'une nuit à l'autre, comme les facteurs météorologiques et les conditions favorables aux remontées des lombrics à la surface du sol. Nous souhaitions également tester s'il existait une variabilité de l'utilisation quotidienne des habitats bovins en fonction du sexe, de la période de l'année et de la proximité ou de l'importance des pâtures dans l'environnement des animaux suivis (Tableau 23).

Les données brutes de géolocalisation ont permis d'obtenir le nombre de localisations en pâture pour chaque nuit ou chaque 24h pour chaque animal. En pâture, comme dans les autres milieux ouverts, le taux de succès de prise de points GPS a été en moyenne de 95% et la précision a été évaluée à 10 mètres à partir de tests réalisés avant la pose des colliers. Afin de tenir compte de cette précision, nous avons inclus toutes les localisations se trouvant sur les pâtures identifiées à partir du registre parcellaire graphique et dans une zone tampon de dix mètres autour de celles-ci. Ces traitements spatiaux ont été réalisés avec le logiciel ArcGis 10.0. (ESRI, Redlands, California).

Dans un deuxième temps, nous avons calculé la surface de pâture incluse dans le domaine vital et le centre d'activité par mois pour chaque individu suivi. Cette approche permet de prendre en compte l'intensité de l'utilisation des pâtures des individus en terme spatial. L'unité temporelle choisie ici a été le mois qui est approximativement la durée minimale de suivi, générant un nombre de localisations supérieur à 50, suffisant pour calculer le domaine vital (Seaman et al. 1999) et pouvant discriminer des modifications de l'occupation de l'espace chez ces espèces. Il a également été vérifié que les conditions météorologiques étaient homogènes à l'intérieur de chacun des mois de l'étude. Les domaines vitaux ont été estimés en utilisant la méthode du kernel fixe prenant en compte 95% des localisations, considérée comme représentant au mieux la distribution de l'utilisation de l'espace (Worton 1995). La valeur du paramètre de lissage a été déterminée en multipliant le paramètre h de référence par le facteur 0,2, ce facteur multiplicateur ayant été choisi visuellement avec l'objectif de ne pas surestimer la surface réellement utilisée. Les centres d'activité (CA) ont été déterminés par le kernel 50% (Calenge et al. 2002; Bodin 2005), avec le même paramètre de lissage que pour le domaine vital.

Le domaine vital a également été calculé avec le polygone minimum convexe prenant en compte 100% des localisations (MCP100%), d'une part dans le but de comparer nos résultats aux autres études et d'autre part afin de déterminer les surfaces et proportions de

certains milieux disponibles pour chaque animal (Aebischer et al. 1993). Dans la suite de l'article, le terme « domaine vital » (DV) désigne l'estimation réalisée par le kernel 95%. Ces traitements ont été réalisés avec le package adehabitat de R (Calenge 2006).

Pour chaque animal, les surfaces de pâture se superposant aux domaines vitaux et aux centres d'activité mensuels ainsi générés ont été calculées en utilisant ArcGis 10.0. (ESRI, Redlands, California) Elles constituent les variables à expliquer. Elles ont été calculées pour chaque individu à l'aide d'Arc Gis 10.0 à partir des données du registre parcellaire graphique.

6.1.1.5.Analyses statistiques

Pour les analyses temporelle et spatiale, nous avons utilisé des modèles linéaires mixtes, permettant de prendre en compte la variabilité individuelle (variable ***ind)*** dans la partie aléatoire des modèles (Dingemanse & Dochtermann 2013). Ils ont été ajustés et comparés pour expliquer les trois indicateurs de l'utilisation des pâtures par les blaireaux : le nombre de localisations en pâture par nuit par animal, ***nloc,*** la surface de pâture se superposant au domaine vital mensuel ***pat_dv*** et au centre d'activité mensuel ***pat_ca***.

La part de variabilité expliquée par la partie aléatoire***,*** a été déterminée par le rapport de la variance interindividuelle sur la variance totale de la partie aléatoire incluant la variance résiduelle. La part de variabilité expliquée par la partie fixe du modèle a été estimée en calculant le ratio entre la déviance du modèle ayant une partie fixe nulle et la déviance du modèle final.

La distance entre le terrier et la pâture (***dist t-p***) pour les blaireaux ou la proportion de pâture disponible (***pat_dispo***), c'est-à-dire comprises dans le MCP100% global de l'individu, pour le sanglier, le sexe, la température (minimale, ***T min***, pour les blaireaux, maximale, ***T max*** pour les sangliers), la pluviométrie, la période (***Per***, comprenant 4 classes : ***P1*** à ***P4*** pour les blaireaux et les 4 saisons pour les sangliers) telle que définie dans le paragraphe 6.1.1.2 et la figure 28, et la variable « nuit à lombrics » (***NL***) ont été testées dans la partie fixe du modèle comme variables explicatives pour le nombre de localisations sur pâture par nuit ou par 24h et par animal (***nloc***) (Tableau 23).

Pour expliquer les surfaces de pâture se superposant aux domaines vitaux (***pat_dv***) et aux centres d'activité mensuels (***pat_ca***), nous avons également testé dans la partie fixe de chacun des modèles le sexe, la distance entre le terrier et la pâture (***dist t-p***) ou la proportion de pâture disponible (***pat_dispo***), la période (***Per***), le nombre de nuits à lombrics dans le mois (***NbNL***) et la proportion de cultures disponible (***cult_dispo***), calculée à partir de le surface du MCP 100% de chaque individu (Tableau 23).

La sélection de modèle a été réalisée en suivant la procédure de Zuur et al. (2009). La partie aléatoire du modèle a été déterminée en comparant le modèle avec et sans prise en compte de l'effet aléatoire de l'individu en incluant dans la partie fixe toutes les variables choisies et les interactions d'ordre 2 biologiquement plausibles. Pour choisir les

variables à retenir dans la partie fixe, nous avons ensuite ajusté tous les sous-modèles possibles à partir du précédent, et retenu les modèles présentant les plus faibles AIC (Akaike information criterion) à chaque étape. Nous avons également appliqué le principe de parcimonie (Burnham & Anderson 2002) : lorsque deux modèles avaient des valeurs AIC proches (différence inférieure à 2), nous avons choisi celui comportant le moins de paramètres. Pour le modèle expliquant le nombre de localisations par nuit sur les pâtures, nous avons vérifié s'il existait une autocorrélation temporelle entre les sorties quotidiennes, c'est-à-dire si les animaux avaient tendance à avoir le même nombre de localisations en pâture d'une nuit à l'autre. Cette vérification a été faite en observant le patron d'autocorrélation temporelle des résidus du modèle choisi précédemment. Puis le cas échéant, la structure de cette autocorrélation a été identifiée pour être prise en compte dans le modèle final. La sélection de la meilleure structure d'autocorrélation entre l'absence d'autocorrélation, Ar(1) et ARMA (1,1) a été faite en comparant les AIC. Enfin, les paramètres ont été estimés par la méthode de la quasi-vraisemblance pénalisée (REML : restricted maximum likelihood).

La normalité des résidus a été vérifiée visuellement et par un test de Shapiro. Après examen des résidus, nous avons choisi de transformer la variable initiale à expliquer pour aboutir à des résidus normalement distribués. Nous avons réalisé une transformation racine carrée pour les variables ***nloc*** pour le sanglier et le blaireau ainsi que pour les variables ***pat_dv*** et ***pat_ca*** pour le blaireau. Pour le sanglier ces variables ***pat_dv*** et ***pat_ca*** ont été transformées avec une fonction log. Nous avons vérifié que cette transformation ne modifiait pas les parties fixe et aléatoire du modèle sélectionné.

Tableau 23 : variables testées dans les modèles linéaires généralisés mixtes expliquant le nombre de localisations sur les pâtures par nuit ou par 24h et la surface de pâture incluse dans le domaine vital et le centre d'activité par mois. Les valeurs extrêmes des variables quantitatives figurent entre parenthèse

	Blaireau	***Sanglier***
Facteurs intrinsèques	Individu, sexe	
Facteurs paysagers	Distance terrier-pâture (10 → 500m)	Proportion de pâture disponible (2 → 55%)
Période	4 périodes entre 08/11 et 05/12	4 saisons (2011 et 2012 confondues)
Facteurs météorologiques	Température minimale quotidienne* (-15 → 21℃)	Température maximale quotidienne* (-6 → 35℃)
	Pluviométrie quotidienne*(0 → 27mm)	
	Nuit à lombrics* (oui : 1, non : 0)* Nombre de nuits à lombrics par mois** (0 → 16)	
Ressources alimentaires	Proportion de cultures disponibles** 0 → 48% 5 → 47%	

*Variable utilisée uniquement pour expliquer le nombre de localisations sur les pâtures par nuit ou par 24h
** Variable utilisée uniquement pour expliquer la surface de pâture dans le domaine vital et le centre d'activité par mois

6.1.2. **Résultats**

6.1.2.1.Sangliers

Cent soixante douze sangliers ont été capturés, majoritairement des jeunes, pour un taux de capture de 0,296 captures/nuit-piège. Onze sangliers, six femelles et cinq mâles appartenant à des compagnies différentes réparties dans la zone sud ont été équipés de colliers GPS. Ces animaux ont été suivis pendant 127,5 jours en moyenne (min : 25 jrs, max : 253 jrs, médiane : 126 jrs). La perte des colliers (ouverture prématurée du système de décrochement automatique, probablement suite aux frottements répétés sur cette partie du collier) et la chasse ont entrainé des durées de suivis plus courtes que prévues dans le protocole.

Onze individus ont été suivis pendant l'été, neuf pendant l'automne et cinq pendant le printemps. Un seul individu (S1) a été suivi pendant l'hiver 2012-13. De plus, cet individu a présenté la proportion de pâture disponible la plus faible (Figure 29). Afin de ne pas déséquilibrer le plan d'échantillonnage, nous avons décidé de ne pas prendre en compte l'hiver 2012-2013 dans l'analyse.

La part de pâture disponible a varié entre 2,5 et 55,4% selon les individus.

Le nombre de localisations sur l'ensemble du suivi a été compris entre 1100 et 9912 par animal. Mensuellement, ce nombre a varié entre 473 et 1917 (Tableau 24). Les domaines vitaux mesurent en moyenne 2429,4 ± 1633,5 ha par la méthode du MCP100% et 770,7 ± 564,7 ha par la méthode du kernel 95%. La distance moyenne entre les points extrêmes du MCP 100% est de 7,4 ± 2,7 km (Tableau 24, Figure 29).

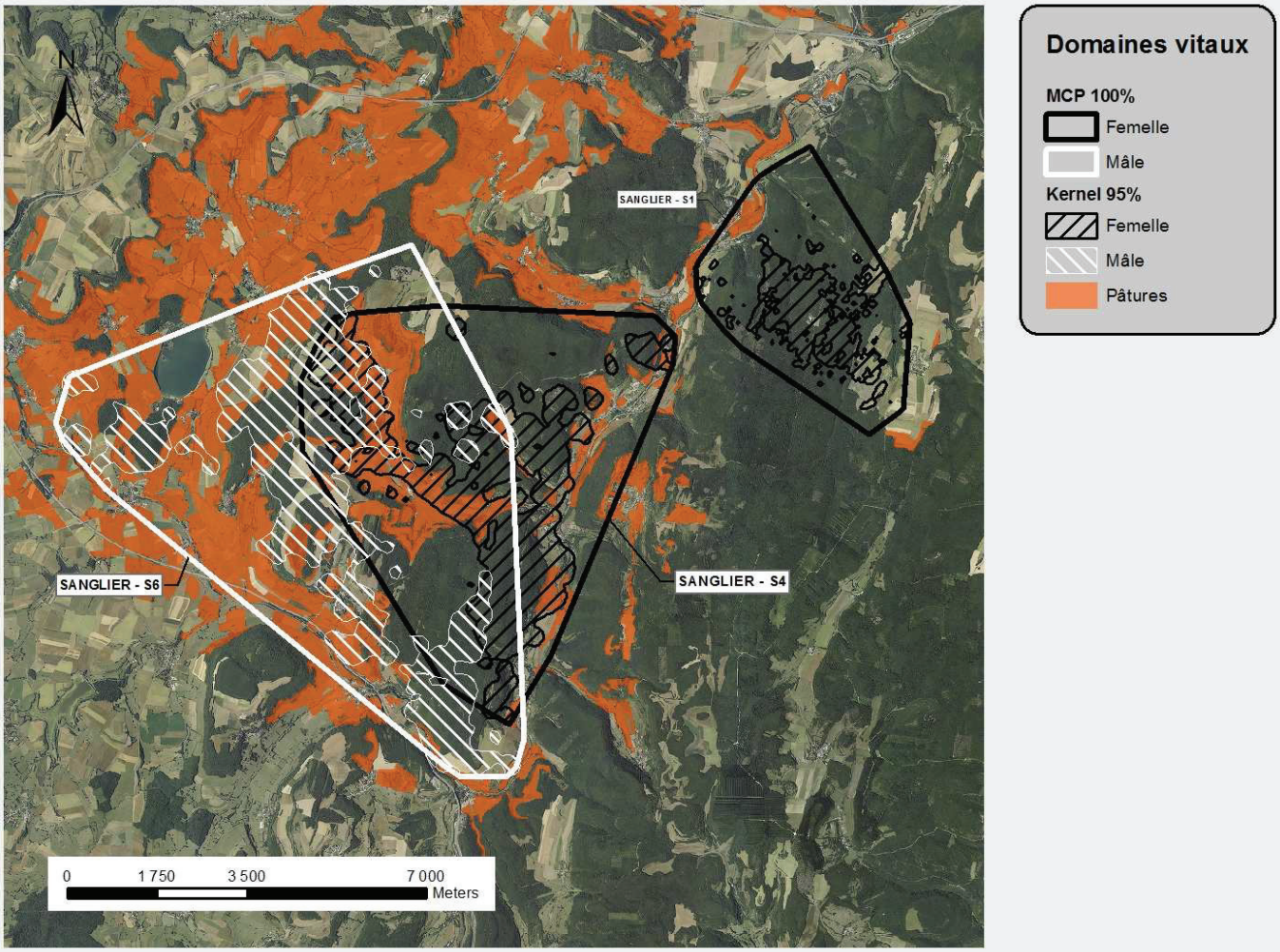


Figure 29 : représentation des domaines vitaux (MCP100% et Kernel 95%) de 3 sangliers suivis (S1, S4 et S6) et localisation des pâtures.

Tableau 24 : caractéristiques des sangliers équipés de collier GPS

sanglier	*Sexe*	*Poids (kg)*	*Classe âge*	*Durée du suivi (jrs)*	*Période du suivi*	*Saisons de suivi*	*Nombre total de localisations*	*Proportion de pâture disponible (%)*	*Taille MCP 100% (ha)*	*Kernel 95% (ha)*	*Kernel 50% (ha)*	*Distance maximale (km)*
S1	F	65	Subadulte	212	07/06/12 - 04/01/13	printemps, été, automne, hiver	8560	2,5	1393,9	363,8	22,9	5,7
S2	F	60	Subadulte	253	01/08/11 - 09/04/12	été, automne, hiver, printemps	9912	9,6	1527,1	296,9	15,1	7,5
S3	F	68	Adulte	160	27/06/12 – 03/12/12	été, automne	6436	19,2	1263,0	466,6	65,1	6,0
S4	F	69	Adulte	211	10/08/11 – 07/03/12	été, automne, hiver	7573	20,9	3857,9	1425,4	174,1	9,0
S5	M	100	Adulte	38	06/09/12 – 13/10/12	été, automne	1461	29,2	1524,9	413,2	55,3	5;7
S6	M	110	Subadulte	47	16/09/11 – 01/11/11	été, automne	1988	32,2	5522,6	1973,9	200,6	11,6
S7	M	104	Subadulte	25	29/08/12 – 22/09/12	été	1100	34,5	1041,2	261,5	15,5	4,5
S8	M	63	Subadulte	79	24/05/12 – 10/08/12	printemps, été	3145	38,9	3707,8	1089,5	113,8	10,5
S9	M	95	Subadulte	178	25/05/12 – 18/11/12	printemps, été, automne	7003	49,2	2372,1	1284,2	85,9	9,5
S10	F	74	Subadulte	126	30/05/12- 02/10/12	printemps, été, automne	5233	55,2	536,7	140,6	5,8	3,3
S11	F	69	Subadulte	73	10/08/11 – 21/10/11	été, automne	3008	55,4	1527,0	762,5	98,6	6,1
Moyenne ± ET		79,7 ± 18,5		127,4 ± 79,9			5038,0 ± 3061,8	31,5 ± 17,6	2429,4 ± 1633,5	770,7 ± 564,7	77,5 ± 62,4	7,4 ± 2,7

• Nombre de localisations par nuit sur les pâtures

Le nombre de localisations par 24h sur les pâtures est compris entre 0 et 46, soit entre 0 et 100% des localisations enregistrées théoriquement par 24h.

Le modèle retenu est celui incluant les effets de la proportion de pâture disponible (***pat_dispo***), de la saison (***Per***), des conditions favorables aux nuits à lombrics (***NL***)et de l'interaction entre ces deux dernières variables dans la partie fixe. La prise en compte de l'autocorrélation avec la structure ARMA(1,1) améliore le modèle (Tableau 25).

Ainsi, le nombre de localisations sur les pâtures par 24h augmente avec la proportion de pâture disponible. En hiver, l'utilisation quotidienne des pâtures est significativement moins importante qu'en été mais elle s'accroit lors de nuits à lombrics (Tableau 26 et Figure 30).

La part de variabilité expliquée par la partie fixe du modèle retenu est de 17,0% alors que 4,4% de la variance est liée à l'effet aléatoire de l'individu.

Tableau 25 : comparaison des modèles expliquant le nombre de localisations par 24h sur les pâtures (*nloc*, après transformation racine carrée) pour les sangliers. Le modèle sélectionné apparait en jaune.

Structure d'autocorrélation temporelle	Partie fixe	Variable dans la partie aléatoire	Nombre de paramètres	AIC
-	- (modèle nul)	Individu	3	4935,2
-	*sexe + pat_dispo + Per + NL + pluvio + Tmax + Per *pluvio + Per *NL + Per *pat_dispo + Tmax * pluvio*	Individu	23	4741,6
-	*pat_dispo + Per + NL + pluvio + Tmax + Per * pluvio + Per *NL + Per : pat_dispo*	Individu	20	4737,9
AR(1)	*pat_dispo + Per + NL + pluvio + Tmax + Per * pluvio + Per *NL + Per * pat_dispo*	Individu	21	4279,1
ARMA (1,1)	*pat_dispo + Per + NL + pluvio + Tmax + Per:*pluvio + Per*NL + Per* pat_dispo*	Individu	22	4120,1
ARMA (1,1)	*pat_dispo + Per + NL+ Per*NL*	Individu	13	4112,4

Tableau 26 : résultats du modèle retenu expliquant le nombre de localisations en pâture par nuit par sanglier (*nloc*, après transformation racine carrée) : valeurs des paramètres estimés au carré et P-value des tests de Wald.

Effets fixes	***Paramètre estimé²***	***P-value***
Ordonnée à l'origine : nombre moyen de localisations en pâture pour un sanglier ayant 31.5%% de pâture disponible, en été, pour une nuit non favorable aux lombrics	6,391	< 0,001
Proportion de pâture disponible (/10%)	0,352	< 0,001
Période automne vs été	-0,040	0,389
Période hiver vs été	-0,774	0,026
Période printemps vs été	-0,183	0,135
Nuit à lombrics	0,000	0,945
*Période automne * Nuit à lombrics*	-0,009	0,762
*Période hiver * Nuit à lombrics*	0,586	0,032
*Période printemps * Nuit à lombrics*	-0,023	0,819

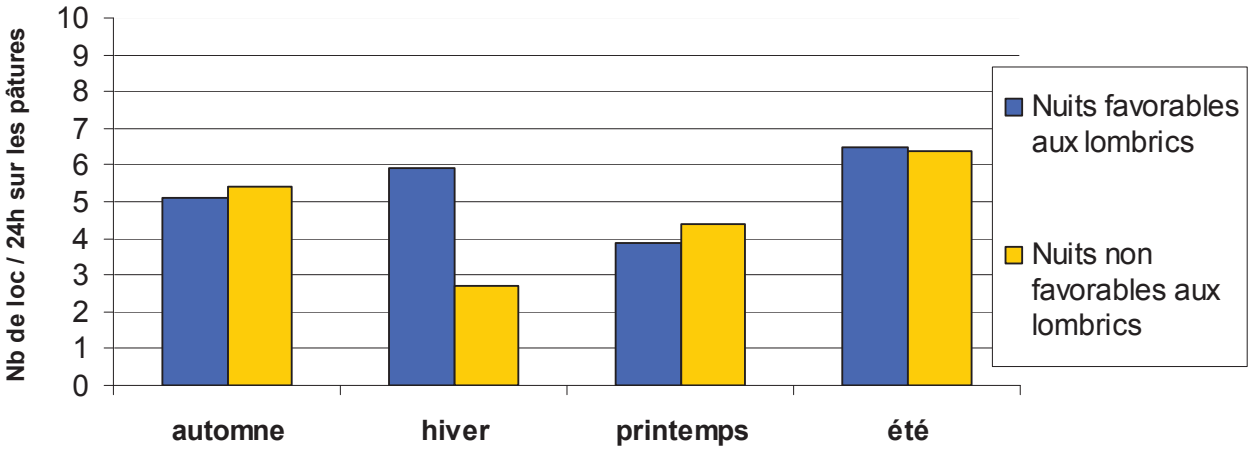


Figure 30 : prédictions du modèle expliquant le nombre de localisations sur les pâtures par 24h en fonction des saisons et selon que les nuits sont favorables ou non favorables aux lombrics pour un sanglier ayant 31,5% de pâture disponible (disponibilité moyenne)

• Surface de pâture incluse dans le domaine vital et le centre d'activité

La surface moyenne de pâture dans le domaine vital calculée mensuellement est de 132,4 ± 169,7 ha. Dans le centre d'activité, cette surface moyenne s'élève à 10,0 ±15.6 ha.

Le modèle expliquant la surface de pâture dans le domaine vital (***pat_dv***) sélectionné intègre la proportion de pâture disponible (***pat_dispo***), la saison (***Per***) et le nombre de nuits à lombrics par mois (***NbNL***) (Tableau 27).

Ainsi, la surface de pâture dans le domaine vital mensuel des sangliers augmente avec la part de pâture disponible et le nombre de nuits à lombrics. L'été est plus favorable à cette utilisation des pâtures que l'hiver et que l'automne (Tableau 28, Figure 31).

D'après le modèle retenu, la surface de pâture dans le centre d'activité mensuel est expliquée par la part de pâture disponible (***pat_dispo***) et le nombre de nuits à lombrics par mois (***NbNL***) (Tableau 29). Cette surface de pâture utilisée au sein du centre d'activité s'étend lorsque la part de pâture disponible augmente et que le nombre de nuits à lombrics par mois est plus élevé (Tableau 30).

La part de variabilité expliquée par la partie fixe du modèle retenu pour expliquer la surface de pâture dans le domaine vital mensuel est de 18,4% alors que 85% de la variance est liée à l'effet aléatoire de l'individu. Pour le centre d'activité, la part de variabilité liée à l'individu est également élevée (77%), tandis que 5,6% de la variabilité est expliquée par la partie fixe du modèle.

Tableau 27 : comparaison des modèles expliquant la surface de pâture incluse dans le domaine vital par mois par sanglier (*pat_dv* après transformation log). Le modèle sélectionné apparait en jaune.

Partie fixe	Variable dans la partie aléatoire	Nombre de paramètres	AIC
	Individu	3	132,4
*sexe + pat_dispo + Per +Nb NL + cult_dispo + Per *pat_dispo + Per* NbNL + pat_dispo* sexe*	Individu	17	120,0
*sexe + pat_dispo + Per +Nb NL + cult_dispo+ Per *pat_dispo*	Individu	13	115,1
pat_dispo + Per +Nb NL	Individu	8	113,9

Tableau 28 : résultats du modèle retenu expliquant la surface incluse dans le domaine vital par mois par sanglier (*pat_dv* après transformation log) : valeurs des paramètres estimés (échelle log) et P-value des tests de Wald.

Effets fixes	***Paramètre estimé***	***P-value***
Ordonnée à l'origine : log de la surface moyenne de pâture (ha) dans le DV mensuel pour un sanglier ayant 31.5% de pâture disponible, en été, pour 0 nuit favorable aux lombrics par mois	1.434	< 0,001
Proportion de pâture disponible	6,596	0,018
Période automne vs été	-0,498	0,099
Période hiver vs été	-1,216	0,001
Période printemps vs été	-0,447	0,113
Nombre de nuit à lombrics	0,138	0,001

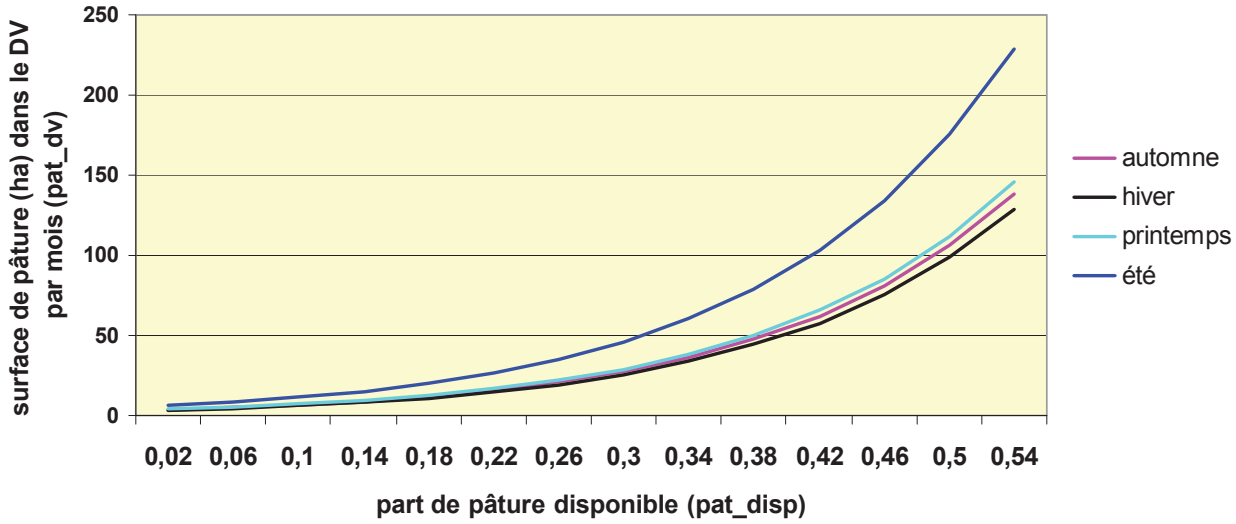


Figure 31 : prédictions du modèle expliquant la surface de pâture dans le domaine vital mensuel (échelle exponentielle) chez le sanglier, en fonction de sa part de pâture disponible (le nombre de nuits à lombrics par mois est ici fixé à 0)

Tableau 29 : comparaison des modèles expliquant la surface de pâture incluse dans le centre d'activité par mois par sanglier (*pat_ca* après transformation log). Le modèle sélectionné apparait en jaune.

Partie fixe	Variable dans la partie aléatoire	Nombre de paramètres	AIC
	Individu	3	111,6
*sexe + pat_dispo + Per +Nb NL + cult_dispo+ Per *pat_dispo + Per* NbNL + pat_dispo* sexe*	Individu	17	119,0
sexe + pat_dispo + Per +Nb NL + cult_dispo+ pat_dispo sexe*	Individu	11	110,1
pat_dispo + Nb NL	Individu	4	109,1

Tableau 30 : résultats du modèle retenu expliquant la surface incluse dans le centre d'activité par mois par sanglier (*pat_ca* après transformation log) : valeurs des paramètres estimés (échelle log) et P-value des tests de Wald

Effets fixes	*Paramètre estimé*	*P-value*
Ordonnée à l'origine : log de la surface moyenne de pâture (ha) dans le CA mensuel pour un sanglier ayant 31,5%% de pâture disponible, en été, pour 0 nuit favorable aux lombrics par mois	3,669	< 0,001
Proportion de pâture disponible	4,130	0,046
Nombre de nuit à lombrics	0,051	0,037

6.1.2.2.Blaireaux

- Captures et suivi télémétrique

Quarante et un individus ont été capturés soit un taux de capture de 0,205 captures/nuit-piège. Dix blaireaux, cinq mâles et cinq femelles adultes ont été équipés de colliers GPS et suivis entre août 2011 et mai 2012. La plupart appartenaient à des groupes différents (les captures ont été réalisées sur des terriers différents) mais au regard de la superposition de leur domaine vital, il est possible que les individus B1 et B3 d'une part et B7 et B9 d'autre part proviennent du même groupe (Figure 32). Ces individus se répartissent équitablement entre la zone nord et la zone sud (Tableau 31). La durée des suivis télémétriques est comprise entre 25 et 185 jours avec une moyenne de (89,9±56,5) (Tableau 31). C'est la durée de vie de la batterie qui a déterminé l'arrêt du suivi sauf pour un blaireau (B7) qui est mort pendant la récolte de données, possiblement des suites de l'infection à *M. bovis*. L'autopsie a montré un mauvais état général, un abcès et une fibrose pulmonaire, la culture était positive pour *M. bovis*.

Sept individus ont été suivis pendant la période 1, quatre pendant la période 2, cinq pendant la période 3 et cinq pendant la période 4 (Tableau 31). Les terriers des blaireaux équipés sont situés à une distance des pâtures variant entre 10 m et 500 m. Le nombre de localisations sur l'ensemble du suivi est compris entre 248 et 1582 par animal. Mensuellement, le nombre de localisations varie entre 82 et 552, nombre suffisant pour l'estimation du domaine vital (Seaman et al. 1999). Sur l'ensemble des suivis, les domaines vitaux calculés mesurent en moyenne 123.6 ha ± 99.3 ha par le MCP 100% et 52.2± 52.2 avec la méthode du kernel 95%. La taille des centres d'activité s'élève en moyenne à 6.2±8.6 ha. La distance moyenne entre les points extrêmes du MCP 100% est de 1,8±0,8 km (Tableau 31).

Parmi toutes les localisations collectées sur les 10 blaireaux, un seul animal (B5) a été détecté fréquentant un bâtiment d'élevage. Cette fréquentation a été ponctuelle puisqu'elle concerne 22 localisations réparties sur 10 nuits, sur les 1167 enregistrées pour cet animal, soit 1,8% des localisations.

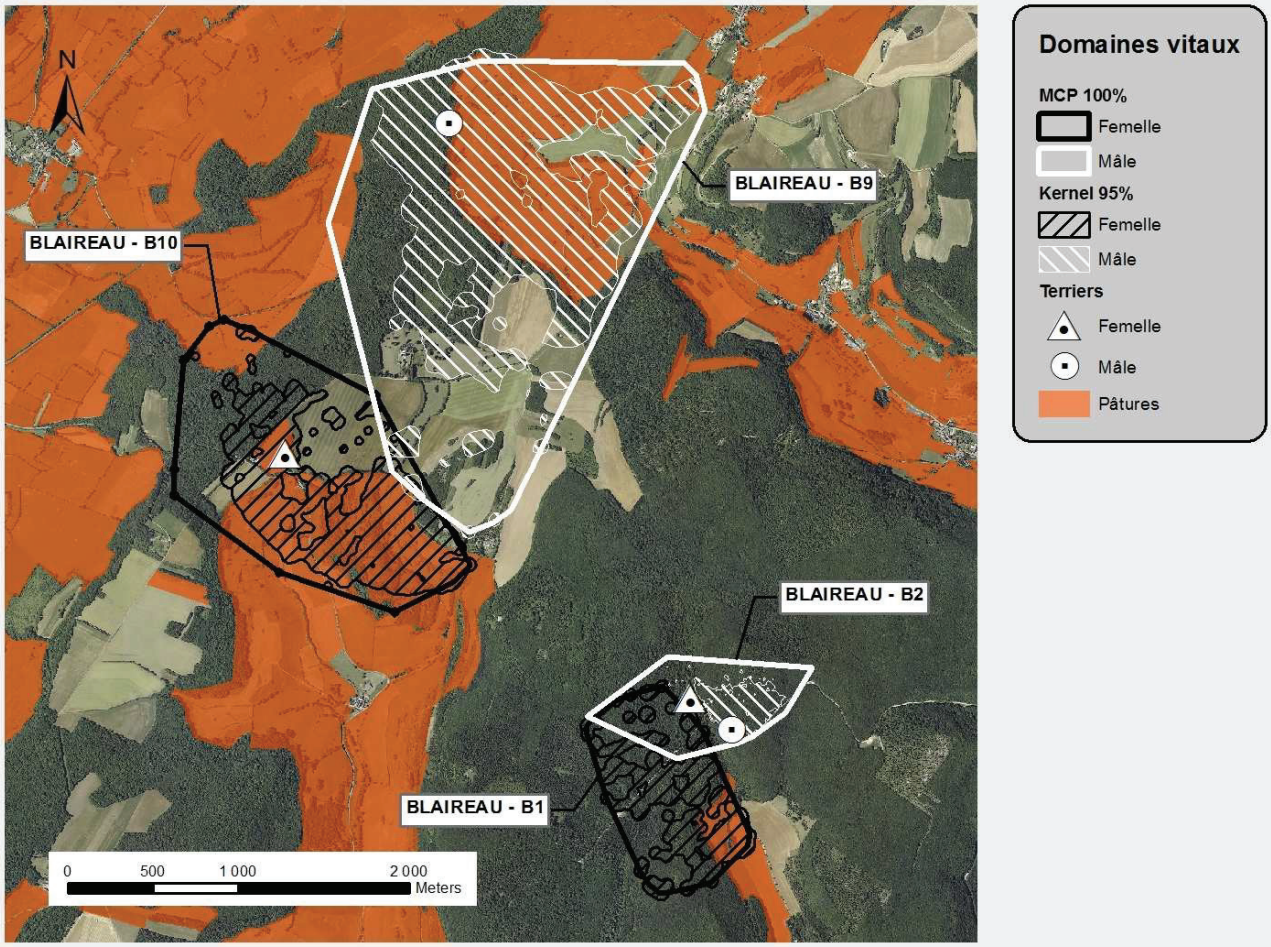


Figure 32 : représentation des domaines vitaux (MCP100% et Kernel 95%) et localisation des terriers de capture de 4 blaireaux suivis (B1, B2, B9 et B10) et répartition des pâtures

Tableau 31 : caractéristiques des 10 blaireaux équipés de collier GPS

Blaireau	*Sexe*	*Poids (kg)*	*Zone*	*Durée du suivi (j)*	*Période du suivi*	*Période*	*Nombre total de localisations*	*Distance terrier-pâture (m)*	*MCP 100% (ha)*	*Kernel 95% (ha)*	*Kernel 50% (ha)*	**Distance maximale (km)**
B1	F	10,0	Sud	25	10/08-07/09/11	P1	248	500	72,5	45,1	7,6	1,2
B2	M	12,0	Sud	174	26/08/11-21/03/12	P1, P2, P3, P4	2561	300	48,5	11,3	2,1	1,3
B3	F	12,3	Nord	46	06/10-05/12/11	P2	432	200	105,6	34,5	4,1	1,9
B4	M	12,0	Nord	83	15/09- 17/12/11	P2, P3	1195	190	101,5	17,0	2,0	1,8
B5	M	14,0	Nord	106	02/02-21/05/12	P3, P4	1167	120	114,3	39,8	6,4	2,1
B6	F	10,0	Nord	185	08/08/11-17/03/12	P1, P2, P3, P4	1853	100	26,6	12,2	1,9	0,9
B7	F	11,0	Sud	40	02/09-27/10/11	P1, P2	331	70	139,7	60,2	6,2	2,5
B8	M	12,5	Nord	29	16/08– 15/09/11	P1	275	45	57,4	30,4	3,7	0,9
B9	M	15,6	Sud	142	21/12/11-23/05/12	P3, P4	1555	40	392,3	183,7	29,7	3,4
B10	F	13,0	Sud	63	15/02/12-02/05/12	P3, P4	835	10	180,1	91,3	17,1	2,3
Moyenne ± ET		12,2 ± 1,6		89,9 ± 56,5			1045 ± 735	158,1 ± 141,7	123,6 ± 99,3	52,2 ± 52,2	6,2 ± 8,6	1,8 ± 0,8

• Nombre de localisations par nuit sur les pâtures

La variable ***nloc*** a varié entre 0 et 21, soit entre 0 et 87,5% de la totalité des localisations récoltée sur une nuit. Le nombre moyen de localisations par nuit a été de 4,6 ± 5,0. Le modèle présentant le plus petit AIC comprend les effets de la distance terrier-pâture (***dist t-p***), de la période (***Per***), de la température minimale (***Tmin***) et de l'interaction entre ces deux dernières variables. La structure ARMA(1,1) fournit le meilleur modèle (Tableau 32).

D'après le modèle sélectionné, la fréquentation des pâtures varie en fonction des périodes avec, à température équivalente, une fréquentation plus faible en automne (P2) et en hiver (P3) par rapport au printemps (P4). De plus l'interaction entre la température et la période a un effet significatif : en automne (*P2*) et en hiver (*P3*), la fréquentation des pâtures diminue lorsque la température est basse, alors que la température ne modifie pas l'utilisation des pâtures aux autres périodes (Tableau 33, Figure 33). L'utilisation des pâtures ne diffère pas entre la fin d'été (*P1)* et le printemps *(P4)*. Enfin, la distance entre le terrier et la pâture a un léger effet sur l'utilisation des pâtures (Tableau 33), les pâtures étant moins utilisées lorsque cette distance est plus grande.

La part de variabilité expliquée par la partie fixe du modèle retenu est de 19% alors que 24 % de la variance est liée à l'effet aléatoire de l'individu.

Tableau 32 : comparaison des modèles expliquant le nombre de localisations par nuit sur les pâtures (*nloc*, après transformation racine carrée) pour les blaireaux. Le modèle sélectionné apparait en jaune.

Structure d'autocorrélation temporelle	Partie fixe	Variable dans la partie aléatoire	Nombre de paramètres	AIC
-	- (modèle nul)	Individu	3	2607,9
-	*sexe + dist T-P + Per + NL + pluvio + Tmin + sexe : dist T-P + Per : sexe + Per :Tmin + Per : pluvio + Per :NL + dist T-P : NL*	Individu	25	2454,7
-	*sexe + dist T-P + Per + Tmin + Per * sexe + Per :Tmin*	Individu	15	2445,7
AR(1)	*sexe + dist T-P + Per + Tmin + Per : sexe + Per :Tmin*	Individu	16	2149,4
ARMA (1,1)	*sexe + dist T-P + Per + Tmin + Per * sexe + Per :Tmin*	Individu	17	2102,3
ARMA (1,1)	*dist T-P + Per + Tmin + Per :Tmin*	Individu	10	2099,5

Tableau 33 : résultats du modèle retenu expliquant le nombre de localisations en pâture par nuit par blaireau (*nloc*, après transformation racine carrée) : valeurs des paramètres estimés au carré et P-value des tests de Wald.

Effets fixes	***Paramètre estimé²***	***P-value***
Ordonnée à l'origine : nombre moyen de localisations en pâture pour un terrier en bord de pâture, en période P4 (mars-mai 2012), pour une température minimale quotidienne (Tmin) de 0℃.	6,401	< 0 ,001
Distance terrier-pâture (pour 100m)	- 0,144	0,051
Période aout-octobre 2011 (P1) vs P4	- 0,060	0,473
Période nov-déc 2011 (P2) vs P4	- 0,624	0,019
Période jan-fev 2012 (P3) vs P4	- 0,264	0,028
Tmin (pour 10℃)	- 0,015	0,481
*Période P1 * Tmin*	0,001	0,886
*Période P2 * Tmin*	0,462	0,017
*Période P3 * Tmin*	0,313	0,013

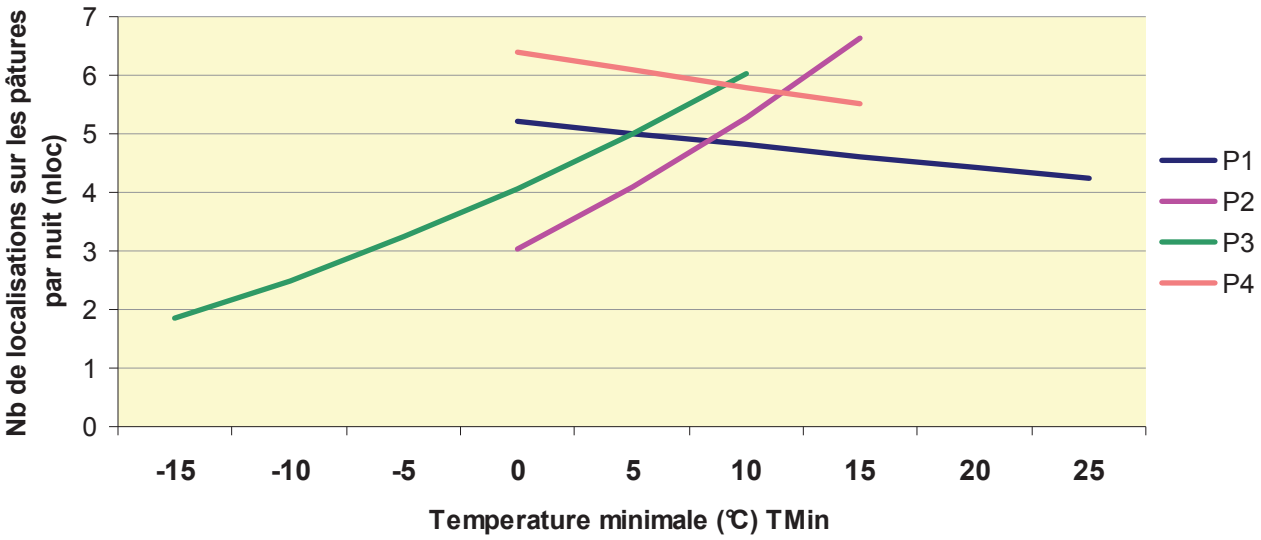


Figure 33 : prédiction du modèle expliquant le nombre de localisations par nuit sur les pâtures en fonction de la température minimale aux différentes périodes pour un blaireau vivant en bord de pâture

Le test de Shapiro rejette l'hypothèse de normalité des résidus ($P < 0,001$) mais la distribution des quantiles des résidus est graphiquement proche des quantiles des résidus suivant la loi normale (Figure 34).

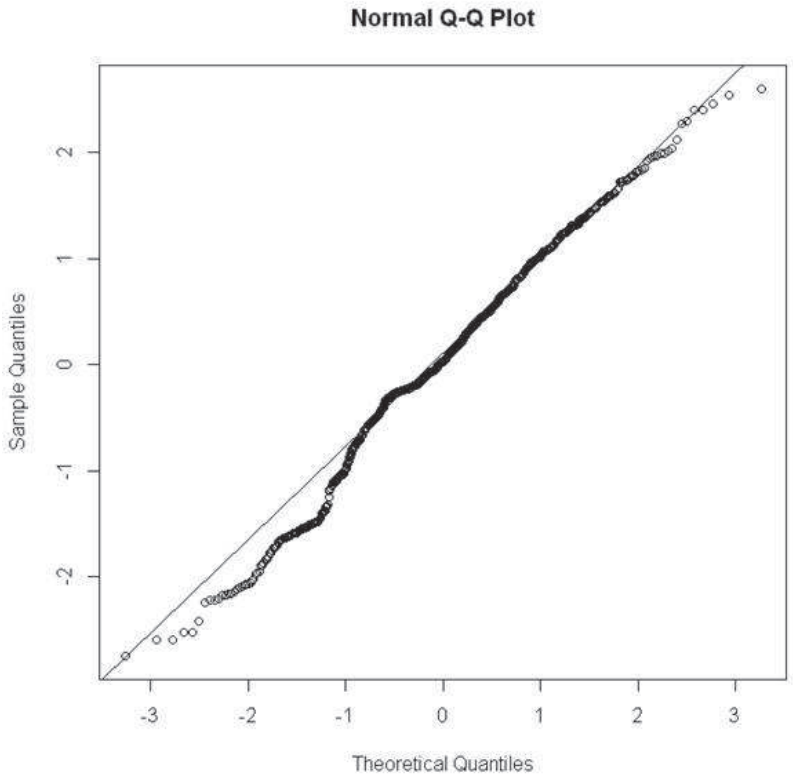


Figure 34 : distribution des quantiles des résidus du modèle expliquant le nombre de localisations sur les pâtures par nuit (***nloc***, cercles) comparée à la distribution normale (ligne).

• Surface de pâture incluse dans le domaine vital et le centre d'activité

La surface de pâture dans le domaine vital ***pat_dv*** calculée mensuellement est comprise entre 0 et 78,2 ha selon les blaireaux. En moyenne elle a été de 15,4 ± 21,5 ha. Dans les centres d'activité, la surface de pâture ***pat_ca*** a varié entre0 et 21,5 ha selon les individus et a été en moyenne de 3,2 ± 5,4 ha.

Le modèle retenu pour expliquer la surface de pâture dans le domaine vital (***pat_dv***) inclut la distance terrier-pâture (***dist t-p)***, le sexe (***sexe)***, la période (***Per)*** et différentes interactions entre ces variables (Tableau 34). La surface des pâtures dans le domaine vital diminue à mesure que la distance terrier-pâture augmente, et les blaireaux vivant en bord de pâture utilisent moins les pâtures en été (*P1*) et en automne (*P2*) qu'au printemps (*P4*). L'interaction entre ***Per*** et ***dist t-p*** montre cependant que, par rapport aux blaireaux vivant en bord de pâture, les blaireaux qui en sont les plus éloignés utilisent davantage les pâtures en été et surtout en automne (*P2)* (Figure 35). En fin d'été et surtout à l'automne (*P1* et *P2*), les mâles utilisent moins les pâtures que les femelles (Tableau 35).

Pour ***pat_ca***, le meilleur modèle intègre les mêmes variables et les mêmes interactions (Tableau 36). Les effets significatifs sont similaires mais l'ampleur de ces effets est plus faible que dans le cas de ***pat_dv*** (Tableau 37).

La partie fixe du modèle explicatif de ***pat_dv*** inclut 32,5% de la variabilité observée alors que pour ***pat_ca***, la partie fixe du modèle choisi explique 45,3% de la variabilité observée. On constate par ailleurs un fort effet de l'individu (effet aléatoire) puisque la part de variabilité liée à l'individu s'élève à 81,1% et à 74,9% respectivement pour ***pat_dv*** et ***pa_ca***.

Tableau 34 : comparaison des modèles expliquant la surface de pâture incluse dans le domaine vital par mois par blaireau (*pat_dv*, après transformation racine carrée). Le modèle sélectionné apparait en jaune.

Partie fixe	***Variable dans la partie aléatoire***	***Nombre de paramètres***	***AIC***
(modèle nul)	Individu	3	127,5
sexe + dist T-P + Per +NbNL + cult_dispo + sexe : dist T-P + Per : sexe + Per : cult_dispo + Per : dist T-P + Per : NbNL	Individu	23	110,3
sexe + dist T-P + Per +NbNL + cult_dispo + Per : sexe + Per : dist T-P	Individu	16	112,0
sexe + dist T-P + Per + Per : sexe + Per : dist T-P	Individu	14	110,0

Tableau 35 : résultats du modèle retenu expliquant la surface incluse dans le domaine vital par mois par blaireau (*pat_dv* après transformation racine carrée) : valeurs des paramètres estimés au carré et P-value des tests de Wald.

Effets fixes	***Paramètre estimé²***	***P-value***
Ordonnée à l'origine : surface moyenne de pâture (ha) incluse dans le DVmensuel pour un blaireau femelle vivant dans un terrier en bord de pâture, en période P4 (mars-mai 2012)	40,596	< 0,001
Distance terrier-pâture (pour 100m)	-7,888	0,002
Sexe mâle vs femelle	5,578	0,093
Période aout-octobre 2011 (P1) vs P4	-5,708	0,008
Période nov-déc 2011 (P2) vs P4	-11,569	0,005
Période jan-fev 2012 (P3) vs P4	-0,929	0,097
*Période P1 * Distance terrier-pâture* (pour 100m)	5,391	0,001
*Période P2 * Distance terrier-pâture* (pour 100m)	9,389	0,001
*Période P3 * Distance terrier-pâture* (pour 100m)	0,812	0,016
*Période P1 * sexe M*	-16,386	0,005
*Période P2 * sexe M*	-32,951	0,001
*Période P3 * sexe M*	-2,281	0,040

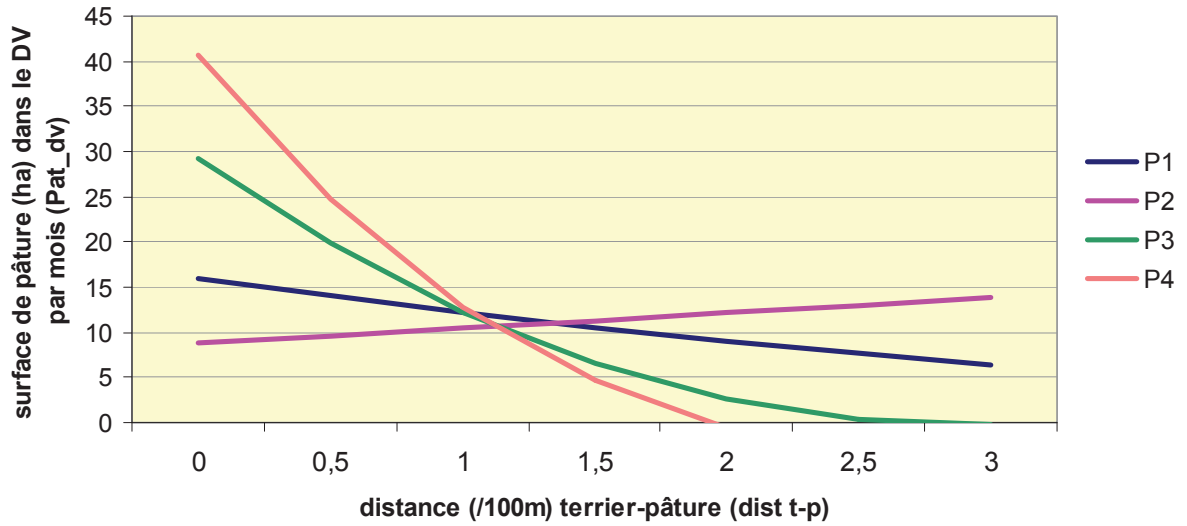


Figure 35 : prédictions du modèle expliquant la surface de pâture dans le DV mensuel en fonction de la distance terrier-pâture aux différentes périodes

Tableau 36 : comparaison des modèles expliquant la surface de pâture incluse dans le centre d'activité par mois par blaireau (*pat_ca* après transformation racine carrée). Le modèle sélectionné apparait en jaune.

Partie fixe	Variable dans la partie aléatoire	Nombre de paramètres	AIC
	Individu	3	92,6
sexe + dist T-P + Per +NbNL + cult_dispo + sexe : dist T-P + Per : sexe + Per : cult_dispo + Per : dist T-P + Per : NbNL	Individu	23	80,5
sexe + dist T-P + Per +NbNL + cult_dispo + Per : sexe + Per : dist T-P	Individu	16	75,9
sexe + dist T-P + Per + Per : sexe + Per : dist T-P	Individu	14	75,4

Tableau 37 : résultats du modèle retenu expliquant la surface moyenne incluse dans le centre d'activité par mois par blaireau (*pat_ca,* après transformation racine carrée) : valeurs des paramètres estimés au carré et P-value des tests de Wald.

Effets fixes	***Paramètre estimé²***	***P-value***
Ordonnée à l'origine : surface moyenne de pâture (ha) incluse dans le CA mensuel pour un blaireau femelle vivant dans un terrier en bord de pâture, en période P4 (mars-mai 2012)	8,285	< 0,001
Distance terrier-pâture (pour 100m)	-2,085	0,003
Sexe mâle vs femelle	2,290	0,067
Période aout-octobre 2011 (P1) vs P4	-2,729	0,004
Période nov-déc 2011 (P2) vs P4	-4,694	0,004
Période jan-fev 2012 (P3) vs P4	-0,696	0,034
*Période P1 * Distance terrier-pâture* (pour 100m)	1,978	0,001
*Période P2 * Distance terrier-pâture* (pour 100m)	2,960	0,003
*Période P3 * Distance terrier-pâture* (pour 100m)	0,446	0,008
*Période P1 * sexe M*	-4,929	0,008
*Période P2 * sexe M*	-8,316	0,006
*Période P3 * sexe M*	-0,998	0,041

6.1.3. **Discussion**

- **Méthodologie**

Nous avons estimé l'intensité des contacts indirects entre sangliers et bovins d'une part, et blaireaux et bovins d'autre part, en déterminant le niveau d'utilisation des pâtures par ces espèces sauvages au moyen de suivis télémétriques. Le taux variable du succès de capture, combiné à l'arrêt prématuré de certains suivis (dû au mauvais fonctionnement du collier ou aux tirs d'animaux équipés), n'a pas permis de suivre tous les individus sur l'ensemble des périodes définies dans le protocole. Ce déséquilibre dans le plan d'échantillonnage a pu influencer le résultat des modèles mixtes dans le sens où les facteurs inhérents aux individus pris comme variables explicatives (sexe, importance ou proximité des pâtures) n'ont pu être testés de façon homogène sur toute la durée du suivi. Il a pu en résulter un biais de confusion entre l'effet des variables temporelles (période et saison) et l'effet des variables individuelles (sexe, distance terrier-pâture ou proportion de pâture disponible). Il est également probable que compte tenu des faibles effectifs d'animaux suivis, nous avons manqué de puissance pour révéler l'effet de certaines variables.

Nous constatons, que, pour les modèles retenus, la part de variabilité liée à l'individu placé en variable aléatoire est très élevée pour *pat_dv* et *pat_ca*. Ce résultat traduit l'importance des variations entre individus au sein d'une même espèce, soulignant que chaque

comportement individuel ne reflète pas l'ensemble des comportements de la population (Dingemanse et al. 2010). Outre la personnalité de l'individu, le comportement est aussi déterminé par des processus extrinsèques environnementaux (Börger et al. 2006). Les variables que nous avons intégrées dans la partie fixe des modèles reflètent une partie de ces facteurs temporels (période) spatiaux (distance terrier-pâture ou part de pâture disponible) et plus largement, environnementaux (température, pluviométrie, nuits à lombrics). Cependant, pour *nloc*, seuls 17% et 19% (pour les sangliers et, blaireaux respectivement) de variabilité sont expliqués par la partie fixe du modèle. Ceci pourrait résulter d'une forte autocorrélation spatiotemporelle, qui caractérise généralement les données d'utilisation de l'espace (Börger et al. 2006) et qui est amplifiée ici par l'échelle temporelle choisie (pas de temps quotidien). La nette amélioration du modèle après la prise en compte de l'autocorrélation temporelle étaye cette hypothèse. D'autres facteurs non mesurés ici pourraient également affecter l'utilisation des pâtures, internes (état physiologique des animaux) ou externes (dérangement).

- **Intensité de l'utilisation des pâtures**

Nos résultats ont montré que le nombre quotidien de localisations sur les pâtures étaient comparables entre les sangliers et les blaireaux. Il est délicat de traduire directement cette variable en durée sur la base de ces résultats bruts et la comparaison doit tenir compte d'une programmation des colliers différente (une localisation toutes les 20 minutes la nuit et toutes les 2h le jour pour les sangliers et une localisation toutes les 30 minutes la nuit uniquement pour les blaireaux). Cette variable reflète néanmoins le temps passé par ces animaux sur les pâtures et il apparait assez comparable entre les deux espèces.

L'intensité spatiale d'utilisation des pâtures estimée à partir de la surface de pâture incluse dans le domaine vital et le centre d'activité est liée aux tailles des domaines vitaux et ces estimateurs, en valeur absolue sont donc très différents entre les deux espèces, les sangliers utilisant une surface de pâture beaucoup plus importante que celle des blaireaux. Ce résultat traduit donc une surface de contact interspécifique avec les bovins plus élevée pour les sangliers que pour les blaireaux.

- **Effet du paysage**

Tout d'abord, nos résultats montrent que sur notre site d'étude, la proximité ou la superficie des pâtures disponibles pour les animaux suivis est un facteur déterminant de l'utilisation de celles-ci que ce soit à l'échelle de 24h ou à l'échelle du mois. Ceci traduit l'importance de la structure paysagère, en l'occurrence la fragmentation plus ou moins importante du paysage dans le niveau d'interaction entre ces espèces sauvages et les bovins. Les individus ayant le moins de pâture à leur disposition sont bien ceux qui, en valeur absolue, les utilisent le moins. Il apparaît par exemple dans notre étude que les blaireaux vivant en milieu forestier à 300m ou plus des pâtures ne les fréquentent pas ou très peu. Les sangliers qui ont 20% ou moins de pâture disponible utilisent moins de 100 ha de pâture dans leur domaine vital.

- **Effet de la saison**

Un deuxième facteur déterminant l'utilisation des pâtures par les espèces sauvages étudiées est la période de l'année.

D'après notre étude, l'été et le printemps sont les saisons les plus favorables à l'utilisation des pâtures par les sangliers, suivis de l'automne puis de l'hiver. De plus, nos résultats montrent qu'en hiver (par rapport à l'été), les sangliers vivant dans un milieu riche en pâtures privilégient d'autres habitats. Les sangliers affectionnent les zones de végétation denses tout au long de l'année, surtout en journée pendant leur phase de repos. En automne et en hiver, le dérangement occasionné par la chasse augmente leur déplacement et les pousse à utiliser potentiellement plus d'habitats (Saïd et al. 2011). En milieu fragmenté, il est fort probable que les milieux ouverts tels que les pâtures soient des zones plus à risque que les milieux fermés. Les ressources alimentaires peuvent également expliquer cet effet saisonnier. Les glands, qui se trouvent à terre en forêt de septembre à la fin de l'hiver constituent la majorité du régime alimentaire du sanglier lorsque la production est importante (Welander 2000; Baubet & Brandt 2003). Ce fut le cas en automne en hiver 2011-2012, ce qui a probablement amené les sangliers à favoriser le milieu forestier par rapport aux autres milieux.

Nos résultats indiquent que les blaireaux utilisent d'avantage les pâtures au printemps qu'aux autres saisons. Par ailleurs, nous avons mis en évidence que la température influençait l'utilisation quotidienne des pâtures en automne et en hiver. Kowalczyk et al. (2003a) ont montré que les blaireaux n'émergeaient pas de leur terrier en dessous d'une température mensuelle moyenne de -4°C et qu'ils ne sortaient quotidiennement que lorsque la température moyenne dépassait les 5°C. Pendant la période hivernale P3, des températures très basses ont été enregistrées au mois de février (jusqu'à – 15°C) et la moyenne des températures durant cette période n'a pas dépassé 1,5°C. En novembre et décembre (période P2), il y a eu plusieurs nuits avec des températures négatives. La température serait donc d'abord un déterminant de la sortie du terrier et, en corolaire, sur l'intensité de l'utilisation des pâtures. Nous avons pu, vérifier cette hypothèse en testant le nombre total de localisations en dehors du terrier comme variable à expliquer (résultats non montrés). Nous remarquons que la pluviométrie n'a pas été retenue dans le modèle *nloc*. En revanche, cette variable a un effet lorsque le nombre total de localisations hors du terrier est modélisé (résultats non montrés). Ainsi, la pluviométrie a un impact sur le temps passé hors du terrier mais nous n'avons pas montré qu'elle avait une influence sur la fréquentation des pâtures.

Nos analyses ont mis en évidence qu'en été et en automne, les blaireaux les plus éloignés des pâtures étaient d'avantage attirés sur les pâtures qu'au printemps. Ces résultats sont concordants avec ceux de Palphramand et al. (2007) qui ont montré que la pâture était un habitat sélectionné par les blaireaux tout au long de l'année mais qu'elle l'était

d'avantage en été et en automne par rapport aux forêts de conifères et de feuillus. Ceci pourrait s'expliquer par une disponibilité alimentaire plus faible en forêt à ces périodes, poussant les blaireaux à diversifier leurs sources de nourritures en allant dans d'autres milieux (Kruuk 1978; Kowalczyk et al. 2003b; Byrne et al. 2012a). Cependant, dans la présente étude, un blaireau vivant en milieu forestier à 300 m de la lisière n'a jamais été localisé dans une pâture au cours des 7 mois qu'ont duré son suivi. De plus, son domaine vital était parmi les plus petits de l'étude (MCP100% : 0,48 km^2). Il semble donc que le milieu forestier soit ici suffisamment riche pour subvenir aux besoins des blaireaux qui y vivent.

D'autre part, au printemps, les comportements territoriaux (exploration et marquage du territoire) sont accrus (Kowalczyk et al. 2006 ; Roper, 2010) ce qui peut conduire les blaireaux à d'avantage utiliser les pâtures et ce d'autant plus que le paysage est fragmenté, le marquage territorial se faisant préférentiellement au niveau des lisières et des limites entre parcelles (White et al. 1993; Hutchings et al. 2002).

- **Effet des nuits à lombrics**

Enfin, nous avions posé comme hypothèse qu'étant donné la prédominance des lombrics dans le régime alimentaire des blaireaux et des sangliers, les conditions météorologiques favorisant leur remontée à la surface du sol pourraient attirer ces animaux sur les pâtures.

Chez le sanglier, nos résultats confirment l'effet attractif des « nuits à lombrics » sur l'utilisation des pâtures. Comme pour les blaireaux, les vers de terre rentrent dans le régime alimentaire des sangliers tout au long de l'année mais ils sont privilégiés lorsque les conditions météorologiques les rendent plus accessibles. Baubet et al. (2003) ont mis en évidence une corrélation entre le nombre de « nuits à lombrics » par mois et la consommation de lombrics. D'après l'analyse des fèces, la consommation de vers de terre est la plus élevée en été et en automne suivi du printemps puis de l'hiver (Baubet et al. 2003). Ceci est cohérent avec l'effet des saisons sur l'utilisation des pâtures que nous avons mis en évidence chez le sanglier, à savoir l'été comme période la plus favorable et l'hiver comme étant la moins propice. En effet, le froid et le gel sont peu favorables à l'accessibilité des lombrics pendant les mois d'hiver ce qui n'attirent pas les sangliers sur les prairies lorsque le sol est gelé (Baubet & Brandt 2009). Cependant, nos résultats montrent qu'en hiver, si les sangliers fréquentent moins les pâtures qu'aux autres saisons, ils s'y rendent tout de même lors de « nuits à lombrics », soulignant le caractère opportuniste de cette espèce qui semble plus important que chez le blaireau.

Chez le blaireau, en effet, les « nuits à lombrics » n'ont pas été retenues comme variable explicative de l'utilisation des pâtures. Pourtant, beaucoup d'auteurs attestent de la prépondérance du lombric et particulièrement l'espèce *Lumbricus terrestis* dans le régime alimentaire du blaireau (Kruuk & Parish 1981; Palphramand et al. 2007; Byrne et al. 2012a). L'organisation spatiale et les mouvements quotidiens sont en partie conditionnés par

la disponibilité de cette ressource alimentaire (Kruuk 1978; Kowalczyk et al. 2003a; Kowalczyk et al. 2006). En Angleterre, où les pâtures contiennent la plus grande biomasse de lombrics par rapport aux autres milieux, l'intensité d'utilisation des pâtures dépend de cette disponibilité, qui est elle même liée à la pluviométrie (Kruuk 1978; Kruuk et al. 1979; Palphramand et al. 2007). Cependant, Kruuk et Parish (1981) ont montré qu'en Ecosse, les lombrics dominaient le régime alimentaire des blaireaux tout au long de l'année et que lorsque ceux-ci étaient moins accessibles (temps chaud et sec ou froid et sec), les blaireaux accentuaient leurs efforts pour les déterrer. En conséquence, les conditions météorologiques n'auraient que peu d'influence sur leur niveau de consommation de vers de terre et donc sur leur utilisation des pâtures dans ce but. D'autre part, dans d'autres écosystèmes comme en Europe de l'Est et du Nord, les milieux les plus riches en vers de terre sont représentés par les forêts de feuillus (Broseth et al. 1997; Kowalczyk et al. 2003a) et non par les pâtures. En Côte d'Or il est possible que la biomasse de vers de terre se répartisse entre prairies et forêts, le fait que certains blaireaux suivis restent en milieu forestier et ne viennent jamais sur les pâtures renforce cette hypothèse. Enfin, certains auteurs nuancent la prépondérance du lombric dans le régime alimentaire du blaireau qui semble dépendre des zones géographique : plus les régions se situent au sud de l'Europe, moins les lombrics dominent le régime alimentaire et plus ils sont remplacés par les insectes, les vertébrés et les végétaux (Byrne et al. 2012a; Roper 2010). L'analyse de fèces ou de contenus stomacaux de blaireaux pourraient confirmer ou infirmer cette hypothèse. Enfin, sur le plan méthodologique, il est possible que les situations concernant les nuits à lombrics n'aient pas été assez contrastées pour permettre la mise en évidence d'un effet. D'autre part, étant donné que la construction de cette variable repose sur des conditions précises de température et de pluviométrie, il est également probable que l'effet des nuits à lombrics soit confondu avec ceux des covariables météorologiques et temporelles (période).

6.2. Fréquentation des sites d'élevage par la faune sauvage

Dans la partie précédente, nous avons montré que sangliers et blaireaux pouvaient rentrer en contact avec les bovins via l'utilisation des pâtures et que celle-ci pouvait être déterminée par une recherche des ressources alimentaires (lombrics). En dehors des ressources naturelles, les aliments et l'eau destinés aux bovins peuvent également constituer une offre alimentaire disponible pour la faune sauvage. Différentes études ont en effet montré que les points d'alimentation et d'abreuvement des bovins sur les pâtures étaient particulièrement attractifs pour la faune sauvage (Garnett et al. 2003; Brook et al. 2013; Berentsen et al. 2013; Kukielka et al. 2013). En outre, la fréquentation des bâtiments d'élevage par certaines espèces comme le blaireau a également été démontrée (Garnett et al. 2002; Tolhurst et al. 2009; Judge et al. 2011).

Etant très fréquentés par les bovins et les animaux s'y nourrissant et s'y abreuvant, ces points concentrent des contacts intraspécifiques et interspécifiques à risque pour la transmission de *M. bovis* soit par voie respiratoire vue la promiscuité entre animaux, soit par voie digestive. La transmission par le partage d'aliments ou d'eau de boisson a effectivement été démontrée expérimentalement entre le cerf de Virginie et les bovins (Palmer, Waters, Ave, et al. 2004) et est fortement suspectée pour le cerf élaphe, le blaireau et le sanglier, mais aussi des bovins vers la faune sauvage étant donné les capacités d'excrétion de *M. bovis* par la voie orale et respiratoire de ces espèces (Phillips et al. 2003; Mccorry et al. 2005; Corner 2006).

Afin de prendre la mesure des contacts entre bovins et faune sauvage pouvant survenir sur ces sites, nous avons réalisé un suivi par vidéosurveillance de différents points sur les pâtures et dans les bâtiments d'élevage. Cette méthode a en outre permis de visualiser les animaux et ainsi de récolter des données comportementales conduisant à une meilleure estimation des potentialités de transmission de l'infection. Nous avons supposé que les installations d'élevage contenant de l'aliment ou de l'eau de boisson pour les bovins et accessibles à la faune sauvage n'avaient pas tous la même attractivité et que celle-ci variait selon les espèces considérées et la saison. En effet, les besoins physiologiques des animaux et les ressources alimentaires naturelles diffèrent d'une saison à l'autre (Garnett et al. 2002; Tolhurst et al. 2009; Kukielka et al. 2013). Nous avons démontré l'importance de la structure paysagère comme déterminant de l'utilisation des pâtures (cf. paragraphe 6.1.), nous avons donc également fait l'hypothèse que la proximité entre ces infrastructures d'élevage et la lisière forestière pouvait influencer leur fréquentation par les populations sauvages. D'autre part, étant donné le différentiel de densités (cf. paragraphe 5) et de paysage des différentes espèces hôtes observé dans la zone infectée nord et la zone infectée sud, nous avons également investigué l'effet de la zone sur la fréquentation des infrastructures d'élevage.

Enfin, nous souhaitions décrire les comportements que les animaux adoptaient sur ces points afin de juger au mieux du risque de transmission de *M. bovis*.

Les résultats attendus devaient permettre de quantifier et de qualifier les contacts des populations sauvages avec ces infrastructures d'élevage et ainsi de proposer des recommandations sur les pratiques d'élevage les plus propices au contact entre les populations sauvages réceptives à *M. bovis* et les bovins.

6.2.1. **Matériel et méthode**

J'ai établi le protocole de cette étude et ai participé à sa mise en œuvre sur le terrain avec l'aide du technicien mis à disposition par la FDC 21 pour la thèse. Le dépouillement des données (tri des vidéos) a été réalisé par ce dernier et un agent de l'ONCFS.

6.2.1.1. Définition des points surveillés, choix des exploitations et des sites d'étude

Les élevages ont été choisis à l'intérieur de la zone d'infection bovine, réparties sur les parties nord et sud. Comme nous l'avons déjà mentionné, ces deux parties se distinguent par leurs caractéristiques paysagères (bocager au nord et à dominante forestière au sud) et par la démographie des différentes populations domestiques et sauvages : les bovins et les blaireaux sont plus abondants au nord tandis que les populations de sangliers et de cerfs sont plus denses au sud (cf. paragraphe 5). La démographie des autres espèces réceptives (renards et chevreuils) n'est pas connue. L'abattage des blaireaux ayant été mis en œuvre depuis 2009 dans le cadre de la lutte contre la tuberculose, nous avons exclu les communes et les sites qui avaient été les plus piégés au cours des précédentes années (*ie* moins de 50 blaireaux piégés en cumulé sur 3 ans par commune). Enfin, nous avons privilégié des secteurs où ont été trouvés, de façon récurrente, des élevages et des animaux sauvages atteints de tuberculose, notamment des élevages ayant subi des contaminations multiples par *M. bovis*. Au total, vingt cinq élevages ont été inclus dans l'analyse.

Pour chaque élevage, un ou plusieurs sites étaient déterminés (un bâtiment d'élevage et/ou une ou plusieurs pâtures). Au total, cinquante sites ont été étudiés. Afin de pouvoir tester l'effet de la proximité de la lisière, nous avons choisi quarante et un sites situés à une distance inférieure à 500 m et neuf sites à une distance supérieure à 500 m de la lisière la plus proche. La difficulté à trouver des sites éloignés de massifs forestiers (en excluant des sites en milieux trop anthropisés) explique ce déséquilibre. Douze élevages, comprenant vingt et un sites ont été choisis dans la zone nord et treize élevages, comprenant vingt neuf sites étaient situés dans la zone sud.

Au sein de chaque site, nous avons défini plusieurs types de points potentiellement attractifs : sur les pâtures, les auges (hauteur comprise entre 10 et 60 cm, pouvant contenir des céréales mélangées), les nourrisseurs à veaux (hauteur comprise entre 50 et 75 cm, contenant la plupart du temps des concentrés), les râteliers (hauteur comprise entre 40 et 60 cm, contenant du foin), les pierres à sel (posée au sol), les abreuvoirs (hauteur comprise entre 20 et 60 cm) et les points d'eau naturels (rivière, mare, source). En bâtiment d'élevage, nous avons suivi les auges des stabulations et des réserves d'aliments (céréales, blé ou orge, stockées en hangar, silos à grains abrités, ensilage de maïs en plein air). Au total, cent un points différents ont été surveillés.

Toutes les exploitations élèvent des bovins allaitants de race charolaise, limousine ou salers. Les vaches ont été laissées en pâture entre le mois d'avril et le mois de novembre et jusqu'au mois de décembre pour certains élevages. Elles ont été rentrées en bâtiment le reste de l'année. Cinq élevages, représentant onze sites pratiquaient le pâturage à l'année.

6.2.1.2.Protocole de surveillance

Nous avons utilisé dix neuf pièges photo à déclenchement automatique par le mouvement, treize de la marque HCO (modèle U-way) et six de la marque Bushnell (modèle Trophy CAM). Les appareils étaient installés pendant dix jours consécutifs, correspondant à une session, une fois par mois sur chaque point surveillé, permettant ainsi une rotation sur 3 points différents au cours du mois. La surveillance s'est déroulée de décembre 2011 à janvier 2013, afin de couvrir une année entière et les quatre saisons. Tous les points n'ont cependant pas été surveillés sur une année entière, la surveillance ayant été interrompue lorsque le point attractif n'était plus présent ou plus alimenté et certains élevages ont été recrutés en cours de protocole.

Afin de préserver la batterie et sachant que les espèces surveillées ont une activité essentiellement nocturne, les appareils HCO étaient programmés pour ne fonctionner que la nuit, soit entre 18h et 7h30 l'hiver, 19h et 7h l'automne et 20h et 7h le printemps et l'été. Les appareils Bushnell ne permettant pas cette programmation et fonctionnant en permanence, ils ont été préférentiellement placés sur les réserves d'aliments où les bovins étaient absents et seules les vidéos enregistrées sur ces tranches horaires ont été prises en compte dans l'analyse (il n'y a cependant pas eu de vidéos montrant des animaux de la faune sauvage sur les enregistrements réalisés en cours de journée).

A chaque déclenchement de l'appareil, une vidéo de 20 secondes était enregistrée, durée jugée suffisamment longue pour recenser les individus et visualiser leur comportement tout en préservant les batteries. L'intervalle minimal entre 2 vidéos, annoncé par les fournisseurs d'appareil était de 5 secondes et la distance de détection de 15 mètres. La date et l'heure était inscrite sur chaque vidéo. La sensibilité de détection était réglée au

maximum et l'appareil était placé à une distance de deux à cinq mètres du point à surveiller (Swann et al. 2004).

A la fin de chaque session, les cartes mémoires des appareils étaient récupérées et les batteries étaient remplacées.

6.2.1.3.Analyses

La session, représente l'unité d'analyse. Chacune d'elle est caractérisée par un nombre de nuits de surveillance effective (c'est-à-dire pendant lesquelles, l'appareil était en état de fonctionnement), une saison, un site et un type de point surveillé. Afin de gagner en puissance dans l'analyse, nous avons regroupé certains types de point. Ainsi, les auges des stabulations et tous les types de réserves de céréales (ensilages, stockages de grains sous hangar, moulin à grain, silos) ont été regroupés en une seule modalité représentant le bâtiment d'élevage (*bât*). En pâture, les nourrisseurs, les auges et les râteliers sont réunis en une seule modalité (*auge*) sauf pour l'étude des comportements (Tableau 38).

Pour chacune des sessions, nous avons recensé le nombre de visites de chaque espèce sauvage observée sur les vidéos (blaireau, cerf, sanglier, renard et chevreuil). Une visite est définie par l'observation d'au moins un individu d'une espèce sauvage donnée dans un intervalle de temps inférieur ou égal à 30 minutes. Nous considérons ainsi que plusieurs vidéos déclenchées à des intervalles de temps inférieur à 30 minutes sur un même appareil pour une espèce donnée constituent un événement (= une visite).

Pour expliquer les variations du nombre de visites de chaque espèce, nous avons utilisé un modèle linéaire généralisé mixte avec un lien Poisson, classiquement utilisé pour analyser les données de comptage. Nous avons placé le site en variable aléatoire, afin de tenir compte de la dépendance très probable des visites sur une même unité géographique. Pour standardiser la durée de surveillance de chaque session, le nombre de nuits de surveillance effective a été transformé en log et placé en offset dans le modèle. Le nombre de visites a été modélisé indépendamment pour le blaireau, le sanglier, le cerf, le chevreuil et le renard.

Les variables explicatives testées dans le modèle ont été le type de point surveillé (Tableau 38), la saison, l'interaction entre ces deux variables, la zone (nord ou sud) et la proximité à la lisière (moins de 500m ou plus de 500m). *A posteriori*, pour le cerf, nous n'avons pas testé la zone car aucune visite de cerf n'a été observée en zone nord (population peu abondante). De plus, pour les cerfs et les chevreuils, afin d'éviter les classes nulles et ainsi améliorer le modèle, nous avons regroupé les types de points abreuvoirs et points d'eau en *points d'abreuvement*, faisant l'hypothèse que les cerfs venaient pour s'abreuver dans ces deux types de points et que l'attractivité était similaire. Pour les mêmes raisons, nous avons regroupé pour ces deux espèces l'auge avec le bâtiment d'élevage en *points d'alimentation*.

La sélection de modèle a été réalisée en suivant la procédure de Zuur et al. (2009) : pour choisir les variables à retenir dans la partie fixe, nous avons ajusté tous les sous-

modèles possibles à partir du précédent, en commençant par le modèle le plus complexe biologiquement pertinent. Au cours de la procédure nous avons retenu les modèles présentant les plus faibles AIC (Akaike information criterion) à chaque étape. Nous avons également appliqué le principe de parcimonie (Burnham & Anderson 2002) : lorsque deux modèles avaient des valeurs AIC proches (différence inférieure à 2), nous avons choisi celui comportant le moins de paramètres.

Dans un second temps, nous avons caractérisé les visites de blaireaux, de sangliers et de cerfs (cette analyse n'a pas été réalisée sur les autres espèces compte-tenu du rôle présumé mineur dans le système multi-hôtes de *M. bovis*). Pour cela, pour chaque espèce, nous avons calculé :

- la durée moyenne des visites et son écart-type, la durée étant calculée entre l'horaire de déclenchement de la première vidéo et l'horaire de la fin de la dernière vidéo constituant la visite. Afin de savoir si la durée des visites différait entre les types de points surveillés, un test de Kruskal-Wallis a été réalisé après avoir constaté que la distribution des données n'était pas normale.

- le nombre moyen d'individus observés et son écart-type, le nombre retenu étant le nombre maximal d'individus vu sur une vidéo appartenant à la visite. Lorsque les données le permettaient, un test de Kruskal-Wallis a également été réalisé (données non normalement distribuées).

- l'occurrence des comportements observés. Pour ceux-ci, huit types de comportements ont été relevés. Différents comportements pouvaient être recensés au cours d'une même visite, soit parce que l'animal les montrait consécutivement, soit parce qu'ils étaient adoptés par différents individus. Seul le comportement de « passage » était inscrit à l'exclusion de tous les autres (Tableau 39).

Tableau 38 : répartition du dispositif de vidéosurveillance selon les sites et les points surveillés en pâture et en bâtiment.

	Nombre de sites surveillés	***Points surveillés***	***Nombre de points***	***Types de points utilisé dans l'analyse****	***Nombre***
bâtiment	7	Réserve céréales	6	*bât*	*17*
		ensilage	4		
		Moulin/silo à grains	3		
		stabulation	4		
pâture	43	Auge	16	*auge*	*37*
		nourrisseur	19		
		râtelier	2		
		sel	27	*sel*	*27*
		abreuvoir	7	*abreuv*	*7*
		Point d'eau	13	*pt-eau*	*13*
Total	**50**		**101**		**101**

* regroupement et dénomination des variables utilisées dans les modèles linéaires généralisées

Tableau 39 : description des comportements relevés pour l'analyse à partir des séquences vidéo

Type de comportement	Description
Nourrissage / abreuvement	L'animal consomme les aliments ou l'eau qui font l'objet de la surveillance (pour le sel, l'animal est vu lécher le sel)
Fouissage ou vermillage* / broute	Pour les sangliers et les blaireaux, l'animal fouit ou vermille* le sol avec son museau ou son groin ; pour les cerfs, ils sont vus en train de brouter
Défécation / Urination / Marquage	L'animal est vu en train de déféquer ou d'uriner ou, pour le blaireau, en train de marquer par les sécrétions de la glande anale (marquage odorant)
Toilettage / grattage / baignade	L'animal est vu en train de se toiletter ou de toiletter un congénère ou de se gratter en contact physique avec le point surveillé. Sur les points d'eau, il est observé en train de se rouler ou de se baigner
Passage / interactions	L'animal passe sans qu'aucun autre comportement précédemment décrit ne soit observé. Lorsque plusieurs individus sont visibles en même temps : observations d'interactions sociales (contacts rapprochés, jeux, comportements agressifs)
Contact rapproché avec bovin	L'animal est vu à une distance de moins de 2 mètres d'un bovin

* action de fouiller le sol à la recherche de vers de terre ou de larves d'insectes.

6.2.2. **Résultats**

6.2.2.1.Données récoltées

Sur l'ensemble des points surveillés, l'effort de piégeage a été de 2984 nuits-pièges se répartissant en 254 sessions d'une durée moyenne de 11,6 nuits et d'un écart-type de 5,9 (Tableau 40). Parmi les 254 sessions, 107 se sont déroulées dans la zone nord (pour un total de 1221 nuits) et 147 dans la zone sud (totalisant 1763 nuits). Certaines sessions ont été raccourcies à cause du déchargement rapide des batteries du fait de températures très basses ou du déclenchement quasi continu par les vaches de l'appareil placé en stabulation ou encore parce que l'infrastructure visée avait été enlevée (cas d'un nourrisseur). Quatorze sessions, soit 5% n'ont pas pu être prises en compte dans l'analyse soit par défaut de fonctionnement de l'appareil (pour 12 sessions), soit parce que l'appareil avait été déplacé par les vaches (1 session) ou parce qu'il était tombé de son support (1 session). Nous avons exclus les vidéos inexploitables (32 vidéos sur 2023), pour cause d'une mauvaise visibilité (images voilées ou floues).

Tableau 40 : nombre de nuits et nombre de sessions de vidéosurveillance réalisés entre décembre 2011 et janvier 2013

	Auge	***Sel***	***Abreuvoir***	***Point d'eau***	***Bâtiment***	***Total***
Nombre de nuits	1005	633	302	442	602	2984
Nombre de sessions	86	53	23	31	61	254

Un total de 498 visites a été détecté, 170 visites de renards (34%), 141 visites de sangliers (28%), 97 visites de chevreuils (19%), 50 visites de blaireaux (10%) et 40 visites de cerfs (8%).

On observe une hétérogénéité des fréquences de visite (nombre de visites / nombre de nuits de surveillance) selon les sites et selon les types de points surveillés. L'abreuvoir, la pierre à sel et l'auge sont les points les plus fréquemment visités par des animaux sauvages toutes espèces confondues (Figures 36 et 37). Entre les différentes installations regroupées dans la dénomination « auge », les râteliers et les nourrisseurs ont été moins fréquentés que les auges sensu stricto. Dans les bâtiments, les stabulations ont été d'avantage visitées que les réserves de céréales mais uniquement par des renards.

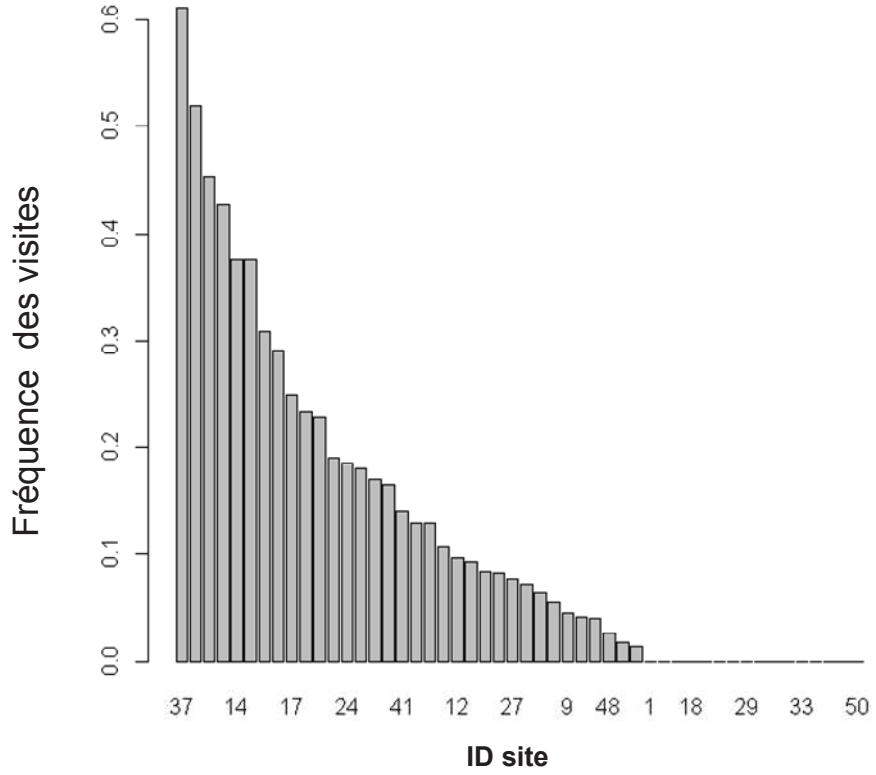


Figure 36 : répartition de la fréquence des visites (nombre de visites / nombre de nuits de surveillance) de la faune sauvage (toutes espèces confondues) en fonction des sites surveillés (les numéros en abscisse correspondent chacun à l'identifiant d'un site)

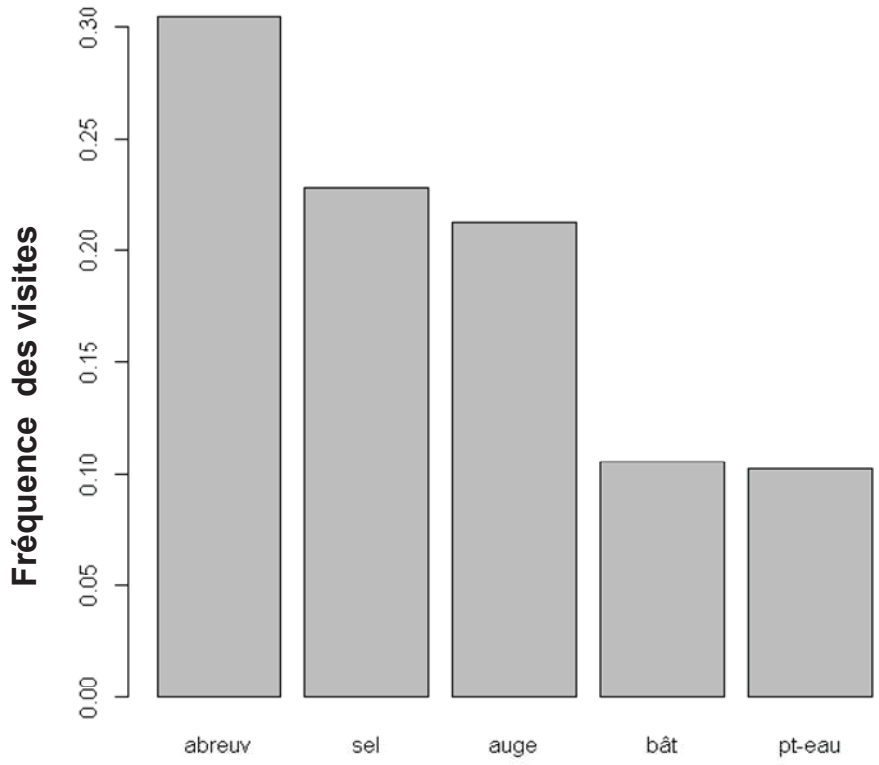


Figure 37 : répartition de la fréquence des visites (nombre de visites / nombre de nuits de surveillance) de la faune sauvage (toutes espèces confondues) en fonction des types de point surveillés

6.2.2.2.Nombre de visites par nuit

- **Cerfs**

La fréquence des visites de cerfs est comprise entre 0 et 2 visites par nuit par session (en moyenne, 0,020 ± 0,141). Aucune visite de cerf n'a été observée en bâtiment d'élevage ni en hiver quel que soit le site. Les cerfs ont surtout fréquenté les pierres à sel. Parmi les différents types d'auge, seuls les nourrisseurs ont été visités.

Le modèle retenu inclut le type de point, la saison et l'interaction entre ces deux variables (AIC = 112,4, nombre de paramètres : 13). Il montre que les cerfs ont eu tendance à fréquenter préférentiellement le sel (printemps, été), puis les points d'alimentation (été, automne) et les points d'abreuvement (printemps) (Tableau 41 et Figure 38).

Tableau 41 : résultat retenu expliquant le nombre de visites de cerfs par nuit : valeurs des paramètres du modèle de Poisson et P-value des tests de Wald (les classes abreuvoirs et points d'eau ont été regroupés en point d'abreuvement, de même pour auge et bâtiment, regroupé en point d'alimentation).

Effets fixes	Paramètre estimé	P-value
Ordonnée à l'origine : nombre moyen de visites de cerfs par nuit sur pierre à sel en automne (échelle exponentielle)	-12,36	< 0 ,001
Type de point : point d'alimentation vs sel	2,787	0,009s
Type de point : point d'abreuvement vs sel	-0,051	0,967
Hiver vs automne	-16,90	0,999
Printemps vs automne	3,636	0,002
Eté vs automne	2,919	< 0 ,001
*Type de point : point d'alimentation vs sel * Hiver*	0,420	1,000
*Type de point : point d'abreuvement vs sel * Hiver*	0,743	1,000
*Type de point : point d'alimentation vs sel * Printemps*	-17,93	0,925
*Type de point : point d'abreuvement vs sel * Printemps*	-1,167	0,495
*Type de point : point d'alimentation vs sel * Eté*	-3,110	0,005
*Type de point point d'abreuvement vs sel * Eté*	-1,932	0,164

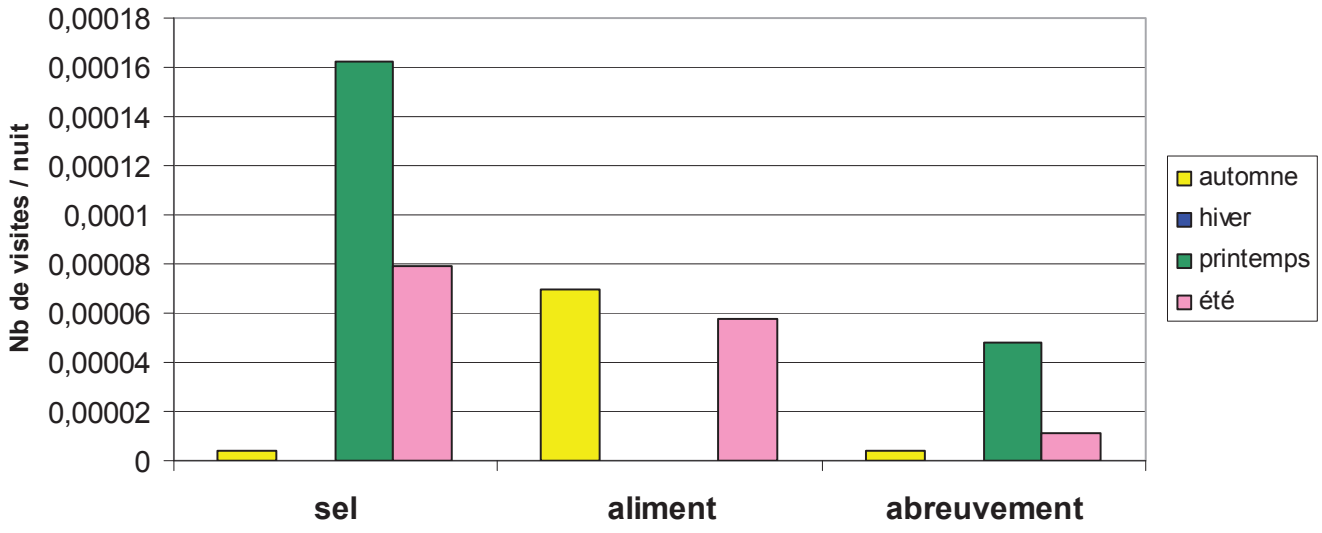


Figure 38 : prédictions du modèle expliquant le nombre de visites de cerfs par nuit sur les différents types de points surveillés (aliment : auges et bâtiments ; abreuvement : point d'eau et abreuvoir) en fonction des saisons

- **Sangliers**

La fréquence des visites de sanglier est comprise entre 0 et 1,909 par nuit par session (moyenne : 0,050 ± 0,194). Tous les types de points ont été fréquentés en pâture sauf les râteliers. Les abreuvoirs ont été les points les plus visités. Une seule visite a été détectée dans un bâtiment d'élevage sur un tas de fumier.

Le modèle sélectionné intègre le type de point, la saison et l'interaction entre ces deux variables et la zone (AIC = 295,4, nombre de paramètres : 21). Les visite ont été plus fréquentes en été sur les points d'eau, et dans une moindre mesure aux abreuvoirs (printemps, été) et sur les pierres à sel (été) (Tableau 42 et Figure 39).

Tableau 42 : résultat du modèle retenu expliquant le nombre de visites de sangliers par nuit : valeurs des paramètres du modèle de Poisson et P-value des tests de Wald

Effets fixes	Paramètre estimé	P-value
Ordonnée à l'origine : nombre moyen de visites de sangliers par nuit aux abreuvoirs en automne (échelle exponentielle)	-4,994	< 0 ,001
Type de point : auge vs abreuvoir	-1,617	0,056
Type de point : point d'eau vs abreuvoir	0,402	0,645
Type de point : sel vs abreuvoir	0,291	0,586
Type de point : bâtiment vs abreuvoir	1,072	0,452
Hiver vs automne	-1,843	0,022
Printemps vs automne	1,465	< 0 ,001
Eté vs automne	1,375	0,002
*Type de point : auge vs abreuvoir * Hiver*	2,098	0,077
*Type de point : point d'eau vs abreuvoir * Hiver*	-16,34	1,000
*Type de point : sel vs abreuvoir * Hiver*	-16,96	0,996
*Type de point : bâtiment vs abreuvoir * Hiver*	-15,72	0,993
*Type de point : auge vs abreuvoir * Printemps*	-0,070	0,939
*Type de point : point d'eau vs abreuvoir * Printemps*	-19,49	0,998
*Type de point : sel vs abreuvoir * Printemps*	-2,564	< 0 ,001
*Type de point : bâtiment vs abreuvoir * Printemps*	-18,87	0,998
*Type de point : auge vs abreuvoir * Eté*	-0,655	0,541
*Type de point : point d'eau vs abreuvoir * Eté*	1,859	0,044
*Type de point : sel vs abreuvoir * Eté*	-0,231	0,714
*Type de point : bâtiment vs abreuvoir * Eté*	-18,12	0,998

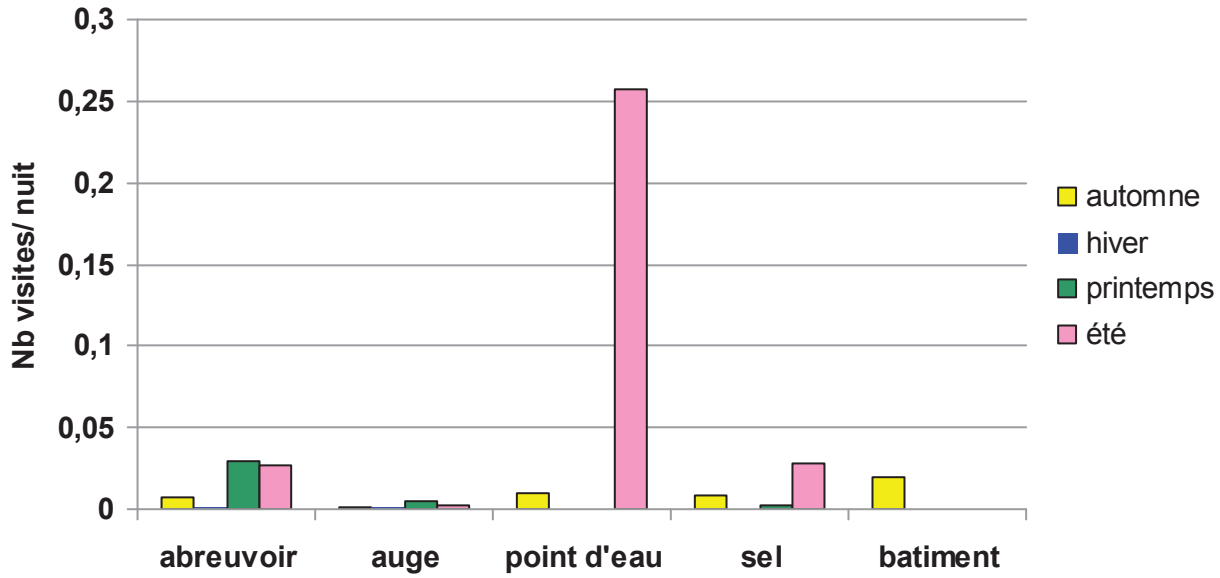


Figure 39 : prédictions du modèle expliquant le nombre de visites de sangliers par nuit sur les différents types de points surveillés en fonction des saisons.

➢ Blaireaux

La fréquence des visites de blaireaux a varié entre 0 et 0,636 visites par nuit par session (0,016 ± 0,073 en moyenne). En pâture, les blaireaux ont fréquenté tous les types de point à l'exception des râteliers. Les auges ont été les installations les plus visitées. En bâtiment, ils n'ont été observés qu'au niveau des réserves de céréales (moulin à grain ou hangar de stockage de céréales).

Le modèle retenu pour expliquer la fréquence de visite inclus le type de point et la saison (AIC= 202,9, nombre de paramètres : 9). Les blaireaux ont davantage fréquenté les auges que les autres points. La saison la moins propice aux visites a été l'automne (Tableau 43, Figure 40).

Tableau 43 : résultat du modèle retenu expliquant le nombre de visites de blaireaux par nuit : valeurs des paramètres du modèle de Poisson et P-value des tests de Wald

Effets fixes	***Paramètre estimé***	***P-value***
Ordonnée à l'origine : nombre moyen de visites de blaireaux par nuit aux abreuvoirs en automne (échelle exponentielle)	-9,863	< 0 ,001
Type de point : auge vs abreuvoir	2,691	< 0 ,001
Type de point : point d'eau vs abreuvoir	1,434	0,436
Type de point : sel vs abreuvoir	1,249	0,128
Type de point : bâtiment vs abreuvoir	0,965	0,613
Hiver vs automne	2,385	0,005
Printemps vs automne	2,053	0,016
Eté vs automne	1,908	0,019

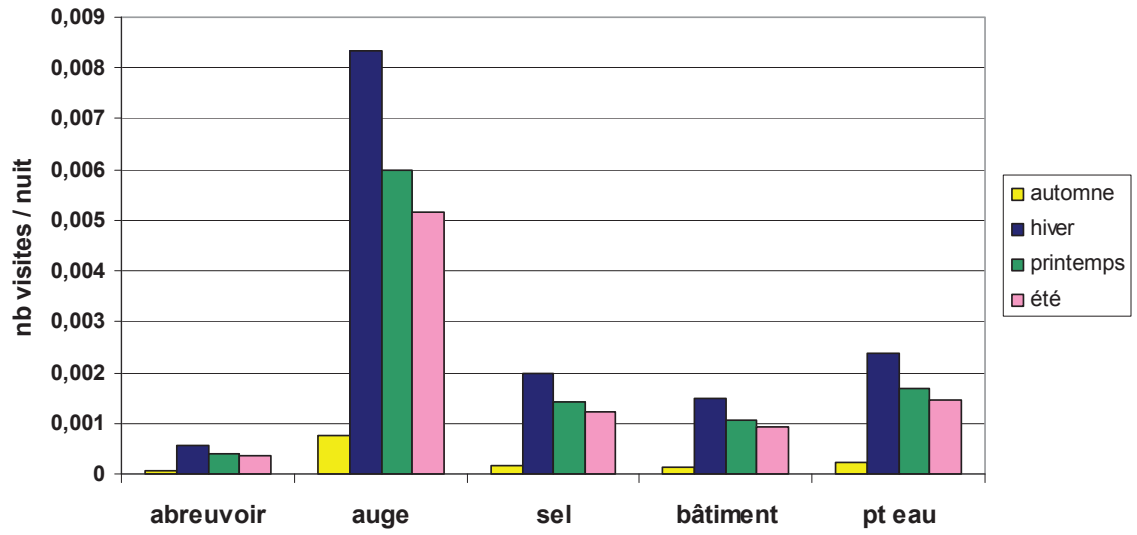


Figure 40 : prédictions du modèle expliquant le nombre de visites de blaireaux par nuit sur les différents types de points surveillés en fonction des saisons.

- **Chevreuils**

La fréquence des visites de chevreuils a varié entre 0 et 1,54 visites par nuit par session (moyenne : 0,035 ± 0,161). Les auges et le sel ont été les points les plus fréquentés et aucun chevreuil n'a été vu en bâtiment d'élevage.

Le modèle retenu inclut le type de point, la saison et l'interaction entre ces deux variables (AIC=226,8, nombre de paramètres :13). D'après ce modèle, les chevreuils sont surtout venus sur les points d'alimentation (auges et les nourrisseurs) en toutes saisons (sauf au printemps) et dans une moindre sur les points d'abreuvement (Tableau 44 et Figure 41).

Tableau 44 : résultat du modèle retenu expliquant le nombre de visites de chevreuils par nuit : valeurs des paramètres du modèle de Poisson et P-value des tests de Wald (les classes abreuvoirs et points d'eau ont été regroupés en point d'abreuvement, de même pour auge et bâtiment en point d'alimentation).

Effets fixes	***Paramètre estimé***	***P-value***
Ordonnée à l'origine : nombre moyen de visites de chevreuils par nuit sur point d'abreuvement en automne (échelle exponentielle)	-10,280	< 0 ,001
Type de point : point d'alimentation vs point d'abreuvement	2,757	0,014
Type de point : sel vs point d'abreuvement	1,463	0,214
Hiver vs automne	-12,86	0,984
Printemps vs automne	1,836	0,114
Eté vs automne	2,246	0,038
*Type de point : point d'alimentation vs point d'abreuvement * Hiver*	13,30	0,983
*Type de point : sel vs point d'abreuvement * Hiver*	14,14	0,982
*Type de point : point d'alimentation vs point d'abreuvement * Printemps*	-3,745	0,006
*Type de point : sel vs point d'abreuvement * Printemps*	-1,150	0,397
*Type de point : point d'alimentation vs point d'abreuvement * Eté*	-1,143	0,336
*Type de point sel vs point d'abreuvement * Eté*	-0,662	0,602

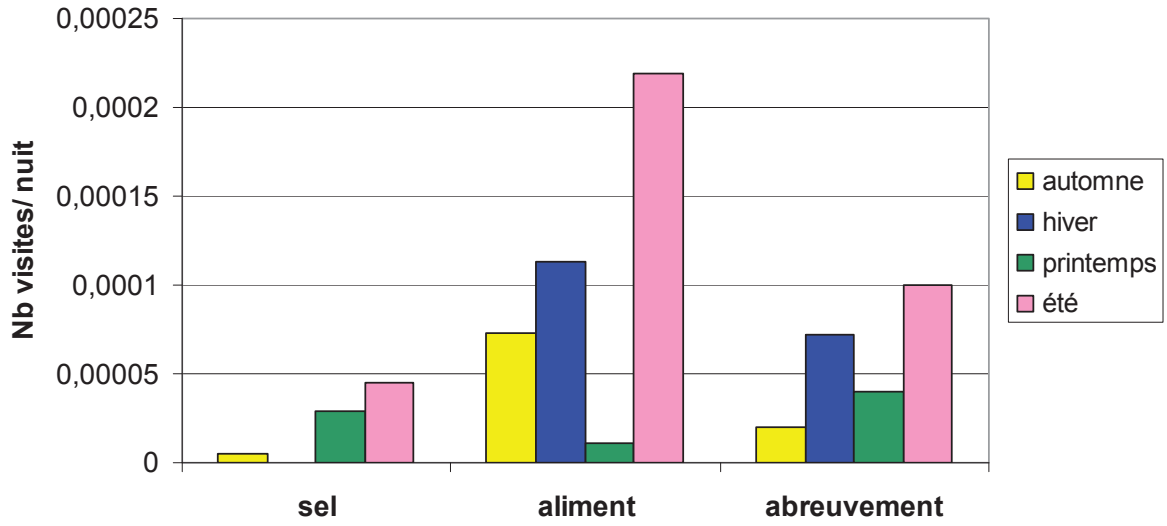


Figure 41 : prédictions du modèle expliquant le nombre de visites de chevreuils par nuit sur les différents types de points surveillés (aliment : auges et bâtiments ; abreuvement : point d'eau et abreuvoir) en fonction des saisons

- **Renards**

La fréquence des visites de renards a varié entre 0 et 1,83 visites par nuit par session (moyenne : 0,064 ± 0,192). Les renards sont venus sur tous les types de points, particulièrement dans les bâtiments et sur les auges dans les pâtures.

D'après le modèle sélectionné (AIC= 419,4, nombre de paramètres : 6), les visites des renards sont expliquées par la saison et la zone. Ainsi, les renards sont venus d'avantage sur les points d'élevage en été par rapport à l'automne et il y a eu moins de visites dans la zone sud que dans la zone nord (Tableau 45).

Tableau 45 : résultat du modèle retenu expliquant le nombre de visites de renards par nuit : valeurs des paramètres du modèle de Poisson et P-value des tests de Wald.

Effets fixes	***Paramètre estimé***	***P-value***
Ordonnée à l'origine : nombre moyen de visites renards en automne dans la zone nord (échelle exponentielle)	-3,312	< 0 ,001
Hiver vs automne	-0,108	0,747
Printemps vs automne	-0,300	0,391
Eté vs automne	0,391	< 0 ,001
Zone sud vs zone nord	-0,908	0,015

6.2.2.3.Description des visites

- **Cerfs**

Durée des visites

Les visites de cerfs ont duré de 0,02 à 292 minutes (moyenne : 14,1 ± 47,0 minutes) Les durées des visites ne sont pas significativement différentes selon les points surveillés (Test de Kruskal-Wallis, p = 0,113) (Figure 42).

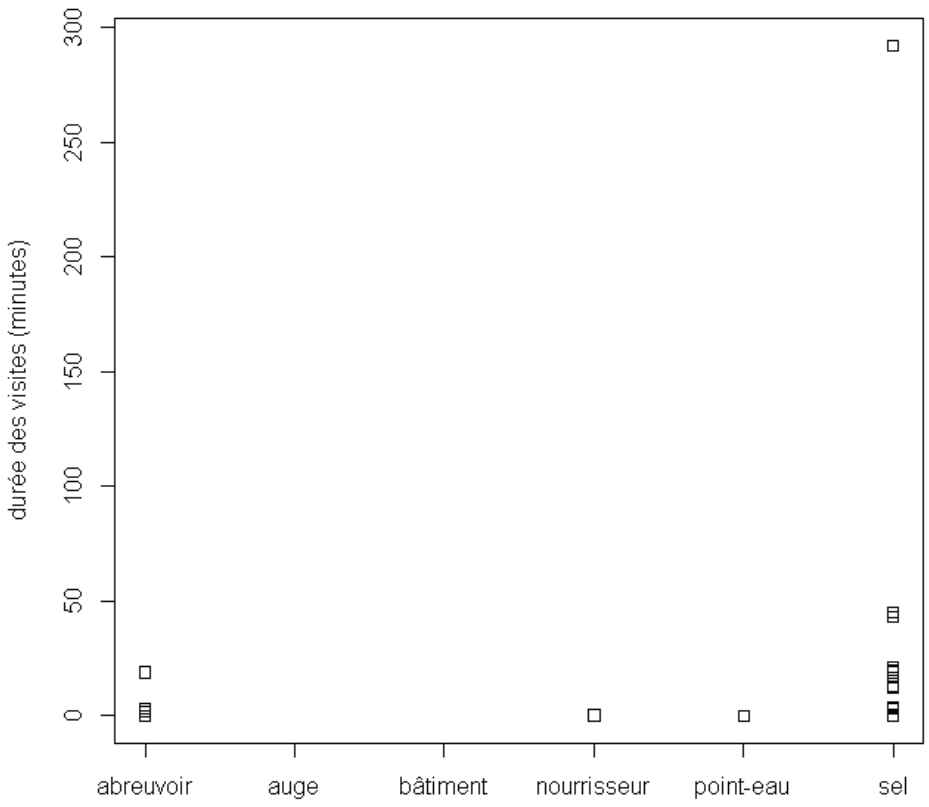


Figure 42 : durée des visites de cerfs en fonction des différents sites surveillés

Nombre d'individus par visite

Entre 1 et 5 cerfs par visite ont pu être dénombrés et en moyenne 1,6 ± 0,9 cerfs ont été observés par visite tous types de point confondus, la majorité étant des biches (seul un cerf mâle a été observé sur une pierre à sel). Les trois visites montrant 4 et 5 individus ont concerné une pierre à sel et un nourrisseur. Le nombre d'individus ne diffère pas statistiquement entre les types de sites (Test de Kruskall-Wallis, p = 0,343).

Comportement

Les comportements n'ont pas été distribués de façon homogène sur les différents points. La consommation a été le comportement le plus fréquent avec 43% des occurrences qui se sont réparties sur les pierres à sel, que les cerfs viennent lécher dans 52% (16/31) des visites sur ce point et sur les abreuvoirs où ils viennent boire dans les deux visites sur les quatre visualisées. En revanche, les images n'ont pas montré de cerfs s'alimentant dans un nourrisseur et aucun abreuvement n'a été observé sur les points d'eau mais une seule visite a été enregistrée sur ce type de point (Figures 43 et 44).

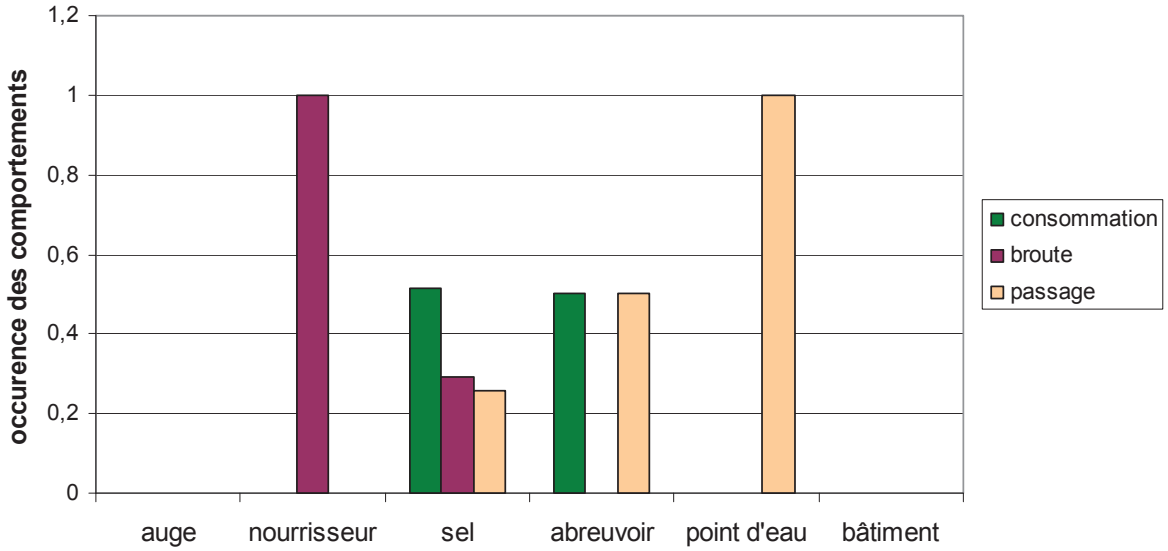


Figure 43 : distribution des comportements relevés sur les visites de cerfs selon les sites surveillés

Figure 44 : biche léchant une pierre à sel dans une pâture

- **Sangliers**

Durée des visites

Les 141 visites de sangliers ont duré de 0,02 à 330 minutes (moyenne 14,8 minutes ± 44,2) tous types de points confondus, mais la durée a différé selon les points (Test de Kruskal-Wallis, p = 0,003). Les visites les plus longues ont été observées en bâtiment mais elles n'ont concerné que trois visites observées sur trois jours consécutifs sur un même tas de fumier où les sangliers sont restés en moyenne 290 minutes. En dehors de ce site, l'auge et l'abreuvoir ont été les deux types de points où les visites les plus longues ont été recensées (12,4 et 11,1 minutes en moyenne respectivement) (Figure 45).

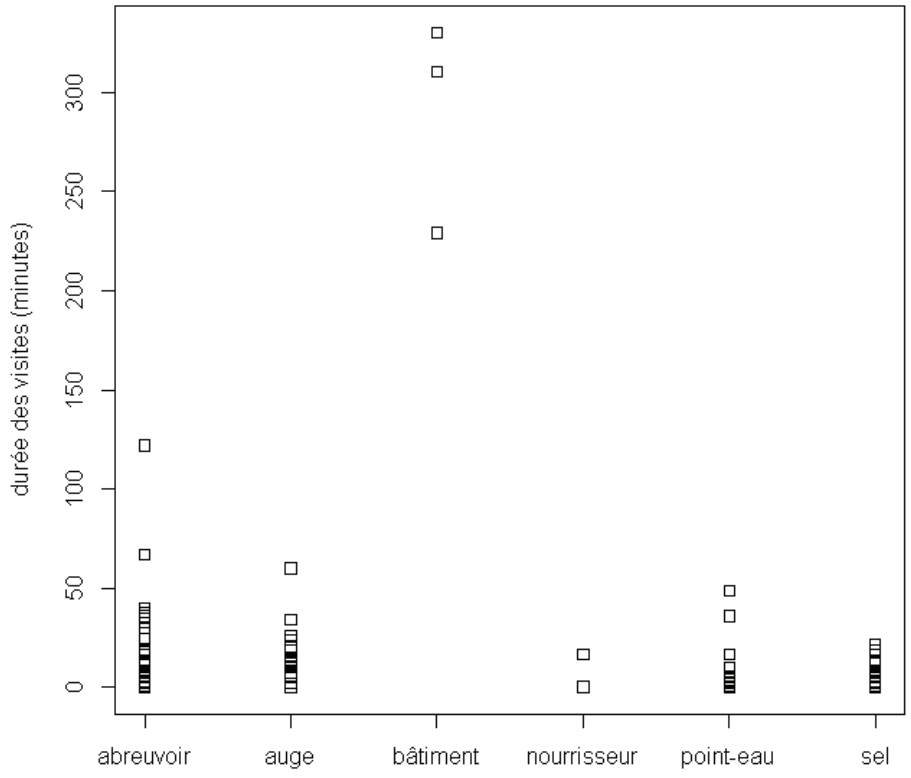


Figure 45 : durée des visites de sangliers observées sur les différents points surveillés

Nombre d'individus par visite

Entre 1 et 28 sangliers par visite ont pu être dénombrés. Le nombre moyen de sangliers compté par visite a été de 5,2 ± 5,7. Les sites d'élevage sont le plus souvent visités soit par une compagnie entière, constituée d'au moins une dizaine d'individus, soit par un individu solitaire, ce qui explique la variabilité observée. Le nombre d'individus diffère selon le type de point surveillé (Test de Kruskal-Wallis, p = 0,005) (Figure 46).

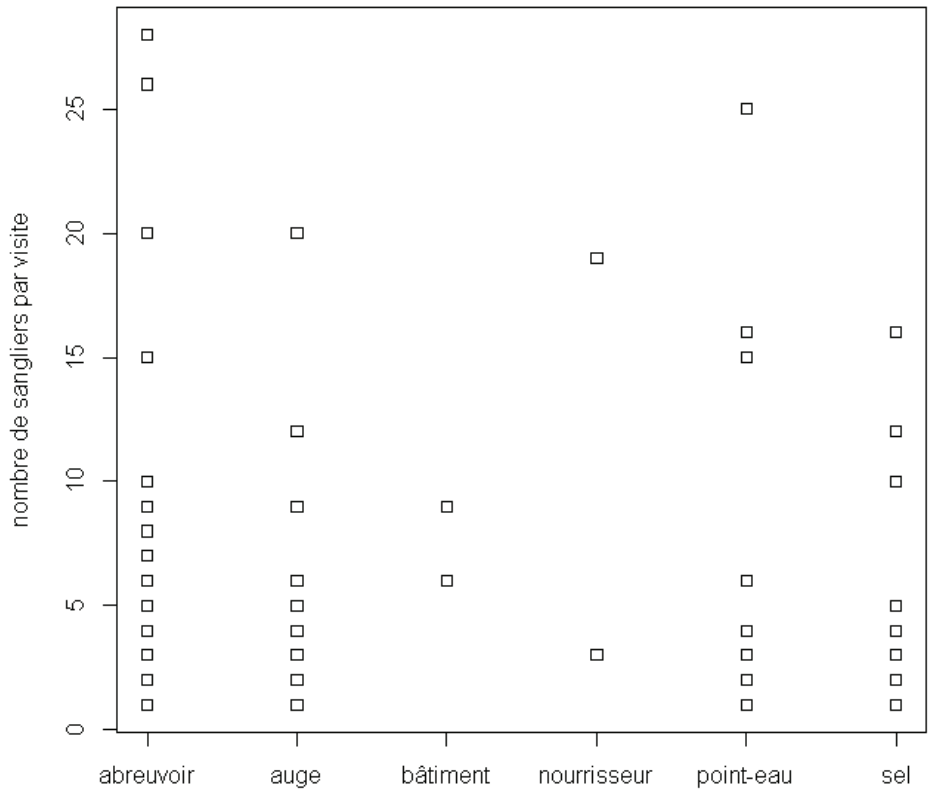


Figure 46 : nombre de sangliers observés par visite en fonction des différents sites surveillés

Comportement

Les comportements ont été hétérogènes selon les points. Le fouissage et le vermillage ont été les comportements les plus rencontrés chez le sanglier (occurrence globale de 39%) quel que soit le type de point surveillé. Le second comportement le plus fréquent a été la consommation : nous avons ainsi observé des sangliers venir manger les aliments tombés à terre sous les auges (73% des visites sur les auges), lécher la pierre à sel (26% des visites sur les pierres à sel) et boire aux abreuvoirs (46,% des visites sur les abreuvoirs) et aux points d'eau (25% des visites sur les points d'eau) (Figures 47 et 48).

Cent pour cent (26/26) des comportements de consommation sur abreuvoir et 88% (14/16) des comportements de consommation sous une auge ont été détectés sur un même site. Il s'agit d'une pâture se trouvant en zone sud entourée de forêt et bordée de deux

cultures. Une partie des compagnies étant identifiée suite aux captures pour le suivi télémétrique, nous avons pu constater que différentes compagnies (au moins trois) fréquentaient ce même site.

Les sangliers se sont nourris sur le fumier lors des trois visites observées en bâtiment. Nous avons observé des animaux se grattant sur la pierre à sel dans près de 10% des visites sur ce type de point. Sur les points d'eau, un sanglier a été vu se baigner. Les autres comportements de toilettage correspondaient à des sangliers se frottant contre des arbres ou des piquets.

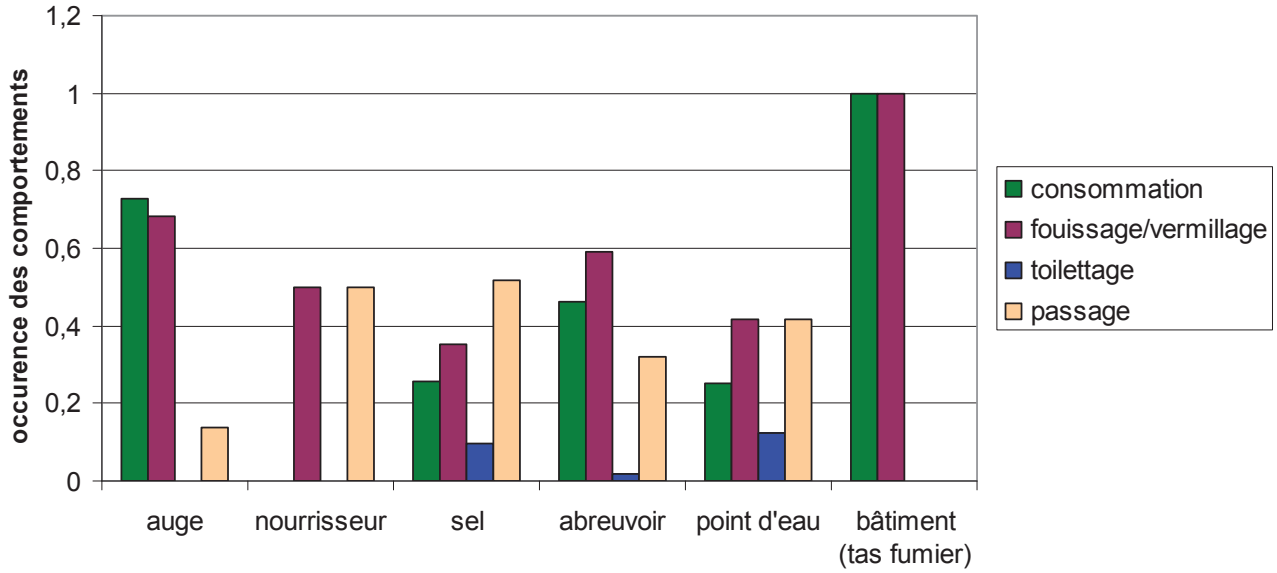


Figure 47 : distribution des comportements relevés sur les visites de sangliers selon les sites surveillés

Figure 48 : sangliers s'abreuvant sur un abreuvoir en pâture

- **Blaireau**

Durée des visites

Au total, 50 visites ont été observées et ont duré entre 1 minute et 34 minutes (moyenne 2,7 minutes ± 8,3.). Les durées ne sont pas homogènes selon les points surveillés (Test de Kruskal-Wallis, p = 0,012). Les visites les plus longues ont été observées en pâture, sur les auges, et en bâtiment au niveau des stocks d'aliments (Figure 49).

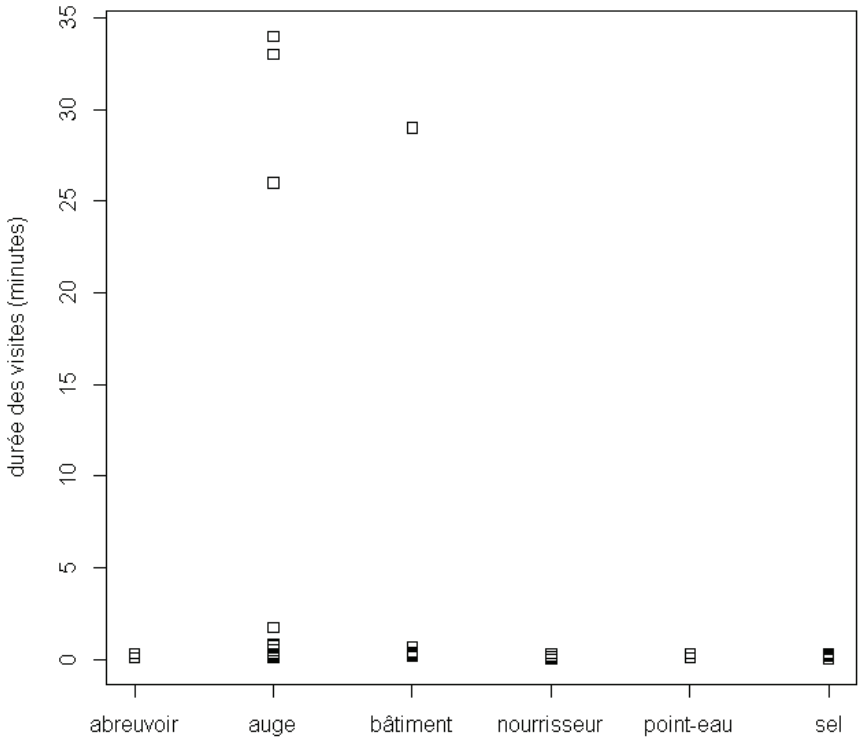


Figure 49 : durée des visites de blaireau observées sur les différents points surveillés

Nombre d'individus par visite

Sur 48 des 50 visites détectées, un seul individu était observé. Deux blaireaux ont été visualisés sur deux visites au niveau d'auges situées sur le même site (Figure 50).

Figure 50 : visites de deux blaireaux sur une auge en pâture

Comportement

Les items de comportement n'ont pas été distribués de façon homogène sur tous les types de points surveillés (Figure 51). Le passage près de l'installation d'élevage surveillée a été le comportement le plus fréquent (50% des visites), tous points confondus. La consommation de céréales distribuées aux bovins a été le comportement le plus commun au niveau des auges en pâture (19/27) mais il faut noter que ce comportement n'a été observé que sur un site.

Les blaireaux ont consommé les céréales tombées à terre et n'ont jamais été vus grimper ou de tenter de grimper dans l'auge. Sur l'une des deux visites de point d'eau enregistrées, un blaireau a bu et marqué (ou uriné, la distinction entre ces deux comportements étant très difficile à faire) au bord du point d'eau. Les visites en bâtiment n'ont concerné qu'un seul site, elles ont été observées au niveau d'un moulin à grain et d'un hangar de stockage de blé. Les blaireaux y ont été observés se toilettant dans 3 visites sur 7. Aucune visite en stabulation en présence ou en l'absence de vaches n'a été observée, y compris dans cette exploitation. Un seul contact proche avec un bovin a été visualisé en pâture au niveau d'une auge : la vache s'est approchée du blaireau, qui se trouvait derrière l'auge de l'autre côté de la clôture. Le blaireau a pris rapidement la fuite (Figure 52).

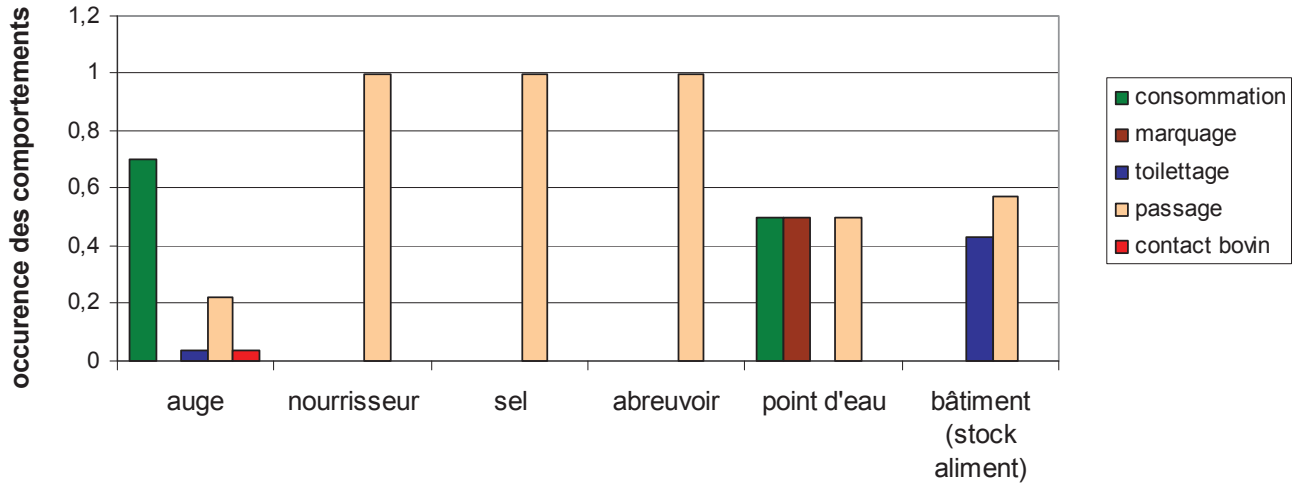


Figure 51 : distribution des comportements relevés sur les visites de blaireaux selon les sites surveillés

Figure 52 : contact proche avec un bovin observé au niveau d'une auge en pâture

- **Chevreuils et renards**

Nous n'avons pas analysé de façon aussi précise les visites de chevreuils et des renards.

Chez les chevreuils, le visionnage des vidéos a mis en évidence des comportements de consommation sur les auges et les pierres à sel.

Le renard est la seule espèce que nous avons observée dans les stabulations en présence de vaches. Nos images ont montré que les renards venaient sur les points d'alimentation pour chasser des rongeurs. Nous avons également observé des renardeaux sauter dans un nourrisseur où ils ont consommé des concentrés et dans lequel ils défèquaient.

6.2.3. **Discussion**

- **Méthodologie**

Différentes contraintes (principalement de conduite d'élevage) n'ont pas permis de suivre tous les sites tout au long de l'année de suivi. Ainsi, dans la majorité des exploitations de notre site d'étude, les bovins pâturaient entre avril et novembre et étaient rentrés en bâtiment en hiver jusqu'au début du printemps. De ce fait, nous étions limités pour suivre des points d'attractivité en pâture pendant la saison hivernale. De même, les ressources potentiellement accessibles à la faune sauvage dans les bâtiments d'élevage n'étaient pas constantes tout au long de l'année. Il y a donc eu un déséquilibre du plan d'échantillonnage engendrant une possible confusion entre l'effet des saisons, l'effet du site et celui du type de point.

Les résultats ont montré une forte hétérogénéité des fréquences de visite selon les sites. Il y a donc vraisemblablement des particularités liées aux sites et sans doute spécifiques de chaque espèce qui pourraient expliquer leur niveau de fréquentation. Cet effet site mériterait d'être exploré davantage (localisation, organisation, gestion des points attractifs), d'autant que cette attractivité variable est probablement un facteur de risque majeur du contact domestique-sauvage et donc du risque de tuberculose.

Concernant le dispositif de vidéosurveillance, 5% des sessions n'ont pu être prises en compte principalement par défaut technique des appareils ou des batteries, ce qui a entrainé une perte de données. Le champ de vision du piège-photo ne permettait pas toujours de couvrir la totalité de l'espace ciblé et il est possible que des visites aient eu lieu dans ces « angles morts » ou que des comportements n'aient pas pu être visualisés. De plus, lorsqu'un animal passait rapidement devant le point, la vitesse de déclenchement des appareils n'a pas permis de récolter la donnée. Enfin, la charge des batteries a parfois été un facteur limitant, ne

permettant pas d'enregistrer toute la durée de la visite. Ces contraintes techniques ont surement résulté en une sous-estimation du nombre de visites et de leur durée.

- **Visite des cerfs**

Le niveau de fréquentation des cerfs sur les infrastructures d'élevage a été faible (en moyenne, 0,020 ± 0,141 visite par nuit).

Les cerfs sont surtout venus lécher les pierres à sel au printemps et en été Ce résultat est retrouvé aux Etats-Unis sur le cerf de Virginie et correspond à un besoin physiologique en minéraux de ces ruminants, particulièrement chez les femelles qui mettent bas et sont en lactation à ces périodes (Kennedy et al. 1995; Atwood & Weeks 2003).

Des visites ont aussi été observées sur des abreuvoirs, où les cerfs ont été vus s'abreuver et au niveau de nourrisseurs, mais sans consommation observée. Points d'abreuvement et points d'alimentation sont considérés comme des sites déterminants de la transmission intraspécifique et interspécifique de *M. bovis* entre cerfs, sangliers et bétail en Espagne, et, entre cerfs de Virginie et bovins dans le Michigan (Palmer, Waters, Ave, et al. 2004; Palmer, Waters & Whipple 2004; Vicente et al. 2007; Castillo et al. 2011; Brook et al. 2013). Cependant, dans ces pays, les pratiques d'élevage extensives et les pratiques cynégétiques d'affouragement massif associées à un climat plus rude (chaud et sec en Espagne et très froid dans le Michigan), conduisent certainement à une fréquentation plus importante de ces points par les cerfs que ce que nous avons constaté en Côte d'Or.

D'après nos résultats, les pierres à sel et les abreuvoirs sembleraient constituer les points les plus à risque de contact entre cerfs et bovins en élevage. Compte-tenu du régime et du comportement alimentaire du cerf, la consommation d'herbe (que nous avons pu visualiser autour des nourrisseurs cf. figure 43) sur les pâtures pourrait également favoriser les contacts contaminants entre cerfs et bovins (Kukielka et al. 2013; Lande et al. 2013). De façon concordante avec une étude de vidéosurveillance en Espagne, nous n'avons observé aucun contact direct entre cerfs et bovins (Kukielka et al. 2013).

- **Visite des sangliers**

Nos résultats ont mis en évidence une fréquence peu élevée de visites de sangliers, quoique supérieur à celle des cerfs (moyenne : 0,050 ± 0,194 visite par nuit).

Nous avons montré que les sangliers visitaient surtout les pâtures et sur celles-ci, les points d'abreuvement beaucoup plus fréquemment que les points d'alimentation. L'attractivité des points d'eau pour les sangliers est retrouvée dans d'autres pays. Dans le centre et le sud de l'Espagne, où le climat est aride, les points d'eau constituent des points d'agrégation des populations de sangliers et leur nombre est associé à une augmentation de la prévalence de tuberculose (Vicente et al. 2007). Un suivi par piégeage photographique a

néanmoins montré que les visites de sangliers étaient plus fréquentes sur les points d'alimentation que sur les points d'eau artificiels, cependant, le site d'étude comportait une rivière dans laquelle les animaux pouvaient s'abreuver (Kukielka et al. 2013). Au Texas, les points d'eau ont été identifiés comme des lieux privilégiés pour les contacts entre bovins et sangliers (Cooper et al. 2010). Nous avons également une observation de bain et une fréquentation accrue en été. Les points d'eau des pâtures sont donc également utilisés par les sangliers pour leur thermorégulation (Bracke 2011). Nous avons observé de façon pratiquement systématique les sangliers fouiller les points d'eau ou les abords humides des abreuvoirs avec leur groin. Les sols humides sont en effet rapportés comme étant des substrats privilégiés pour ce comportement, les animaux y trouvant plus facilement des ressources nutritives (Welander 2000).

Des sangliers ont également été observés au niveau de pierres à sel qu'ils sont venus lécher et où ils ont fouillé à proximité, attestant de l'attractivité de cet aliment pour le sanglier. Les pierres ont également été utilisées comme support par certains individus pour se gratter.

Enfin, nous n'avons eu que trois visites ponctuelles en bâtiment d'élevage sur un tas de fumier situé dans un pré à environ 10 mètres du bâtiment où se trouvaient les bovins. Les autres types de point surveillé en bâtiment (réserve de céréales) n'ont pas semblé attractifs pour les sangliers. Il est probable qu'ils trouvent dans les cultures sur pied suffisamment de ressources de ce type (Cooper et al. 2010) sans avoir besoin de venir se nourrir dans les bâtiments. Cette visite pointe cependant l'attractivité du fumier pour les sangliers qui doivent y trouver de nombreux insectes et larves d'insectes. En Espagne, il a été montré dans une ferme, que les points d'alimentation constituaient les sites où avaient lieu la majorité des contacts indirects entre bovins et sangliers, principalement pendant la saison sèche qui correspond dans cette région à la saison où les ressources naturelles sont le moins disponibles (Kukielka et al. 2013). Nos résultats ont montré une faible fréquentation des auges et nous n'avons pas mis en évidence de saisonnalité particulière. La glandée importante au cours de l'année de l'étude pourrait être une explication. Pour confirmer cette hypothèse, il conviendrait de répliquer l'étude lors d'une année de faible glandée.

Aucune vidéo n'a montré de contact direct entre bovins et sangliers ce qui est cohérent avec d'autres travaux conduits en Espagne et aux Etats-Unis faisant état d'absence ou de très rares contacts directs entre les deux espèces (Cooper et al. 2010; Kukielka et al. 2013).

Enfin nos résultats ont montré qu'en moyenne, les visites des sangliers ont été relativement longues (15 minutes en moyenne) et que des groupes d'en moyenne 5 individus étaient observés. Cela souligne le caractère grégaire de cette espèce dans la recherche des ressources et devra être pris en compte dans le risque de transmission de *M. bovis* aux bovins.

- **Visites de blaireaux**

Les visites de blaireaux ont été moins fréquentes que celles des sangliers et des cerfs (0,016 ± 0,073 visite par nuit en moyenne) et elles ont surtout concerné des points d'alimentation sur les pâtures ou dans les bâtiments.

Des études de vidéosurveillance dans des exploitations ont été menées en Angleterre et ont montré des taux de fréquentation supérieurs dans les bâtiments d'élevage. Tolhurst et al. (2009), par exemple, ont comptabilisé une fréquence comprise en moyenne entre 0,1 à 1,8 blaireaux vus par nuit-piège selon les saisons. Il est cependant délicat de comparer les résultats quantitatifs entre ces estimations et les nôtres car elles sont rattachées à des sites particuliers qui ne sont pas représentatifs de l'ensemble d'une zone. En outre, des différences dans le dispositif de vidéosurveillance (nombre d'appareils posés et lieu de pose) rendent également la comparaison difficile sur la fréquence et la durée des visites. Nous pouvons cependant comparer ces visites sur le plan qualitatif.

Au sein des bâtiments d'élevage, les stocks d'aliment ont été les lieux les plus visités par les blaireaux, à l'instar de ce qui est rapporté en Angleterre (Garnett et al. 2002; Tolhurst et al. 2009; Judge et al. 2011). En revanche, nous n'avons pas observé de blaireaux en stabulation en présence de bovins, contrairement à ce qui est décrit dans ces mêmes études anglaises (Garnett et al. 2002; Tolhurst et al. 2009; Judge et al. 2011). Il est surprenant que nous n'ayons pas observé de comportement de consommation dans les stocks d'aliments en élevage, puisqu'il est très probable que les blaireaux s'y rendent pour se nourrir. En Angleterre, ce comportement a en effet été rapporté dans plus de 40% des visites dans les bâtiments (Tolhurst et al. 2009). Comme déjà mentionné, il est possible que nos dispositifs de vidéosurveillance n'aient pas permis de visualiser ce comportement. En revanche, sur trois des sept visites en bâtiment, le blaireau a été vu se grattant et se toilettant. En adoptant ce comportement, il est susceptible d'excréter des aérosols ou de la salive et ainsi potentiellement contaminer les aliments s'il est infecté.

Dans les pâtures, nous n'avons visualisé qu'un seul contact rapproché entre un bovin et un blaireau autour d'une auge. Ce résultat concorde avec les études anglaises où il a été démontré au moyen de capteurs de contacts, que les contacts directs entre bovins et blaireaux étaient rares (Böhm et al. 2009; Drewe et al. 2013) et que les blaireaux préféraient fréquenter les pâtures en l'absence de bovin (Mullen et al. 2013).

Concernant les autres comportements détectés en pâture, nous constatons que les blaireaux sont venus consommer principalement autour des auges l'aliment tombé à terre et c'est également sur ces points que les visites durent le plus longtemps (3,8 minutes en moyenne). Sur les pierres à sel, les blaireaux observés sont passés sans montrer d'intérêt particulier et sans consommer le sel. Les nourrisseurs ne semblent pas non plus être particulièrement attractifs puisqu'ils y passent peu de temps et qu'aucun comportement de consommation n'y a été observé.

Les points d'abreuvement semblent moins attractifs pour les blaireaux que les points d'alimentation. En effet, nous n'avons jamais observé de blaireaux buvant à un abreuvoir, sans doute pour des raisons d'accessibilité, et une seule fois sur un point d'eau. Celui-ci se trouvait à quelques dizaines de mètre d'un terrier et nous avons pu identifier que le blaireau venant boire à ce point d'eau provenait effectivement de ce terrier (individu équipé de collier GPS).

Nos résultats ont montré un maximum de visites en hiver puis au printemps et en été et beaucoup moins en automne. Dans les études anglaises, l'été et le printemps sont les saisons les plus favorables avec des visites à la fois plus fréquentes et plus longues (Tolhurst et al. 2009; Judge et al. 2011). Les auteurs expliquent cette saisonnalité par l'importance des besoins énergétiques au printemps et la variation de ressource disponible, notamment les vers de terre (Garnett et al. 2002; Tolhurst et al. 2009).

Les visites de blaireaux ont été relativement courtes par rapport aux autres espèces (3 minutes en moyenne) et elles ont concerné le plus souvent un seul individu, correspondant au comportement de l'espèce qui a des aires de gagnage individuels (Roper 2010). Le niveau de contact avec ces infrastructures d'élevage, pris sur ces critères, est donc moins élevé que pour le sanglier et le cerf.

- **Visite des autres espèces**

Les chevreuils ont comptabilisé en moyenne 0,035 ± 0,161 visite par nuit et ont donc été observés plus fréquemment que les blaireaux et les cerfs. Ils ne sont pas venus dans les bâtiments d'élevage et ont surtout été attirés par les auges et les pierres à sel, où ils ont consommé aliments et sel. L'été s'est avéré davantage propice aux visites de cette espèce. Ces contacts indirects potentiels avec les bovins exposeraient les chevreuils à une source de contamination à partir des bovins mais leur faible réceptivité constatée jusqu'alors en Côte d'Or (aucun cas détecté) n'est pas en faveur d'un rôle important dans le système multi-hôte de *M. bovis*.

Nos résultats ont montré que le renard était l'espèce la plus fréquente sur les infrastructures d'élevage (34% des visites et 0,064 ± 0,192 visite par nuit en moyenne) et ceci en bâtiment comme sur les pâtures. En outre, c'est la seule espèce que nous avons observée dans les stabulations en présence de vaches. Nous avons donc mis en évidence un niveau d'interaction indirect avec les bovins plus élevé que pour les autres espèces qui pourrait exposer cette population de renard à une source d'infection bovine.

Chapitre 3

Discussion générale: rôle des populations sauvages dans le système multi-hôtes de M. bovis en Côte d'Or, estimation du risque de transmission aux bovins et recommandations

Pour chaque population sauvage impliquée dans le système multi-hôtes de la tuberculose bovine en Côte d'Or et plus particulièrement pour les sangliers et les blaireaux, nous avons étudié le niveau de prévalence, la capacité d'excrétion, la densité, ou des indices de densité et le niveau potentiel de contact avec les bovins à travers l'utilisation des pâtures et la fréquentation des infrastructures d'élevage.

Ces paramètres, associés à la connaissance de l'écologie des différentes espèces et de la géographie de la région, doivent permettre de mieux définir le statut occupé par chaque population au sein de la communauté d'hôtes de *M. bovis* en Côte d'Or (Corner 2006; Nugent 2011; Palmer 2013). Plus précisément, nous avons tenté de déterminer le rôle de chaque population dans la persistance, la propagation et la transmission-retour de *M. bovis* aux bovins. Nous nous sommes principalement intéressés au cerf, sanglier et blaireau, bien que pour la première espèce citée, nous ne disposions pas de données expérimentales sur l'utilisation des pâtures. Nous avons également traité plus brièvement du renard et du

chevreuil. A l'issue de cette étude par espèce, nous avons ensuite posé la question de la possibilité de constitution d'une communauté d'hôtes sauvages réservoir.

Dans un deuxième temps, nous avons caractérisé le risque de transmission de *M. bovis* posé par ces populations aux bovins en termes spatial, temporel et en termes de pratiques d'élevage.

Notre objectif final était de déduire des mesures de gestion visant à réduire le risque d'entretien de l'infection à *M. bovis* dans la faune sauvage et limitant les interactions entre les hôtes sauvages et les bovins.

1. RÔLE DES POPULATIONS SAUVAGES DANS LE SYSTÈME MULTI-HÔTE DE *M. BOVIS* EN CÔTE D'OR

1.1. Démarche utilisée pour l'évaluation du rôle des différentes espèces

Nous avons procédé à une analyse qualitative en utilisant l'échelle de la méthode d'analyse de risque en santé animale de l'ANSES (AFSSA 2008) fondée sur l'analyse du risque à l'importation éditée dans le code terrestre de l'Office Internationale des Epizooties (OIE 2010). Cette méthode utilise dix niveaux graduels (de nul à très élevé) pour qualifier la probabilité d'émission de survenue d'un événement sanitaire (Dufour et al. 2011)(Tableau 46). Elle comprend une part de subjectivité indéniable. Afin de la limiter et conformément à la méthode, chaque niveau de risque a été discuté de façon collégiale avec mes trois encadrants (Barbara Dufour, Emmanuelle Gilot-Fromont et Jean Hars) (Dufour & Plée 2009).

Cette évaluation qualitative constitue un outil permettant de prendre en compte de façon explicite les différents facteurs qui conditionnent le risque évalué, dans l'état actuel des connaissances.

Tableau 46 : grille de qualificatifs utilisés pour l'estimation des probabilités d'émission (Sources : AFSSA 2008 et Dufour et al. 2011)

Echelle ordinale	*Qualificatifs*
0	*Nulle (N)*
1	*Quasi-nulle (QN)*
2	*Minime (M)*
3	*Extrêmement faible (EF)*
4	*Très faible (TF)*
5	*Faible (F)*
6	*Peu élevée (PE)*
7	*Assez élevée (AE)*
8	*Elevée (E)*
9	*Très élevée (TE)*

Afin de déterminer quel pouvait être le statut de chaque population, nous avons utilisé les paramètres évalués dans les précédentes parties, auxquels nous avons ajouté les caractéristiques principales du comportement social pouvant avoir des conséquences épidémiologiques (cf. chapitre 1).

Sur la base de la grille d'évaluation (Tableau 46), nous avons attribué un score qualitatif aux niveaux de prévalence, de densité et d'excrétion ainsi qu'aux niveaux de contact avec les bovins et aux traits comportementaux pour chaque espèce (cerf, sanglier, blaireau) et pour chacune des zones (nord et sud). L'évaluation a été fondée sur des critères semi-quantitatifs car reposant à la fois sur des données chiffrées et sur l'estimation qualitative de certains paramètres et de l'éthologie.

Pour le niveau de prévalence, nous nous sommes fondés sur les valeurs extrêmes et la valeur calculée sur l'ensemble des années de surveillance pour chacune des deux sous-zones (cf. chapitre 2, paragraphe 3).

Pour les niveaux d'excrétion, les critères de classification ont reposé sur la nature des lésions observées chez les individus infectés (cf. chapitre 2, paragraphe 3), sur les résultats expérimentaux de recherche de *M. bovis* dans les excrétas pour le sanglier et le blaireau (cf. chapitre 2, paragraphe 4) et sur des données bibliographiques.

La qualification du niveau de densité repose chez le blaireau sur l'étude expérimentale conduite en zone infectée. Nous avons utilisé les résultats pour les zones non piégées (la zone échantillonnée A correspondant à la zone nord et la zone échantillonnée C à la zone sud ; cf. chapitre 2, paragraphe 5). Pour le sanglier et le cerf, nous avons utilisé les indices de densités correspondant aux tableaux de chasse (des unités de gestion cynégétique n°7 et 12 pour la zone nord et de la vallée de l'Ouche et des Hautes Côtes pour la zone sud) et, pour le cerf, nous avons également pris en compte les indices kilométriques d'abondance dont nous disposions pour la zone sud (cf. chapitre 2, paragraphe 5).

Concernant le niveau de contact, nous avons fondé notre estimation sur les valeurs chiffrées obtenues pour l'utilisation des pâtures et les fréquentations des points d'alimentation et d'abreuvement (cf. chapitre 2, paragraphe 6). Nous avons vu que l'utilisation en terme de temps passé (nombre de localisations) chaque nuit sur les pâtures était comparable entre les sangliers et les blaireaux (cf. chapitre 2, paragraphe 6.1). Ici, nous rapportons la surface utilisée dans le domaine vital mensuel. Sachant que la zone sud est à dominante forestière et que la zone nord est bocagère, nous avons intégré dans notre évaluation l'effet de la structure paysagère, correspondant aux variables « distance terrier-pâture » et « proportion de pâture disponible » des modèles blaireau et sanglier respectivement, en utilisant les prédictions du modèles expliquant la surface de pâture dans le DV mensuel (cf. chapitre 2, paragraphe 6.1). Les valeurs fournies correspondent aux prédictions pour les saisons où l'utilisation est maximale. Aucun sanglier n'a été suivi dans la zone nord, où la proportion de milieu ouvert est d'environ 70%. Nous avons donc estimé que

leur utilisation des pâtures était supérieure à celle prédite par le modèle pour un sanglier ayant 54% de pâture disponible qui correspond à la valeur maximale dont nous disposons pour la zone sud. Nous nous basons donc sur une borne inférieure de surface de pâture dans le DV mensuel. Pour les blaireaux, nous considérons qu'en zone sud, les terriers peuvent se trouver au bord des pâtures ou à plusieurs centaines de mètres alors qu'en zone nord, étant donné le paysage bocager, la majorité des terriers se trouvent à moins de 100m des pâtures.

Pour l'utilisation des infrastructures d'élevage, en dehors du cerf, nous n'avons pas différencié la zone sud et la zone nord car nos analyses n'ont pas mis en évidence d'effet de la zone sur la fréquence des visites et nous avons fourni les valeurs extrêmes et moyennes de la fréquence des visites, de leur durée et du nombre d'individus présents (cf. chapitre 2 paragraphe 6.2).

Pour évaluer le risque lié au comportement social et spatial, nous avons utilisé l'étude des facteurs de risque réalisée dans le paragraphe 4 du chapitre 1. Pour les sangliers et les blaireaux, concernant le comportement spatial, nous avons utilisé en plus les valeurs extrêmes et la moyenne de la taille des domaines vitaux déterminés par la méthode du MCP 100%, ainsi que les distances extrêmes que nous avons relevées pendant le suivi télémétrique (cf. chapitre 2, paragraphe 6.1). Pour le cerf, ces données sont issues de la bibliographie.

Nous avons déterminé la taille moyenne des groupes déterminés par les travaux expérimentaux pour le blaireau (cf. chapitre 2, paragraphe 5) et pour le sanglier (en calculant la moyenne des tailles de groupes, en excluant les individus solitaires vus pour chaque visite à partir de la vidéosurveillance, cf. chapitre 2 paragraphe 6.2). Nous avons ajouté d'autres caractéristiques jugées pertinentes pour l'évaluation du risque (milieu de vie, type de relation entre congénères…).

Pour le chevreuil et le renard, nous avons réalisé un traitement moins détaillé, compte-tenu des plus faibles quantités de données dont nous disposions.

En cas d'incertitude sur l'estimation, nous avons utilisé un intervalle. Celui-ci est d'autant plus grand que l'incertitude est élevée (AFSSA 2008).

A partir de ces éléments et de la comparaison avec des situations épidémiologiques décrites dans la littérature et présentant des analogies avec celle de la Côte d'Or, nous avons émis des hypothèses sur la probabilité pour chaque population (blaireau, sanglier et cerf) d'être un hôte réservoir (capable de maintenir seul l'infection sans source extérieure) ou un hôte de liaison (incapable de maintenir seul de façon pérenne l'infection sans source de contamination extérieure à la population mais pouvant transmettre le pathogène à une autre population) (Corner 2006; Rhyan & Spraker 2010; Nugent 2011) dans le contexte de la Côte d'Or. Puis nous nous sommes intéressés à la probabilité avec laquelle ces populations pouvaient transmettre la tuberculose aux bovins (transmission-retour). Enfin, nous avons évalué pour chacune d'elle, le risque d'extension spatiale de l'infection.

Au fil de la discussion, nous avons identifié les données manquantes qui permettraient une évaluation plus complète et avons indiqué les études supplémentaires qu'il serait nécessaire de mettre en œuvre pour les récolter (texte en italique).

1.2. Limites des données produites

Avant d'estimer le rôle de chaque espèce, il nous a semblé important de discuter de l'inférence des résultats expérimentaux vis-à-vis de la population générale.

Tous les résultats à partir desquels nous basons cette évaluation sont issus d'un échantillonnage. Or, il est difficile de savoir dans quelle mesure ces résultats peuvent être inférés aux populations de la zone infectée.

Concernant le niveau de prévalence, nous avons déjà mentionné dans la partie 3 du chapitre 2 les biais liés à l'échantillonnage de la faune sauvage conduisant à un manque de représentativité. Nous avons cependant estimé la prévalence dans la population générale en fournissant un intervalle de confiance à 95%, tenant compte de la taille d'échantillon.

Pour la capacité d'excrétion, nos résultats reposent sur un très faible échantillon (7 sangliers partiellement analysés et 27 blaireaux) et sur une méthodologie pionnière. L'inférence à la capacité d'excrétion de la population de blaireaux et de sangliers infectés est donc délicate.

Pour les sangliers et les grands cervidés, les indices de densité reposent en partie sur les tableaux de chasse. Dans ce cas, comme nous l'avons déjà mentionné dans la partie 5 du chapitre 2, la difficulté pour l'inférence à la population réelle est de savoir quelle relation existe entre cet indice et la densité réelle. Cette limite impose de rester prudent sur les conclusions tirées à partir des densités basées sur cet indice cynégétique. Pour le cerf en zone sud, la disponibilité de l'indice kilométrique d'abondance fournit une estimation standardisée permettant la comparaison entre différentes localités.

Concernant les niveaux de densité des blaireaux, nous avons considéré les trois zones d'étude comme représentatives de la zone infectée en terme de paysage et d'intensité du piégeage. Or ce dernier élément est évolutif dans le temps et dans l'espace puisqu'une campagne de piégeage est mise en œuvre chaque année avec une pression de prélèvement variable selon les zones et les années. Pour cette évaluation, nous avons pris en compte les densités dans les zones non piégées, considérant ainsi le risque avec une densité « initiale » sans l'effet des mesures de lutte mises en place depuis.

La taille des domaines vitaux et les distances extrêmes parcourues reposent sur le suivi télémétrique de dix blaireaux et de onze sangliers sans qu'il soit possible de savoir si

ces individus étaient représentatifs de la population, et ce d'autant plus que nous avons souligné l'importance des variations interindividuelles dans le comportement (cf. chapitre2, partie 6). Nous avons cependant considéré que ces individus différaient du point de vue des caractéristiques intrinsèques comme le poids, le sexe, l'âge (donnée récoltée uniquement chez le sanglier avec une classification en adultes ou subadultes), l'habitat (plus ou moins forestier, représentant, pour les blaireaux, la variabilité paysagère rencontrée dans la zone infectée, et pour les sangliers, celle rencontrée dans la zone sud) et qu'ils ont été suivis à différentes périodes de l'année. Sachant que la variabilité des tailles de domaines vitaux est principalement liée à ces caractéristiques intrinsèques, environnementales et saisonnière (Broseth et al. 1997; Calenge et al. 2002; Kowalczyk et al. 2003b; Do Linh San et al. 2007; Saïd et al. 2011), et que ces populations partagent le même biotope, nous pouvons penser que, les valeurs extrêmes trouvées incluent celles de la majorité de la population de la zone infectée.

Concernant la vidéosurveillance, les sites n'ont pas été choisis au hasard. Nos résultats illustrent probablement des situations particulières mais permettant d'identifier des facteurs de risque de contacts avec la faune sauvage. De ce fait, les valeurs trouvées n'ont pas été utilisées comme des taux de contact avec les bovins mais comme des indicateurs de l'utilisation de points particuliers (auges, abreuvoir, pierre à sel, bâtiment) sur les pâtures et sur les bâtiments.

1.3. Rôle de la population de cerfs

Pour cette espèce, nous avons estimé la capacité d'excrétion d'élevée sur la base des lésions observées sur les cerfs trouvés infectés dans la zone d'étude, majoritairement multifocales et ouvertes (cf. chapitre 2 paragraphe 3.2), et sur la bibliographie.

Nous n'avons pas suivi de cerfs par télémétrie et ne pouvons donc pas fournir de distances extrêmes parcourues ni de tailles de domaine vital. Nous avons donc utilisé des données issues de la bibliographie. L'utilisation des pâtures est variable selon les milieux et il est difficile de déterminer un niveau de contact indirect avec les bovins à partir d'études réalisées dans d'autres régions. Notre évaluation est de ce fait moins précise que pour celle des sangliers et des blaireaux (Tableaux 47 et 48).

Le partage des souches de *M. bovis* entre cerfs et bovins au sein des mêmes zones atteste que la transmission interspécifique a bien eu lieu entre les deux espèces. Dans toutes les situations de communautés d'hôtes de *M. bovis* impliquant des bovins et des populations sauvages, les premiers sont reconnus comme ayant initialement transmis l'infection aux deuxièmes (ANSES 2011). Nous admettons donc également cette configuration en Côte d'Or.

Tableau 47 : résumé des paramètres et des comportements utilisés pour l'évaluation du rôle du cerf dans le système multi-hôtes de *M. bovis*. Tous les paramètres sont issus de l'étude expérimentale sauf indication faisant référence à la littérature (min et max : valeur minimale et maximale des données brutes ; µ : valeur moyenne).

	Niveau de prévalence % [IC95%]	**Indice de densité nb cerfs tirés / km^2 (IKa : nb cerfs/ km)**	**Capacité d'excrétion**	**Utilisation des infrastructures d'élevage I**	**Comportement spatial**	**Comportement social**
Zone nord	2003-2013 **0% [0-5,6%]**	De **0,01** à **0,06** entre 2001 à en 2013	Elevée par voie orale et nasale[a]	*Nombre de visites par nuit* **Min : 0 ; max : 2** **µ = 0,02** *Nombre d'individus par visite* **Min : 1 ; max : 5** **µ= 1,6** Durée des visites (min) **Min : 0,1 ; max : 292** **µ= 14 min**	**+/- sédentaire (domaines vitaux polynucléés)** Migration des jeunes mâles[b] *Taille domaines vitaux* [c] *(ha)* *Mâles* 1000 → 4000 *Femelles* : 400 → 2000 *Distances extrêmes :* 20 km[b,d]	- **Grégaire**, femelles et mâles vivent groupes séparés. - Rassemblement et dislocation de groupes selon les saisons[e]
Zone sud	**Min** (2003-04) **:** **0%** [0-3,3%] **Max** (2012-13) : **1,2%** [0,1-4,3%] 2003-2013 **0,5% [0-1,3%]** (cf. Figure 53)	De **1** (**0,9**) en 2001 à **0,4** (**0,3**) en 2008 puis **1,2** (**0,8**) en 2013; (cf. Figure 53)				

[a] Lugton et al. 1998; Johnson et al. 2008; Zanella, Duvauchelle, et al. 2008; Martín-Hernando et al. 2010
[b] Pépin et al. 2008
[c] Bruinderink et al. 2003
[d] Hamann et al. 1997 ; Klein & Hamann 1999
[e] Cluton Brock et al. 1982

Tableau 48 : évaluation qualitative pour le cerf du niveau de prévalence, de la capacité d'excrétion, du niveau de densité et du niveau de contact entre cerfs et bovins. Le score attribué au comportement spatial concerne le risque d'extension spatiale et le score attribué au comportement social concerne le risque de transmission intraspécifique

	prévalence	excrétion	densité	Contact	Comportement spatial	Comportement social
Zone nord	1-3	7-8	2-3	6-8*	7-8	5-6
Zone sud	2-3	7-8	6-7	4-6	7-8	5-6

* sur la base du paysage bocager dans cette zone entrainant une interface plus importante avec les bovins qu'en zone sud

- **Cerfs : hôtes réservoirs ou hôtes de liaison ?**

En zone nord, la prévalence bovine et l'importante surface de pâtures augmentant les aires de contact avec les bovins exposent davantage les cerfs à une contamination d'origine bovine que dans la zone sud, il n'est pas exclu que des individus soient infectés mais les résultats de la surveillance font état d'une prévalence minime (Tableau 47). De plus, le niveau de densité reflété par les tableaux de chasse paraît trop faible pour permettre l'entretien de la tuberculose au sein de la population de grands cervidés (cf. chapitre 2, paragraphe 5.1).

En zone sud, le niveau de densité est très supérieur à celui de la zone nord. Nous avons souligné dans la partie 5.1 du chapitre 2 que ce niveau de densité était comparable à celui de la forêt de Brotonne où le cerf est considéré comme un réservoir. Si nous comparons l'évolution de la densité (IKa) et de la prévalence entre la zone sud et la forêt de Brotonne la situation de la zone sud à la forêt de Brotonne (Figure 53), nous observons que malgré un niveau de densité comparable, il semble que le statut épidémiologique du cerf soit différent. En forêt de Brotonne, les niveaux de prévalence détectés lors de la première année de surveillance puis au cours de l'éradication de la population sont en faveur d'une situation enzootique chez le cerf alors qu'en vallée de l'Ouche et Hautes Côtes, le très faible niveau de prévalence détectée orienterait davantage vers une circulation sporadique de l'infection à *M. bovis*. La sensibilité de la population des cerfs de Côte d'Or semble pourtant comparable à celle de la forêt de Brotonne, avec des animaux présentant des lésions ouvertes et généralisées laissant supposer dans les deux cas une capacité d'excrétion élevée (Zanella, Duvauchelle, et al. 2008). Ce fut d'ailleurs l'un des critères pour considérer la population de cerfs de Brotonne comme un réservoir (Hars et al. 2010). Pour expliquer cette différence de statut épidémiologique du cerf entre la forêt de Brotonne et la Côte d'Or malgré un niveau d'abondance, une sensibilité et donc une capacité d'excrétion comparables, nous pouvons faire une première hypothèse sur l'ancienneté de l'infection dans la population. La contamination de la population de cerfs aurait été plus ancienne en Normandie qu'en Côte d'Or, laissant le temps à l'infection de se développer dans une population dense (au niveau de 2001, avant la mise en place de l'éradication de la population). Une deuxième explication possible, qui pourrait être complémentaire de la première, tiendrait dans la configuration particulière de la forêt de Brotonne, entourée par des barrières géographiques peu perméables

(autoroutes et boucles de la Seine) qui limitent les mouvements de la faune sauvage émigrante et immigrante dans ce massif, aboutissant à des populations quasiment « fermées » (Hars et al. 2010). En Côte d'Or, au contraire, le contexte géographique permet les échanges de populations entre différents massifs forestiers, ce qui, à l'inverse de la forêt de Brotonne, pourrait contribuer à « diluer » l'infection.

Dans les autres régions où les grands cervidés sont considérés comme des réservoirs de *M. bovis*, dans le sud de l'Espagne et dans le Michigan, les densités sont plus élevées (20 cerfs / km^2 et 19-23 cerfs / km^2 , respectivement) et il existe des facteurs climatiques et/ou cynégétiques entrainant un fort degré d'agrégation (Gortazar, Vicente, et al. 2011; Miller & Sweeney 2013), ce qui n'est pas le cas en Côte d'Or.

Il est difficile d'établir simplement quelle serait la densité seuil de persistance de la tuberculose dans la population de cerfs de Côte d'Or. *Des travaux de modélisation intégrant la dynamique de population et le niveau d'excrétion seraient un outil utile pour la détermination théorique de la taille critique de la population permettant l'entretien de l'infection* (Ward & Smith 2012; Zanella et al. 2012).

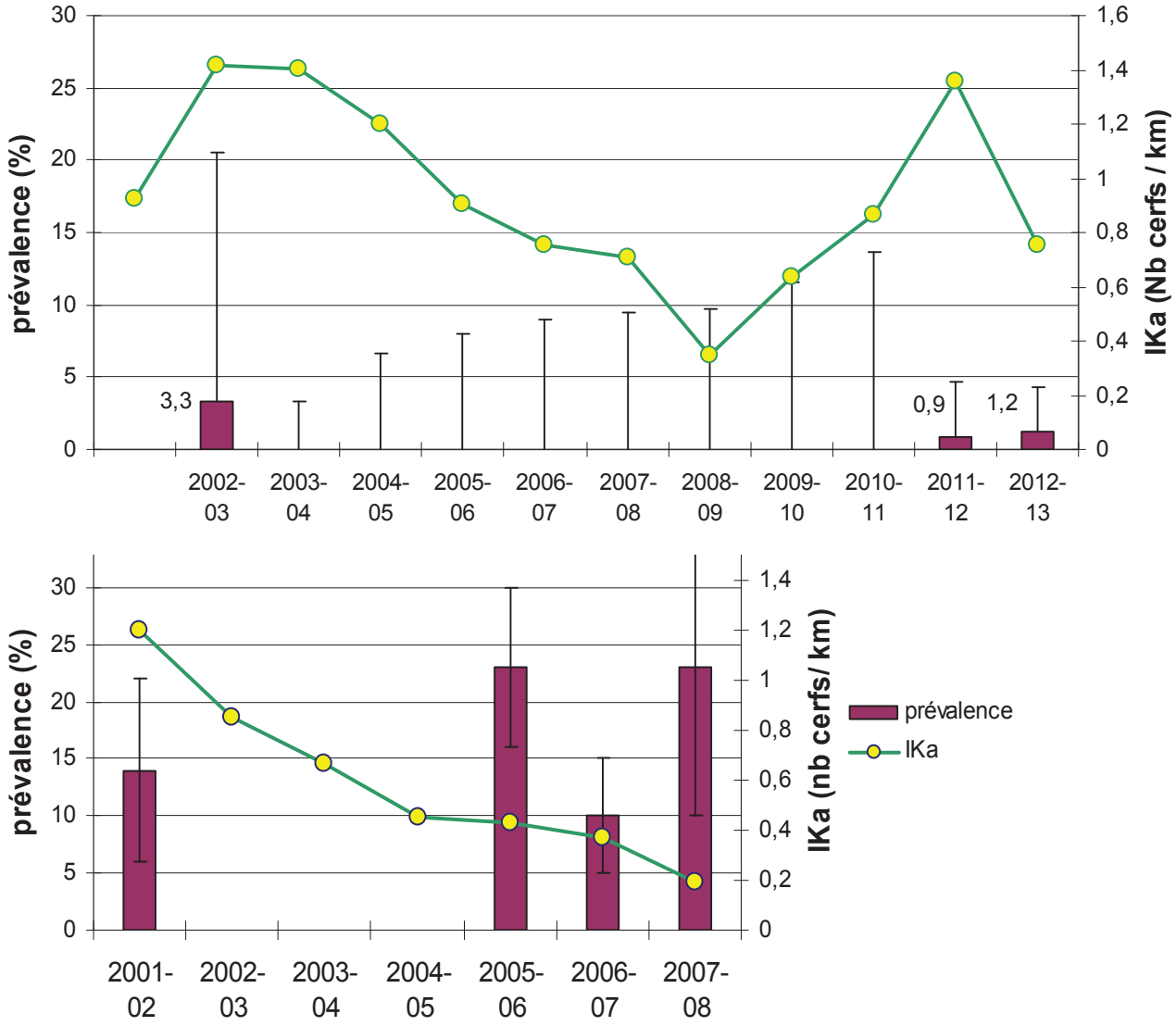


Figure 53 : évolution de l'indice kilométrique d'abondance (IKa) et de la prévalence apparente dans la zone sud de la Côte d'Or (en haut) et en forêt de Brotonne (en bas).

A ce jour, la population de cerfs de la partie sud de la zone infectée ne paraît donc pas constituer un hôte réservoir de la tuberculose bovine.

Qu'en est-il de son rôle potentiel d'hôte de liaison ?

Son comportement alimentaire l'expose moins que le sanglier à l'infection par *M. bovis* et l'espèce paraît également moins réceptive, comme en témoignent les niveaux de prévalence toujours plus faibles chez le cerf que chez le sanglier quand les deux espèces sont sympatriques et donc exposées à la même pression d'infection (Nugent et al. 2002; Zanella, Durand, et al. 2008; Hars et al. 2010; Vicente et al. 2013). En revanche, son régime alimentaire herbivore et son appétence pour le sel en été, que nous avons constatée à l'issue de l'étude de vidéosurveillance (cf. chapitre 2 paragraphe 6.2) l'exposent à des contacts

indirects avec les bovins et donc à une infection potentielle de *M. bovis* via l'utilisation des pâtures. En l'absence de données quantitatives sur l'utilisation des pâtures, il est difficile d'évaluer précisément quel est l'ampleur de ces interactions. *Une étude similaire à celle conduite sur le sanglier et le blaireau permettrait de mieux apprécier ce niveau de contact indirect avec les bovins.* Le partage d'habitats forestiers et de ressources avec les sangliers et les blaireaux peuvent également être l'occasion de transmission interspécifique.

Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre 1, la structure démographique et sociale de la population influence la dynamique de l'infection (Lloyd-Smith, Cross, et al. 2005; Vicente et al. 2013). Chez le cerf, le renouvellement de la population est beaucoup moins rapide que pour le sanglier, l'afflux d'individus sains est donc moins important, ce qui est moins propice au développement et à la persistance de la maladie (Lloyd-Smith, Cross, et al. 2005; Vicente et al. 2013). Cependant, du fait de sa longévité (durée de vie estimé à 15 ans), les cerfs peuvent aussi être considérés comme des vecteurs temporels (permettant l'extension de l'infection dans le temps, cf. chapitre1) de l'infection (Nugent 2011) et leur durée d'exposition est longue ce qui augmente la probabilité qu'ils s'infectent.

Le comportement social grégaire avec des regroupements saisonniers de plusieurs groupes (Cluton-Clock et al. 1982), pouvant mettre en contact quelques individus infectés et excréteurs avec un grand nombre d'individus sains est en revanche favorable à un fort taux de transmission intraspécifique (Blanchong et al. 2007; Conner et al. 2008; Lloyd-Smith, Cross, et al. 2005).

En outre, du fait de leur grande sensibilité à l'infection et de la charge bacillaire élevée se trouvant dans leurs tissus lésés (Johnson et al. 2008; Martín-Hernando et al. 2010), les cerfs peuvent propager très efficacement *M. bovis* dans l'environnement. Les carcasses infectées peuvent également être très contaminantes pour les espèces nécrophages réceptives comme le sanglier et le renard, une seule carcasse pouvant contaminer plusieurs dizaines d'individus (Zanella, Duvauchelle, et al. 2008; Johnson et al. 2008; Nugent 2011; Zanella et al. 2012).

Le cerf en Côte d'Or apparait donc plutôt comme un hôte de liaison, à l'instar d'autres systèmes multi-hôtes en Angleterre et en Nouvelle-Zélande (Delahay et al. 2007; Ward et al. 2009; Nugent 2011;). Ce rôle d'hôte de liaison pourrait être important même lorsque la densité d'animaux infectés est faible du fait de sa capacité à amplifier l'infection.

- **Rôle des cerfs dans la transmission-retour de la tuberculose bovine aux bovins**

Pour évaluer le rôle du cerf dans la transmission-retour de la tuberculose bovine aux bovins, nous disposons de données expérimentales moins complètes que pour les blaireaux et les sangliers. L'absence de suivi télémétrique sur cette espèce ne nous permet pas d'estimer le niveau d'utilisation des pâtures, nous fondons donc cette évaluation sur les résultats de la vidéosurveillance et sur la bibliographie.

Les herbacés constituent une part importante du régime alimentaire des cerfs. Les pâtures représentent des zones d'alimentation nocturnes et sont sélectionnées surtout au printemps et en été et chez les femelles (Licoppe & Crombrugghe 2003; Godvik et al. 2009; Lande et al. 2013).

Nous avons également constaté une fréquentation plus forte au printemps-été sur les points d'alimentation et d'abreuvement sur les pâtures, quoique moins élevée que pour les sangliers et les blaireaux (cf. chapitre 2 partie 6.2). Les biches sont apparues particulièrement attirées par les pierres à sel à cette période, ce qui pourrait s'expliquer par un besoin accru de minéraux pendant la lactation (Atwood & Weeks 2003) Nous avons également observé des cerfs buvant dans des abreuvoirs. La durée moyenne des visites de 14 minutes avec un maximum observé de 292 minutes témoigne du fait que les cervidés peuvent faire des visites prolongées sur les pâtures. Etant donnée la forte capacité d'excrétion de *M. bovis* des cerfs, le risque pour un individu infecté de contaminer l'herbe, la pierre à sel et l'eau apparaît assez élevée. Les périodes de forte fréquentation des pâtures coïncident avec la période où les bovins s'y trouvent ce qui augmente ainsi le risque de transmission indirecte avec les bovins. Du fait de la faible prévalence détecté à ce jour, ce risque reste cependant limité. Trois des quatre cerfs trouvés positifs ces deux dernières années provenaient des Hautes Côtes, où la densité de bovins est faible par rapport à la vallée de l'Ouche et surtout à la zone nord. Cependant, il existe un continuum forestier entre les Hautes Côtes et vallée de l'Ouche et la distance entre ces deux secteurs est facilement parcourue par les cerfs. **Dans la zone sud, le risque de transmission-retour aux bovins par les cerfs nous semble donc faible mais non négligeable. En revanche, dans la zone nord, ce risque apparait minime étant donné le niveau de densité et de prévalence de la population.**

A titre de comparaison, une évaluation quantitative relative du risque (le risque posé par le blaireau étant pris comme référence) d'exposition à *M. bovis* par les cervidés aux bovins en Angleterre a résulté en un risque relatif médian de 0,16 pour le cerf élaphe (intervalle 95% : 0,01-2,58) dans un contexte de densité élevée de la population (3 à 14 cerfs/km^2) et une prévalence faible (1% environ), les auteurs concluant que la pression d'infection exercée par les cervidés sur les bovins sur les pâture étaient plus basse que celle exercée par les blaireaux (Ward et al. 2009).

- **Rôle des cerfs dans l'extension géographique de la tuberculose bovine**

En l'absence de données expérimentales sur les déplacements des cerfs sur notre site d'étude, nous fondons notre discussion sur des données bibliographique.

L'occupation de l'espace est différente entre les deux sexes : les femelles ont un domaine vital continu tandis que les mâles ont différents territoires disjoints (trois en général : domaine de printemps, domaine de rut et domaine d'hiver) qu'ils occupent à des périodes différentes de l'année (Hamann et al. 1997; Klein & Hamann 1999; Pépin et al. 2008). Par conséquent, les domaines vitaux des mâles sont plus étendus que ceux des femelles

et peuvent atteindre plusieurs milliers d'hectares (Klein & Hamann 1999). Les distances parcourues entre les domaines saisonniers varient selon les études entre 3 et 20 km (Hamann et al. 1997; Klein & Hamann 1999; Pépin et al. 2008) (Tableau 47). Sur cette base, nous pouvons supposer que les cerfs pourraient étendre l'infection sur une distance maximum de 20 km et une surface de plusieurs milliers d'hectares mais *ces mouvements étant dépendants des ressources du milieu et des zones de protection, un suivi télémétrique d'individus dans la zone d'étude permettrait de confirmer ou d'infirmer ces valeurs*. Le comportement spatial des mâles adultes se double d'un comportement social qui les amène à se regrouper entre eux et à connecter plusieurs hardes de biches au moment du rut, représentant donc un classe à risque de propagation de l'infection plus élevé que les femelles (Conner et al. 2008). Avant de se sédentariser, les jeunes mâles adoptent un comportement erratique, certains quittant totalement leur unité familiale et émigrent. Cette grande mobilité apparente peut durer deux à trois ans avant les prémices de leur sédentarisation vers l'âge de quatre à cinq ans (Hamann et al. 1997; Pépin et al. 2008). Ce comportement favoriserait une extension géographique plus importante par cette catégorie d'animaux. Même si les cerfs les plus âgés ont plus de probabilité d'être infectés (Martín-Hernando et al. 2010), nous pouvons noter que parmi les 4 cerfs trouvés infectés entre 2011 et 2012, deux avaient moins de 2 ans. Les individus les plus atteints qui sont les plus excréteurs ont probablement des déplacements restreints du fait de leur mauvais état général, cependant, **il semble que le cerf soit un hôte particulièrement enclin à propager la tuberculose sur plusieurs dizaines de kilomètres.**

En conclusion, essentiellement sur la base des niveaux de prévalence et d'abondance connus en Côte d'Or complétés par des données bibliographiques, nous considérons le cerf comme un hôte de liaison. Dans le système multi-hôtes de la partie nord de la zone infectée, ce rôle est probablement mineur, du fait de la très faible densité associée à une faible prévalence dans cette population.

Dans la partie sud, malgré un faible niveau d'infection, le cerf pourrait avoir un rôle non négligeable du fait de sa capacité d'excrétion conduisant à un rôle d'hôte amplificateur de l'infection pour les autres espèces réceptives de la communauté d'hôtes sauvages, notamment les espèces nécrophages. Nous avons évalué le risque de transmission-retour aux bovins relativement peu élevé pour la zone sud mais cette évaluation reste néanmoins assez spéculative du fait du manque de données sur le niveau de contact entre cerfs et bovins sur le site d'étude. Enfin, le cerf pourrait propager l'infection sur plusieurs dizaines de kilomètres mais ce risque demeure faible compte-tenu du faible niveau de prévalence détecté jusqu'à présent.

1.4. Rôle de la population de sangliers

L'ensemble des paramètres estimés figure dans le tableau 49 et l'évaluation qualitative figure dans le tableau 50.

Nous avons constaté une proximité spatiale et un partage des souches entre bovins et sangliers infectés, à l'exception d'un cas en 2013 (cf. chapitre 2 paragraphe 3.3). Nous admettons donc, comme chez le cerf, que les bovins ont initialement infecté la population de sangliers sans pouvoir dater à quand remonte cette contamination et l'émergence de la tuberculose dans cette population.

Tableau 49 : résumé des paramètres et des comportements utilisés pour l'évaluation du rôle du sanglier dans le système multi-hôtes de *M. bovis*. Tous les paramètres sont issus de l'étude expérimentale sauf indication faisant référence à la littérature (min et max : valeur minimale et maximale des données brutes ; µ : valeur moyenne).

	Niveau de prévalence % [IC95%]	**Capacité d'excrétion**	**Indice de densité (sangliers tirés / km²)**	**Utilisation des pâtures** surface de pâture dans le DV mensuel (ha):	**Utilisation des infrastructures d'élevage**	**Comportement spatial**	**Comportement social**
Zone nord	**Min** (2006-07) : **0%** [0-18,5%] **Max** (2007-08) : **5,9%** [0,7-19,7%] **2003-2013** : **4,0%** [2,4-6,1%]	**Modérée** par voie orale et nasale Excrétion fécale rare[a]	**0,4** → **1,7** entre 2005 et 2013	Prédiction du modèle (en été pour un sanglier ayant 70%de pâture disponible) **> 229**[c]	*Nombre de visites par nuit* **Min : 0 ; max : 1,9 µ= 0,05** *Nombre d'individus par visite* **Min : 1 ; max : 28 µ= 5,2** Durée des visites (min) **Min : 0,3 ; max :330 µ= 15**	**Sédentaire**. **Mâle > femelle** Déplacements plus importants en période de chasse *Taille : MCP100% (ha)*: *Mâles* : **Min : 1041 ; max : 5523 µ= 3323** *Femelles :* **Min :537 max : 3858 µ= 1684** *Distances maximales* (km): *Mâles* : **15** *Femelles* : **9**	- **Grégaire**, femelles, jeunes et subadultes vivent en compagnie de **taille moyenne 8**[d] - Les mâles adultes sont solitaires - interactions sociales intragroupes : +++ - Interactions sociales intergroupes :+
Zone sud	**Min** (2006-07) : **0%** [0-10.0%] **Max** (2008-09) : **15,3%** [9.2-23.4%] **2003-2013** : **7,1%** [5,4-9,2%] (cf. figure 54)		**1,3** → **3,5** entre 2005 et 2013 (en augmentation) (cf. figure 54)	Prédiction du modèle (en été pour un sanglier ayant 31.5%[b] de pâture disponible) **38**			

[a] Martín-Hernando et al. 2007
[b] disponibilité moyenne calculée pour les 11 individus suivis
[c] valeur correspondant à un sanglier ayant 54% de pâture disponible, soit la disponibilité maximale des sangliers suivis en zone sud puisqu'aucun sanglier n'a été suivi en zone nord
[d] donnée issue de la vidéosurveillance

Tableau 50 : évaluation qualitative pour le sanglier du niveau de prévalence, de la capacité d'excrétion, du niveau de densité et du niveau de contact entre sangliers et bovins. Le score attribué au comportement spatial concerne le risque d'extension spatiale et le score attribué au comportement social concerne le risque de transmission intraspécifique

	prévalence	excrétion	densité	Contact avec bovins*	Comportement spatial	Comportement social
Zone nord	3-4	3-4	4-5	7-8	6-7	6-7
Zone sud	4-5	3-4	7-8	4-6	6-7	6-7

* prenant en compte l'utilisation des pâtures et l'utilisation des infrastructures d'élevage

- **Sanglier : hôte de liaison ou hôte réservoir ?**

Afin d'évaluer si la population de sangliers est capable d'entretenir l'infection ou si une source extérieure est nécessaire, nous avons comparé la situation de la Côte d'Or à la seule situation connue où le sanglier est reconnu comme un réservoir de *M. bovis*. Dans le sud et l'ouest de l'Espagne, le sanglier est en effet capable d'entretenir l'infection de façon autonome, en l'absence de source de contamination extérieure, notamment bovine. Ce statut a été établi sur la base de prévalences très élevées (42% en moyenne), de la forte proportion de tuberculose généralisée (60%), laissant supposer une excrétion importante, et sur la circulation autonome de souches de *M. bovis* sans association spatiale récente avec les bovins (Gortazar et al. 2005; Vicente et al. 2006; Martín-Hernando et al. 2007; Naranjo et al. 2008; Gortazar, Vicente, et al. 2011). De nombreuses études ont montré que les points d'agrégation constitués par les points d'eau naturels ou artificiels et les points d'alimentation constituaient des facteurs de risque majeurs conduisant aux fortes prévalences infectieuses et lésionnelles observées dans cette région. La présence de ces facteurs est liée aux pratiques cynégétiques et au climat très aride de cette région favorisant les rassemblements autour des quelques ressources disponibles (Vicente et al. 2007; Boadella et al. 2011b; Vicente et al. 2013). Les fortes densités (jusqu'à 90 sangliers /km^2) sont également associées au statut tuberculeux des sangliers et la réduction des densités diminue la prévalence notablement (Boadella et al. 2012). Cette situation contraste avec celle des régions atlantiques (Asturies et Galice) où la prévalence de mycobactéries du complexe *tuberculosis* a été estimée à 2,6% et la proportion de sangliers à lésion généralisée à 17%. Les densités y sont beaucoup plus faibles et le climat océanique ainsi que la gestion cynégétique ne produisent pas les facteurs d'agrégation tels que ceux rencontrés dans les régions méditerranéennes. Dans ce contexte, le sanglier n'est pas considéré comme un réservoir (Munoz-Mendoza et al. 2013).

A la lumière de la situation espagnole, les deux principales conditions d'entretien autonome de la tuberculose dans les populations de sanglier semblent donc être un taux de contact intraspécifique très élevé engendré par une forte agrégation, associé à une très forte densité d'animaux très excréteurs.

En Côte d'Or, en dehors de quelques parcs de chasse, les sangliers ne sont pas parqués et circulent entre les massifs forestiers. L'agrainage est interdit depuis 2011, il a donc

pu constituer un facteur d'agrégation avant cette date mais sans doute à un moindre degré qu'en Espagne car le milieu de la Côte d'Or est beaucoup plus riche (présence de fruits forestiers et de cultures). Le climat est relativement humide (900 mm de précipitations par an). Les facteurs environnementaux et cynégétiques responsables du fort degré d'agrégation dans le sud de l'Espagne ne sont donc pas réunis en Côte d'Or. Le suivi de certains points d'alimentation et d'abreuvement sur les pâtures a néanmoins montré que plusieurs compagnies peuvent s'y succéder au cours d'une même nuit. Le degré d'agrégation augmente probablement lorsque les ressources naturelles sont plus rares, il est donc variable en fonction des saisons et des conditions climatiques. Ces points d'alimentation et ces points d'eau naturels et artificiels peuvent alors, dans une moindre mesure qu'en Espagne, constituer temporairement des facteurs d'agrégation.

Nous avons qualifié la capacité d'excrétion des sangliers infectés de Côte d'Or de modérée (cf. Tableaux 49 et 50), alors que sur les mêmes critères, celle de la population du sud de l'Espagne serait qualifiée d'élevée à très élevée.

Concernant la densité, nous ne disposons que d'indicateurs fondés sur les tableaux de chasse. Nous avons vu que la traduction de cet indice en densité réelle était périlleuse et que cela rendait difficile la comparaison avec d'autre régions. *L'utilisation d'indicateurs de densité indépendants des pratiques cynégétiques serait nécessaire pour une meilleure évaluation du risque.* Cependant, malgré ces limites, le niveau de densité de Côte d'Or est assurément plus faible que celui du sud de l'Espagne et la densité de la zone sud apparaît assez proche de celui de la forêt de Brotonne avant la réduction des densités (cf. chapitre 2, paragraphe 5.1). Par conséquent, ce niveau de densité apparaît peu favorable au maintien de la tuberculose par les sangliers de Côte d'Or et cela d'autant plus dans la zone nord que dans la zone sud étant donné le différentiel de densité observé entre ces deux zones (cf. Tableaux 49 et 50).

Dans ces conditions et par comparaison, il est très peu probable que la tuberculose se développe et persiste dans la population des sangliers de Côte d'Or avec la même ampleur que dans le sud de l'Espagne.

Nous pouvons alors nous poser la question de savoir si la population de sangliers de la zone infectée est apte à faire persister la tuberculose, même à un niveau de prévalence plus faible qu'en Espagne, ou si son rôle se limiterait à celui d'un d'hôte de liaison.

Le premier déterminant de ces deux possibilités est la démographie. Dans une population homogène, la tuberculose bovine est une maladie densité-dépendante et des travaux empiriques ou théoriques ont montré l'effet de la densité sur la persistance de *M. bovis* dans des populations d'ongulés sauvages (Ward & Smith 2012; Boadella et al. 2012; Vicente et al. 2013). Il est cependant difficile de déterminer une valeur seuil en dessous de laquelle l'infection ne peut persister, d'une part à cause de la structure spatiale et

démographique hétérogène de la population et d'autre part à cause de la variabilité du taux de transmission liée à la chronicité de la tuberculose et à des états excréteurs transitoires (Lloyd-Smith, Cross, et al. 2005; Vicente et al. 2013). En Espagne, les jeunes et les subadultes, représentent la catégorie la plus sensible dans la population de sangliers et donc potentiellement la plus excrétrice (Martín-Hernando et al. 2007), ce qui influence la dynamique de l'infection, ces individus contribuant de façon exacerbée à la transmission de la maladie (Lloyd-Smith, Schreiber, et al. 2005; Boadella et al. 2012) Ce constat serait à confirmer pour la population de la Côte d'Or. En outre, la chasse et la forte prolificité de l'espèce entrainent un renouvellement rapide de la population, qui pour un R_0 et une taille de population donnés, favorise la persistance de l'infection (Lloyd-Smith, Cross, et al. 2005).

Nous ne pouvons donc pas établir simplement quelle serait la densité seuil de persistance de la tuberculose dans la population de sangliers de Côte d'Or. *Des travaux de modélisation intégrant la dynamique de population et le niveau d'excrétion seraient un outil utile pour la détermination théorique de la taille critique de la population permettant l'entretien de l'infection* (Ward & Smith 2012; Zanella et al. 2012).

Si nous mettons en perspective les résultats des niveaux d'infection et les niveaux de densité basés sur les tableaux de chasse en zone sud, nous constatons une tendance à la coévolution de l'indice de densité et de la prévalence (Figure 54). D'autre part, au niveau spatial, nous avons rapporté une plus forte prévalence en zone sud qu'en zone nord, et une tendance similaire pour la densité (cf. Tableaux 49 et 50). Pourtant, nous supposons une exposition plus importante des sangliers à l'infection en zone nord (prévalence plus élevée chez les bovins et les blaireaux). Ces observations laissent supposer un rôle important de la densité, cependant, *une analyse intégrant différentes variables environnementales, démographiques et épidémiologiques (type de paysage, densité, prévalence chez les bovins et les blaireaux) ainsi que l'âge et le sexe des animaux serait nécessaire pour mieux comprendre les facteurs de risque d'infection chez le sanglier.*

Nous pouvons également supposer que, comme pour les blaireaux, il existe une hétérogénéité de la distribution de l'infection liée au comportement social (Gortazar, Torres, et al. 2011). *Il serait intéressant de mesurer les variations de la prévalence entre groupes, dans le but de déterminer si certains groupes tiennent un rôle plus important que d'autres dans l'occurrence et potentiellement dans la persistance de l'infection, et identifier les facteurs de risque liés à ces groupes.* Nous pouvons néanmoins nous attendre à une agrégation moins marquée de l'infection que dans le cas du blaireau car les sangliers se montrent moins stables géographiquement et nous avons pu constater à l'issue du suivi télémétrique de onze individus provenant de groupes différents que leurs domaines vitaux se chevauchaient largement (cf. chapitre 2 paragraphe 6.1). De plus, leur milieu de vie, contrairement au terrier des blaireaux n'est pas particulièrement propice à la persistance de la bactérie par rapport à d'autres milieux.

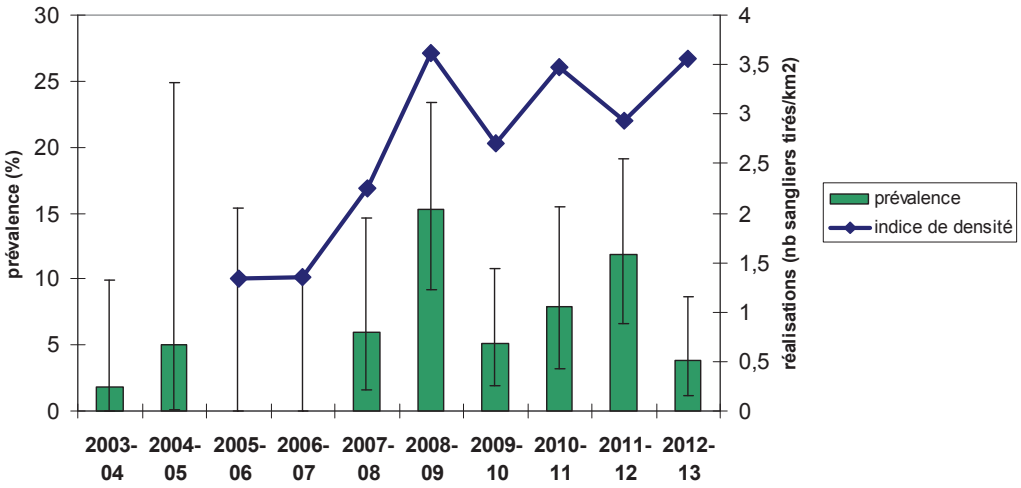


Figure 54 : évolution de la prévalence apparente et de l'indice de densité (nombre de réalisations par km^2) en zone sud entre 2003 et 2013.

Le deuxième déterminant que nous proposons d'étudier pour évaluer la capacité du sanglier à entretenir ou à juste transmettre *M. bovis* est son exposition et sa réceptivité.

Le comportement alimentaire nécrophage et l'habitude du sanglier à fouiller le sol l'expose particulièrement à l'infection par *M. bovis*. Ainsi, en Nouvelle-Zélande, les sangliers sont utilisés comme des sentinelles de la présence de *M. bovis*, la prévalence atteignant rapidement (en l'espace de 2 à 15 mois à partir de sangliers introduits indemnes) 100% dans les zones d'enzootie sans qu'ils ne soient capables pour autant d'entretenir l'infection en l'absence d'autres hôtes comme les bovins ou les phalangers-renards (Nugent et al. 2002; Nugent 2011). En forêt de Brotonne, avant que des mesures de gestion ne soient mises en œuvre, la prévalence chez le sanglier avait atteint 42% (Zanella, Durand, et al. 2008). Dans ce cas, les cerfs infectés présents en forte densité dans cette forêt ont été considérés comme source de contamination pour les sangliers (Zanella, Durand, et al. 2008; Hars et al. 2010; Zanella et al. 2012). L'élimination de la population de cerfs a effectivement été suivie d'une baisse de la prévalence chez le sanglier jusqu'à un niveau inférieur à 1% (Hars et al. 2010; ANSES 2011). Cependant, une diminution de la densité de sangliers a également été mise en œuvre et il est délicat de savoir quelle part relative chacune de ces mesures a eu dans la baisse de la prévalence constatée chez le sanglier. Ces exemples montrent que le sanglier est très exposé par son comportement fouisseur et nécrophage et qu'il est également très réceptif à *M. bovis*. Ainsi, le niveau de prévalence peut refléter un niveau d'exposition sans forcément signifier un risque d'entretien de l'infection. Ceci pourrait s'expliquer par une capacité d'excrétion modérée et donc à faible aptitude à transmettre la bactérie entre congénères.

En Côte d'Or, les bovins peuvent constituer des sources de contamination pour le sanglier. Etant donnée la réceptivité de cette espèce, nos résultats sur les niveaux de contacts avec les pâtures et l'attractivité des infrastructures d'élevage en zone d'infection bovine, la contamination des sangliers à partir des bovins, de façon récurrente, est probable en Côte d'Or. D'autres sources de contamination sont également possibles : les sangliers partagent ressources et habitat avec les populations de blaireaux et de cerfs. Ils peuvent donc s'infecter par contact indirect avec ces hôtes sauvages. Espèce nécrophage, le sanglier peut également consommer des carcasses infectées. Ce comportement peut conduire à des transmissions multiples puisqu'une seule carcasse peut être consommée par toute une compagnie, voire plusieurs (Gortázar et al. 2008; Zanella et al. 2012).

En conclusion, nous faisons l'hypothèse que la population de sangliers de Côte d'Or serait davantage un hôte de liaison qu'un hôte réservoir et que le niveau de prévalence observée reflèterait à la fois le niveau d'exposition à des sources extérieures constituée par les autres populations infectées (domestiques et sauvages) ainsi que le niveau de densité. D'autres études sont nécessaires pour confirmer ces associations et déterminer la taille de population critique pouvant conduire à une constitution de réservoir dans cette population.

- **Rôle des sangliers dans la transmission-retour aux bovins**

Le niveau de contact entre sangliers et bovins est potentiellement élevé notamment dans la zone nord (cf. Tableau 49). Comme en attestent nos résultats et ceux de la bibliographie (Baubet & Brandt 2009), les pâtures sont utilisées pour la recherche de lombrics et dans ce but, les sangliers vermillent en fouillant le sol avec leur groin. Or chez le sanglier, les aérosols sont considérés comme contenant la charge bacillaire la plus élevée, même en l'absence de lésions pulmonaires visibles (Martín-Hernando et al. 2007; Zanella et al. 2008), le vermillage apparaît donc comme une activité à risque pour la contamination du sol des pâtures et donc la transmission indirecte aux bovins.

Sur les points d'alimentation et d'abreuvement, nous avons également constaté que le fouissage était un comportement très fréquent (cf. chapitre 2 paragraphe 6.2), engendrant le même risque d'excrétion par aérosols que le vermillage. Les sangliers viennent également consommer et s'abreuver, ce qui est propice à une excrétion par les voies orales et respiratoires que nous avons mises en évidence (cf. chapitre 2 paragraphe 4). De plus, contrairement au blaireau qui est le plus souvent solitaire dans sa recherche de nourriture, les membres d'une même compagnie restent ensemble pendant leur phase de repos comme dans leur phase active. Nous avons observé des tailles de groupes de 8 individus en moyenne sur les points d'alimentation et d'abreuvement (cf. Tableau 49). Nous pouvons donc considérer que l'intensité des contacts que nous avons trouvée avec le suivi télémétrique des laies équipées de collier correspond à celle de toute une compagnie. Le risque de contamination des pâtures est donc amplifié par ce comportement grégaire. Sur les points suivis par

vidéosurveillance, nous avons également constaté que la durée des visites était plus relativement longue (15 minutes, durée comparable à celle observée pour les cerfs et 5 fois plus longues, en moyenne, que celle des blaireaux), ce qui augmente le temps de contact avec ces infrastructures d'élevage largement utilisées par les bovins.

Il apparaît donc qu'en prenant l'ensemble de ces facteurs en compte, le taux de contact indirects entre sangliers et bovins peut être considéré comme relativement élevé (Tableau 50). En outre, la nature de ces contacts est propice à une excrétion de *M. bovis* dans l'environnement des pâtures. Cependant, le risque de contamination environnementale est modulé par la capacité considérée comme modérée d'excrétion de la population de sangliers (Tableau 50).

La transmission de *M. bovis* aux bovins à partir de substrat contaminé par les sangliers dépend également de la durée de survie de bactéries viables dans l'environnement. Lorsqu'ils fouillent le sol, les sangliers retournent la terre et *M. bovis* peut être excrété dans la terre où différentes études ont évalué un temps de survie maximal de 88 jours dans le Michigan à plus de 6 mois en Nouvelle-Zélande (Jackson et al. 1995; Fine et al. 2011). Les points d'eau et les abreuvoirs étant les infrastructures d'élevage les plus visités par les sangliers, ils peuvent potentiellement excréter *M. bovis* dans l'eau qui est ensuite bue par les bovins. Dans l'eau, la durée maximale de survie de *M. bovis* a été estimée dans le Michigan à 58 jours (Fine et al. 2011). Ces durées de survie sont issues d'études mises en œuvre dans des biotopes différents de celui de la Côte d'Or. *Afin d'évaluer correctement le risque de transmission aux bovins, il serait nécessaire de connaitre la durée de survie de M. bovis dans l'environnement typique de la Côte d'Or.*

- **Rôle des sangliers dans l'extension géographique de la tuberculose bovine**

Nos résultats expérimentaux issus du suivi télémétrique ont montré que la taille des domaines vitaux mesurés par le polygone convexe minimum prenant en compte 100% des localisations pouvait varier d'un facteur 10, entre 537 et 5523 ha (cf. Tableau 49). Ces valeurs représentent les surfaces les plus importantes qui peuvent être couvertes par un individu. A l'intérieur de ces domaines, la distance la plus grande parcourue que nous avons mesurée est de 15 km pour les mâles et de 9 km chez les femelles (cf. Tableau 49), la période de suivi de ces deux animaux incluant la période de chasse. De façon concordante avec la littérature, les mâles ont tendance à avoir des domaines plus étendus que les femelles (Calenge et al. 2002; Saïd et al. 2011). La période de l'année et notamment la période de chasse est également un facteur influant la taille des domaines car les sangliers augmentent leur déplacement en réponse à ce dérangement (Calenge et al. 2002; Saïd et al. 2011), ce que nous avons également constaté chez certains individus suivis (résultats non montrés). Ainsi, au regard de nos résultats, les sangliers mâles seraient capables de déplacer l'infection sur une surface de plus de 50 km^2 et sur une distance de 15 km tandis que les femelles pourraient véhiculer la tuberculose sur une surface de 39 km^2 et une distance maximale de 9 km. La distinction entre

mâles et femelles est importante d'un point de vue épidémiologique étant donnée la différence de comportement social et spatial entre les sexes. Les laies vivent en compagnies matriarcales avec les jeunes de l'année et leur déplacement correspond à celui de la compagnie entière (Mauget 1982). Ainsi elles peuvent déplacer l'infection sur des distances et des surfaces plus faibles que les mâles mais le risque est amplifié par le nombre d'individus infectés au sein de la compagnie. Les mâles peuvent étendre l'infection sur de plus grandes distances, mais le risque reste celui lié à un individu. Lors de la reproduction, ils se déplacent entre compagnies à la recherche de femelles à saillir (Mauget 1982) et peuvent, dans ces conditions, rentrer en contact épidémiologique avec différents groupes.

Le sanglier serait donc capable de véhiculer l'infection sur plus de 10 km mais cette extension spatiale n'implique pas forcément une propagation de l'infection, étant donné la capacité d'excrétion considérée comme modérée de cette population.

L'étude de la distribution spatiale de l'infection chez le sanglier en Côte d'Or est difficile en raison des différences d'échantillonnage entre sites. La découverte en 2012-2013 d'un sanglier abattu en vallée de l'Ouche infecté avec la souche SB0120, circulant dans la zone nord, pourrait être une démonstration de l'aptitude du sanglier à véhiculer l'infection. La détection récente (2013-2014) de nouveaux cas porteurs de cette souche dans le secteur des Hautes Côtes (résultats non montrés) témoignerait d'une propagation effective de l'infection par les sangliers sur plusieurs dizaines de kilomètres, en l'absence de foyers bovins avec ce spoligotype à proximité. *Une surveillance ciblée pourrait être mise en œuvre pour mieux comprendre comment cette souche s'est propagée (dispersion d'individus ou transmission de proches en proches).*

Les caractéristiques du paysage sont également un facteur à prendre en compte dans le risque d'extension spatiale par les sangliers. La présence d'un continuum forestier comme c'est le cas entre la vallée de l'Ouche et les Hautes Côtes est favorable à la circulation des animaux et donc à l'extension de l'infection. Au contraire, des barrières géographiques comme les autoroutes (par exemple les autoroutes A6 et A38 longeant la vallée de l'Ouche à l'ouest et au nord) limitent probablement cette extension.

En conclusion, les données actuelles tendent à orienter le rôle de la population de sangliers de Côte d'Or plutôt vers un rôle d'hôte de liaison qu'un réservoir de la tuberculose bovine. Les facteurs de risque d'infection des sangliers doivent être explorés afin de mieux évaluer quels sont les principaux déterminants du niveau de prévalence pouvant éventuellement rendre la population plus apte à entretenir l'infection. Malgré une capacité modérée d'excrétion du bacille, la transmission-retour aux bovins est possible étant donné le taux de contact indirect potentiellement élevé avec entre ces deux populations. Enfin, le sanglier semble capable de propager l'infection sur des distances de plusieurs dizaines de kilomètres.

1.5. Rôle de la population de blaireaux

L'ensemble des paramètres estimés figurent dans le tableau 51 et leur évaluation qualitative dans le tableau 52.

Le partage des souches de *M. bovis* entre blaireaux et bovins au sein des mêmes zones atteste que la transmission interspécifique a bien eu lieu entre les deux espèces. Comme pour le cerf et le sanglier, nous admettons donc que les bovins ont initialement infectés les blaireaux. Il est difficile de savoir à quand remonte l'émergence de la tuberculose dans la population de blaireaux car nous ne disposons que de données à partir de 2009. Avant cette date, quelques animaux avaient été analysés mais l'absence de cas positifs détectés ne signifiait pas l'absence de cas étant donné la très faible pression de surveillance mise en œuvre alors.

Tableau 51 : résumé des paramètres et des comportements utilisés pour l'évaluation du rôle du blaireau dans le système multi-hôtes de *M. bovis*. Tous les paramètres sont issus de l'étude expérimentale sauf indication faisant référence à la littérature (min et max : valeur minimale et maximale des données brutes ; µ : valeur moyenne).

	Niveau de prévalence % [IC95%]	**Capacité d'excrétion**	**Niveau de densité[b] (blaireaux adultes / km²)**	**Utilisation des pâtures [c]** surface de pâture dans le DV mensuel (ha)	**Utilisation des infrastructures d'élevage**	**Comportement spatial**	**Comportement social**
Zone nord	**Min** (2012) : **4,4%** [1,9-8,5%] **Max** (2013**)** : **11,8%** [7,5-17,2%] **2009-2013** **8.4%** [6,7-10,5%]]	Elevée voies respiratoire, orale, urinaire, fécale et transcutanée (pus de blessure)[a]	3→9	Prédiction du modèle (au printemps pour un blaireau vivant en bord de pâture) : **40**	*Nombre de visites par nuit* **Min : 0 ; max : 0,6 µ=0,016** *Nombre d'individus par visite* **1 indiv / visite** *Durée des visites* **Min : 1 ; max : 34 min / visite µ= 3 min**	**Sédentaire Territorial** *Taille : MCP100%* (ha): **min : 27 ; max : 392 µ= 124 ha** *Distances maximales (m)* **min : 912 ; max : 3500 µ=1,8**	- **Grégaire**, vit en groupes familiaux dans des **terriers**. - Taille moyenne estimée des groupes : **4 indiv[d]** - interactions sociales intragroupes +++[e] - Interactions sociales intergroupes +/-[e] (morsures) - Marquage du territoire par latrines - zone de gagnage individuelle
Zone sud	**Min** (2009) **: 0%** [0-23,2%] **Max** (2011) **: 6,5%** [3,2-8,5%] ***2009-2013*** **4,0%** [2,0-7,0%		4→5	Prédiction du modèle (au printemps pour un blaireau vivant en bord de pâture) : **40** Prédiction du modèle en automne (pour un blaireau vivant à 300 m des pâtures) : **14**			

[a] étude expérimentale et Corner et al. 2010
[b] en zones non piégées
[c] en zone sud, nous présentons le niveau d'utilisation des pâtures par des blaireaux vivant en bord de pâture ou en forêt ; en zone nord, du fait de la faible proportion de forêt, nous ne présentons que l'utilisation des pâtures par un blaireau vivant en bord de pâture au printemps, représentant le niveau maximal
[d] données expérimentale issue de l'estimation des densités
[e] interactions intragroupes : 13 à 57 contacts / jour d'une durée de 24 à 90 minutes entre membres d'un groupe ; interactions intergroupes : 12 contacts sur 6 mois d'étude, d'une durée moyenne de 32 secondes (Böhm et al. 2009)

Tableau 52 : évaluation qualitative pour le blaireau du niveau de prévalence, de la capacité d'excrétion, du niveau de densité et du niveau de contact entre blaireaux et bovins. Le score attribué au comportement spatial concerne le risque d'extension spatiale et le score attribué au comportement social concerne le risque de transmission intraspécifique

	prévalence	excrétion	densité	Contact avec bovins*	Comportement spatial	Comportement social
Zone nord	4-5	6-7	5-6	4-6	2-3	7-8
Zone sud	3-4	6-7	4-5	1-4	2-3	7-8

* prenant en compte l'utilisation des pâtures et l'utilisation des infrastructures d'élevage

- **Blaireau, hôte de liaison ou réservoir ?**

Le niveau de prévalence détecté au début de la surveillance en 2009 dans une population dont on peut estimer la densité comprise entre 4 et 10 blaireaux / km^2 (niveau correspondant au site d'étude non piégé de la zone nord) était de 6%. L'échantillonnage, lors de cette première année de surveillance, a été très hétérogène mais les blaireaux analysés provenaient majoritairement de secteurs proches de foyers bovins récents. En 2012, la zone périphérique de la zone infectée (dans un rayon de 5 km) a été ciblée et aucun blaireau positif n'a été détecté malgré une taille d'échantillon conséquente (N = 524). En 2013, en revanche, les blaireaux analysés en zone nord provenaient essentiellement des « points noirs », c'est-à-dire de secteurs (à l'échelle de la commune) où des élevages avaient subi des contaminations successives. La prévalence s'est alors élevée à près de 12% (cf. chapitre 2, partie 3.4). Ces résultats semblent indiquer que la tuberculose ne s'est développée que dans des populations de blaireaux se trouvant à faible distance des foyers bovins. *Pour confirmer ce constat et le préciser, il serait nécessaire de recenser et d'analyser les blaireaux présents dans un rayon d'au moins 5 km autour des exploitations (ou d'un échantillon d'exploitations) ayant été infectées, afin de voir s'il existe un gradient d'infection en fonction de la distance aux fermes infectées. Une telle étude permettrait en outre de déterminer le degré et l'échelle de l'association spatiale existant entre les foyers bovins et les blaireaux infectés* (Woodroffe et al. 2005; Balseiro et al. 2013).

Comme en Côte d'Or, l'infection est également groupée spatialement et sur le plan phylogénique entre bovins et les blaireaux au Royaume-Uni et en Irlande (Woodroffe et al. 2005; Olea-Popelka et al. 2005). Le blaireau est néanmoins considéré comme un réservoir car capable de maintenir la tuberculose au sein de sa population et de la retransmettre aux bovins (Donnelly et al. 2003; Bourne 2007; Murphy et al. 2010; Gormley & Corner 2013). De plus, en Irlande, la tuberculose est présente dans des blaireaux en dehors des zones d'infection bovine (ANSES 2011; Gormley & Corner 2013).

A partir de ce constat, nous pouvons formuler deux hypothèses : soit l'infection chez les blaireaux nécessite une source récurrente d'infection extérieure à cette population pour y être entretenue (hypothèse 1 : hôte de liaison), soit les blaireaux sont capables d'entretenir seuls l'infection sans nouvelle source externe de contamination (hypothèse 2 :

réservoir). Des travaux de modélisation apportent des éléments aidant à s'orienter vers l'une ou l'autre hypothèse. Hardstaff et al. (2012) ont ainsi montré par modélisation qu'après introduction d'un blaireau infecté au sein d'un groupe, l'infection pourrait persister sans source extérieure d'infection si les groupes comportaient au moins 6 individus. A 8 individus, les simulations montrent que la prévalence intra-groupe se maintient à 5% indépendamment de toute autre source extérieure d'infection. Pour les groupes de taille inférieure à 6 individus, l'augmentation de la prévalence et la persistance de l'infection nécessite une source de contamination autre que provenant d'un congénère. **Ainsi, pour des groupes de 4 individus comme ce que nous avons estimé en moyenne dans la zone infectée de la Côte d'Or (cf. Tableau 51), la persistance de l'infection dans la population de blaireau nécessiterait qu'une source extérieure de contamination transmette *M. bovis*.**

Plusieurs considérations limitent cependant l'application du modèle de Hardstaff et al. (2012). Tout d'abord, ce modèle a été paramétré avec des niveaux de contacts intragroupes et intergroupes déterminés par une étude conduite en Angleterre, où la taille des groupes est plus importants qu'en Côte d'Or (entre 3 et 7 adultes *vs* 2,2 en moyenne) (Böhm et al. 2009). Par ailleurs, d'autres travaux fondés cette fois sur des données empiriques ont montré soit une absence de lien entre la taille des groupes et le niveau de prévalence intra-groupe (Delahay et al. 2000a), soit une corrélation négative entre la taille des groupes et le niveau de prévalence, les auteurs émettant alors l'hypothèse que les individus appartenant à de petits groupes sociaux se déplacent davantage, interagissent plus fréquemment avec les groupes voisins, augmentant ainsi la probabilité de transmission entre groupes (Woodroffe et al. 2009). C'est ce qui pourrait expliquer le maintien de la tuberculose dans la population de blaireaux en Irlande alors que leur niveau de densité est inférieur au niveau d'Angleterre et assez proche de celui de Côte d'Or (Byrne et al. 2012a; Hardstaff et al. 2012). Cependant, le niveau de prévalence chez le blaireau en Irlande est bien supérieur à celui de la Côte d'Or (20-36% *vs* 6-8%) (Griffin et al. 2005; Murphy et al. 2010).

Les résultats du modèle de Hardstaff et al. (2012) pourraient abonder en faveur de l'hypothèse 1 (hôte de liaison), à savoir que des sources de contamination extérieures seraient requises pour que l'infection se maintienne dans la population des blaireaux de Côte d'Or. Nos résultats attestant d'un niveau de contact important des blaireaux avec les pâtures pour les populations établies à proximité de celles-ci et donc surtout pour la population de la zone nord, cette source extérieure pourrait alors être principalement d'origine bovine pour ces populations de blaireaux. Pour les blaireaux forestiers, concernant davantage la population de la zone sud, étant donné leur faible contact avec les pâtures et donc avec les bovins, les sources extérieures de contamination pourraient être constituées par les autres hôtes sauvages comme le sanglier ou le cerf. **Dans les deux cas, la population de blaireaux pourrait être considérée comme un hôte de liaison. Cependant si l'on tient compte des limites de l'application de ce modèle que nous venons d'évoquer, l'hypothèse 2 (réservoir) pourrait être envisagée**. *Afin de trancher entre ces deux hypothèses, il conviendrait de mieux connaître le niveau de contact intergroupe qui existe en Côte d'Or.*

D'autres éléments sont également à prendre en compte et notamment les niveaux d'infection et d'excrétion et comment ceux-ci sont répartis entre les groupes. Dans le contexte enzootique et de fortes densité d'Angleterre, l'infection est agrégée spatialement et durablement ce qui se traduit par un maintien de l'infection sur de longues périodes dans les mêmes groupes sans nécessairement être transmise aux groupes adjacents (Delahay et al. 2000a) mais il existe une augmentation du nombre d'individus infectés (pouvant passer d'un statut exposé à celui d'excréteur et « superexcréteur ») au fil du temps dans les groupes (Delahay et al. 2013). Or, ces animaux « superexcréteurs » peuvent jouer un rôle prépondérant dans la propagation de l'infection (Lloyd-Smith, Schreiber, et al. 2005). Nous avons mis en évidence un potentiel d'excrétion que nous avons qualifié d'élevé (Tableau 51) dans la population de blaireaux infectés de Côte d'Or, même si notre méthodologie n'a pas permis de connaître le niveau d'excrétion de bacilles viables. Ceci pourrait favoriser la transmission intraspécifique et donc la persistance de l'infection au sein des groupes. Cependant, nous ne connaissons pas le degré d'agrégation spatiale de l'infection chez le blaireau qui pourrait nous renseigner sur la distribution de l'infection dans et entre les groupes. Les résultats de la surveillance active semblent indiquer une concentration des cas infectés dans certaines communes mais nous ne disposons pas d'information plus précises sur leur provenance et notamment si ces blaireaux infectés appartiennent à un même groupe ou pas. **La persistance de *M. bovis* pourrait néanmoins exister localement dans des agrégats d'infection où la prévalence est localement élevée et où l'on suppose que le nombre de blaireaux excréteurs peut être important.** *La connaissance des niveaux d'infection (nombre infectés et nombre d'excréteurs) à l'échelle des groupes serait requise pour étudier le niveau d'agrégation de l'infection à l'intérieur et entre groupes et ainsi mieux comprendre la dynamique de l'infection dans la population de blaireaux de Côte d'Or, permettant des actions de lutte plus ciblées.*

Enfin, le rôle du terrier dans la persistance de l'infection au sein d'un groupe a déjà été évoqué puisque des copies d'ADN de *M. bovis* ont été retrouvés dans du sol de terrier plusieurs mois après que des blaireaux infectés y aient séjourné (Young et al. 2005). L'absence de lumière, la faible amplitude thermique et le degré élevé d'humidité sont en effet favorables à la persistance de *M. bovis* (Morris et al. 1994; Phillips et al. 2003; Fine et al. 2011). La présence de *M. bovis* dans les terriers peut constituer une source de contamination environnementale contribuant à entretenir l'infection au sein d'un groupe ou à contaminer un autre groupe ou d'autres espèces (renard par exemple) si un terrier laissé vacant demeure infectieux. *Des études de durée de survie de M. bovis dans les terriers seraient souhaitables pour étayer cette hypothèse et mieux comprendre quel rôle le terrier peut jouer dans la persistance de l'infection*.

- **Rôle des blaireaux dans la transmission-retour aux bovins**

Nous avons mis en évidence une capacité élevée d'excrétion des blaireaux par différentes voies comprenant la salive, le mucus trachéal, l'urine et les fèces ainsi qu'une utilisation des pâtures élevée pour les blaireaux les plus proches de celles-ci et variable selon la saison. Le niveau de fréquentation des pâtures et les comportements des blaireaux adoptés sur ces pâtures sont donc déterminants pour évaluer quel niveau de contamination peut résulter de cette utilisation.

Sur la base d'autres travaux et par observation personnelle sur les sites d'étude, nous savons que les blaireaux défèquent et urinent sur les pâtures, notamment dans des latrines qui se situent préférentiellement au niveau des lisières, des bordures des prairies ou à des intersections (White et al. 1993; Hutchings & Harris 1999; Drewe et al. 2013). A l'échelle du groupe, Courtenay et al. (2006) ont trouvé une relation directe entre le taux d'excrétion de *M. bovis* dans les fèces et la positivité des latrines se trouvant dans le territoire de ce groupe et plus généralement, qu'il existait une association entre la détection de *M. bovis* dans l'environnement et la fréquence d'excrétion du bacille dans l'urine et les fèces des blaireaux. Il a par ailleurs été montré que les bovins rentraient en contact avec les latrines et l'urine des blaireaux lorsqu'ils pâturaient : Drewe et al. (2013) ont dénombré 1716 contacts sur cinq mois de suivi entre les 33 bovins d'un troupeau et 13 latrines situées sur une pâture. Les comportements d'investigation des latrines par les bovins sont hétérogènes (dans cette étude, cinq bovins sont rentrés en contact avec les latrines à plus de 100 reprises alors que la majorité du troupeau a eu moins de 50 contacts) et dépendent entre autres du statut hiérarchique au sein du troupeau et de la hauteur de l'herbe (en cas de surpâturage, les vaches évitent moins les latrines que quand l'herbe est haute et les vaches de plus bas rang hiérarchique sont plus exposées) (Hutchings & Harris 1997; Drewe et al. 2013).

Sachant que des blaireaux à un stade avancé de la maladie peuvent excréter jusqu'à 10^5 cfu / ml d'urine et 10^4 cfu /g de fèces (Gallagher et al. 1998) et que la dose infectante minimale par voie endotrachéale chez les bovins est (expérimentalement) de 1 cfu (Dean et al. 2005), la transmission indirecte de blaireaux à bovins par inhalation ou ingestion d'herbe souillées par l'urine ou les fèces déposés dans les latrines sur les pâtures est probable (Hutchings & Harris 1999).

Même si nous n'avons pas mis en évidence d'effet des « nuits à lombrics » sur l'utilisation des pâtures (cf. chapitre 2 paragraphe 6.1), nous pouvons supposer sur des bases bibliographiques qu'un autre comportement adopté par les blaireaux sur les pâtures est le vermillage (Kruuk et al. 1979). Dans ce cas, ils peuvent contaminer l'herbe et le sol des pâtures par la voie respiratoire ou salivaire. Sachant que le mucus trachéal peut contenir jusqu'à 10^6 cfu / ml d'exsudat bronchique (Gallagher et al. 1998), la fréquentation des pâtures par des blaireaux infectés et excrétant par ces voies présenteraient un risque de contamination pour les bovins pâturant. De plus, si les bovins ont tendance à éviter de brouter à proximité des latrines (cf. supra; Hutchings & Harris 1997), il est probable qu'ils n'ont pas ce

comportement d'évitement pour de l'herbe contenant de la salive et du mucus trachéal de blaireau. **Nous pouvons donc déduire qu'il existe un risque assez élevé de contamination environnementale des pâtures par les blaireaux infectés pouvant potentiellement conduire à une transmission aux bovins.** *Le risque ne peut cependant être évalué quantitativement qu'en connaissant le nombre de blaireaux excréteurs, leur niveau d'excrétion par les différentes voies et enfin la persistance de bacilles infectant dans l'environnement.*

A la lumière de nos résultats, nous pouvons juste faire l'hypothèse que le risque serait plus élevé sur un site connaissant un plus grand nombre de blaireaux infectés (prenant en compte à la fois les niveaux d'abondance et de prévalence), situé en paysage fragmenté où les populations de blaireaux sont établis en lisière de pâture (fréquentant donc davantage les pâtures), que dans les situations inverses. A ce titre, la population de blaireaux de la zone nord serait alors plus à risque de transmettre l'infection aux bovins que celle de la zone sud.

Concernant les visites de blaireaux dans les bâtiments d'élevage, notre étude expérimentale n'a révélé qu'une faible fréquence de visites. Comme nous l'avons déjà mentionné, nous sommes limités pour inférer les résultats de cette étude à la population et à généraliser sur toutes les exploitations de la zone infectée de Côte d'Or. Nous retenons de notre étude expérimentale que ces visites, très hétérogènes selon les sites, semblent liées à des comportements individuels et à la configuration particulière de certaines exploitations. Le nombre de groupes de blaireaux à proximité des exploitations est certainement un des éléments expliquant la variabilité que nous avons observée. Un facteur déterminant du risque de transmission est là aussi la persistance de bacilles viables dans le substrat contaminé et le risque de contact contaminant de ce substrat avec les bovins. D'après la bibliographie, les conditions rencontrées en bâtiment d'élevage (abrité de la lumière et faible amplitude thermique) pourraient être favorables à une durée de survie prolongée de *M. bovis* (Phillips et al. 2003; Tolhurst et al. 2009), de même que la présence de céréales stockées (Fine et al. 2011) *mais cette durée devrait être estimée dans les conditions climatiques rencontrées en Côte d'Or.*

- **Rôle des blaireaux dans l'extension géographique de la tuberculose bovine**

A partir du suivi télémétrique, nous avons estimé la taille du domaine vital de dix individus adultes (et possiblement subadultes) mâles et femelles. La taille de ces domaines, déterminés par la méthode du polygone convexe minimum prenant en compte 100% des localisations a varié entre 27 et 392 ha. A l'intérieur de ce domaine vital, la distance maximale parcourue est comprise entre 912 m et 3,5 km (Tableau 51). Ces valeurs représentent l'aire et la distance maximales qui peuvent être parcourues par un individu sur la période de suivi puisqu'il tient compte des localisations extrêmes. **Etant donnée l'échelle de déplacement des blaireaux ainsi déterminée, il apparaît qu'un individu infecté et excréteur ne propagerait l'infection que sur de courtes distances et des petites**

superficies, que nous pouvons estimer, en ajoutant une petite marge à nos résultats, à 4 km et 400 ha respectivement. Considérant l'importance des transmissions intragroupes évoquée plus haut, il serait cependant plus judicieux de se placer à l'échelle du groupe, représentant alors l'unité épidémiologique, pour estimer cette capacité d'extension géographique de l'infection. Dans cette configuration, l'unité spatiale ne serait plus le domaine vital et les déplacements individuels mais le territoire du groupe entier qui est également reconnu comme étant relativement stable dans des contextes de densités modérées à élevées (Roper 2010). *La détermination de ces territoires par des méthodes d'appâts marqués* (Delahay et al. 2000b) *serait donc nécessaire pour compléter cette évaluation, elle permettrait en outre de mieux connaître la distribution spatiale des groupes et fournirait une première approche pour estimer les contacts intergroupes dont nous avons souligné l'importance dans le paragraphe précédent.*

D'autre part, plusieurs phénomènes pourraient entrainer une extension géographique de la tuberculose par les blaireaux, plus importante que ce que notre estimation nous a permis de faire. Le phénomène de dispersion naturelle des jeunes hors du groupe familial amène ces derniers à parcourir des distances allant jusqu'à 5 km (Pope et al. 2006). Cependant, ce phénomène assez mal connu ne semble pas systématique et dépend de la structure et de la densité de population (Roper 2010). Dans notre étude, nous n'avons pas distingué les adultes des subadultes. Seul le poids et le sexe ont été enregistrés. L'individu ayant le domaine vital le plus étendu (394 ha) était un mâle de près de 16 kg. Il est donc beaucoup plus probable que ses déplacements soient ceux d'un mâle adulte plutôt que ceux d'un subadulte en dispersion.

Un autre phénomène de dispersion a été constaté suite à la régulation de la population de blaireaux mise en œuvre en Angleterre. Cet abattage massif a eu pour effet de perturber la structure sociale des groupes, augmentant le comportement exploratoire, la taille des domaines vitaux et le chevauchement des territoires des groupes pour les blaireaux survivants et ceux des groupes voisins (Riordan et al. 2011), favorisant ainsi les interactions intergroupes et augmentant le risque de contacts avec des troupeaux bovins. La conséquence fut une augmentation de la prévalence chez les blaireaux et une augmentation de l'incidence bovine en périphérie des zones d'abattage lorsque celui-ci a été conduit de façon localisée (abattage réactif autour des fermes infectées) (Tuyttens et al. 2000; Donnelly et al. 2006; Woodroffe et al. 2006; Vial & Donnelly 2012). En Côte-d'Or, environ 10 000 blaireaux ont été abattus dans la zone infectée depuis 2009 (Source DDPP 21) et jusqu'alors, aucune propagation de l'infection hors de la zone d'infection bovine n'a été détectée chez le blaireau (524 blaireaux ont été testés et trouvés tous négatifs en 2012 en zone périphérique de cette zone infectée, cf. chapitre 2, paragraphe 3.4). Des nouveaux foyers bovins sont survenus hors de la zone infectée mais un échantillon de blaireaux était analysé en périphérie de chacun d'eux depuis 2009 et aucun blaireau infecté n'a été détecté. De plus d'autres sources d'introduction de l'infection, en dehors de la faune sauvage, ont été mises en cause dans ces foyers (source : DDPP21). *Pour totalement écarter la survenue éventuelle de ce phénomène, un suivi du*

niveau d'infection des populations de blaireaux dans les sites où le piégeage est intense et en périphérie, comparé à une zone témoin non piégée pourrait être utile.

Enfin, en Angleterre des études ont montré que les blaireaux tuberculeux avaient une occupation de l'espace atypique marquée par un domaine vital plus étendu (50% plus grand que les blaireaux non infectés) un temps passé plus important en dehors de leur terrier principal et une utilisation plus fréquente des terriers secondaires. Ces modifications comportementales pourraient être dues à l'infection elle-même, à l'affaiblissement des animaux infectés et/ou au rejet par le reste du groupe (Cheeseman & Mallinson 1981; Garnett et al. 2005; Weber et al. 2012). Un blaireau femelle mort pendant l'étude au bout de 2 mois de suivi était positif à *M. bovis* avec des lésions et un état général reflétant un stade avancé de l'infection. Le domaine vital de ce blaireau mesurant 1,40 km^2 (MCP 100%), ne correspond pas au plus grand domaine observé dans l'étude mais se situe dans la fourchette haute. Ses derniers déplacements étaient limités et se situaient dans une pâture à 600 m de son terrier principal. Il est impossible de conclure à partir d'un seul individu, et de savoir si son comportement était effectivement modifié par l'infection.

En conclusion, il est difficile de savoir dans l'état actuel des connaissances si la population des blaireaux de Côte d'Or est capable d'entretenir l'infection de façon autonome. Cette capacité semble possible localement dans les secteurs de forte prévalence de la zone nord mais le niveau d'agrégation de l'infection en relation avec la structure sociale de la population doit être mieux connu pour une meilleure évaluation. Le rôle du blaireau en tant qu'hôte de liaison est plus probable, se contaminant auprès de sources bovines et éventuellement auprès d'autres hôtes sauvages pour les blaireaux forestiers de la zone sud et pouvant à son tour transmettre *M. bovis* à d'autres populations dont il partage l'habitat. Son rôle dans l'extension spatiale de l'infection paraît limité à de faibles distances (quelques kilomètres).

1.6. Rôle de la population de renards

Dans la zone nord, la prévalence chez le renard a atteint 5,3% (IC 95% : [0,6 - 17,7%]) entre 2005 et 2012 tandis qu'aucun renard atteint n'a été détecté dans la zone sud. Ces animaux infectés n'ont pas présenté de lésion visible, ce qui est cohérent avec d'autres cas d'infection décrits en Angleterre ou aux Etats-Unis chez cette même espèce (Bruning-Fann et al. 2001; Delahay et al. 2007) et qui atteste de leur faible sensibilité à *M. bovis*.

Les renards sont exposés par leur régime alimentaire nécrophage qui peut les conduire à consommer des carcasses infectées (Bruning-Fann et al. 2001; Delahay et al. 2002; Martín-Atance et al. 2006; Gortazar, Vicente, et al. 2011). En l'occurrence, en Côte d'Or, ces carcasses peuvent être des sangliers, des cerfs ou des blaireaux. L'occupation de terriers de blaireaux inhabités ou parfois même en cohabitation avec ceux-ci représente une autre source d'exposition si la bactérie a persisté dans cet environnement (Delahay et al. 2002).

Le niveau de contact avec les bovins pourrait être assez élevé, compte-tenu des résultats issus de la vidéosurveillance. Ainsi, le nombre de visites sur des infrastructures d'élevage a été plus élevé que pour les autres espèces (0,06 visite par nuit en moyenne), notamment dans les bâtiments d'élevage. En revanche, aucun type de point d'abreuvement et d'alimentation surveillé ne semble plus attractif qu'un autre pour le renard (cf .chapitre 2, paragraphe 6.2). Les zones d'élevage semblent être davantage des terrains de chasse pour la prédation de rongeurs (observé sur les vidéos) ou constituer des abris. La consommation de concentrés dans des nourrisseurs a cependant été observée. Enfin, les éleveurs constatent également la présence de renards qui viennent dans les bâtiments consommer la délivrance des vaches lors des vêlages.

La densité de renard n'est pas connue dans la zone infectée.

En Angleterre, avec un niveau de prévalence comparable chez le renard à celui de la Côte d'Or, une évaluation semi-quantitative du risque de transmission de la tuberculose du renard au bovin relative au risque posé par le blaireau pris comme référence a résulté en un risque médian de 0,04 (intervalle de confiance à 95% : 0-0,009) (Delahay et al. 2007).

Au regard de tous ces éléments, nous considérons que le renard n'a probablement qu'un rôle de cul de sac épidémiologique, malgré un niveau de prévalence non négligeable. *Cependant, il serait nécessaire d'augmenter l'échantillon afin d'affiner cette prévalence. En outre, étant donné son niveau de contact élevé avec les bovins et la voie de contamination orale prédominante chez cette espèce, une recherche de M. bovis dans ses excrétas, et particulièrement les fèces, permettrait de conforter cette hypothèse. D'autre part, nous pourrions envisager l'utilisation de cette espèce comme sentinelle de l'infection, comme cela est fait pour le coyote aux Etats-Unis* (Berentsen et al. 2011).

1.7. Rôle de la population de chevreuils

Aucun chevreuil atteint de tuberculose n'a été détecté jusqu'alors en Côte d'Or. Cependant nous avons vu que la pression de surveillance mise en œuvre était assez faible (cf. chapitre 2 paragraphe 3.5) et ce résultat n'exclut pas totalement la présence de chevreuils infectés dans la zone. Cette faible prévalence est concordante avec les autres systèmes multi-hôtes sauvages de *M. bovis* où le chevreuil est présent, ailleurs en France, en Italie, en Espagne et au Royaume-Uni (Delahay et al. 2007; Dondo et al. 2009; Hars et al. 2012). Elle pourrait s'expliquer par une faible exposition de cette espèce en raison de son comportement alimentaire plus cueilleur que brouteur (Pellerin 2005; Dondo et al. 2009). En revanche, dans tous les cas où des chevreuils infectés ont été détectés, ils ont présenté un tableau lésionnel sévère avec une dissémination à plusieurs organes et des lésions ouvertes, attestant d'une forte sensibilité et d'une capacité élevée d'excrétion du bacille (Delahay et al. 2002; Delahay et al. 2007; Dondo et al. 2009; Reveillaud 2011).

D'autre part, l'utilisation des pâtures, en lien avec leur régime alimentaire, est supposée être moins intense pour le chevreuil que pour les cerfs (Ward et al. 2009). Nous avons cependant mis en évidence par la vidéosurveillance, un nombre de visites sur des infrastructures d'élevage intermédiaire entre celui des cerfs et celui des sangliers, les auges et le sel semblant les plus attractifs, surtout en été (cf. chapitre 2, paragraphe 6.2). L'évolution des tableaux de chasse du chevreuil et leur comparaison entre les trois unités de gestion cynégétique correspondant à la zone infectée montre une tendance à l'augmentation des populations et un niveau d'abondance environ deux fois plus élevé dans la zone sud que dans la zone nord (Source FDC 21).

En Angleterre, une évaluation quantitative relative du risque (le risque posé par le blaireau étant pris comme référence) d'exposition à *M. bovis* par les chevreuils aux bovins a résulté en un risque relatif médian de 0,25 (intervalle 95% : 0,02-3,32) dans un contexte de densité élevée de la population (34 chevreuils/km^2) et une prévalence faible (1% environ) (Ward et al. 2009).

Compte-tenu de l'ensemble de ces éléments, nous considérons que le chevreuil n'a qu'un rôle marginal, dans le système multi-hôtes de la Côte d'Or et que si quelques individus peuvent ponctuellement s'infecter, leur nombre paraît beaucoup trop faible pour jouer un rôle dans la transmission de l'infection à d'autres populations.

1.8. Conclusion sur le rôle de chaque population sauvage

En conclusion nous proposons de synthétiser les résultats d'évaluation du rôle de chaque population étudiée dans le Tableau 53. Cette synthèse évalue qualitativement la probabilité que chacune de ces populations soit réservoir, hôte de liaison, la probabilité de transmission-retour aux bovins et celle d'étendre spatialement l'infection. Pour ce dernier élément, nous ajoutons la valeur chiffrée maximale exposée dans chacune des parties précédentes afin de mesurer quelle pourrait être l'ampleur de cette extension.

Tableau 53 : évaluation qualitative de la probabilité de tenir différents rôles épidémiologiques dans le système multi-hôtes de *M. bovis* pour les populations de cerfs, de sangliers, de blaireaux, de renards et de chevreuils de la zone infectée de tuberculose bovine (- : très peu probable ; + : assez probable ; ++ : probable ; +++ : très probable)

	Cerf	***Sanglier***	***Blaireau***	***Renard***	***Chevreuil***
Réservoir	-	-	+ (localement)/-	-	-
Hôte de liaison	+	++	++/+++	-	-
Transmission-retour aux bovins	Zone sud : +/- Zone nord : -	+	Zone sud : + Zone nord : ++	-	-
Extension spatiale	++ (20 km)[b]	++ (15 km)[a]	- (3,5 km)[a]	-	-

[a] base expérimentale
[b] base bibliographique

Cette évaluation a été réalisée pour chaque population indépendamment les unes des autres, il convient maintenant de se demander quelles pourraient être les conséquences épidémiologiques de leur assemblage tel qu'il existe dans la zone infectée de la Côte d'Or en terme de risque de persistance de l'infection.

1.9. Evaluation de la capacité de la communauté d'hôtes sauvages à maintenir la tuberculose bovine

Nous avons exposé dans le chapitre 1 les différentes communautés d'hôtes sauvages de *M. bovis* décrites dans le monde, illustrant leur variété et leur complexité. En Côte d'Or, même si chacune des espèces impliquées est déjà connue comme hôte de *M. bovis* dans d'autres régions, l'assemblage de ces différentes populations est inédit ou tout du moins n'a pas été décrit.

1.9.1. **Concepts théoriques**

D'après la définition de Haydon et al. (2002), un réservoir peut-être défini comme une ou plusieurs populations ou environnements en contact épidémiologique dans lequel le pathogène peut être maintenu de façon permanente (population source) et à partir duquel l'infection est transmise à une population cible.

La question posée est donc celle de savoir si les liens épidémiologiques existant entre les différents hôtes de la communauté présents en Côte d'Or permettent l'entretien de la tuberculose, constituant une source d'infection pérenne pour les bovins.

Parmi les populations hôtes sauvages impliquées, dans l'état actuel des connaissances, nous n'avons pas clairement identifié de réservoir sauvage de tuberculose bovine. Des études seraient nécessaires pour confirmer les résultats de cette première approche, néanmoins si nous nous plaçons dans cette hypothèse, la communauté d'hôtes sauvages de Côte d'Or se composerait actuellement de trois hôtes de liaison (blaireau, possiblement réservoir localement, sanglier et cerf), d'un cul-de-sac épidémiologique (le renard) et d'un hôte marginal (le chevreuil).

Cependant, l'assemblage de différents hôtes pourrait résulter en un R_0 supérieur à 1 (Haydon et al. 2002), l'effet pouvant être additif en augmentant le nombre d'individus infectés et ainsi les sources de contamination ou potentialiser la circulation de l'agent pathogène, contribuant ainsi à sa persistance (Holt et al. 2003; Ward et al. 2009). Cet effet peut concerner la population cible, en l'occurrence les bovins mais également chacune des populations composant la communauté en abaissant par exemple leur taille critique nécessaire pour entretenir l'infection.

D'après Fenton & Pedersen (2005), un « vrai système multi-hôtes » dans lequel l'agent pathogène persiste implique un taux élevé de transmission à la fois intraspécifique et interspécifique.

La nature et l'intensité des interactions entre les différentes populations-hôtes sauvages sont essentielles à déterminer pour expliquer l'effet produit par un assemblage d'hôtes donné (Holt et al. 2003; Fenton & Pedersen 2005; Rhyan & Spraker 2010). Dans les paragraphes suivants, nous allons explorer comment les différentes populations hôtes sauvages présentes en Côte d'Or peuvent interagir puis quelles pourraient être les conséquences de telles interactions sur le cycle épidémiologique de *M. bovis*.

1.9.2. **Possibilités d'interactions interspécifiques entre les différents hôtes sauvages de *M. bovis* en Côte d'Or**

Les différentes populations hôtes évoluent dans un environnement commun au sein duquel elles partagent leur habitat, que ce soit en milieu majoritairement forestier comme dans la zone sud ou en milieu bocager comme dans la zone nord. Le besoin de couvert végétal

pour les sangliers et les cerfs (Licoppe & Crombrugghe 2003; Keuling et al. 2009; Saïd et al. 2011) ainsi que l'emplacement des terriers privilégiés en lisière de bois pour les blaireaux (Roper 2010) augmente probablement le niveau de partage du milieu boisé dans la zone nord étant donné la surface réduite de bois, favorisant ainsi les interactions entre ces espèces.

Le partage des ressources est un déterminant important du niveau de contacts entre les populations sauvages. Nous avons vu que blaireaux et sangliers étaient de gros consommateurs de lombrics, ils peuvent donc être amenés à partager les sites où cette ressource est la plus disponible comme les pâtures ou les prairies. Le besoin en eau, commun à toutes les espèces peut également amener des individus des différentes espèces à s'abreuver sur les mêmes points d'eau. Ceux-ci peuvent être naturels comme des rivières ou des mares mais également des souilles qui sont parfois entretenues artificiellement pour des motivations cynégétiques. En outre, ces souilles et ces mares peuvent également être un lieu de bains pour le déparasitage pratiqué par les sangliers mais aussi par les grands cervidés (observation personnelle). Cependant, étant donné le climat assez humide qui règne en Côte d'Or, ces points d'eau génèrent sans doute beaucoup moins d'interactions interspécifiques que dans les régions arides comme dans le sud de l'Espagne ou en Afrique du sud, où ils constituent des points d'agrégation (Gortázar et al. 2008; De Garine-Wichatitsky et al. 2013).

A contrario, même si des études sont nécessaires pour le vérifier, les conditions climatiques de la Côte d'Or sont relativement favorables à la survie de *M. bovis* dans l'environnement (Jackson et al. 1995) ce qui augmente le temps pendant lequel les substrats peuvent être contaminants et donc augmente le risque de transmission interspécifique.

Comme nos résultats de vidéosurveillance l'ont démontré, les aliments et l'eau distribués aux bovins dans les pâtures constituent des sites d'interactions particulièrement à risque puisqu'ils mettent potentiellement en contact les différentes populations sauvages entre elles et ces populations avec les bovins.

Trois des espèces impliquées dans le système multi-hôtes de *M. bovis* sont nécrophages : le sanglier, le renard et dans une moindre mesure, le blaireau. Ce comportement alimentaire les expose particulièrement à une infection par voie orale et respiratoire en cas de consommation d'une carcasse infectée (Bruning-Fann et al. 2001; Gortazar, Vicente, et al. 2011; Nugent 2011). Nous avons déjà souligné l'amplification de l'infection qui pourrait avoir lieu si une carcasse de cerf infecté, généralement très riches en bactéries (et d'autant plus si l'animal est mort suite à une tuberculose généralisée) était consommée par une ou plusieurs compagnies de sangliers, des blaireaux et des renards. Or, ce scénario est probable en Côte d'Or bien que nous le supposons rare étant donné la faible prévalence de la maladie chez le cerf.

Il existe donc de multiples possibilité d'interactions entre les blaireaux, sangliers, cerfs, renards et chevreuils de la zone infectée de Côte d'Or, il serait cependant nécessaire de quantifier ces interactions pour évaluer le risque de transmission interspécifique. *Pour cela, il pourrait être utile par exemple mesurer le degré de recouvrement des domaines vitaux des trois espèces. L'identification d'items paysagers (lisière, bosquet par exemple) ou*

de sites particuliers (point d'abreuvement…) ou de périodes de l'année où les interactions sont les plus intenses seraient de première importance pour mettre en place des actions de lutte visant à limiter le risque de transmission interspécifique de M. bovis au sein de la communauté d'hôtes sauvages. L'importance de la nécrophagie dans la transmission interspécifique pourrait être étudiée en mesurant le taux de contact des individus de chaque espèce sur une carcasse d'individu d'une autre espèce.

1.9.3. Conséquences épidémiologiques des interactions entre les différentes populations-hôtes sauvages de la Côte d'Or

Plusieurs hypothèses peuvent être émises sur la base des caractéristiques écologiques et épidémiologiques de chaque espèce hôte.

En premier lieu, connaissant les différences de niveaux de prévalence et d'abondance entre la zone sud et la zone nord ainsi que le contraste paysager, nous pouvons supposer que le niveau d'interaction et de transmission interspécifique de la tuberculose n'est pas homogène sur toute la zone infectée. Ainsi, en zone nord, les blaireaux sont plus abondants et plus infectés qu'en zone sud alors que l'on observe une situation inverse pour le sanglier. De plus, comme nous l'avons vu, la densité très faible de cerfs dans la zone nord confère probablement un rôle mineur à cette espèce dans cette zone, alors que dans la zone sud, sa participation dans la communauté d'hôte est probablement plus importante. D'autre part, la répartition des élevages bovins est également hétérogène (plus dense au nord) et de ce fait, leur participation en tant que source ou récepteur potentiel de l'infection pour les hôtes sauvages n'a probablement pas la même ampleur entre la zone nord et la zone sud. Au sein de cette dernière, et plus particulièrement dans les Hautes Côtes qui comptent très peu d'élevages, la persistance de la tuberculose nécessiterait une plus grande aptitude de la communauté d'hôtes sauvages à faire circuler l'infection de façon autonome. *A ce titre, la surveillance de l'évolution des niveaux de prévalence des populations de ce secteur apparaît importante pour évaluer cette capacité. En outre, une évaluation quantitative du risque réalisée à une échelle locale (sous-zone) intégrant les niveaux de densité et d'infection, la capacité d'excrétion et le degré des interactions permettrait de mieux cerner les conséquences épidémiologiques des différentes distributions des hôtes* (Ward et al. 2009).

Par ailleurs, les comportements spatiaux des différentes populations diffèrent puisque les blaireaux d'un côté, vivent sur des territoires de quelques centaines d'hectares au maximum alors que les sangliers et les cervidés évoluent sur des domaines vitaux de plusieurs milliers d'hectares. Nous avons vu que, chez le blaireau, ce comportement spatial, associé à une forte territorialité et à un comportement social stable favorisait une agrégation de l'infection à l'échelle des groupes sociaux. Or la présence sympatrique de sangliers et de cerfs, interagissant avec ces blaireaux pourrait engendrer une dissémination de l'infection entre groupes de blaireaux ou vers le compartiment domestique, nivelant ainsi le degré d'agrégation de l'infection occasionnée par les blaireaux. En Nouvelle-Zélande, les cerfs et surtout les sangliers ont ainsi été considérés comme des « hôtes vecteurs spatiaux » car

propageant l'infection entre des poches d'infection entretenues par des phalangers-renards qui n'auraient pas pu être en contact sinon, compte-tenu de l'échelle de leurs déplacements (Nugent 2011). En Angleterre, à notre connaissance, un tel rôle du cerf vis-à-vis des blaireaux n'a pour l'instant pas été décrit (Delahay et al. 2007; Ward et al. 2009). Cependant, les sangliers sont absents du système multi-hôtes anglais. En Côte d'Or, le rôle de cette espèce dans la connexion spatiale de l'infection entre des sous-populations de blaireaux pourrait être prépondérant, considérant sa plus grande réceptivité et le niveau de partage des ressources plus important avec les blaireaux (via les lombrics par exemple) par rapport au cerf. La découverte en vallée de l'Ouche et dans les Hautes Côtes, de quatre sangliers (un en 2012-2013 et trois en 2013-14, résultats non montrés pour ces derniers) ; d'un blaireau en 2012 et d'un autre trouvé en 2013 (résultat non montré) infectés porteurs du spoligotype SB0120, souche non retrouvée jusqu'à présent dans ce secteur dans les populations hôtes domestiques et sauvages, est en faveur d'une telle hypothèse.

Enfin, nous avons précédemment indiqué que le taux de renouvellement des populations pouvait influencer la dynamique de la tuberculose et quel pouvaient en être ses effets dans chacune des populations. Or, dans la communauté d'hôtes, cohabitent une espèce à fort taux de renouvellement, le sanglier (maturité sexuelle vers 10 mois ; une à deux portées par an ; 5 à 7 marcassins par portée) et une espèce à faible taux de renouvellement, le cerf (maturité sexuelle à 18 mois ; un faon par an). La longue durée de vie de ce dernier peut lui conférer un rôle de « vecteur temporel » de la tuberculose comme cela a été décrit par Nugent (2011) en Nouvelle-Zélande alors que le turn-over rapide, exacerbé par la chasse, chez les sangliers, favorise la persistance en alimentant le pool d'individus sains (Lloyd-Smith, Cross, et al. 2005; Vicente et al. 2013). La combinaison de ces deux démographies pourrait potentialiser la capacité d'entretien de *M. bovis* au sein de ces deux populations et donc dans la communauté d'hôtes.

1.9.4. **Conclusion**

Il existe à ce jour trop de données manquantes pour affirmer si la communauté d'hôtes sauvages présente en Côte d'Or est susceptible d'agir comme un réservoir de *M. bovis*. Nous avons cependant identifié des facteurs de risque, propres à cet assemblage d'hôtes inédit dont il serait nécessaire de confirmer les effets. Ainsi, le système multi-hôtes de la Côte d'Or se compose d'un réservoir domestique constitué par les bovins, de blaireaux qui pourraient potentiellement entretenir l'infection localement, de sangliers et de cerfs, hôtes de liaison, pouvant propager l'infection sur de grandes distances et l'amplifier, et enfin de renards et de chevreuils ayant, à ce jour et dans l'état actuel des connaissances, un rôle très mineur.

2. CARACTÉRISATION SPATIALE, TEMPORELLE ET ZOOTECHNIQUE DU RISQUE DE TRANSMISSION DE M. BOVIS ENTRE FAUNE SAUVAGE ET BOVINS EN CÔTE D'OR

2.1. Caractérisation spatiale du risque

L'étude du rôle de chaque population a mis en exergue que celui-ci peut varier entre la zone sud et la zone nord du département de par les contrastes en termes de paysage, de niveau d'abondance et de prévalence de *M. bovis* dans ces populations sauvages. Des différences existent aussi concernant la distribution des élevages bovins, plus denses dans la zone nord avec une incidence plus élevée de tuberculose bovine. De ce fait, il convient d'évaluer le niveau de risque de transmission interspécifique des populations sauvages vers les bovins de façon distincte entre ces deux zones.

Nous avons également proposé des pistes pour appréhender le risque plus finement encore, en lien avec les hétérogénéités des paramètres au sein d'une même zone et en tenant compte de l'échelle locale de la dynamique d'infection qui existe chez le blaireau. Enfin, le risque pourrait également être évalué à très petite échelle, pour répondre à des objectifs spécifiques de gestion (risque pour une exploitation).

2.1.1. **A l'échelle des parties sud et nord de la zone infectée**

Nous avons repris les évaluations des paramètres réalisées pour chaque espèce dans la partie précédente (Tableaux 48, 50 et 52) et nous les avons représentées afin de mettre en perspective pour les zones nord et sud (Figure 55).

L'objectif étant ici de comparer le risque de transmission-retour des populations sauvages aux bovins, nous n'avons pas inclus les facteurs comportementaux (qui renseignent davantage sur la capacité de persistance ou d'extension spatiale au sein des populations sauvages).

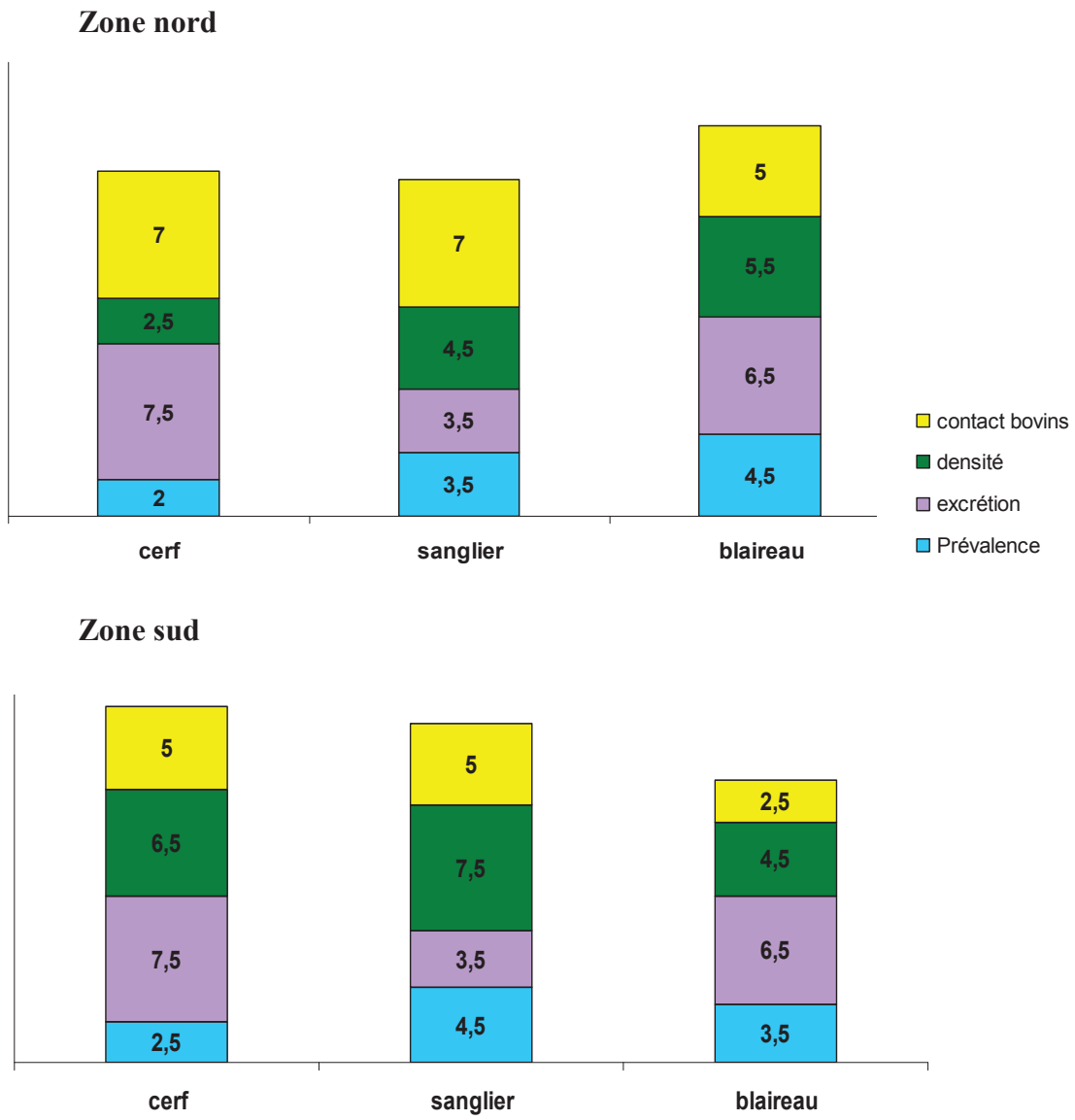


Figure 55 : synthèse de l'évaluation du risque qualitative (AFSSA 2008) de transmission-retour aux bovins par les populations de cerfs, de sangliers et de blaireaux (les valeurs affichées correspondent à la valeur médiane du score attribué dans le paragraphe 1).

Bien qu'ils soient exprimés avec un certain degré d'incertitude et qu'il soit difficile de connaître la part relative de chaque facteur dans la pression d'infection exercée par ces populations aux bovins, ces résultats éclairent sur le niveau de risque de transmission interspécifique de *M. bovis* posé aux bovins par les trois populations sauvages étudiées. Ainsi, nous constatons que si les scores de chaque espèce diffèrent d'un paramètre à l'autre, leur combinaison semble résulter en des niveaux d'émission relativement proches compte-tenues des incertitudes qui perdurent. De légères différences apparaissent cependant.

En zone nord, c'est la population de blaireaux qui semble exercer la plus forte pression d'infection sur les bovins mais les sangliers et les cerfs, que nous supposons avoir un

niveau de contact élevé avec les bovins du fait du paysage très fragmenté, auraient une probabilité d'émission de l'infection proche de celle des blaireaux.

Dans la zone sud, les populations de sangliers et de cerfs semblent les plus à risque, notamment à cause de leur densité assez élevée, la capacité élevée d'excrétion pour le cerf, et la prévalence moyenne chez le sanglier.

Par ailleurs, comme nous l'avons vu dans la partie précédente, l'assemblage de ces trois populations a probablement des conséquences épidémiologiques dont il est difficile, dans l'état actuel des connaissances, de mesurer les effets. Compte-tenu des densités environ dix fois plus élevées de cerfs et deux fois plus élevées de sangliers (sur la base des tableaux de chasse) en zone sud par rapport à la zone nord (le différentiel de densité de blaireaux est inversé mais *a priori* moins marqué, sous réserve des incertitudes de nos estimations de densité), nous pouvons supposer que ces interactions seraient plus fortes dans la zone sud. Cependant, d'autres facteurs comme le paysage (pouvant favoriser les contacts dans les zones boisées en zone nord du fait de leur surface plus faible), le niveau de prévalence et la différence d'exposition au compartiment domestique pourraient influencer la dynamique d'infection à l'intérieur de chacune de ces « sous-communautés ». *Nous rappelons donc la nécessité de mieux connaître les interactions existant entre les différentes populations sauvages dans chacune de ces zones.*

L'évaluation du niveau de risque à l'échelle de chacune des zones nord et sud constitue une première approche. Il est cependant peu probable que ce niveau de risque soit homogène au sein de chacune d'elles en raison de variation locale des paramètres utilisés dans l'estimation. Nous pouvons donc envisager d'appréhender le niveau du risque à une échelle plus fine.

2.1.2. A l'intérieur des zones sud et nord

Dans ce paragraphe, nous proposons des pistes pour évaluer le risque à différentes échelles spatiales.

- **Estimation du risque selon les niveaux d'exposition et d'émission**

Les variations locales des niveaux de densité et de prévalence des populations sauvages ainsi que la fragmentation plus ou moins prononcée du paysage, qui pourrait influencer le niveau de contact, influencent la probabilité d'émission tandis que les variations de densité de bovins et leur exposition (temps de présence en pâture, lieux utilisés, présence de points attractifs dans les pâtures) modifient la probabilité d'exposition.

Il est donc envisageable de définir des secteurs relativement homogènes pour chacun de ces paramètres. Si nous considérons la zone sud par exemple, nous constatons qu'il existe une hétérogénéité paysagère et de densité des bovins, avec un gradient décroissant du

nord-ouest vers le sud est, où les élevages sont beaucoup moins nombreux voire absents et où le paysage forestier domine. Sur ces critères, nous pourrions définir différents secteurs comme illustré par la figure 56. Associé à la connaissance des niveaux de densité et de prévalence des populations sauvages, *le niveau de risque pourrait alors être évalué à l'échelle de ces trois secteurs.*

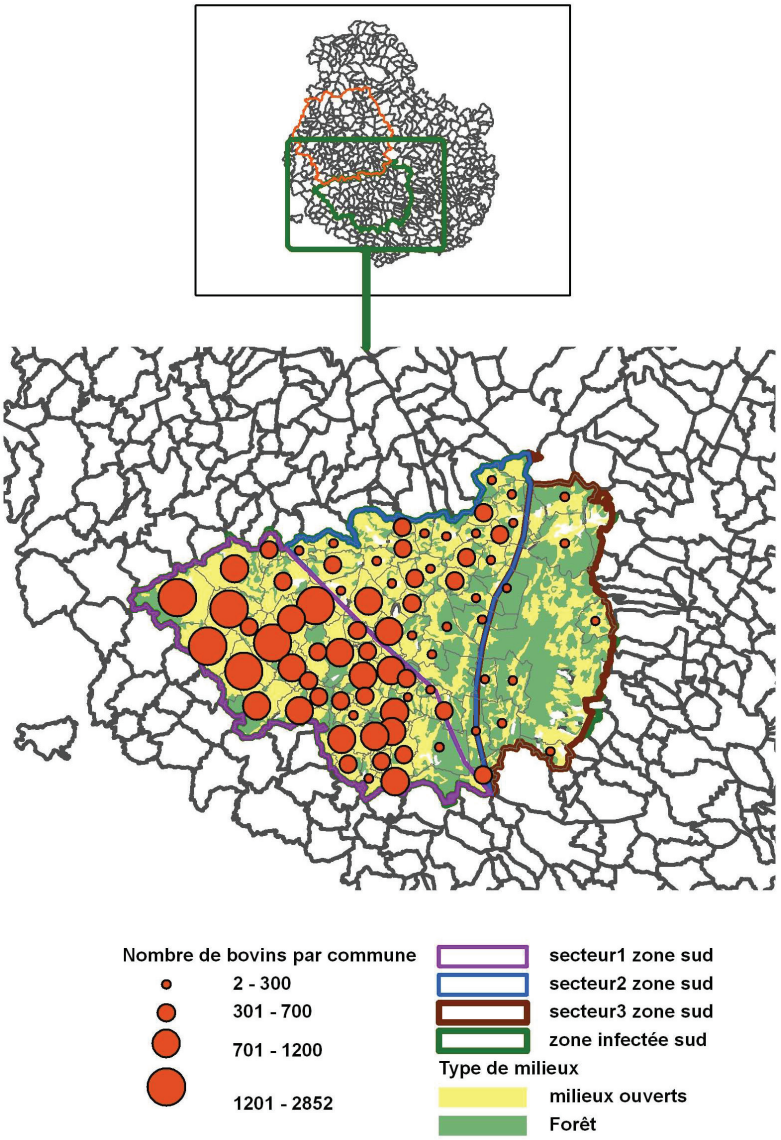


Figure 56 : sectorisation de la partie sud de la zone infectée en fonction du nombre de bovins par commune et du paysage (Sources DDPP 21 et Corine land cover).

➢ A l'échelle des agrégats d'infection

Nous avons vu dans le paragraphe 1 que le comportement social et spatial des blaireaux peut aboutir à une agrégation spatiale de l'infection à l'échelle du groupe. Ce constat, réalisé en Angleterre dans des conditions de plus forte densité, n'a pas été étudié en Côte d'Or. Nous pouvons néanmoins supposer l'existence d'une telle agrégation au vu de l'observation des contrastes importants de niveau de prévalence d'une commune à l'autre au

sein d'une même zone, principalement dans la zone nord. En outre, sur ces sites, des foyers bovins ont été déclarés, parfois à plusieurs reprises faisant suspecter l'existence de poches locales d'infection persistantes dans un système multi-hôtes. *Comme nous l'avons déjà indiqué dans le paragraphe 1, la première étape serait de déterminer l'échelle des agrégats d'infection entre l'infection chez le blaireau et chez les bovins. Ensuite, une évaluation plus précise du risque pourrait être réalisée en déterminant le niveau d'abondance (en recensant le nombre de terriers qui fournit une information sur le nombre de groupes) et le niveau de prévalence à l'échelle des groupes recensés.*

Le niveau de contact pourrait être déterminé sur la base de nos résultats en prenant en compte la distance moyenne entre les terriers et les exploitations.

Concernant les autres populations-hôtes, si l'échelle de l'agrégat d'infection correspond à un ou plusieurs territoires de chasse, les tableaux de chasse de ces territoires pourraient être utilisés comme indices d'abondance des sangliers et des cerfs, bien que cette échelle fine soit potentiellement plus petite que celle des territoires de ces animaux.

- **A l'échelle des exploitations**

La configuration de chaque exploitation pourrait être étudiée au cas par cas en termes de types d'infrastructures présentes, pratiques d'élevage, densité locale des espèces sauvages environnantes afin d'en déduire une gestion du risque la plus adaptée possible. Nous proposons une gradation du risque en lien avec l'utilisation des différents types d'infrastructures d'élevage dans le paragraphe 2.4.

Enfin, il serait également possible de considérer une gradation du risque à l'échelle de la pâture. Le suivi télémétrique a en effet mis en évidence une utilisation hétérogène de celles-ci et il serait intéressant d'explorer quels sites sont préférentiellement utilisés au sein des pâtures par les blaireaux et les sangliers. Si ces sites correspondent à des items identifiables et récurrents, ils pourraient alors orienter la mise en place de mesures visant à réduire le risque de contact entre faune sauvage et bovins sur les pâtures. Une telle étude serait alors complémentaire des travaux réalisés par vidéosurveillance qui ciblaient spécifiquement des points d'abreuvement et d'alimentation.

En conclusion, le choix de l'échelle de l'évaluation du niveau du risque dépend donc de l'échelle à laquelle la gestion du risque est envisagée. L'utilisation de grilles formées par des carrés de surface régulière (25 ou 100 km^2 par exemple) constituant l'unité de l'évaluation du risque et intégrant les différents paramètres conditionnant le risque (prévalence, abondance, excrétion, habitat pouvant refléter le niveau de contact pour chaque population avec les bovins) permettrait de distinguer l'analyse de risque à différentes unités d'échelle spatiale. Une telle carte de risque constituerait un outil de gestion utile pour identifier les secteurs particulièrement à risque pour la transmission interspécifique (White et al. 2008; Ward et al. 2009).

2.2. Caractérisation temporelle du risque

2.2.1. **Limites méthodologiques**

L'étude s'est déroulée entre août 2011 et janvier 2013. Les 10 blaireaux équipés de collier GPS ont été suivis d'août 2011 à mai 2012 et les 11 sangliers d'août 2011 à janvier 2013. Les animaux ont été suivis sur une période maximale de 8 mois. De ce fait, nous n'avons pas de réplicas quant à l'effet des saisons, chaque animal ayant été suivi sur une année donnée. Il en est de même pour la vidéosurveillance, l'étude ayant été conduite entre décembre 2011 et janvier 2013. Nous ne pouvons donc exclure que les effets retenus et estimés soient spécifiques de l'année de l'étude, compte-tenu des variabilités qui peuvent exister d'une année à l'autre. Par exemple, l'hiver 2012 (mois de février) a connu des températures très froides (température minimale jusqu'à -17°C) qui n'ont pas été observées l'année suivante. Ceci a pu influencer le comportement et l'activité des animaux et notamment celle des blaireaux, peu actifs par ces températures (Roper 2010).

La fructification forestière, notamment les glands, a été très importante durant l'automne-hiver 2011-2012 et moins l'année suivante ce qui a probablement influencé le comportement des sangliers pour lesquels ils constituent une ressource essentielle à cette période (Welander 2000; Baubet & Brandt 2009). La variabilité du nombre de nuits à lombrics a également pu entrainer un effet année sur l'utilisation des pâtures.

Nous considérons donc qu'il y a probablement eu un « effet année », que nous n'avons pas pris en compte. Pour les sangliers, cet effet et notamment celui de la glandée a pu être nivelé car sur les onze sangliers suivis, quatre l'ont été en 2011-2012 et 7 en 2012-13. Pour les blaireaux, l'effet des très basses températures en février 2012 a probablement résulté en une moindre activité et donc une moindre fréquentation des pâtures à cette période.

2.2.2. **Evaluation du risque**

Le risque de transmission entre bovins et espèces sauvages est susceptible de varier selon les saisons. Nos résultats ont mis en évidence un effet de la saison ou de la période de l'année sur l'utilisation des pâtures ainsi que sur la fréquentation des infrastructures d'élevage en pâture et en bâtiment et ce, chez toutes les espèces suivies. Nous avons également montré que certaines conditions climatiques influençaient l'utilisation des pâtures par les blaireaux et les sangliers (température pour les blaireaux et conditions favorables à l'accessibilité des lombrics chez les sangliers) (cf. chapitre 2 paragraphe 6.1).

Il existe également une saisonnalité dans la conduite d'élevage, principalement allaitant en Côte d'Or, se traduisant par un temps de pâturage permanent entre mars-avril et novembre-décembre et une rentrée des animaux en bâtiment le reste de l'année, en particulier

au moment des vêlages. Toutefois, quelques élevages, notamment dans la partie sud de la zone infectée, sont au pâturage toute l'année.

En conséquence, le risque de contact entre les populations sauvages et les bovins varie d'une saison à l'autre. Afin de hiérarchiser les saisons à risque pour les bovins d'être en contact indirect avec les populations-hôtes sauvages, nous avons repris les résultats issus de l'utilisation des pâtures et de la vidéosurveillance concernant l'effet des saisons (cf. chapitre 2 partie 6).

Pour chacune des trois espèces blaireau, sanglier et cerf, nous avons appliqué la même méthodologie que pour la caractérisation spatiale du risque entre les zones nord et sud en utilisant la grille AFSSA (2008). Un score qualitatif (de 0 à 9) a été attribué à chaque saison pour chaque estimateur de l'utilisation des pâtures (temps passé par nuit sur les pâtures et surface de pâture dans le domaine vital mensuel sauf pour les cerfs qui n'ont pas été suivis par télémétrie) ainsi que pour la fréquentation des points d'alimentation et d'abreuvement. La valeur du score est fondée sur les prédictions des modèles expliquant ces trois variables (cf chapitre 2 partie 6). Cette valeur est relative, elle permet de classer l'effet des saisons sur ces variables l'une par rapport à l'autre mais ne elle ne représente pas un niveau absolu d'utilisation des pâtures ou de fréquentation des infrastructures d'élevage.

Lorsque d'autres variables interagissaient avec la saison, nous avons précisé les classes les plus à risque ou affecté un score différent selon les catégories.

- **Niveau de risque relatif des contacts interspécifiques faune sauvage-bovins vis-à-vis des saisons**

Le détail et le total des scores attribués figurent dans le Tableau 54.

Tableau 54 : classement de l'effet relatif des saisons sur l'utilisation des pâtures et la fréquentation des points d'alimentation et des points d'abreuvement (les saisons où les bovins se trouvent dans les pâtures figurent en vert) (grille AFSSA 2008)

	Temps passé par nuit sur les pâtures (Utilisation quotidienne)				***Surface de pâture dans le DV mensuel (Utilisation mensuelle)***				***Fréquentation des points d'alimentation et des points d'abreuvement***			
	printemps	été	automne	hiver	printemps	été	automne	hiver	printemps	été	automne	hiver
Cerf	?	?	?	?	?	?	?	?	4	5 (sel +++[b])	3-4	0-1
Sanglier	4	8	6	3 7 si nuit à lombric	5	8	4	3	3-4	7 (point d'eau +++[b])	3	2
Blaireau[a]	8	5	2 si T°min< 5°C 3 si T°min> 5°C	1 si T°min< 5°C 3 si T°min> 0°C	Blaireaux en lisière 8 Blaireaux forestiers 2	Blaireaux en lisière 5 Blaireaux forestiers 4	Blaireaux en lisière 4 Blaireaux forestiers 5	Blaireaux en lisière 7 Blaireaux forestiers 3	4	3	1	5

[a] par simplification et afin d'unifier avec les autres analyses, nous avons considéré que P1= été ; P2= automne ; P3= hiver et P4= printemps

[b] type de point majoritairement fréquenté à cette saison par cette espèce

D'après le tableau 54, l'été et le printemps se dégagent comme étant les deux saisons les plus à risque pour l'utilisation des zones d'élevage par les populations sauvages de blaireaux, de sangliers et de cerfs. Pour ces derniers, les données concernant l'utilisation des pâtures sont manquantes. Cependant, en extrapolant les observations issues de la vidéosurveillance et sur des bases bibliographiques (Licoppe & Crombrugghe 2003; Berentsen et al. 2013) nous pouvons faire l'hypothèse que le printemps et l'été seraient également plus propices à l'utilisation des pâtures que l'hiver.

Sachant que les bovins se trouvent sur les pâtures du milieu du printemps à la fin de l'automne, nous pouvons en déduire que le risque de contact indirect entre les bovins et les populations sauvages étudiées est maximal au printemps et en été.

En détaillant par espèce, nous constatons que le risque lié au blaireau serait maximum au printemps sauf en milieu forestier où l'automne serait plus à risque. L'attractivité des points d'alimentation pour les blaireaux est plus forte en hiver et peut donc constituer un risque de contact par l'aliment en pâture ou en bâtiment.

Le risque lié au sanglier est prédominant en été, que ce soit dans l'utilisation des pâtures ou les contacts avec les infrastructures d'élevage. Parmi ceux-ci, les points d'eau ressortent nettement comme les types de points les plus fréquentés à cette période.

Enfin, le risque lié au cerf que nous ne pouvons juger que sur la base des visites sur les points d'abreuvement et d'alimentation, semblerait maximum en été, les pierres à sel étant le point de contact le plus à risque parmi les types de point surveillés.

- **Persistance de *M. bovis* dans l'environnement**

Les études de survie de *M. bovis* réalisées dans différentes conditions de température, d'humidité et d'ensoleillement dans des substrats naturels montrent que les conditions les plus propices à la persistance de la bactérie sont une température basse, un faible taux d'ensoleillement et une hygrométrie élevée (Duffield & Young 1984; Jackson et al. 1995; Fine et al. 2011). Ainsi, dans le Michigan, la période au cours de laquelle la survie de *M. bovis* est la plus longue (isolement de la bactérie jusqu'à 88 jours après inoculation dans le sol) se rapproche des conditions rencontrées au cours de la période hivernale de la Côte d'Or. En été par des températures élevées (20°C en moyenne et fort ensoleillement), le bacille ne persiste dans le sol que 11 jours. Cependant, dans l'eau, même dans ces conditions, *M. bovis* a été retrouvé après 48 jours, indiquant que ce substrat est particulièrement protecteur pour la bactérie, de même que le sol humide qui la protège de la dessiccation et la met à l'abri des radiations U.V. (Fine et al. 2011).

A la lumière de ces études, il apparaît que la saison qui permettrait en Côte d'Or une durée de survie plus longue serait l'hiver, ce qui ne coïncide pas avec la présence des bovins sur les pâtures ni avec le maximum de fréquentation des sites d'élevage par les

populations sauvages. Nous avons cependant vu que les sangliers utilisaient les pâtures en hiver lorsque les conditions étaient favorables aux lombrics, donc par temps humide. De plus, lorsqu'ils vermillent, les sangliers peuvent contaminer les couches plus profondes du sol et la durée de survie dans ces conditions serait compatible avec un sol de pâture potentiellement encore infectant (sous réserve du nombre de bacilles viables qui ont été excrétées) lorsque les bovins sont remis à l'herbe au printemps.

L'été serait la saison la plus défavorable à la survie de *M. bovis* en Côte d'Or mais permettrait tout de même une survie de la bactérie de plusieurs jours si l'on considère que la durée d'ensoleillement et la température sont plus basses que dans le Michigan et que le temps est plus humide. De plus, les abreuvoirs et les points d'eau sont beaucoup plus visités en été par les sangliers et dans une moindre mesure par les cerfs qui peuvent y excréter *M. bovis* lorsqu'ils boivent, se baignent ou fouillent le sol. Le niveau élevé de fréquentation par les sangliers (fréquence des visites et nombre d'individus) à cette saison et la forte capacité d'excrétion des cerfs associée à la durée prolongée de survie de *M. bovis* dans l'eau pourraient conduire à une contamination de l'eau de boisson des bovins par *M. bovis* par ces deux espèces. En période de sécheresse, ce risque pourrait être accru par une moindre disponibilité des ressources naturelles en eau poussant les populations sauvages à davantage s'abreuver sur les points d'eau approvisionnés pour les bovins.

Comme nous l'avons déjà indiqué précédemment, une étude de la persistance de M. bovis dans les conditions climatiques et les substrats rencontrés dans la zone infectée de Côte d'Or permettrait une évaluation plus précise de ce risque.

Sur la base de la bibliographie, nous avons réalisé une évaluation de risque qualitatif de rémanence de *M. bovis* dans l'environnement aux différentes saisons. Ici encore, il s'agit d'un risque relatif, comparant la durée de persistance d'une saison à l'autre en Côte d'Or sur une échelle de 0 à 9 (AFSSA 2008) (Tableau 55).

Tableau 55 : évaluation qualitative de la persistance de *M. bovis* dans l'environnement selon la saison (selon la grille AFSSA, 2008)

	Printemps	***Eté***	***Automne***	***Hiver***
Persistance de *M. bovis* dans l'environnement	3-5	1-3	4-6	7-9

- **Saisonnalité du nombre d'animaux excréteurs**

Nous avons vu que la tuberculose à *M. bovis* était une maladie d'évolution chronique avec des périodes de latence plus ou moins longues. La transition vers un stade plus avancé de la maladie pouvant entrainer une excrétion de la bactérie peut-être liée à des conditions de stress d'origine interne (physiologique) ou externe (environnementale) (Gallagher et al. 1998; Gavier-Widén et al. 2009). En cela, les variations saisonnières de disponibilité des ressources, le cycle de vie des animaux ainsi que la périodicité de facteurs

anthropogéniques comme la chasse peuvent induire une variabilité temporelle dans l'excrétion de *M. bovis* chez les populations sauvages.

Il a ainsi été montré en Angleterre, dans un suivi longitudinal de l'infection au sein d'une population de blaireaux, que le risque pour un animal d'être un cas incident exposé (*i.e.* fournissant un résultat positif au test sérologique) et excréteur (*i.e.* fournissant une culture positive à partir d'un excréta) était plus élevé au printemps et plus faible en hiver. Les auteurs expliquent ce résultat par un stress physiologique du à la période de lactation chez les femelles et à une activité sexuelle (recherche de partenaires) et territoriale accrue rendant les animaux plus sensibles (Delahay et al. 2013). L'activité sexuelle est également génératrice d'interactions intraspécifiques agressives entre mâles pouvant entrainer des morsures qui représentent un mode de transmission de la tuberculose fréquent chez les blaireaux (Jenkins et al. 2012). En outre, il est cohérent qu'en hiver, période de moindre activité et de confinement des groupes dans leur terrier, la faible exposition à des sources extérieures d'infection ne favorise pas l'apparition de nouveaux cas (Delahay et al. 2013).

Cette dynamique temporelle de l'infection chez le blaireau accentuerait le risque de transmission au printemps, d'autant plus que cette saison correspond également à une activité intense de marquage territorial dans les latrines et donc à une possibilité accrue d'excrétion de *M. bovis* par l'urine et les fèces de blaireaux sur les pâtures.

Dans le sud de l'Espagne, la proportion de sangliers tuberculeux et parmi ceux-ci, la proportion d'individus présentant une tuberculose généralisée a été plus élevée au cours des années les plus sèches. Cette association entre l'ampleur de l'infection et ce facteur climatique peut s'expliquer par une rareté des ressources conduisant à un état de sous-nutrition favorisant la progression de la maladie par baisse de l'immunocompétence. Cette association n'a pas été retrouvée chez le cerf (Vicente et al. 2013).

En Côte d'Or, l'hiver représente probablement la saison où les ressources sont les moins disponibles pour le sanglier (sauf lors d'année à glandée très importante). De plus, la période de mise-bas et de lactation se déroule généralement en hiver (Servanty et al. 2009). Cette saison correspond donc à la fois à des conditions climatiques plus rudes, à un stade physiologique plus fragile chez les femelles suitées et à la période de chasse génératrice de stress (Stankowich 2008). L'ensemble de ces conditions pourrait conduire à une baisse de l'état corporel et de l'immunocompétence et ainsi augmenter la sensibilité des individus (Martin et al. 2008). Les marcassins issus des mises-bas d'hiver pourraient alors être plus exposés et, étant eux-mêmes plus sensibles à l'infection en raison de leur âge (Martín-Hernando et al. 2007; Zanella, Duvauchelle, et al. 2008), ils pourraient amplifier l'infection à cette saison.

Chez les cerfs, les périodes de stress physiologique correspondent au printemps et à l'été pour les femelles en lactation et à la saison du rut, en fin d'été et au début d'automne

pour les mâles. Ces périodes pourraient correspondre à une plus grande sensibilité des individus à l'infection et entrainer une plus forte excrétion.

Des suivis transversaux et longitudinaux réalisés sur chacune des ces populations permettrait d'estimer l'incidence de l'infection et de mieux comprendre les déterminants intrinsèques (comme l'âge, le sexe et d'éventuelles coïnfections) et extrinsèques (facteurs temporels et environnementaux) de l'expression clinique de la maladie et donc de la capacité d'excrétion.

Les variabilités de l'excrétion selon les saisons, évaluée selon la grille de l'AFSSA (2008) figurent dans le tableau 56. Nous avons pris en compte la capacité d'excrétion évaluée auparavant (élevée pour blaireau, très élevée pour le cerf et modérée pour le sanglier, cf. paragraphe 1) et l'avons modulée en fonction des saisons.

Tableau 56 : évaluation qualitative de la probabilité d''excrétion de *M. bovis* par les blaireaux, sangliers et cerfs en fonction des saisons (AFSSA 2008)f

	Printemps	***Eté***	***Automne***	***Hiver***
Cerf	7-9	7-8	7-8	7-8
Sanglier	3-5	3-5	3-5	5-7
Blaireau	6-8	5-7	5-7	2-4

- **Conclusion : estimation du risque de transmission des populations sauvages aux bovins selon les saisons**

Afin de comparer le risque de transmission de *M. bovis* des populations sauvages vers les bovins entre les différentes saisons, nous avons synthétisé les variations saisonnières des paramètres exposés précédemment pour chaque espèce. Compte-tenu des différences de contact entre les blaireaux forestiers et les blaireaux vivant en lisière de pâture, nous avons distingué ces deux catégories de blaireaux. Pour les bovins, nous avons évalué l'exposition et considéré qu'elle était élevée quand les bovins étaient en pâture (8) et quasi nul à minime (1 à 2) en hiver lorsqu'ils sont en bâtiment (sachant que les visites en bâtiments étaient très rares et concernaient essentiellement les blaireaux). Cette synthèse est représentée sur les figures 57,58 et 59.

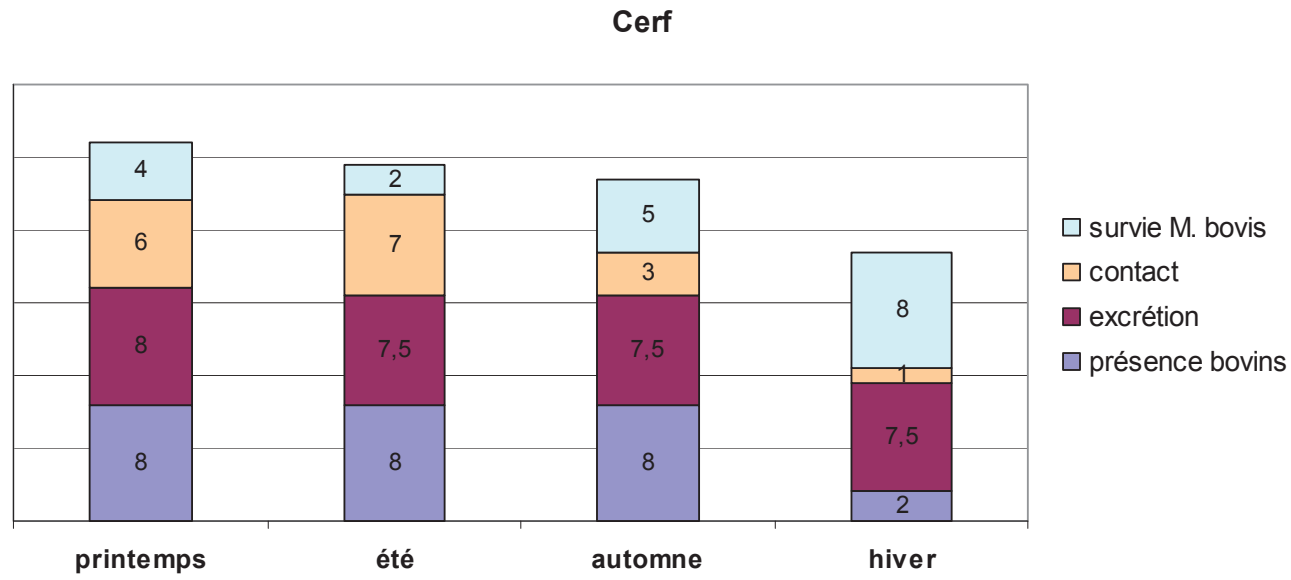


Figure 57 : synthèse du risque qualitatif (AFSSA 2008) relatif de transmission de *M. bovis* entre cerfs et bovins selon les saisons (les valeurs des scores correspondent aux valeurs médianes des intervalles fournis).

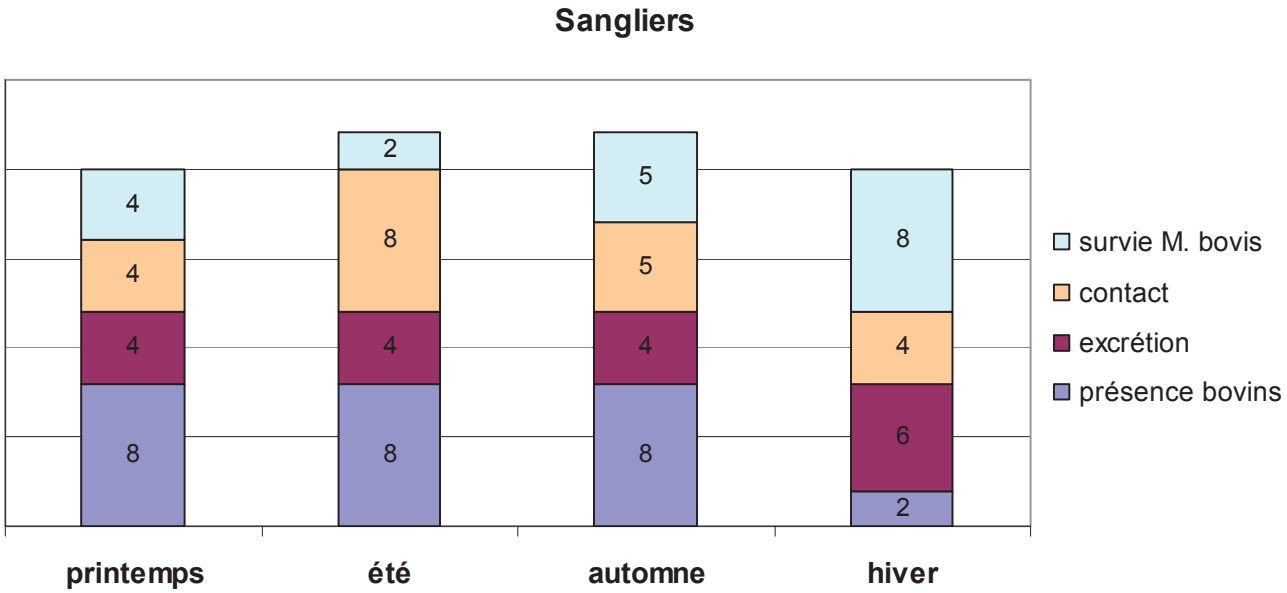


Figure 58 : synthèse du risque qualitatif (AFSSA 2008) relatif de transmission de *M. bovis* entre sangliers et bovins selon les saisons (les valeurs des scores correspondent aux valeurs médianes des intervalles fournis).

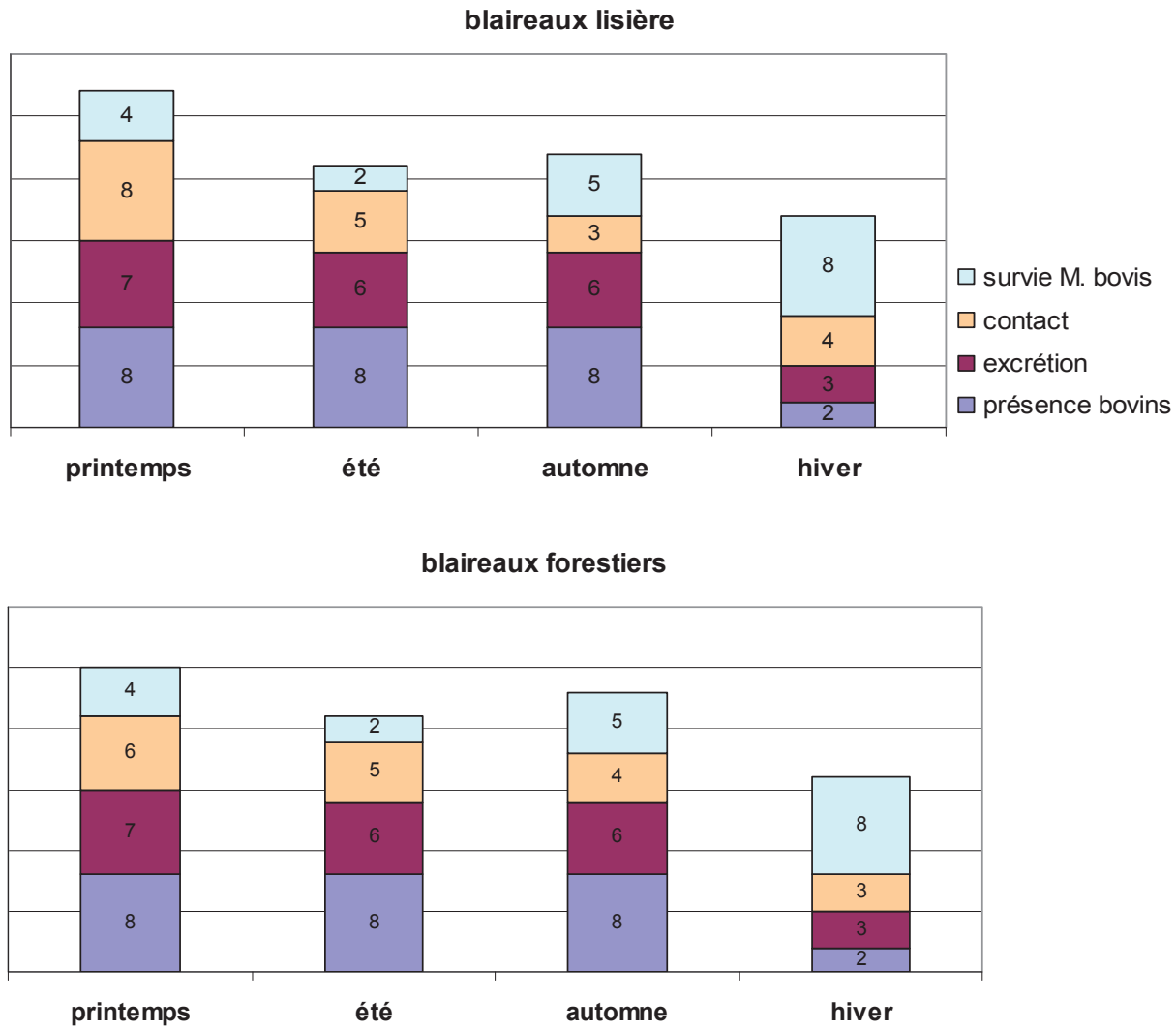


Figure 59 : synthèse du risque qualitatif relatif (AFSSA 2008) de transmission de *M. bovis* entre blaireaux et bovins selon les saisons (les valeurs des scores correspondent aux valeurs médianes des intervalles fournis)

Compte-tenu des limites de la méthode et des incertitudes que nous avons sur certains paramètres et leur effet cumulatif, ces résultats doivent être pris avec précaution. Il se dégage néanmoins que pour le cerf, le printemps, l'été et l'automne auraient un niveau de risque très proche, l'hiver serait moins propice à la transmission-retour, principalement du fait de l'absence des bovins sur les pâtures. L'été et l'automne seraient les saisons la plus propices pour la transmission interspécifique entre sangliers et bovins. Le printemps et l'automne seraient plus à risque pour la transmission entre blaireaux et bovins.

2.3. Caractérisation des pratiques d'élevage à risque

Nous avons souligné dans le paragraphe 6.2 du chapitre 2 que les sites n'ayant pas été choisis au hasard, nos résultats issus de la vidéosurveillance illustraient probablement des situations particulières permettant d'identifier des facteurs de risque de contacts avec la faune sauvage. Nous avons par ailleurs observé une fréquentation très hétérogène selon les sites. La description de ces sites les plus fréquentés en termes de localisation et de configuration géographique, ainsi que les pratiques particulières identifiées nous permettent d'émettre des hypothèses sur les éléments qui sembleraient représenter un risque accru de fréquentation par la faune sauvage.

Nous proposons dans un premier temps un tableau décrivant de manière relative et qualitative l'attractivité des différents points d'alimentation et d'abreuvement en fonction des espèces en nous fondant sur les résultats de la vidéosurveillance. Une estimation du risque lié à l'utilisation de chacun de ces points a ensuite été réalisée avec la grille de l'AFSSA (2008). Puis nous avons décrit les caractéristiques des sites les plus fréquentés nous semblant favoriser la fréquentation par la faune sauvage, à la lumière de la bibliographie.

2.3.1. **Attractivité des points d'alimentation et d'abreuvement et évaluation du risque de transmission lié à leur utilisation par la faune sauvage**

Nous avons utilisé la même méthodologie que précédemment pour caractériser chaque point en fonction de son niveau de fréquentation pour chaque espèce. La valeur du score affecté est fondée sur les prédictions des modèles expliquant les visites de blaireaux, de sangliers et de cerfs (cf. chapitre 2 paragraphe 6.2). Cette valeur est relative, elle permet de classer les types de points les uns par rapport aux autres et entre espèce mais ne elle ne représente pas un niveau de fréquentation des infrastructures d'élevage. Lorsque d'autres variables interagissaient avec le type de point (saison), nous avons précisé les classes les plus à risque. L'intensité des contacts dépendant du temps de contact, donc de la fréquence et de la durée des visites ainsi que du nombre d'individus présents à chaque visite, nous avons pris en compte chacun de ces éléments auxquels nous avons attribué un score selon l'échelle ordinale de l'AFSSA (2008), puis nous avons à nouveau utilisé cette échelle pour estimer dans quelle mesure le comportement observé pouvait induire l'excrétion de *M. bovis*. Par exemple, si la consommation est le comportement majoritaire, le score est maximal, en revanche, le passage devant le point correspond à score minimal. Nous avons ensuite combiné cette estimation à la capacité d'excrétion de chaque espèce (cf. Tableaux 48, 50 et 52) pour en déduire une estimation de l'opportunité d'excrétion sur chaque point. Puis, nous avons indiqué la moyenne et les valeurs extrêmes du nombre d'individus par visite. Enfin concernant la survie de la bactérie dans l'environnement, en l'absence d'étude spécifique à la Côte d'Or, nous nous fondons comme précédemment sur la bibliographie (Jackson et al. 1995; Phillips et al.

2003; Fine et al. 2011). L'eau et le sol humide sont favorables à une plus longue survie de la bactérie (plusieurs mois, qualificatif ordinal : 7-8). Nous considérons, par ailleurs, qu'au niveau des bâtiments d'élevage, les céréales stockées en hangar et le fumier permettent une durée de vie intermédiaire de la bactérie (de l'ordre de plusieurs semaines, 5-6 sur l'échelle de l'AFSSA). Enfin, les bacilles excrétés au niveau de pierres à sel ou dans l'herbe proches des auges ou des nourrisseurs auraient une durée de vie correspondant à celle établie sur les pâtures.

A partir de tous ces éléments, nous avons estimé qualitativement le risque de transmission de l'infection lié à l'utilisation des différents points pour chacune des espèces (Tableau 57).

Tableau 57 : Estimation qualitative relative du risque de transmission de *M. bovis* des blaireaux, sangliers et bovins selon les points d'alimentation et d'abreuvement fondée sur le niveau de fréquentation, la durée des visites et l'opportunité d'excrétion de *M. bovis* (établie en fonction du comportement observé et de la capacité d'excrétion). Les chiffres en gras correspondent au score qualitatif attribué selon la grille de l'AFSSA (2008).

		auge	***nourrisseur***	***sel***	***abreuvoir***	***point d'eau***	***bâtiment***	***Nombre d'individus par visite[e] Moyenne (Min-max) score***
blaireau	Niveau fréquentation	**5**[b]		**3**	**1**	**4**	**3**	1 (1-2)
	Durée visite[a]	4 min (**4-5**)	0,1 min (**1**)	0,2 min (**1**)	0,2 min (**1**)	0,2 min (**1**)	4 min (**4-5**)	
	Opportunité d'excrétion	**8**	**1-2**	**1-2**	**1-2**	**8**	**8**[c]	3
	Persistance de *M. bovis*	**3-4**	**3-4**	**3-4**	**7-8**	**7-8**	**5-6**	
sanglier	Niveau fréquentation	**2**[b]		**4** été +	**5** printemps+ été +	**7** été ++++	**3**[d] automne +	5 (1-28)
	Durée visite[a]	12 min (**6**)	9 min (**5-6**)	4 min (**4-5**)	11 min (**6**)	6 min (**4-5**)	290 min[d] (**9**)	
	Opportunité d'excrétion	**6**	**2**	**5**	**6**	**6**	**6**	7
	Persistance de *M. bovis*	**3-4**	**3-4**	**3-4**	**7-8**	**7-8**	**5-6**	
cerf	Niveau fréquentation	**3**[b] automne ++ Eté +		**5** printemps+++ été ++	**2-3**	**0**	**0**	2 (1-5)
	Durée visite[a]	0 (**0**)	0,3 min (**1**)	17 min (**6-7**)	6 min (**4-5**)	**0**	**0**	
	Opportunité d'excrétion	**0**	**3**	**8**	**8**	**0**	**0**	4
	Persistance de *M. bovis*	**3-4**	**3-4**	**3-4**	**7-8**	**7-8**	**5-6**	

[a] correspond à une durée minimale compte-tenu de la méthodologie (cf.chapitre 2 paragraphe 6.2)
[b] types de point fusionnés en une seule variable dans le modèle
[c] nous avons considéré que les blaireaux venaient s'alimenter sur les réserves de céréales même si nous ne l'avons pas observé directement
[d] le point visité en bâtiment par les sangliers correspond à un tas de fumier
[e] nous n'avons pas distingué ce nombre en fonction des types de points car nous n'avons montré de différences que pour le sanglier (cf.chapitre 2 paragraphe 6.2)

- **Attractivité des différents types de points**

D'après le Tableau 57, nous constatons que l'attractivité des différents points est variable en fonction des espèces. Les blaireaux semblent davantage attirés par les auges, les sangliers par les points d'eau et les cerfs par le sel. Comme nous l'avons déjà souligné, les variations saisonnières de cette attractivité traduisent probablement des besoins physiologiques spécifiques associés à une variation de la disponibilité des ressources naturelles.

Auges et nourrisseurs

Concernant les points d'alimentation, il apparaît que les auges sont plus attractives que les nourrisseurs et qu'on y observe davantage de comportements potentiellement excréteurs. Les nourrisseurs n'ont en effet occasionné que très peu de comportements de consommation des aliments qui y sont distribués. Les aliments peuvent tomber facilement à terre lorsqu'ils sont distribués dans les auges, ou lorsque les vaches les consomment. Dans les nourrisseurs, les rebords sont plus hauts et le dispositif est tel que les veaux souvent coincés par leurs congénères, sont maintenus la tête au-dessus du nourrisseur pendant qu'ils mangent, minimisant la quantité d'aliment qui tombe à terre.

Pierres à sel

Les pierres à sel sont très attractives pour les cerfs et dans une moindre mesure pour les sangliers. Les blaireaux ne semblent en revanche pas attirés par cette ressource (les visites observées correspondent juste à des passages et aucune consommation ou fouille autour de la pierre n'a été observée).

Points d'abreuvement

Parmi les différents types de points d'abreuvement surveillés, le point d'eau a davantage attiré les sangliers que les abreuvoirs, même si ceux-ci restent tout de même attractifs pour cette espèce. La possibilité pour les sangliers de boire, se baigner et fouiller dans les points d'eau explique certainement cette forte fréquentation, particulièrement en été.

La hauteur des abreuvoirs utilisés pour les bovins ne semble pas leur poser de problème pour y boire et les abords souvent boueux peuvent aussi favoriser la fouille et le bain. Pour les cerfs, les abreuvoirs semblent plus attractifs que les points d'eau. Nous pouvons faire l'hypothèse que l'eau plus propre des abreuvoirs et le fait que cette espèce n'ait pas les mêmes besoins de thermorégulation que le sanglier orientent leur choix vers les abreuvoirs où l'eau leur est, de plus, facilement accessible. Pour les blaireaux, en revanche, le manque d'accessibilité des abreuvoirs est certainement un frein à leur fréquentation et expliquerait qu'ils viennent plutôt sur les points d'eau.

Bâtiments

Sur les trois espèces étudiées ici, ce sont essentiellement les blaireaux qui ont fréquenté les bâtiments. Ceux-ci n'ont été vus que visitant des réserves de céréales se trouvant en bâtiment couvert mais facilement accessibles. Nous n'avons pas vu de blaireaux se promenant sur les ensilages de maïs, pourtant très accessibles car toujours installés en extérieur dans la cour de la ferme. Le type d'aliment (céréales) semblerait donc être plus déterminant que son apparente accessibilité mais cela resterait à confirmer en surveillant d'autres sites.

Les visites de sangliers dans un bâtiment ne concerne qu'un site et n'ont été observées que 2 nuits d'affilée (sur 26 nuits de surveillance) sur un tas de fumiers à côté d'un bâtiment d'élevage. Ce résultat souligne néanmoins l'attractivité que cette ressource peut avoir sur les sangliers puisque les deux visites ont duré entre 229 et plus de 330 minutes (les batteries ont été déchargées avant le départ des sangliers). La richesse du fumier en larves d'insectes pourrait expliquer cette attractivité. Par ailleurs, le contact de sangliers avec ce substrat peut représenter un risque de transmission des bovins vers les sangliers si *M. bovis* est excrété dans les bouses (Phillips et al. 2003).

- **Estimation du niveau de risque de transmission associé à la fréquentation des infrastructures d'élevage**

Nous avons représenté le risque de transmission de *M. bovis* des différentes espèces vers les bovins pour chaque type de point en cumulant les différents paramètres estimés dans le tableau 57. Nous gardons les mêmes réserves que précédemment sur les limites de la méthode ainsi que sur les incertitudes que nous avons sur certains paramètres et leur effet cumulatif. Lorsque l'écart de niveau de risque apparaît important entre différents points pour une même espèce, cette représentation oriente cependant sur les points qui seraient les plus à risque pour la transmission de *M. bovis* entre ces espèces sauvages et les bovins.

Ainsi, chez le cerf, le risque le plus élevé serait lié à l'utilisation des abreuvoirs et des pierres à sel (Figure 60). Chez le sanglier, l'utilisation des points d'eau et des abreuvoirs représenterait le risque de transmission le plus élevé (Figure 61) tandis que pour le blaireau, la fréquentation des auges, des bâtiments et des points d'eau ressort comme la plus propice à transmettre *M. bovis* aux bovins par rapport aux autres points considérés (Figure 62).

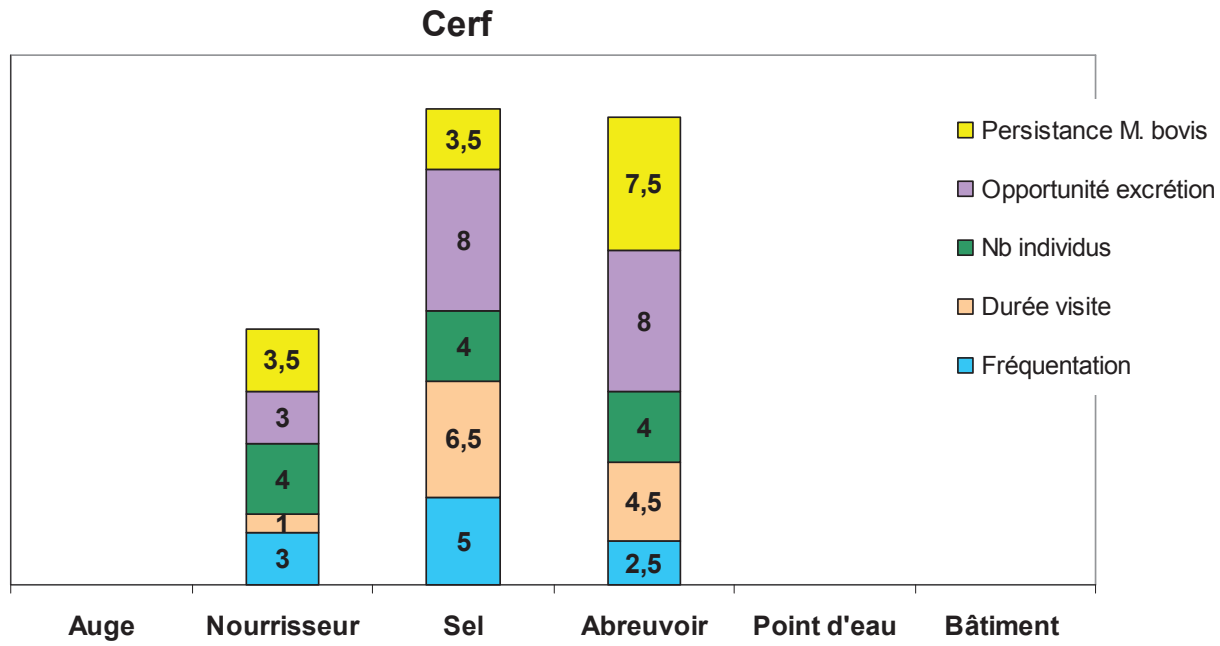


Figure 60 : synthèse de l'évaluation du risque qualitative (AFSSA 2008) de transmission de *M. bovis* entre cerfs et bovins lié à l'utilisation de différentes infrastructures d'élevage.

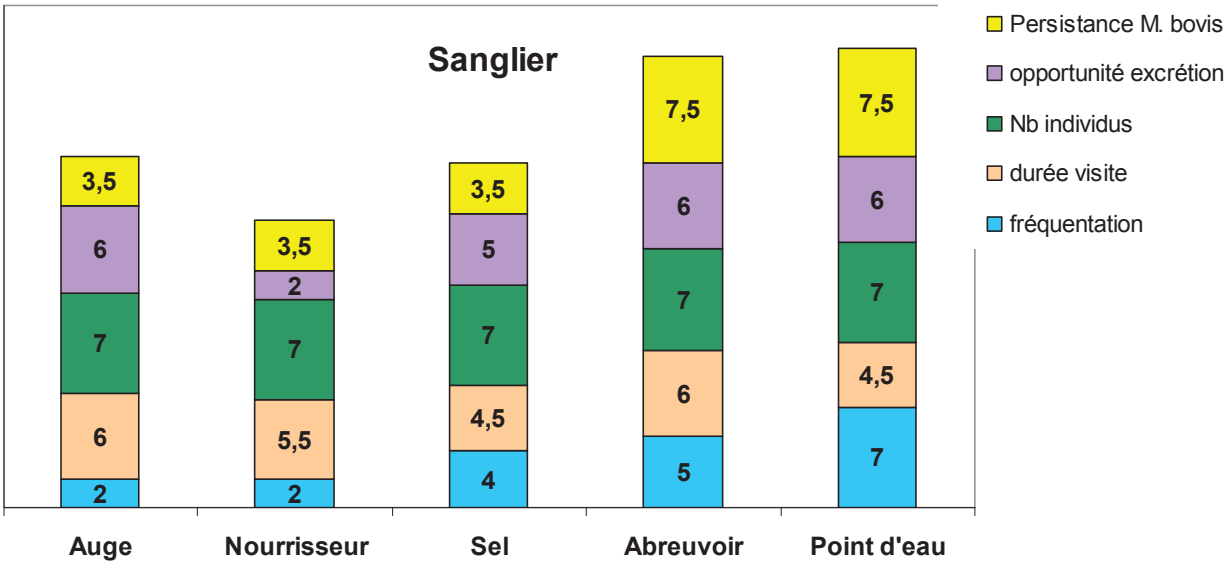


Figure 61 : synthèse de l'évaluation du risque qualitative (AFSSA 2008) de transmission de *M. bovis* entre sangliers et bovins lié à l'utilisation de différentes infrastructures d'élevage (nous n'avons pas fait figurer la visite en bâtiment du fait de son caractère ponctuel).

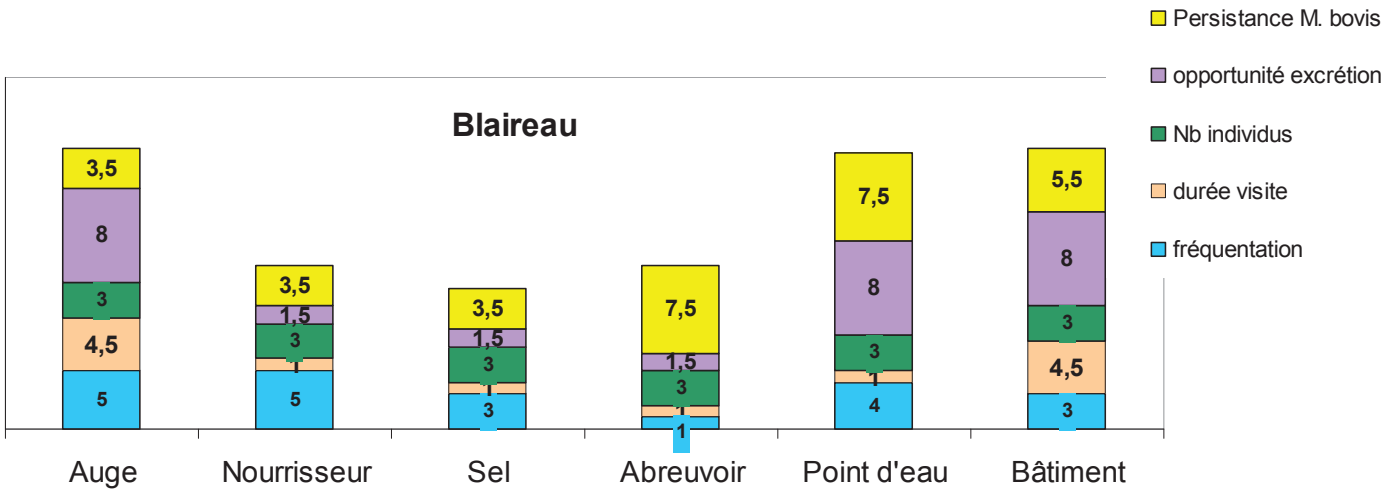


Figure 62 : synthèse de l'évaluation du risque qualitative (AFSSA 2008) de transmission de *M. bovis* entre blaireaux et bovins lié à l'utilisation de différentes infrastructures d'élevage.

2.3.2. **Caractérisation des sites à risque**

Dans ce paragraphe, nous avons caractérisé les sites en termes de contexte démographique et géographique, d'accessibilité des points d'alimentation et d'abreuvement et de conduite d'élevage, ayant concentré le plus de visites afin de dégager des hypothèses sur les facteurs de risque d'attractivité pour la faune sauvage.

- **Contexte démographique et géographique**

Nos résultats n'ont pas mis en évidence d'effet de la zone (nord ou sud) sur la fréquence de visites en dehors des renards (cf. chapitre 2 paragraphe 6.2) (cette variable n'a pas été testée pour les cerfs). Bien qu'il soit possible que nous ayons manqué de puissance pour mettre en évidence l'effet de cette variable, ce résultat associé à la forte hétérogénéité de la fréquentation entre des sites parfois très proches (quelques kilomètres), témoigne de la nécessité de considérer le risque à une échelle locale.

Densité de blaireaux autour des sites

Nous avons déjà évoqué, les disparités qui peuvent exister entre secteurs, notamment concernant le niveau de densité locale des blaireaux. Ainsi, différentes études en Angleterre et en Irlande ont montré un risque accru d'infection chez les bovins associé à la proximité (entre 500 et 1500 m des parcelles) ou la densité (supérieure à 3 par km^2) de terriers actifs (Martin et al. 1997; Reilly & Courtenay 2007; Vial et al. 2011).

Dans la présente étude, la distribution et la densité des terriers autour des exploitations n'ont pas été mesurées. Sur le site où 26% des visites de blaireaux ont été observées et le seul où ils ont été vus pénétrer dans les bâtiments, nous avons pu constater que trois terriers étaient distants de moins de 1000 m des bâtiments et à moins de 100 m des

pâtures dans des petits bois en lisière. Néanmoins les bâtiments visités n'étaient pas directement mitoyens de pâture ou de bois. Nous ne pouvons tirer une quelconque conclusion à partir de cette donnée trop partielle.

Le recensement systématique des terriers dans un périmètre de 1500 m autour des exploitations (infectées et non infectées) permettraient de confirmer ou d'infirmer si la présence de terriers proches de l'exploitation constitue effectivement un facteur de risque d'infection pour les bovins.

Configuration paysagère

Un autre site a comptabilisé 46% des visites de blaireaux et 51% des visites de sangliers. Ce site correspond à une pâture localisée en zone sud, située en lisière de massif forestier, bordée par des cultures et comprenant, à l'intérieur, des petits massifs de forêts. Reilly & Courtenay (2007) ont montré, en Angleterre, que la présence de milieux variés (prairie, bois, terres cultivées, taillis) au sein d'une exploitation était associée à un risque accru d'infection des cheptels bovins. La configuration spécifique de cette pâture réunissant des milieux favorables aux blaireaux et aux sangliers (ainsi qu'aux chevreuils qui ont également beaucoup fréquenté ce site) pourrait être une des explications de sa forte fréquentation par la faune sauvage. De plus, cette pâture comportait plusieurs points attractifs (auge, pierre à sel et abreuvoir) situés de part et d'autre de la parcelle, les animaux devant la traverser pour passer de l'un à l'autre.

Nous pouvons faire l'hypothèse qu'une pâture ou un bâtiment se trouvant entouré d'un assemblage de milieux variés pouvant offrir différentes ressources et habitats pour la faune sauvage augmente la probabilité que les animaux la traverse pour rejoindre ces différents milieux. Si des points d'alimentation ou d'abreuvement s'y trouvent, ces sites seront d'autant plus attractifs et pourront être « enregistrés » et transmis aux congénères comme lieu de ressource potentielle pour ces animaux (Berentsen et al. 2013).

Bien que nous n'ayons pas mis en évidence d'effet de la proximité (500m) de la lisère (peut-être par limite méthodologique) sur la fréquentation des infrastructures d'élevage (cf. chapitre 2, paragraphe 6.2), nous avons cependant constaté, et ce particulièrement pour les cerfs, que la grande majorité des sites visités se trouvait à proximité immédiate d'une forêt, voire que la pâture incluait une partie de la lisière. Ce facteur paysager a déjà été souligné comme un facteur de risque des interactions entre faune sauvage et domestique dans le Michigan pour les interactions bovins-cerfs de Virginie, en Angleterre entre les blaireaux et les bovins ou encore en Nouvelle-Zélande entre phalangers-renards et bovins (Porphyre et al. 2008b; Ward et al. 2010; Brook et al. 2013).

- **Accessibilité des points**

Nous avons pu constater que sur les pâtures, certains des sites les plus visités comportaient des clôtures de fils barbelés en mauvais état, présentant des brèches et des piquets mal plantés. Il est cependant difficile sur les pâtures, de mettre en place des clôtures dissuasives pour toutes les espèces à risque de transmission de la tuberculose, compte-tenu de leur différence de taille et de leur capacité à franchir de telles barrières. Aucun des points d'alimentation ou d'abreuvement que nous avons surveillés n'était protégé sauf un point d'eau (où nous avons vu un blaireau s'abreuver et des sangliers passer).

En bâtiment, les lieux visités par les blaireaux correspondaient à un hangar de stockage de blé comportant une porte mais laissant un espace de plus de 30 cm au-dessus de sol ce qui n'était assurément pas dissuasif pour un blaireau. L'autre lieu de stockage de céréales visité était totalement ouvert sur l'extérieur (au bord d'une route). En Angleterre, des études ont montré que la mise en place de panneaux en aluminium galvanisé ou de clôtures électrifiées empêchaient significativement l'accès des blaireaux aux stocks d'aliments et aux stabulations faisaient baissé de manière significative les nombre de visites dans les fermes (Tolhurst et al. 2008; Judge et al. 2011).

La hauteur des auges ou des abreuvoirs n'a pas semblé être un élément déterminant de la fréquentation de ces points. En dehors de renards, nous n'avons observé aucun animal manger ou sauter directement dans une auge même si la hauteur pouvait théoriquement le leur permettre. En Angleterre, des blaireaux ont été observés grimpant (jusqu'à une hauteur de 115 cm), mangeant et déféquant dans des mangeoires de bovins (Garnett et al. 2002; Garnett et al. 2003).

Lorsque les auges étaient situées contre la clôture et proche d'une lisière, les animaux arrivant par le bois restaient majoritairement du côté de la lisière (dans la limite de ce que le cadrage de la caméra permettait de voir).

Pour les sangliers et les cerfs, l'abreuvement dans des abreuvoirs d'une hauteur de plusieurs dizaines de centimètres a été observé à de nombreuses reprises, attestant qu'ils sont parfaitement accessibles pour ces animaux. Pour les blaireaux en revanche, cette hauteur est probablement dissuasive et seuls les points d'eau semblent constituer un point d'abreuvement potentiel partagé avec les bovins.

Enfin, le tas de fumier sur lequel une compagnie de sangliers est restée à trois reprises plus de 4h était disposé sur une prairie à l'air libre à quelques mètres des bâtiments d'élevage et était donc complètement accessible pour les sangliers.

- **Conduite d'élevage**

Parmi l'ensemble des sites suivis, onze étaient situés sur une exploitation pratiquant le pâturage à l'année, tous ces élevages se trouvant en zone sud. Vingt visites d'animaux sauvages (4% du nombre total de visites) ont été recensées pendant l'hiver sur des pâtures où les vaches étaient à l'herbe, appartenant à 3 élevages pratiquant le pâturage à l'année ou laissant leur bovins en pâture jusqu'en décembre. Parmi ces vingt visites, dix sept étaient des visites de blaireaux sur une auge et les trois autres étaient des sangliers venus sur une auge, une pierre à sel et un abreuvoir. Ces résultats tendent à montrer que le nourrissage des bovins sur les pâtures en période hivernale est surtout attractif pour les blaireaux. Une explication serait qu'en hiver, les ressources sont plus rares et les blaireaux qui ont une activité ralentie et sortent peu de leur terrier à cette saison (Roper 2010) pourraient être attirés par cette offre alimentaire facilement accessible. En Angleterre les visites de blaireaux sont plus nombreuses au printemps et par temps sec dans les bâtiments et sur les auges mais la période de l'étude où la conduite d'élevages des fermes suivies ne permettaient pas de juger de l'attractivité des auges sur les pâtures en hiver (Garnett et al. 2002; Tolhurst et al. 2009; Judge et al. 2011).

Peu de sangliers sont venus sur ces auges alimentées pendant l'hiver alors qu'ils y sont venus plus fréquemment au printemps (neuf visites). Comme nous l'avons déjà mentionné, l'année du suivi a correspondu à une forte fructification des glands et il est probable que cette ressource ait couvert la majorité de leur besoin nutritionnel à cette période, l'aliment donné aux bovins devenant alors moins attractif.

Au niveau du site le plus fréquenté (pâture comptabilisant 20% du nombre total de visites et environ la moitié des visites de sanglier et de blaireaux), l'aliment des bovins était distribué le soir contrairement à la plupart des autres sites où celui-ci était distribué le matin ou en journée. De ce fait, les reliquats laissés par les bovins et donc disponibles pour la faune nocturne étaient plus importants que pour des auges remplies le matin ou en journée. Cet horaire de distribution pourrait expliquer en partie l'attractivité de ce point d'alimentation et constituerait ainsi un facteur de risque de contact entre les bovins et la faune sauvage. D'autre part, l'abreuvoir, alimenté par une source, était rempli en continu, même en l'absence de bovins sur la pâture pendant une période où les pluies étaient faibles, ce qui a contribué à entretenir l'attractivité du site. Dans le Michigan, l'heure de distribution aux bovins a également montré un tendance à augmenter le risque de visites des cerfs de Virginie sur les exploitations (Berentsen et al. 2013).

2.3.3. **Conclusion**

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont donc permis de caractériser qualitativement le risque de transmission-retour de l'infection à *M. bovis* des populations sauvages vers les bovins. Nous avons également intégré des facteurs estimés à partir de la bibliographie dans une démarche qualitative de l'évaluation du risque. Nous avons précédemment souligné les limites de cette méthode subjective et les résultats de cette évaluation doivent être pris avec précaution, de façon relative. Ils constituent une première approche permettant de prendre en compte tous les paramètres évalués. *Pour aller plus loin et surtout quantifier ces différents risques de transmission, une approche par modélisation, utilisant directement les données chiffrées récoltées dans ce travail pourrait être envisagée*.

Les résultats montrent cependant des tendances qui peuvent orienter les gestionnaires (risque lié au blaireau plus élevé en zone nord au printemps-automne, sur les auges et dans les bâtiments d'élevage; risque lié aux sangliers et aux cerfs plus marqué en zone sud en été sur les points d'eau pour les sangliers et au printemps-été sur les pierres à sel pour les cerfs).

En outre, ces variations de risque spatiales et temporelles dégagées pour chaque espèce se retrouvent combinées au sein d'une communauté d'hôtes interagissant avec les bovins, rendant la gestion du risque plus complexe encore.

3. RECOMMANDATIONS

A l'issue des synthèses qui viennent d'être réalisées sur le rôle de chaque population et la caractérisation du risque de transmission-retour de l'infection aux bovins, nous proposons dans cette partie des recommandations concernant la surveillance de l'infection à *M. bovis* dans les populations-hôtes sauvages (encadrés bleus) permettant une meilleure appréciation du risque ainsi que des préconisations en termes de mesures de gestion.

Ces mesures concernent à la fois des actions de lutte à mener dans les populations sauvages (encadrés jaunes) mais également des mesures de gestion du risque dans les élevages (encadrés verts), à la lumière de nos résultats.

Comme dans les parties précédentes, les pistes de recherche sont écrites en italique.

3.1. Mesures visant à limiter le rôle des populations sauvages dans le système multi-hôtes de M. bovis *en Côte d'Or*

3.1.1. **Dans les populations de sangliers et de cerfs**

3.1.1.1. Propositions de renforcement de la surveillance et résultats attendus

Une stratification de l'échantillon par âge, sexe et zone pourrait être mise en œuvre dans le protocole de surveillance active.

La récolte de ces données permettrait de mieux décrire quels sont les facteurs de risque extrinsèques (densité, paysage) et intrinsèques (âge, sexe) associés à l'augmentation de la prévalence dans les populations de sangliers et de cerfs. La stratification par zone permettrait également de mieux connaître la distribution spatiale de l'infection car il existe à l'heure actuelle des secteurs très peu échantillonnés au cœur de la zone infectée (entre la zone nord et la vallée de l'Ouche).

Concernant la stratification géographique, la périphérie immédiate de la zone infectée (dans un rayon de 20 km en tenant compte des barrières géographiques) pourrait également faire l'objet d'une surveillance afin d'objectiver une éventuelle propagation de l'infection par ces espèces.

Nous soulignons l'importance de la surveillance du secteur des Hautes Côtes en rapport avec le risque de constitution d'une communauté d'hôtes réservoir. Sachant que deux spoligotypes différents circulent désormais dans ce secteur chez le sanglier et le blaireau, la connaissance des spoligotypes des individus infectés permettra d'objectiver si des transmissions interspécifiques sont survenues entre hôtes sauvages (les bovins étant pratiquement absents sur ce secteur).

Enfin, la prévalence de sangliers et de cerfs excréteurs par recherche de M. bovis dans les excrétas (glande salivaire, mucus trachéal et laryngé, fèces) et la connaissance des caractéristiques de l'individu (âge, sexe) permettrait de compléter les premières données acquises dans la présente étude et d'explorer le lien entre l'excrétion et les facteurs intrinsèques.

3.1.1.2. Propositions de mesures de lutte

A la lumière des expériences espagnoles, américaines et australiennes, les deux stratégies mises en œuvre ayant montré un effet notable en terme de baisse de la prévalence de *M. bovis* chez le sanglier et le cerf sont la réduction des densités et la suppression des points d'alimentation ou d'abreuvement, qui sont des facteurs d'agrégation favorisant les

contacts interspécifiques (O'brien et al. 2006; Acevedo et al. 2007; Boadella et al. 2012; Miller & Sweeney 2013). En France, l'expérience de la forêt de Brotonne et des travaux de modélisation réalisés ont également montré que la réduction des densités accompagnée de l'arrêt de l'agrainage et du ramassage des viscères des animaux abattus, aboutissaient à une baisse de la prévalence chez les deux espèces (Hars et al. 2010; ANSES 2011; Zanella et al. 2012).

La configuration géographique et démographique de la Côte d'Or est très différente de celle rencontrée dans ces différents régions, pour autant, la tuberculose étant densité-dépendante, ces facteurs de risque restent valables dans le contexte de la Côte d'Or.

- **Baisse des densités**

Nous avons souligné dans la partie 1 la difficulté à déterminer une valeur seuil de la densité, pour laquelle la tuberculose ne pourrait persister au sein d'une population. Dans cet objectif, des travaux de modélisation ainsi que l'exploration des déterminants du niveau de prévalence seraient des outils nécessaires à cette évaluation. Il conviendrait donc de travailler dans ce sens.

En l'absence de telles données, nous nous limitons aux préconisations déjà établies par l'ANSES (2011), fondées sur l'expérience des situations que nous venons d'évoquer précédemment. Pour le sanglier, le niveau de densité « critique »à ne pas dépasser serait de 10 sangliers / km^2 avant chasse. Pour le cerf, l'ANSES préconise de ne pas dépasser un niveau de densité de 5 à 8 voire de 3 à 5 cerfs / km^2.Ces chiffres, discutables vue l'imprécision à l'origine des estimations, permet toutefois de cibler les secteurs où de très hautes densités de sangliers révélées par des tableaux de chasse très importants réalisés sur plusieurs années, les prédisposent au développement de la tuberculose.

Pour le sanglier, la recherche et l'utilisation d'indicateurs de densité s'affranchissant des biais introduits par la gestion cynégétique des populations, facilement mis en œuvre sur le terrain et reproductibles, seraient souhaitable pour disposer d'outils fiables pour la gestion sanitaire.

En l'absence de tels outils, considérant que nous ne disposons que d'indices d'abondance (tableaux de chasse et IKa), il conviendrait de traduire ces préconisations en « attributions »de bracelets pour les chasseurs et de maintenir ces quotas fixes sur plusieurs années afin d'évaluer leurs effets sur l'évolution de la densité et de la prévalence. Cette évaluation relative et empirique serait un outil complémentaire pour aider à la détermination de la taille critique de la population en dessous de laquelle la tuberculose ne peut persister (Lloyd-Smith, Cross, et al. 2005).

En complément de ces recommandations quantitatives, nous pouvons proposer des préconisations qualitatives pour les catégories d'animaux à cibler dans le but de réduire

plus efficacement les densités et d'éliminer préférentiellement les individus ayant un rôle plus important dans la persistance et la transmission de l'infection. Ainsi Gamelon et al. (2012) ont montré que le tir sélectif des femelles subadultes (entre 30 et 50 kg) et adultes (plus de 50 kg) était la stratégie la plus efficace pour faire baisser la densité des populations de sangliers. Or nous avons vu que les animaux les plus âgés étaient les plus susceptibles d'être infectés. D'autre part, la structure sociale des sangliers, basée sur des groupes matrilinéaires, confère aux laies adultes un rôle central et stable au sein des compagnies. Ces femelles peuvent donc représenter une classe particulièrement à risque pour la persistance de l'infection dans les compagnies.

Le tir sélectif des laies et des biches subadultes et surtout adultes pourrait donc à la fois faire baisser plus efficacement les densités et diminuer le risque de persistance de l'infection dans les populations.

Dans le Michigan, une augmentation des tirs des biches et des jeunes mâles a été mis en œuvre pour limiter la population des cerfs de Virginie (O'brien et al. 2006).

- **Limitation des facteurs d'agrégation**

En Côte d'Or le ramassage des viscères a été mis en place en 2003-04 en zone sud et en 2008-09 en zone nord et l'agrainage est interdit depuis 2011 sur un périmètre limitée à la zone d'infection bovine, étendue en 2012 à une plus large superficie couvrant plus d'1/3 du département. Les points de nourrissage artificiel pouvant constituer des facteurs d'agrégation sont donc aujourd'hui limités. D'autres types de point d'agrégation comme les souilles, dont le substrat humide est probablement favorable à la persistance de *M. bovis*, pourraient constituer des points de contact interspécifiques entre les différents hôtes sauvage qui viennent y boire et s'y baigner.

Un suivi de la fréquentation de ces souilles par vidéosurveillance ainsi que la recherche de M. bovis permettraient d'étudier leur rôle potentiel dans la transmission interspécifique de l'infection dans la communauté d'hôtes sauvages.

Comme nous l'avons constaté, les points d'abreuvement et d'alimentation destinés aux bovins constituent des facteurs d'agrégation dans la mesure où ils sont fréquentés par les différentes populations hôtes et par différents groupes au sein de la même espèce. Les recommandations préconisées dans le paragraphe suivant pour réduire les contacts entre bovins et faune sauvage sont donc également valables à ce titre là.

3.1.2. **Dans les populations de blaireaux**

3.1.2.1. Propositions de renforcement de la surveillance et résultats attendus

Dans la partie 1, nous avons expliqué comment la structure sociale et spatiale des populations de blaireaux conditionnait la dynamique de l'infection dans cette population et nous avons souligné l'importance d'améliorer la connaissance de la distribution de l'infection.

Les objectifs d'une surveillance renforcée seraient ainsi:

- d'estimer la prévalence à l'intérieur des groupes,
- de comparer la prévalence entre groupes adjacents,
- d'estimer la prévalence dans les groupes présents dans un rayon de plusieurs kilomètres autour des foyers bovins récents et plus anciens.

Une telle surveillance permettrait de connaître le degré d'agrégation de l'infection au sein des groupes, entre groupes voisins et entre les foyers bovins et la population de blaireaux voisine. Ces données permettraient de savoir dans quelle mesure le risque d'entretien de l'infection est circonscrit à certains groupes, comme cela semble ressortir des résultats déjà acquis, ou si l'infection est répartie de façon homogène sans regroupement spatial. Par ailleurs, la distance entre les foyers bovins et l'infection chez les blaireaux tout particulièrement dans la zone nord, où le système multi-hôtes bovins-blaireaux est certainement prédominant, apporterait des éléments permettant d'objectiver l'association spatiale qui pourrait exister entre ces foyers bovins et les blaireaux infectés et de connaître l'échelle de cette association.

La surveillance pourra également être stratifiée par secteur à l'intérieur des zones : au niveau des agrégats d'infection, comme cela a déjà été entrepris en 2013 mais également en zone sud entre les différents types de paysages (plus ou moins forestiers, cf. Figure 56). En effet, nous avons souligné le risque de constitution d'une communauté d'hôtes sauvages autonome plus importante sur ce secteur, à laquelle le blaireau pourrait prendre part. Dans ce but, le spoligotypage des souches trouvées sur les individus infectés est une donnée essentielle.

En plus du statut infectieux des animaux, une recherche systématiques de *M. bovis* dans leurs excrétas permettrait de compléter nos connaissances sur la prévalence de blaireaux excréteurs et super-excréteurs et ainsi de mieux juger du risque de transmission intraspécifique et interspécifique.

3.1.2.2.Proposition de mesures de lutte

- **L'expérience des îles britanniques**

L'efficacité de la baisse de la densité des populations de blaireaux a été testée au Royaume-Uni et en Irlande avec des résultats mitigés selon les stratégies et les pays.

Au Royaume-Uni, l'abattage réactif (*i.e.* abattage des blaireaux localisés autour des fermes infectées suite à un foyer) a été accompagné d'une augmentation de l'incidence bovine de 27% à l'intérieur de ces zones par rapport aux zones témoins où aucune action de lutte n'était conduite (Bourne 2007).

La stratégie d'abattage proactif (*i.e.* abattage des blaireaux sur une surface d'au moins 100 km^2 plusieurs années de suite) a conduit à une baisse de l'incidence bovine de 20 à 30% à l'intérieur des zones traitées. Deux tendances se sont montrées significatives : une tendance temporelle avec un bénéfice augmentant de 11,2% par an et une tendance spatiale avec un effet d'autant plus bénéfique que l'on se rapproche du cœur de la zone (bénéfice centripète). Cependant, en périphérie de ces zones d'abattage, l'incidence a augmenté de 9% (Bourne 2007; Jenkins et al. 2010).

La stratégie d'abattage proactif a également montré son efficacité sur le risque de recontamination des élevages, contrairement à l'abattage réactif (Karolemeas et al. 2012). En revanche, les deux stratégies ont été suivies d'une augmentation de la prévalence de l'infection chez le blaireau, surtout en bordure des zones d'abattage (Bourne 2007).

En Irlande, des stratégies similaires ont été testées et les résultats ont montré des effets différents. Le protocole d'abattage proactif a entraîné une baisse progressive de la prévalence de l'infection dans la population de blaireaux ré-emergente alors que dans les zones d'abattage réactif, la prévalence dans la population de blaireaux a augmenté (Griffin et al. 2005; Corner, Clegg, et al. 2008). Cinq ans après le début des abattages, l'incidence chez les bovins a diminué de 60 à 96% selon les comtés dans les zones d'abattage proactif par rapport à la zone de référence où un abattage réactif avait été conduit. Aucune tendance significative ne s'est dégagée suite à l'abattage réactif mais les effets délétères d'extension périphérique de la maladie observés en Royaume-Uni n'ont pas été observés en Irlande (Corner, Clegg, et al. 2008; Olea-Popelka et al. 2009). Actuellement, la stratégie adoptée est l'abattage réactif autour des fermes infectées afin d'y maintenir une densité inférieure à 0,5 blaireaux / km^2 (ANSES 2011).

Les conséquences délétères de l'abattage des blaireaux observés en Royaume-Uni peuvent s'expliquer par le phénomène de perturbation sociale des populations. Ainsi, l'abattage massif a eu pour effet de perturber la structure sociale des groupes, augmentant le comportement exploratoire et la taille du domaine vital des blaireaux survivants (Riordan et al. 2011). Ces comportements ont favorisé les contacts intergroupes et ont potentiellement

augmenté les contacts avec des troupeaux bovins. La baisse de la densité résultant de l'abattage proactif compense ces effets en réduisant le nombre d'individus pouvant rentrer en contact. Dans les zones d'abattage réactif, en revanche, si la densité de blaireaux n'est pas à un niveau suffisamment bas pour contrebalancer ces effets, le risque de contact entre bovins et blaireaux est accru. Au Royaume-Uni, dans les zones adjacentes aux zones d'abattage proactif, l'effet combiné des densités élevées de blaireaux avec des déplacements importants engendrés par les abattages de la zone connexe a entraîné un risque plus élevé de contacts intraspécifiques et interspécifiques pouvant expliquer l'augmentation de l'incidence observée dans ces zones (Woodroffe et al. 2006; Donnelly et al. 2007; Bourne 2007).

Les différences des effets observés entre le Royaume-Uni et l'Irlande relèvent probablement d'une combinaison de facteurs incluant un différentiel de densité de blaireaux (2-3 blaireaux / km^2 en Irlande *vs* 10-20 blaireaux / km^2 en Angleterre) et une structure sociale différente des groupes des blaireaux (taille des groupes plus petite avec des territoires plus étendus en Irlande), une meilleure efficacité du piégeage (utilisation de collets en Irlande *vs* cages au Royaume-Uni) et la présence de barrières naturelles ou de zones tampons autour des zones d'abattage en Irlande, limitant l'effet de la perturbation sociale observé au Royaume-Uni (Bourne 2007; ANSES 2011).

A la lumière de ces expériences et des données acquises dans la présente étude, nous proposons des pistes pour la stratégie de lutte chez le blaireau en Côte d'Or.

- **Quelle stratégie adopter en Côte d'Or ?**

Depuis 2009, environ 10 000 blaireaux ont été abattus dans la zone infectée. Cet abattage massif réalisé sur une surface de plusieurs milliers de km^2 pendant plusieurs années consécutives pourrait correspondre à un abattage proactif. Cependant les détails du nombre d'animaux piégés par commune montre une très forte hétérogénéité d'un secteur à un autre et parfois même d'une commune à une autre (Figure 63). Ainsi entre 2009 et 2012, sur les 414 communes avec prélèvements, la densité de prélèvements annuelle a varié de 0,01 à 5,7 blaireaux prélevés/km², avec une moyenne de 1,0 ± 1,2 (Ruette & Dohlem, résultats non publiés). Le système reposant sur un réseau de piégeurs bénévoles explique cette disparité. Par comparaison, la pression de piégeage réalisée en Angleterre lors du RBCT (Random badger culling trial) a été de 1,8 blaireaux piégés/km^2/an, effort qui a été accompagné par une baisse de 70% de la densité de blaireaux observée (Bourne 2007). En Irlande, une étude a estimé une diminution du nombre de terriers actifs de 53% et une baisse d'activité des terriers (baisse 40 à 82% du nombre de gueules actives) après un piégeage moyen de 0,45 blaireaux/km^2/an cumulant 2,8 blaireaux piégés/km^2 (Byrne et al. 2012b;. Byrne et al. 2012c).

A la lumière de ces études, le piégeage tel qu'il a été réalisé en Côte d'Or devrait avoir eu un impact sur le niveau des populations de blaireaux dans les zones où il a été conduit de façon intensive. Le manque de précision de nos résultats concernant les niveaux de densités (cf. chapitre 2 paragraphe 5.2) entre les zones piégées et non piégées (3,6-5,3 et 3,2-

9,1 blaireaux adultes / km^2 respectivement) que nous avons échantillonnées ne permet pas de conclure de façon robuste sur la différence de densité entre les zones. Néanmoins, si nous prenons la fourchette haute des densités trouvées (5,3 et 9,1 blaireaux/km^2 en zones piégée et non piégée respectivement), nous constatons une différence de 42% entre les deux zones. Cette différence proviendrait à la fois d'un nombre moindre de terriers actifs et d'une taille de groupe plus réduite puisque moins de terriers avec couples ont été observés en zone piégée par rapport à la zone piégée (cf. chapitre 2 paragraphe 5.2).

En 2012, suite aux préconisations de l'ANSES (ANSES 2011), la stratégie d'abattage a été orientée vers un abattage réactif intensif autour des exploitations infectées. Compte-tenu de la relative proximité des foyers bovins conduisant à l'existence d'une zone infectée coalescente de 2500 km^2, cet abattage intensif a concerné l'ensemble de la zone en essayant de combler les secteurs peu piégés les années précédentes, la stratégie pouvant alors s'apparenter à un abattage proactif tel que décrit précédemment. A l'intérieur d'une zone tampon de 5 km en périphérie de la zone infectée, un abattage plus modéré (cinq blaireaux piégés par commune), destiné à surveiller la propagation de l'infection a été mis en œuvre. Comme nous l'avons déjà mentionné, les résultats, en zone de surveillance ont tous été négatifs et aucun blaireau infecté n'a été détecté en dehors de la zone infectée.

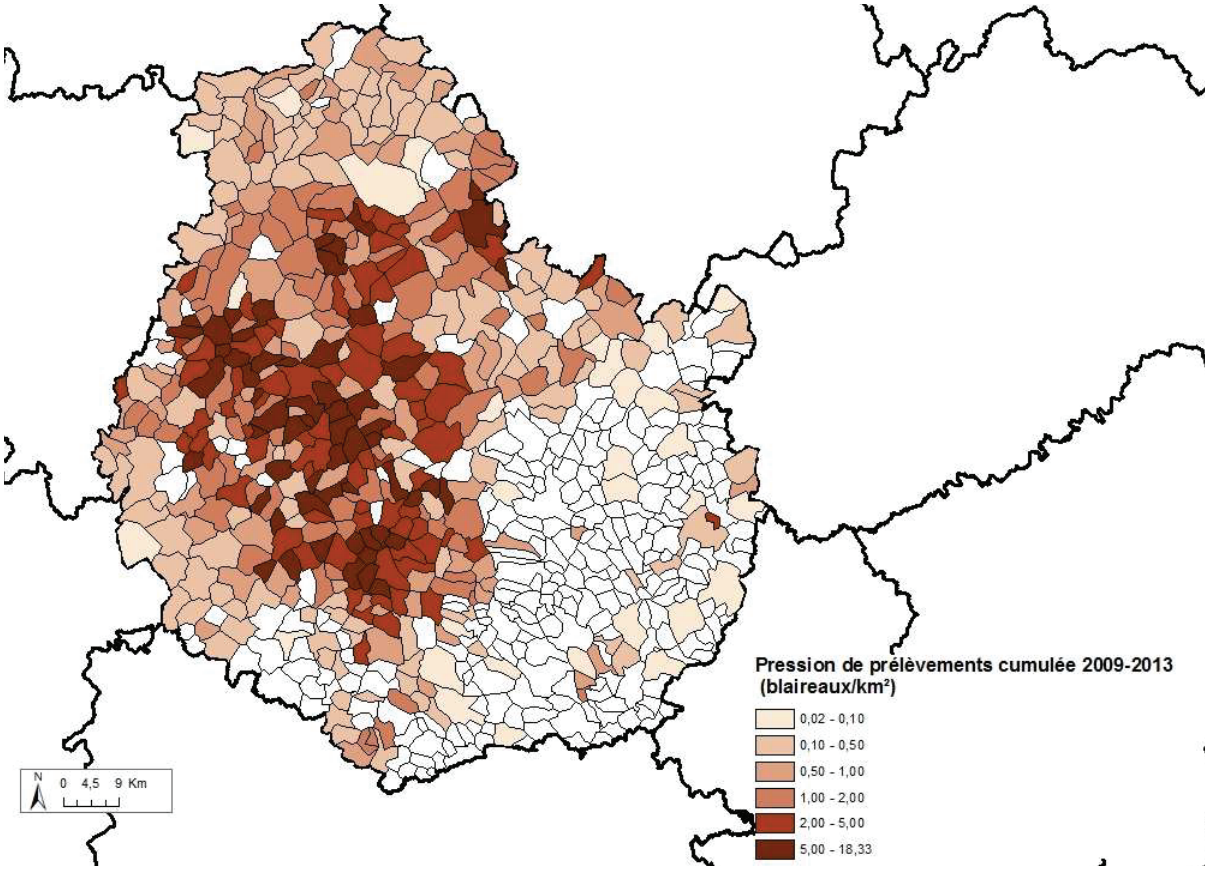


Figure 63 : densité des blaireaux piégés (nb blaireaux/km^2) cumulé sur 2009 et 2013 (source : Ruette et Dolhem, non publiés, d'après données de la DDPP21)

Considérant les niveaux modérés de densité (proches de ceux d'Irlande et plus faibles qu'au Royaume-Uni) et de prévalence (plus faible que dans les Iles britanniques) dans la population de blaireaux en Côte d'Or, nous pouvons supposer que les conséquences épidémiologiques de la perturbation sociale induites par l'abattage ont pu être plus limitées car les blaireaux en dispersion auraient *a priori* moins de risque de rentrer en contact avec d'autres blaireaux (densité plus faible) et auraient une probabilité plus faible d'être infectés (prévalence plus faible). Néanmoins, au Royaume-Uni et en Irlande, les effets ont été observés sur plusieurs années (7 ans) après les opérations d'abattage, il conviendrait donc de maintenir la surveillance dans les zones adjacentes des territoires les plus piégés. Compte-tenu des disparités du nombre de blaireaux piégés entre communes, ce plan de surveillance devrait se faire à une échelle locale (autour d'une ou de plusieurs communes par exemple) et non à l'échelle de toute la zone infectée.

Nous préconisons alors de piéger le maximum d'individus appartenant aux groupes positifs (dès qu'un individu positif est identifié). L'élimination d'un ou deux individus dans chaque groupe aura moins d'effet sur la baisse de densité surtout s'il s'agit de jeunes. D'un autre côté si les jeunes ne sont pas éliminés et qu'ils sont infectés, ils peuvent potentiellement propager l'infection à d'autres groupes lors de leur dispersion. L'élimination totale du groupe est donc souhaitable pour une meilleure efficacité sur la baisse des densités et le contrôle de l'infection. L'étude sur les densités a mis en évidence des petites tailles de groupes (deux adultes + deux jeunes en moyenne), ce qui peut rendre cet objectif plus facilement atteignable. Compte-tenu de la corrélation que nous avons mise en évidence entre le taux de contact et la distance terrier-pâture, le piégeage des terriers les plus proches des pâtures devrait être privilégié. En outre, considérant que le printemps serait la saison la plus à risque pour la transmission de blaireaux à bovins (cf. paragraphe 2.2), ce piégeage devait se faire en hiver et début du printemps (avant la mise à l'herbe des bovins). En Irlande, il a également été montré que ces deux saisons étaient les plus efficaces pour le piégeage (Byrne et al. 2012c).
La destruction des terriers où des individus infectés ont été détectés serait une mesure complémentaire à mettre en place si l'on suppose que le terrier joue un rôle important dans la persistance de l'infection. La mise en œuvre technique de cette mesure reste cependant encore à définir. En relation avec nos résultats, cette destruction pourrait concerner préférentiellement les terriers les plus proches des pâtures.

L'efficacité du piégeage pourrait être évaluée en termes d'effet sur la baisse de la densité en comparant, à effort de piégeage constant, le nombre de blaireaux piégés d'une année sur l'autre. L'évolution du nombre de terriers actifs pourrait être utilisé comme indicateur de l'évolution de la densité dans des zones échantillonnées ou autour des fermes infectées (Byrne et al. 2012b).

L'efficacité du piégeage en termes de baisse de la prévalence dans la population de blaireaux, pourrait être évaluée d'une année sur l'autre en analysant un nombre constant de blaireaux sur un secteur donné chaque année.

3.1.3. **Dans les populations de chevreuils et de renards**

Nous avons vu que le chevreuil n'avait qu'un rôle marginal dans le système multi-hôtes de *M. bovis* en Côte d'Or (cf. partie 1). En Dordogne, trois chevreuils tuberculeux ont été trouvés depuis 2011 ; le statut épidémiologique de cette espèce dans ce département présentant le tableau de chasse le plus élevé de France reste à définir. En Côte d'Or, l'évolution des niveaux de densité de cette espèce doit être suivie et la surveillance doit être adaptée en fonction.

Nous avons considéré le renard comme un cul-de-sac épidémiologique mais avons mis en évidence un niveau de contact important avec les infrastructures d'élevage et un niveau de prévalence de 5% en zone nord (cf. chapitre 2 paragraphes 3.5 et 6.2).

Nous préconisons un renforcement de la surveillance de cette espèce, surtout analysée jusqu'à présent en surveillance événementielle. Ceci, afin de confirmer son rôle de cul-de-sac épidémiologique et dans ce but, la recherche de *M. bovis* dans les excrétas pourraient être réalisée. En outre, cette espèce pourrait être utilisée comme sentinelle de l'infection en périphérie ou hors de la zone infectée (Berentsen et al. 2011)

3.1.4. **Conclusion et perspectives**

Pour les trois espèces sauvages, nous préconisons une surveillance active plus ciblée avec une stratification plus poussée de l'échantillonnage. Cette orientation permettrait non seulement d'appliquer des mesures de gestion plus ciblées et plus efficaces mais également de récolter des données précieuses pour améliorer la compréhension des phénomènes épidémiologiques.

Par ailleurs, le développement de nouveaux outils sérologiques (test ELISA, Interféron gamma) chez le sanglier et le blaireau déjà utilisés en Espagne et en Angleterre représente une perspective intéressante pour la surveillance. Ils permettent en effet de suivre l'exposition des populations à large échelle et sur de longues séries temporelles (Gortazar, Vicente, et al. 2011; Richomme et al. 2013). En terme de gestion, la mise au point chez le blaireau de tests rapides utilisable sur le terrain (Chambers et al. 2002; Lyashchenko et al. 2008) pourrait également être intéressante en permettant par exemple d'analyser le statut infectieux d'individus ou de groupes dans un but de gestion (identification des groupes à risque pour les bovins). Ces tests pourraient également venir compléter les méthodes diagnostiques utilisées jusqu'à présent (PCR et culture) afin d'améliorer la sensibilité et la

spécificité globale du diagnostic (Drewe et al. 2010). En termes de recherche, ils permettraient de mieux comprendre les liens entre l'exposition à *M. bovis* et la présence de lésions et de l'excrétion (Chambers et al. 2002; Boadella et al. 2011c).

Concernant les mesures de lutte, nous avons insisté sur la baisse des densités des animaux de la faune sauvage, qui reste à ce jour un élément primordial de la lutte contre la tuberculose bovine chez ces espèces et ayant déjà montré son efficacité dans d'autres contextes. *L'effet de la réduction des densités pourrait être simulé à l'aide de modèles intégrant la démographie, la dynamique de population et le niveau de prévalence de chaque population prenant part à la communauté d'hôtes présente en Côte d'Or*. Ils constitueraient un outil de gestion utile, notamment pour aider à déterminer les objectifs de densité et identifier la ou les populations dont la réduction de densité serait la plus efficace dans la lutte contre le risque de persistance de l'infection (Barron et al. 2013). Ces mesures devraient cependant être discutées avec les acteurs du monde cynégétique afin de garantir leur mise en œuvre sur le terrain.

Le développement de vaccins chez le blaireau en Angleterre et chez le sanglier en Espagne, ouvre de nouvelles perspectives de gestion du risque. Ces vaccins ont déjà montré leur efficacité en diminuant l'expression et la progression de la maladie chez les individus vaccinés (Chambers et al. 2011; Lesellier et al. 2011; Garrido et al. 2011). Des vaccins administrables par voie orale ne sont cependant pas encore disponibles et seraient utiles pour étendre les mesures vaccinales.

Les autres mesures de lutte consistent à limiter les interactions entre les différentes populations de la communauté d'hôtes et entre celles-ci et les bovins. Dans ce but, des recommandations en termes de pratiques d'élevage peuvent être émises.

3.2. Recommandations en termes de pratiques d'élevage

3.2.1. **Au niveau des pâtures**

3.2.1.1. Gestion des lisières

En Côte d'Or, l'interpénétration entre la forêt et les milieux ouverts induit une continuité paysagère entre ces deux milieux de telle sorte que la majorité des pâtures se trouvent à une distance de moins de 500 mètres des lisières et qu'une proportion importante des pâtures est mitoyenne des bois.

Les lisières constituent non seulement le « point d'entrée » des animaux sauvages sur la pâture mais également, un habitat privilégié pour l'installation des terriers de

blaireaux et le dépôts de latrines (White et al. 1993; Hutchings et al. 2002). De plus, même si des travaux complémentaires seraient nécessaires pour le confirmer, le suivi télémétrique semble montrer une utilisation plus importante des zones de lisières par les sangliers et les blaireaux par rapport au reste de la pâture.

L'interruption de la contigüité entre les lisières et les pâtures, en mettant par exemple en place une « zone tampon », éviterait un certain nombre de contacts entre les bovins et la faune sauvage, notamment des contacts particulièrement à risque avec les latrines ou les terriers des blaireaux.

Dans la mesure où les bovins utilisent aussi les lisières pour s'abriter de la pluie ou du soleil, leur suppression pourrait cependant poser un problème en termes de bien-être pour ceux-ci.

Une alternative serait alors d'installer sur la zone de lisière des clôtures dissuasives pour la faune sauvage, à différentes hauteurs afin qu'elles soient efficaces pour chaque espèce. Les clôtures électriques ont montré leur efficacité sur les blaireaux (Tolhurst et al. 2008; Judge et al. 2011), les sangliers (Vidrih & Trdan 2008), notamment pour la protection des cultures, mais la pousse de l'herbe pourrait poser problème. Différentes conceptions de clôtures métalliques pourraient être efficaces pour empêcher l'entrée de ces animaux sauvages sur les pâtures et éviter que les bovins n'aillent brouter et explorer par dessus la clôture vers la lisière (limitant ainsi les contacts potentiels avec les latrines et les terriers de blaireaux).
Pour le cerf, plusieurs types de clôtures ont déjà montré leur efficacité et pourraient être testées (Goddard et al. 2001; Lavelle et al. 2010)
A minima, les clôtures longeant les lisières devraient être maintenues en bon état.

3.2.1.2.Gestion des points d'abreuvement

A l'intérieur des pâtures, nous avons vu que la majorité des points d'alimentation et d'abreuvement étaient accessibles pour les populations sauvages, contribuant ainsi à l'attractivité des pâtures. Limiter cette accessibilité pourrait alors, d'une part, rendre la pâture potentiellement moins attractive et, d'autre part, diminuerait le risque de transmission interspécifique lié à l'utilisation de ces points.

Concernant les points d'abreuvement, nous avons vu que les blaireaux ne pouvaient accéder aux abreuvoirs contrairement aux points d'eau. De plus, d'après nos résultats, ceux-ci représentent le point le plus à risque pour la transmission de *M. bovis* entre sangliers et bovins (cf. paragraphe 2.3).

La mise en place systématique d'abreuvoirs et la condamnation des points d'eau (ou leur protection par des clôtures si la condamnation est impossible pour les rivières ou les mares par exemple) dans les pâtures permettraient donc de diminuer en partie le risque de transmission entre les blaireaux, sangliers et les bovins.
Les abreuvoirs demeurent cependant accessibles pour les sangliers et les cerfs pour lesquels ils constituent d'après nos résultats, l'infrastructure d'élevage la plus à risque de contacts entre bovins et ces espèces sauvages. Il serait donc souhaitable de limiter leur accessibilité en les plaçant par exemple dans des parcs délimités par des clôtures électriques ou des barrières métalliques équipées d'un passage sélectif pour l'accès des bovins, ou de les placer à l'intérieur d'abris. De plus, de tels dispositifs limiteraient l'accès aux zones humides entourant les abreuvoirs, lieu de fouille privilégiée et possiblement de bain pour les sangliers.

Nous avons également mentionné que, sur certains sites les abreuvoirs alimentés par une source continue restaient remplis même en l'absence des bovins sur la pâture, constituant une ressource disponible permanente pour les populations sauvages. L'eau de l'abreuvoir pourrait ainsi rester contaminante jusqu'au retour des bovins sur la pâture, étant donné la durée de survie prolongée de *M. bovis* dans ce substrat.

3.2.1.3.Gestion des points d'alimentation

- **Pierre à sel**

Les pierres à sel, sont, dans la grande majorité des exploitations, posées à même le sol. Or, nous avons vu que le sel était particulièrement attractif pour les cerfs en été et, dans une moindre mesure, pour les sangliers (cf. chapitre 2, paragraphe 6.2).

Leur suspension à un support, comme cela est déjà pratiqué par certains éleveurs pourrait diminuer le risque vis-à-vis des sangliers (qui, d'après nos observations, en plus de consommer le sel, utilise ces pierres à lécher comme support pour se gratter) mais ne serait pas efficace vis-à-vis des cervidés. Une première mesure simple serait de ne pas poser la pierre à lécher directement sur le sol mais de la mettre dans un récipient (seau par exemple) comme cela est déjà fait dans certaines exploitations.

Cela permettrait d'une part, de diminuer l'attractivité en introduisant un contenant artificiel et d'autre part, le récipient éviterait que le sel ne diffuse dans le sol le rendant attractif pour la fouille des sangliers. Comme pour les abreuvoirs, ces seaux pourraient être mis dans des parcs ou des abris protégés par des clôtures ou des barrières. Dans le Michigan, la mise en place de cours clôturées pour protéger les aliments destinés au bétail s'est révélée être une mesure efficace pour lutter contre la transmission de la tuberculose entre cerfs de Virginie et bovins (Brook 2010).

- **Auges**

Nous avons constaté que l'utilisation d'auges et de nourrisseurs pour l'alimentation des bovins en pâture s'était révélée attractive pour les trois espèces. L'aliment tombé à terre sous les auges (beaucoup moins fréquemment au niveau des nourrisseurs) ainsi que l'heure de distribution conditionnant la quantité disponible pour la faune pendant leur phase d'activité, ont semblé être des facteurs d'attractivité déterminants.

En conséquence, modifier ces pratiques, en premier lieu, ne pas distribuer l'aliment par terre (comme cela est fait par certains éleveurs, notamment pour « apprivoiser » les vaches allaitantes, peu habituées à se faire manipuler) ni le soir mais assez tôt dans la journée pour que les bovins aient le temps de terminer leur ration, permettraient de réduire l'attractivité des points d'alimentation. La conception et l'installation des auges devraient favoriser une hauteur suffisante pour limiter l'accès aux blaireaux et aux sangliers (la préconisation en Angleterre pour prévenir l'accès des blaireaux dans les auges est de 80 cm, Garnett et al. 2003), avoir des rebords assez hauts pour éviter au maximum que les aliments tombent à terre lorsque les bovins mangent. L'utilisation de parcs dans la pâture ou de dispositifs plus « fermés » que les auges (silo avec distribution à la demande par exemple) pourraient s'avérer efficace pour limiter l'attractivité du nourrissage des bovins sur les pâtures, et ce d'autant plus pour les élevages pratiquant le pâturage à l'année, l'hiver s'étant montré dans notre étude, plus à risque pour la fréquentation des blaireaux sur ces points d'alimentation.

3.2.1.4.Gestion du pâturage

Au Royaume-Uni, un certain nombre de recommandations en termes de pratiques d'élevage visant à limiter les contacts avec les blaireaux ont fait l'objet de publications scientifiques (Ward et al. 2010) et gouvernementales par le ministère de l'Agriculture ainsi que des vidéos à visée pédagogiques (MAFF 2013 : http://www.defra.gov.uk/ahvla-en/publication/ag-btb-cattle-wildlife/).

Ces recommandations en plus de celles déjà formulées précédemment, incluent la pratique de pâturages tournants. En effet, laisser un troupeau sur une longue période sur une même pâture fréquentée par des blaireaux, augmente le temps de contact des bovins avec ceux-ci et s'ils sont infectés, augmente le risque de transmission (Ward et al. 2010). De plus, cette pratique peut favoriser l'utilisation de la pâture par les blaireaux pour la recherche de vers de terre, d'une part car les prairies en pâturage permanent sont plus riches en lombrics que les parcelles non pâturées (Muldowney et al. 2003) et d'autre part, car lorsque l'herbe est rase du fait du surpâturage, la recherche de lombrics est facilitée (Kruuk et al. 1979). Nous pouvons d'ailleurs supposer que ces effets sont les mêmes pour les sangliers, étant donné le caractère opportuniste de leur consommation de lombrics que nous avons mis en évidence. En outre, le surpâturage expose davantage les bovins aux excrétas de blaireaux et notamment les latrines. En effet, si celles-ci sont initialement évitées par les bovins, lorsqu'ils ont le choix de

brouter ailleurs, les contacts prolongés avec les latrines sont plus probables lorsque l'herbe se fait plus rare (Hutchings & Harris 1997). Une étude a par ailleurs montré une fréquence relativement élevée (jusqu'à 200 visites sur 5 mois pour certaines vaches) entre les latrines et les bovins (Drewe et al. 2013). Afin d'éviter ces contacts à risque, la pose de clôtures autour des zones de latrines est recommandée en Angleterre (Ward et al. 2010).

L'utilisation de pâturage tournant sur des paddocks de petite superficie présente également l'avantage de conserver la cohésion du troupeau et d'augmenter la densité des bovins. Sachant que les blaireaux évitent les contacts directs avec les vaches, les zones de pâtures densément peuplées seraient alors moins fréquentées par les blaireaux (Böhm et al. 2009; Drewe et al. 2013; Mullen et al. 2013).

En Côte d'Or, si certaines prairies sont utilisées alternativement comme pâture et comme prairie de fauche, le pâturage permanent prédomine et la pratique du pâturage tournant utilisant des paddocks est peu répandue.

Une gestion des pâtures pourrait consister à diviser les grandes pâtures permanentes en plus petites parcelles où les bovins seraient déplacés régulièrement. De plus, le déplacement corollaire des points d'alimentation et d'abreuvement pourrait limiter leur fréquentation par la faune sauvage en modifiant leurs repères géographiques.

La mise en place de telles pratiques requerrait néanmoins une modification « culturelle » de la conduite d'élevage et serait beaucoup plus contraignante pour les éleveurs. Une alternative serait de gérer les pâtures en fonction du risque qu'elles présentent vis-à-vis de la fréquentation des populations sauvages.

Ainsi, les pâtures se trouvant en lisière, disposant de points d'eau, proches de terriers ou contenant beaucoup de latrines, pourraient être préférentiellement utilisées pour la fauche ou être mise en culture ou en jachère.

3.2.2. **Au niveau des bâtiments**

Nos résultats ont montré que la fréquentation des bâtiments concerne essentiellement les blaireaux et les renards, ces derniers étant *a priori* moins à risque d'être infectés et d'excréter *M. bovis*.

Là aussi, de nombreux travaux ont été conduits au Royaume-Uni débouchant sur des recommandations, visant à empêcher l'accès des blaireaux aux bâtiments et particulièrement aux réserves d'aliments et aux stabulations (Ward et al. 2010). A cet effet, les mesures préconisées consistent à fermer les lieux de stockage et les stabulations par des portes ou des panneaux métalliques (qui peuvent être amovibles) ou des clôtures électrifiées (Figure 64). La hauteur au sol à respecter est de 7,5cm.

Dans ce pays, un suivi par vidéosurveillance réalisé sur 19 fermes où des visites de blaireaux avaient auparavant été constatées, a montré l'efficacité de ces mesures qui, correctement mises en œuvre, ont exclu totalement les blaireaux des bâtiments ainsi protégés (Judge et al. 2011). De plus, ces dispositifs ont également entrainé une baisse du nombre de visites dans les zones non protégées des fermes (Tolhurst et al. 2008; Judge et al. 2011). En réponse à ces installations et notamment aux clôtures électriques, les blaireaux ont peu modifié leur domaine vital mais leur centre d'activité a été déplacé et plus fragmenté, ce comportement correspondant probablement à une recherche de nourriture à partir de ressources peu utilisées auparavant. La réponse comportementale d'évitement de la ferme n'a pas été pérenne et après deux semaines de pose des clôtures, les blaireaux sont revenus lorsque celles-ci ont été enlevées, soulignant l'importance de laisser ces dispositifs en place de façon permanente (Tolhurst et al. 2008).

A la lumière de ces études, nous pouvons recommander la mise en place de dispositifs similaires dans les bâtiments des exploitations de la zone infectée de Côte d'Or et notamment les fermes les plus exposées au contact avec les blaireaux (terriers à proximité).

Figure 64 : exemples de dispositifs visant à protéger les infrastructures d'élevage contre l'intrusion de blaireaux (Source : Judge et al. 2011)

En fonction du risque de fréquentation des sangliers et des cerfs évalués à l'échelle locale, ces mesures pourraient aussi être adaptées à ces espèces en installant par exemple des fils électrifiés ou des panneaux suffisamment hauts. Car même si nous n'avons pas observé de cerfs et très peu de visites de sangliers en bâtiments, ces événements restent possibles (la visite de fermes par les cerfs de Virginie est fréquente dans le Michigan (Berentsen et al. 2013)). En outre, les trois longues visites de sanglier qui ont eu lieu sur un

tas de fumier près d'un bâtiment soulignent la nécessité de stocker celui-ci dans un bâtiment ou de le protéger par des clôtures électriques.

3.2.3. **Conclusion**

Ces propositions devraient être discutées avec les éleveurs afin de considérer leur faisabilité et une étude coût-bénéfice devrait être entreprise afin d'évaluer les mesures qui seraient prioritaires à mettre en œuvre. Une adaptation de ces mesures pourrait être réalisée pour chaque exploitation ou groupe d'exploitations en fonction du niveau et du type de risque encouru en lien avec sa localisation et ses pratiques d'élevage, après une analyse de risque locale telle que nous l'avons présentée précédemment (cf. paragraphe 2.1.2).

L'efficacité de ces mesures pourrait être évaluée en mettant en place un suivi vidéo sur les sites où nous avons observé des visites en comparant la fréquentation de ces sites par la faune sauvage avant et après la mise en œuvre des mesures.

Conclusion

Notre étude avait pour objectif de déterminer le rôle des différentes populations-hôtes sauvages impliquées dans le système multi-hôtes de *M. bovis* en Côte d'Or. Dans ce département en effet, la tuberculose bovine, en recrudescence depuis plusieurs années chez les bovins circule également dans le compartiment sauvage composé sur ce site de blaireaux, sangliers, cerfs, renards et chevreuils.

Afin d'établir leur statut épidémiologique et d'évaluer dans quelle mesure ces populations pouvaient constituer une source d'infection pour les bovins, nous avons estimé, à partir d'études expérimentales et de traitements de données disponibles, différents facteurs de risque de création de réservoir et de transmission de l'infection aux bovins. Ces facteurs incluent la sensibilité et la réceptivité de l'hôte à *M. bovis*, son comportement social et spatial, sa démographie et les interactions qu'il entretient avec les autres hôtes infectés, et notamment les bovins. Notre étude expérimentale a permis d'estimer des déterminants majeurs de l'aptitude à la transmission interspécifique et intraspécifique de *M. bovis,* qui n'étaient pas connus auparavant pour ces populations. Ainsi, nous avons quantifié et qualifié les contacts entre sangliers, blaireaux d'une part et bovins d'autre part. Nous avons fourni les premiers éléments d'évaluation de la capacité d'excrétion de ces deux populations sauvages. Une estimation de la densité de la population de blaireaux dans la zone infectée a également été réalisée.

Pour autant, nous n'avons pas pu trancher de façon certaine sur le rôle de chaque population car des données demeurent manquantes ou lacunaires. En outre, chaque population arbore une combinaison unique de ces facteurs de risque dont il est délicat de connaître la contribution relative dans la capacité à faire persister et à transmettre l'infection. De plus, cette combinaison peut varier spatialement à l'échelle de la zone infectée du département, et temporellement en fonction des saisons. A l'issue de notre étude, nous n'avons pas identifié de réservoir sauvage avéré même si le blaireau pourrait localement jouer ce rôle. Les populations de sangliers, cerfs et blaireaux seraient davantage des hôtes de liaison pouvant retransmettre l'infection aux bovins. Des travaux supplémentaires, que nous avons listés dans cette thèse, investiguant notamment les niveaux d'excrétion, l'effet du niveau de densité et de la structure des populations sur la dynamique d'infection, seraient requis pour avancer dans la définition du rôle de chaque population sauvage.

La cohabitation de ces différentes populations interagissant entre elles et avec les bovins est inédite et ajoute encore de la complexité au système. Son étude apparaît donc de première importance pour améliorer la connaissance des mécanismes épidémiologiques qui régissent les systèmes multi-hôtes impliquant des espèces sauvages. Nous avons émis des hypothèses quant aux possibles effets de l'assemblage de ces différents hôtes, mais il serait nécessaire de poursuivre les investigations. L'objectif, en premier lieu, serait de déterminer si cette communauté d'hôtes ainsi constituée a une capacité à devenir réservoir. Là encore, l'étude de la situation de la côte d'Or apporterait des éléments permettant de mieux comprendre les schémas de transmission entre les différents hôtes de *M. bovis* pouvant conduire à la persistance de l'infection.

Les résultats de notre étude trouvent également une application directe en termes de gestion du risque. Nous avons fait des recommandations pour améliorer la surveillance des populations sauvages et limiter le risque d'entretien de l'infection. D'autre part, nous avons caractérisé le risque posé par ces populations aux bovins en termes spatial, temporel et concernant la conduite d'élevage sur la base de nos estimations expérimentales et sur des bases bibliographiques. Ainsi, nous avons préconisé une évaluation de ce risque à une échelle spatiale fine pour une gestion plus ciblée, prenant en compte l'attractivité et l'accessibilité des sites d'élevage et la communauté d'hôtes présente localement. Afin de réduire les contacts entre faune sauvage et bovins, nous avons proposé des mesures concrètes de pratiques d'élevage et de biosécurité sur les pâtures et dans les bâtiments.

La lutte contre la tuberculose bovine dans un tel système multi-hôtes passe donc par la mise en œuvre de mesures concomitantes chez les bovins, dans les populations-hôtes sauvages et à l'interface entre ces deux compartiments. Elle fait appel à des acteurs très différents aux intérêts parfois divergents, ce qui peut représenter un frein à l'application des mesures. Leur acceptabilité est donc un pré requis nécessaire pour garantir une mise en œuvre effective.

En outre, l'échange avec d'autres pays touchés par la maladie, des connaissances et des effets de l'application de mesures et d'outils de gestion tels que la vaccination, est essentiel pour avancer dans le lutte contre la tuberculose bovine et tendre vers son éradication.

Références bibliographiques

Acevedo, P. et al., 2007. Estimation of European wild boar relative abundance and aggregation: a novel method in epidemiological risk assessment. *Epidemiology and infection*, 135, pp.519–527.

Acevedo-Whitehouse, K. et al., 2005. Genetic resistance to bovine tuberculosis in the Iberian wild boar. *Molecular ecology*, 14(10), pp.3209–17.

Aebischer, N., Robertson, P. & Kenward, R., 1993. Compositional analysis of habitat use from animal radio-tracking data. *Ecology*, 74(5), pp.1313–1325.

AFSSA, 2008. Une méthode qualitative d'estimation du risque en santé animale, Rapport. Maisons-Alfort.69 p.

Anderson, D.P. et al., 2013. A novel approach to assess the probability of disease eradication from a wild-animal reservoir host. *Epidemiology and infection*, 141(7), pp.1509–21.

ANSES, 2011. *Tuberculose bovine et faune sauvage*. Rapport, ANSES édition scientifique Maisons-Alfort. 119 p.

Anonymous, 2009. The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007. *The EFSA Journal* 223, pp 3-20

Ashford, R.W., 2003. When is a reservoir not a reservoir? *Emerging infectious diseases*, 9(11), pp.1495–1496.

Atkins, P. & Robinson, P., 2013. Bovine tuberculosis and badgers in Britain: relevance of the past. *Epidemiology and infection*, 141(special issue 7), pp.1437–1444.

Atwood, T.C. & Weeks, H.P., 2003. Sex-spécific patterns of mineral lick preference in white-tailed deer. *Northeastern Naturalist*, 10(4), pp.409–414.

Aznar, I. et al., 2011. Trial design to estimate the effect of vaccination on tuberculosis incidence in badgers. *Veterinary microbiology*, 151(1-2), pp.104–11.

Balseiro, A. et al., 2011. Infection of Eurasian badgers (*Meles meles*) with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* complex in Spain. *The Veterinary journal*, 190, pp.21–25.

Balseiro, A. et al., 2013. Spatial relationships between Eurasian badgers (*Meles meles*) and cattle infected with *Mycobacterium bovis* in Northern Spain. *The Veterinary Journal*, 197, pp.739–745.

Barlow, N.D., 2000. Non-linear transmission and simple models for bovine tuberculosis. *Journal of Animal Ecology*, 69(4), pp.703–713.

Barron, M.C., Nugent, G. & Cross, M.L., 2013. Importance and mitigation of the risk of spillback transmission of Mycobacterium bovis infection for eradication of bovine tuberculosis from wildlife in New Zealand. *Epidemiology and infection*, 141(7), pp.1394–406.

Baubet, E. & Brandt, S., 2009. La consommation de vers de terre par le sanglier: Quelle relation avec les dégâts sur prairies? *Faune sauvage*, 283, pp.8–13.

Baubet, E.A. & Brandt, S.C., 2003. Seasonal and annual variations in earthworm consumption by wild boar (*Sus scrofa scrofa L*). *Ecology*, 190, pp.179–186.

Benet, J., 2012. La tuberculose animale. Cours de maladies contagieuses. Ecole vétérinaire d'Alfort. Maisons-Alfort ,84 p.

Berentsen, A. et al., 2011. Active use of coyotes (*Canis latrans*) to detect Bovine Tuberculosis in northeastern Michigan, USA. *Veterinary microbiology*, 151(1-2), pp.126–132.

Berentsen, A.R. et al., 2013. Characteristics of white-tailed deer visits to cattle farms: implications for disease transmission at the wildlife–livestock interface. *European Journal of Wildlife Research*, in press.

Biet, F. et al., 2005. Review article Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium*-intracellulare complex (MAC). *Veterinary Research*, 36, pp.411–436.

Blanchong, J. a. et al., 2007. TB-infected deer are more closely related than non-infected deer. *Biology Letters*, 3(1), pp.103–105.

Blieux, A., 2011. Détection de *Mycobacterium bovis* dans les sols et la faune du sol. Rapport de Master 2. Université de Bourgogne- Agrosup Dijon.

Boadella, M et al., 2011a. Six recommendations for improving monitoring of diseases shared with wildlife: examples regarding mycobacterial infections in Spain. *European Journal of Wildlife Research*, 57(4), pp.697–706.

Boadella, M et al., 2011b. Spatio-temporal trends of Iberian wild boar contact with Mycobacterium tuberculosis complex detected by ELISA. *EcoHealth*, 8(4), pp.478–84..

Boadella, M. et al., 2011c. Serologic Tests for Detecting Antibodies against Mycobacterium Bovis and Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis in Eurasian Wild Boar (Sus Scrofa Scrofa). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(1), pp.77–83.

Boadella, M. et al., 2012. Effects of culling Eurasian wild boar on the prevalence of *Mycobacterium bovis* and Aujeszky's disease virus. *Preventive veterinary medicine*, 107(3-4), pp.214–21.

Bodin, C., 2005. Partage de l'espace et relation de voisinage dans une population continentale de blaireaux européens. Thèse de doctorat universitaire. Université Montpellier 2. 138 p.

Böhm, M. et al., 2008. Dynamic interactions among badgers: implications for sociality and disease transmission. *Journal of Animal Ecology*, 77, pp.735–745.

Böhm, M., Hutchings, M. & White, P.L., 2009. Contact networks in a wildlife-livestock host community: identifying high-risk individuals in the transmission of bovine TB among badgers and cattle. *PloS one*, 4(4), pp.1–12.

Börger, L. et al., 2006. An integrated approach to identify spatiotemporal and individual-level determinants of animal home range size. *The American naturalist*, 168(4), pp.471–484.

Bourne, F.J., 2007. Bovine TB: The Scientific Evidence, Final Report of the independent scientific group on cattle TB. DEFRA London. 289 p.

Bracke, M.B.M., 2011. Review of wallowing in pigs: Description of the behaviour and its motivational basis. *Applied Animal Behaviour Science*, 132(1-2), pp.1–13.

Brook, R.K. & McLachlan, S.M., 2009. Transdisciplinary habitat models for elk and cattle as a proxy for bovine tuberculosis transmission risk. *Preventive veterinary medicine*, 91(2-4), pp.197–208.

Brook, R.K., 2010. Incorporating farmer observations in efforts to manage bovine tuberculosis using barrier fencing at the wildlife-livestock interface. *Preventive veterinary medicine*, 94(3-4), pp.301–5.

Brook, R.K. et al., 2013. Evaluating use of cattle winter feeding areas by elk and white-tailed deer: implications for managing bovine tuberculosis transmission risk from the ground up. *Preventive veterinary medicine*, 108(2-3), pp.137–47.

Broseth, H., Knutsen, B. & Bevanger, K., 1997. Spatial organization and habitat utilization of badgers *Meles meles*: effects of food patch dispersion in the boreal forest of central Norway. *Zeitschrift fur Saugetierkunde*, 62, pp.12–22.

Bruinderink, G.G. et al., 2003. Designing a coherent ecological network for large mammals in Northwestern Europe. *Conservation Biology*, 17(2), pp.549–557.

Bruning-Fann, C.S. et al., 2001. Bovine tuberculosis in free-ranging carnivores from michigan. *Journal of wildlife diseases*, 37(1), pp.58–64.

Buckland, S.T. et al., 2001. Introduction to distance sampling: estimating abundance of biological populations, New York: Oxford University Press.

Buddle, B. et al., 2011. Update on vaccination of cattle and wildlife populations against tuberculosis. *Veterinary microbiology*, 151(1-2), pp.14–22.

Burnham, K.P. & Anderson, D.R., 2002. Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach second edition., Heidelberg: Springer-Verlag.

Byrne, AW. et al., 2012a. The ecology of the European badger (*Meles meles*) in Ireland: a review. *Biology & Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy*, 112(1), pp.105–132.

Byrne, AW. et al., 2012b. Impact of culling on relative abundance of the European badger (*Meles meles*) in Ireland. *European Journal of Wildlife Research*, 59(1), pp.25–37.

Byrne, AW, O'Keeffe, J. & Sleeman, D., 2012c. Factors affecting European badger (*Meles meles*) capture numbers in one county in Ireland. *Preventive veterinary medicine*, 109(1-2), pp.128–135.

Calenge, C. et al., 2002. Summer and hunting season home ranges of wild boar (*Sus scrofa*) in two habitats in France. *Game and Wildlife Science*, 19(4), pp.281–301.

Calenge, C., 2006. The package "adehabitat' for the R software: a tool for the analysis of space and habitat use by animals. *Ecological Modelling*, 197, pp.516–519.

Caley, P. & Hone, J., 2004. Disease transmission between and within species , and the implications for disease control. *Journal of Applied Ecology*, 41, pp.94–104.

Caley, P. & Hone, J., 2005. Assessing the host disease status of wildlife and the implications for disease control: *Mycobacterium bovis* infection in feral ferrets. *Journal of Applied Ecology*, 42(4), pp.708–719.

Castillo, L. et al., 2011. Management practices and their association with *Mycobacterium tuberculosis* complex prevalence in red deer populations in Southwestern Spain. *Preventive veterinary medicine*, 98(1), pp.58–63.

Chambers, M.A. et al., 2002. Value of existing serological tests for identifying badgers that shed *Mycobacterium bovis*. *Veterinary microbiology*, 86(3), pp.183–9.

Chambers, M.A et al., 2011. Bacillus Calmette-Guérin vaccination reduces the severity and progression of tuberculosis in badgers. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 278(1713), pp.1913–20.

Cheeseman, C. & Mallinson, P., 1981. Behaviour of badgers (*Meles meles*) infected with bovine tuberculosis. *Journal of Zoology*, 42, pp.284–289.

Cleary, G. et al., 2011. Diet of the European badger (*Meles meles*) in the Republic of Ireland: A comparison of results from an analysis of stomach contents and rectal faeces. *Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde*, 76, pp.470–475.

Cleaveland, S., Laurenson, M.K. & Taylor, L.H., 2001. Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Biological sciences*, 356(1411), pp.991–9.

Clifford, D.L. et al., 2013. Tuberculosis infection in wildlife from the Ruaha ecosystem Tanzania: implications for wildlife, domestic animals, and human health. *Epidemiology and infection*, 141(7), pp.1371–81.

Clutton-Brock, T.H., Guiness, F.E. & Albon, S.D., 1982. Red deer: behavior and ecology of two sexes. University of Chicago Press.

Collins, D.M., 2001. Virulence factors of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis*, 81(1-2), pp.97–102.

Collins, D.M., 2011. Advances in molecular diagnostics for *Mycobacterium bovis*. *Veterinary microbiology*, 151(1-2), pp.2–7.

Conner, M.M. et al., 2008. Infectious disease in cervids of North America: data, models, and management challenges. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1134, pp.146–72.

Cooke, M.M., 2000. Tuberculous sialoadenitis in a badger. *New Zealand veterinary journal*, 48(4), p.122.

Cooper, S.M. et al., 2010. Distribution and interspecies contact of feral swine and cattle on rangeland in South Texas: implications for disease transmission. *Journal of wildlife diseases*, 46(1), pp.152–64.

Corner, L. a L., 2006. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. *Veterinary microbiology*, 112(2-4), pp.303–12.

Corner, L. a L., Costello, E., et al., 2008. Experimental tuberculosis in the European badger (*Meles meles*) after endobronchial inoculation with *Mycobacterium bovis*: II. Progression of infection. *Research in veterinary science*, 85(3), pp.481–90..

Corner, L. a L., Clegg, T. a, et al., 2008. The effect of varying levels of population control on the prevalence of tuberculosis in badgers in Ireland. *Research in veterinary science*, 85(2), pp.238–49.

Corner, L. a L., Murphy, D. & Gormley, E., 2010. *Mycobacterium bovis* infection in the Eurasian badger (*Meles meles*): the disease, pathogenesis, epidemiology and control. *Journal of comparative pathology*, 144, pp.1–24.

Corner, L.A.L. et al., 2012. The distribution of *Mycobacterium bovis* infection in naturally infected badgers. *The Veterinary Journal*, 194(2), pp.166–172.

Courtenay, O. et al., 2006. Is *Mycobacterium bovis* in the environment important for the persistence of bovine tuberculosis? *Biology letters*, 2(3), pp.460–2.

Cowled, B. & Garner, G., 2008. A review of geospatial and ecological factors affecting disease spread in wild pigs: considerations for models of foot-and-mouth disease spread. *Preventive veterinary medicine*, 87(3-4), pp.197–212.

Crawshaw, T.R., Griffiths, I.B. & Clifton-Hadley, R.S., 2008. Comparison of a standard and a detailed postmortem protocol for detecting *Mycobacterium bovis* in badgers. *Veterinary Record*, 163, pp.473–477.

Cross, P. et al., 2004. Integrating association data and disease dynamics in a social ungulate: bovine tuberculosis in African buffalo in the Kruger National Park. *Ann. Zool. Fennici*, 41, pp.879–892.

Cross, P.C., 2005. Disentangling association patterns in fission–fusion societies using African buffalo as an example. *Animal Behaviour*, 69, pp.499–506.

Daszak, P., Cunningham, A. & Hyatt, D., 2000. Emerging Infectious Diseases of Wildlife-Threats to Biodiversity and Human Health. *Science*, 287(5452), pp.443–449.

Dean, G. et al., 2005. Minimum infective dose of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infection and immunity*, 73(10), pp.6467–6471..

DEFRA, 2013. Bovine TB (tuberculosis). Available at: http://www.defra.gov.uk/animal-diseases/a-z/bovine-tb/.

Delahay, R.J. et al., 2000a. The spatio-temporal distribution of *Mycobacterium bovis* (bovine tuberculosis) infection in a high-density badger population. *Journal of Animal Ecology*, 69(3), pp.428–441

Delahay, R.J. et al., 2000b. The use of marked bait in studies of the territorial organization of the European badger (*Meles meles*). *Mammal Review*, 30(2), pp.73–87.

Delahay, R.J., Cheeseman, C.L. & Clifton-Hadley, R.S., 2001. Wildlife disease reservoirs: the epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in the European badger (*Meles meles*) and other British mammals. *Tuberculosis*, 81(1-2), pp.43–9.

Delahay, R.J. et al., 2002. The status of *Mycobacterium bovis* infection in UK wild mammals: A review. *The Veterinary Journal*, 164(2), pp.90–105.

Delahay, R.J. et al., 2007. Bovine tuberculosis infection in wild mammals in the South-West region of England: a survey of prevalence and a semi-quantitative assessment of the relative risks to cattle. *Veterinary journal*, 173(2), pp.287–301.

Delahay, R.J. et al., 2013. Long-term temporal trends and estimated transmission rates for *Mycobacterium bovi*s infection in an undisturbed high-density badger (*Meles meles*) population. *Epidemiology and infection*, 141(7), pp.1445-1456.

Dingemanse, N. et al., 2010. Behavioural reaction norms: animal personality meets individual plasticity. *Trends in ecology & evolution*, 25(2), pp.81–89.

Dingemanse, N.J. & Dochtermann, N.A., 2013. Quantifying individual variation in behaviour: mixed-effect modelling approaches. *Journal of Animal Ecology*, 82, pp.39–54.

Do Linh San, E., Ferrari, N. & Weber, J.-M., 2007. Socio-spatial organization of Eurasian badgers (*Meles meles*) in a low-density population of central Europe. *Canadian Journal of Zoology*, 85(9), pp.973–984.

Dondo, A. et al., 2009. Tuberculosis in roe deer from Spain and Italy. *Veterinary Record*, 164, pp.468–470.

Donnelly, C.A. et al., 2003. Impact of localized badger culling on tuberculosis incidence in British cattle. *Nature*, 426, pp.834–837.

Donnelly, C. a et al., 2006. Positive and negative effects of widespread badger culling on tuberculosis in cattle. *Nature*, 439(7078), pp.843–6.

Donnelly, C. a et al., 2007. Impacts of widespread badger culling on cattle tuberculosis: concluding analyses from a large-scale field trial. *International journal of infectious diseases*, 11(4), pp.300–308.

Drewe, J. a et al., 2010. Diagnostic accuracy and optimal use of three tests for tuberculosis in live badgers. *PloS one*, 5(6), p.e11196.

Drewe, J. a et al., 2013. Patterns of direct and indirect contact between cattle and badgers naturally infected with tuberculosis. *Epidemiology and infection*, 141(7), pp.1–9.

Duarte, E.L. et al., 2008. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. *Veterinary microbiology*, 130(3-4), pp.415–21.

Duffield, B.J. & Young, D.A., 1984. Survival of *Mycobacterium bovis* in defined environmental conditions. *Veterinary microbiology*, 10, pp.193–197.

Dufour, B. et al., 2011. A qualitative risk assessment methodology. *Revue Scientifique Et Technique De L' Office International Des Epizooties*, 30(3), pp.1–10.

Dufour, B. & Plée, L., 2009. Analyse du risque en santé animale. *Bulletin des GTV*, 50, pp.71–77.

Engeman, R.M. et al., 2013. Monitoring wild pig populations: a review of methods. *Environmental science and pollution research international*, 20(11), pp.8077–91.

Ezenwa, V.O. et al., 2010. Hidden consequences of living in a wormy world: nematode induced immune suppression facilitates tuberculosis invasion in African buffalo. *The American naturalist*, 176(5), pp.613–24.

Fediaevsky, A. et al., 2010. La tuberculose bovine en France en 2010 , surveillance et détection accrues. *bulletin épidémiologique*, 46, pp.3–9.

Fenton, A. & Pedersen, A.B., 2005. Community epidemiology framework for classifying disease threats. *Emerging infectious diseases*, 11(12), pp.1815–21.

Feore, S. & Montgomery, W.I., 1999. Habitat effects on the spatial ecology of the European badger (*Meles meles*). *Journal of Zoology*, 247(4), pp.537–549.

Fine, A.E. et al., 2011. A study of the persistence of *Mycobacterium bovis* in the environment under natural weather conditions in Michigan, USA. *Veterinary medicine international*, 2011, ID765430

Fromont, E. & Rossi, S., 2000. Echantillonnage en faune sauvage: quelques questions sur la taille d'échantillon. *Epidemiologie et santé animale*, 37, pp.11–19.

Furphy, C. et al., 2012. DNA Typing of *Mycobacterium bovis* isolates from badgers (*Meles meles*) culled from areas in Ireland with different levels of tuberculosis prevalence. *Veterinary medicine international*, 2012, p.742478.

Gallagher, J. & Clifton-Hadley, R.S., 2000. Tuberculosis in badgers; a review of the disease and its significance for other animals. *Research in veterinary science*, 69(3), pp.203–17.

Gallagher, J., Monies, R. & Rule, B., 1998. Role of infected , non-diseased badgers in the pathogenesis of tuberculosis in the badger. *The Veterinary Record*, 142, pp.710–714.

Gamelon, M. et al., 2012. Making use of harvest information to examine alternative management scenarios: a body weight-structured model for wild boar. *Journal of Applied Ecology*, 49(4), pp.833–841.

Gannon, B.W., Hayes, C.M. & Roe, J.M., 2007. Survival rate of airborne *Mycobacterium bovis*. *Research in veterinary science*, 82(2), pp.169–72.

Garel, M. et al., 2010. Are abundance indices derived from spotlight counts reliable to monitor red deer *Cervus elaphus* populations? *Wildlife Biology*, 16(1), pp.77–84.

De Garine-Wichatitsky, M. et al., 2013. A review of bovine tuberculosis at the wildlife-livestock-human interface in sub-Saharan Africa. *Epidemiology and infection*, 141(7), pp.1342–56.

Garnett, B., Delahay, R. & Roper, T., 2005. Ranging behaviour of European badgers (*Meles meles*) in relation to bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) infection. *Applied Animal Behaviour Science*, 94(3-4), pp.331–340.

Garnett, B., Roper, T. & Delahay, R., 2003. Use of cattle troughs by badgers (*Meles meles*) A potential route for the transmission of bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) to cattle. *Applied Animal Behaviour Science*, 80(1), pp.1–8.

Garnett, B.T., Delahay, R.J. & Roper, T.J., 2002. Use of cattle farm resources by badgers (*Meles meles*) and risk of bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) transmission to cattle. *Proc. R. Soc. Lond B.* , 269(1499), pp.1487–91.

Garrido, J.M. et al., 2011. Protection against tuberculosis in Eurasian wild boar vaccinated with heat-inactivated *Mycobacterium bovis*. *PloS one*, 6(9), p.e24905.

Gavier-Widen, D. et al., 2001. Pathology of natural *Mycobacterium bovis* infection in European badgers (*Meles meles*) relationship with bacterial excretion. *Veterinary Record*, 148, pp.299–304.

Gavier-Widén, D. et al., 2009. A review of infection of wildlife hosts with *Mycobacterium bovis* and the diagnostic difficulties of the "no visible lesion" presentation. *New Zealand veterinary journal*, 57(3), pp.122–31.

Goddard, P.J. et al., 2001. Behavioural responses of red deer to fences of five different designs. *Applied Animal Behaviour Science*, 73, pp.289–298.

Godvik, I. et al., 2009. Temporal scales, trade-offs, and functional responses in red deer habitat selection. *Ecology*, 90(3), pp.699–710.

Gormley, E. & Corner, L. a L., 2013. Control strategies for wildlife tuberculosis in Ireland. *Transboundary and emerging diseases*, 60, pp.128–135.

Gortazar, C., Vicente, J. & Gavier-Widen, D., 2003. Pathology of bovine tuberculosis in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Veterinary Record*, 152, pp.779–780.

Gortazar, C. et al., 2005. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from wild ungulates in south-central Spain. *Veterinary Research*, 36, pp.43–52.

Gortázar, C. et al., 2006. Disease risks and overabundance of game species. *European Journal of Wildlife Research*, 52(2), pp.81–87.

Gortázar, C. et al., 2008. Bovine tuberculosis in Doñana Biosphere Reserve: the role of wild ungulates as disease reservoirs in the last Iberian lynx strongholds. *PloS one*, 3(7), p.e2776.

Gortazar, C., Vicente, J., et al., 2011. Progress in the control of bovine tuberculosis in Spanish wildlife. *Veterinary microbiology*, 151(1-2), pp.170–8.

Gortazar, C., Torres, M.J., et al., 2011. Fine-tuning the space, time, and host distribution of mycobacteria in wildlife. *BMC microbiology*, 11(1), p.27.

Gortázar, C. et al., 2012. The status of tuberculosis in European wild mammals. *Mammal Review*, 42(3), pp.193–206.

Granval, P., Muys, B. & Leconte, D., 2000. Intérêt faunistique de la prairie permanente pâturée. *Fourrages*, 162, pp.157–167.

Griffin, J.M. et al., 2005. The impact of badger removal on the control of tuberculosis in cattle herds in Ireland. *Preventive veterinary medicine*, 67(4), pp.237–66.

Gudelj, I. & White, K. a J., 2004. Spatial heterogeneity, social structure and disease dynamics of animal populations. *Theoretical population biology*, 66(2), pp.139–49.

Haddad, N. et al., 2001. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* strains isolated in France from 1979 to 2000. *Journal of clinical microbiology*, 39(10), pp.3623–3632.

Haddad, N., Masselot, M. & Durand, B., 2004. Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. *Research in Veterinary Science*, 76(1), pp.1–18.

Hamann, J., Klein, F. & Saint-Andrieux, C., 1997. Domaine vital diurne et deplacements de biches (*Cervus elaphus*) sur le secteur de la Petite Pierre (Bas-Rhin). *Gibier faune sauvage*, 14, pp.1–17.

Hammond, R., 2001. Irish soil and land-use classifications as predictors of numbers of badgers and badger setts. *Preventive Veterinary Medicine*, 51(3-4), pp.137–148.

Hardstaff, J.L. et al., 2012. Impact of external sources of infection on the dynamics of bovine tuberculosis in modelled badger populations. *BMC veterinary research*, 8(1), p.92.

Hardstaff, J.L. et al., 2013. Evaluating the tuberculosis hazard posed to cattle from wildlife across Europe. *Research in Veterinary Science*, in press.

Hars, J., Richomme, C. & Boschiroli, M., 2010. La tuberculose bovine dans la faune sauvage en France. *bulletin épidémiologique*, (38), pp.28–31.

Hars, J. et al., 2012. Dix années de surveillance de la tuberculose bovine dans la faune sauvage française et perspectives. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimenation*, 52(1), pp.2–6.

Hars, J. et al., 2013. De l'éradication à la réapparition des maladies infectieuses animales. les dangers de la faune sauvage: contexte et outils de gestion. *Epidemiologie et santé animale*, 64, pp.57–69.

Haydon, D.T. et al., 2002. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerging Infectious Diseases*, 8(12), pp.1468–1473.

Hénault, S., Karoui, C. & Boschiroli, M., 2006. A PCR-based method for tuberculosis detection in wildlife. *Developments in biologicals,*, 126, pp.123–132.

Hermoso de Mendoza, J. et al., 2006. Bovine tuberculosis in wild boar (*Sus scrofa*), red deer (*Cervus elaphus*) and cattle (*Bos taurus*) in a Mediterranean ecosystem (1992-2004). *Preventive veterinary medicine*, 74(2-3), pp.239–47.

Holt, R., Dobson, A. & Begon, M., 2003. Parasite establishment in host communities. *Ecology letters*, 6, pp.837–842.

Hounsome, T.D. et al., 2005. An evaluation of distance sampling to estimate badger (*Meles meles*) abundance. *Journal of Zoology*, 266(1), pp.81–87.

Huard, R. et al., 2003. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *Journal of clinical microbiology*, 41(4), pp.1637–1650.

Hutchings, M.R. & Harris, S., 1997. Effects of farm management practices on cattle grazing behaviour and the potential for transmission of bovine tuberculosis from badgers to cattle. *The Veterinary Journal*, 153, pp.149–162.

Hutchings, M.R. & Harris, S., 1999. Quantifying the risks of TB infection to cattle posed by badger excreta. *Epidemiology and infection*, 122(1), pp.167–73.

Hutchings, M.R., Service, K.M. & Harris, S., 2002. Is population density correlated with faecal and urine scent marking in European badgers (*Meles meles*) in the UK? *Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde*, 67, pp.286–293.

Jackson, R., Lisle, G.W. De & Morris, R.S., 1995. A study of the environmental survival of *Mycobacterium bovis* on a farm in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 43, pp.346–352.

Jenkins, H.E. et al., 2007. Effects of culling on spatial associations of *Mycobacterium bovis* infections in badgers and cattle. *Journal of Applied Ecology*, 44(5), pp.897–908..

Jenkins, H.E. et al., 2008. The prevalence, distribution and severity of detectable pathological lesions in badgers naturally infected with Mycobacterium bovis. *Epidemiology and infection*, 136(10), pp.1350–61.

Jenkins, H.E., Woodroffe, R. & Donnelly, C.A, 2010. The duration of the effects of repeated widespread badger culling on cattle tuberculosis following the cessation of culling. *PloS one*, 5(2), p.e9090.

Jenkins, H.E., Cox, D.R. & Delahay, R.J., 2012. Direction of association between bite wounds and *Mycobacterium bovis* infection in badgers: implications for transmission *PLoS ONE*, 7(9), p.e45584.

Johnson, L.K. et al., 2008. Histological observations of bovine tuberculosis in lung and lymph node tissues from British deer. *The Veterinary journal*, 175(3), pp.409–12.

Joly, D.O. & Messier, F., 2004. Factors affecting apparent prevalence of tuberculosis and brucellosis in wood bison. *Journal of Animal Ecology*, 73(4), pp.623–631.

Judge, J. et al., 2011. Effectiveness of biosecurity measures in preventing badger visits to farm buildings *PLoS ONE*, 6(12), p.e28941.

Kalema-Zikusoka, G. et al., 2005. A preliminary investigation of tuberculosis and other diseases in African buffalo (*Syncerus caffer*) in Queen Elizabeth National Park, Uganda. *The Onderstepoort journal of veterinary research*, 72(2), pp.145–51.

Kamerbeek, J. et al., 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of clinical microbiology*, 35(4), pp.907–14.

Karolemeas, K., Donnelly, C. & Conlan, A., 2012. The effect of badger culling on breakdown prolongation and recurrence of bovine tuberculosis in cattle herds in Great Britain. *PloS one*, 7(12), pp.1–8.

Kennedy, J.F. et al., 1995. Characteristics of mineral licks used by white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *American Midland Naturalist*, 134(2), pp.324–331.

Keuling, O., Stier, N. & Roth, M., 2009. Commuting, shifting or remaining? Different spatial utilisation patterns of wild boar *Sus scrofa* L. in forest and field crops during summer. *Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde*, 74(2), pp.145–152..

Kjær, L.J., Schauber, E.M. & Nielsen, C.K., 2008. Spatial and temporal analysis of contact rates in female white-tailed deer. *Journal of Wildlife Management*, 72(8), pp.1819–1825..

Klein, F. & Hamann, J., 1999. Domaines vitaux diurnes et déplacements de cerfs mâles (*Cervus elaphus*) sur le secteur de la Petite Pierre (Bas-Rhin). *Gibier faune sauvage*, 16(3), pp.251–271.

Kowalczyk, R., Bunevich, A.N. & Drzejewska, B.J.Ê., 2000. Badger density and distribution of setts in Bialowieza Primeval Forest (Poland and Belarus) compared to other Eurasian populations. *Acta Theriologica*, 45(3), pp.395–408.

Kowalczyk, R., Jedrzejewska, B. & Zalewski, A., 2003a. Annual and circadian activity patterns of badgers (*Meles meles*) in Białowieza Primeval Forest (eastern Poland) compared with other Palaearctic populations. *Journal of Biogeography*, 30, pp.463–472.

Kowalczyk, R, Zalewski, A. & Jedrzejewska, B., 2003b. Spatial organization and demography of badgers (*Meles meles*) in Bialowieza Primeval Forest , Poland , and the influence of earthworms on badger densities in Europe. *Canadian Journal of Zoology*, 81(1), pp.74–87.

Kowalczyk, R., Zalewski, A. & Jędrzejewska, B., 2006. Daily movement and territory use by badgers *Meles meles* in Bialowieza Primaveral forest, Poland. *Wildlife Biology*, 12(4), pp.385–391.

Kruuk, H., 1978. Foraging and spatial organisation of the European badger, *Meles meles* L. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 4(1), pp.75–89.

Kruuk, H. et al., 1979. The use of pasture by the European Badger (*Meles meles*). *Journal of Applied Ecology*, 16, pp.453–459.

Kruuk, H. & Parish, T., 1981. Feeding specialization of the European badger *Meles mele*s in Scotland. *The Journal of Animal Ecology*, 50, pp.773–788.

Kukielka, E. et al., 2013. Spatial and temporal interactions between livestock and wildlife in South Central Spain assessed by camera traps. *Preventive Veterinary Medicine*, 112(3), pp.213–221.

Lamarque, F. et al., 2000. Le réseau SAGIR , réseau national de suivi sanitaire de la faune sauvage française. *Epidemiologie et santé animale*, 37, pp.21–30.

Lande, U.S. et al., 2013. The effect of agricultural land use practice on habitat selection of red deer. *European Journal of Wildlife Research*, 60(1), pp.69–76.

Lara-Romero, C., Virgós, E. & Revilla, E., 2011. Sett density as an estimator of population density in the European badger *Meles meles*. *Mammal Review*, 42(1), pp.78–84.

Lavelle, M.J. et al., 2010. Response of deer to containment by a poly-mesh fence for mitigating disease outbreaks. *Journal of Wildlife Management*, 74(7), pp.1620–1625.

Lebecel, Y., 2009. *Le blaireau d'Eurasie (Meles meles) en Lorraine*, rapport d'étude. Groupe d'étude des mammifères de Lorraine. 11p.

Lesellier, S. et al., 2011. Protection of Eurasian badgers (*Meles meles*) from tuberculosis after intramuscular vaccination with different doses of BCG. *Vaccine*, 29(21), pp.3782–90.

Licoppe, A. & Crombrugghe, S. De, 2003. Assessment of spring habitat selection of red deer (*Cervus elaphus* L.) based on census data. *Zeitschrift für Jagdwissenschaft*, 49, pp.1–13.

Lloyd-Smith, J.O., Cross, P.C., et al., 2005. Should we expect population thresholds for wildlife disease? *Trends in ecology & evolution*, 20(9), pp.511–9.

Lloyd-Smith, J.O., Schreiber, S.J., et al., 2005. Superspreading and the effect of individual variation on disease emergence. *Nature*, 438(7066), pp.355–9.

Lugton, I. et al., 1998. Epidemiology and pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection of red deer (*Cervus elaphus*) in New Zealand. *New Zealand veterinary journal*, 46(4), pp.147–156.

Lyashchenko, K.P. et al., 2008. Animal-side serologic assay for rapid detection of *Mycobacterium bovis* infection in multiple species of free-ranging wildlife. *Veterinary microbiology*, 132(3-4), pp.283–92.

Macdonald, D.W., Mitchelmore, F. & Bacon, P.J., 1996. Predicting Badger Sett Numbers: Evaluating Methods in East Sussex. *Journal of Biogeography*, 23(5), pp.649–655.

Maeder, S., 2008. Etude de la tuberculose chez le sanglier (Sus scrofa), réservoir de la tuberculose bovine? Enquête épidémiologique 2006 – 2007 en forêt de Brotonne – Mauny (France). Thèse de doctorat vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.132 p.

Martin, S.W. et al., 1997. The association between the bovine tuberculosis status of herds in the East Offaly Project Area, and the distance to badger setts, 1988-1993. *Preventive veterinary medicine*, 31(1-2), pp.113–25.

Martin, L.B., Weil, Z.M. & Nelson, R.J., 2008. Seasonal changes in vertebrate immune activity: mediation by physiological trade-offs. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 363(1490), pp.321–39.

Martín-Atance, P. et al., 2006. Antibodies to *Mycobacterium bovis* in wild carnivores from Doñana National Park (Spain). *Journal of wildlife diseases*, 42(3), pp.704–8.

Martínez-López, B. et al., 2013. Farm-level risk factors for the occurrence, new infection or persistence of tuberculosis in cattle herds from South-Central Spain. *Preventive veterinary medicine*, in press.

Martín-Hernando, M.P. et al., 2010. Distribution of lesions in red and fallow deer naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Journal of comparative pathology*, 142(1), pp.43–50.

Martín-Hernando, M.P. et al., 2007. Lesions associated with *Mycobacterium tuberculosis* complex infection in the European wild boar. *Tuberculosis*, 87(4), pp.360–7.

Matschke, G.H., 1967. Aging European Wild Hogs by Dentition. *The Journal of Wildlife Management*, 31(1), pp.109–113.

Mauget, R., 1982. Seasonality of reproduction in the wild boar. Control of pig reproduction. Ed. DJA Cole & GR Foxcroft,. Butter Worths, London. pp 509-526

Mccorry, T. et al., 2005. Shedding of *Mycobacterium bovis* in the nasal mucus of cattle infected experimentally with tuberculosis by the intranasal and intratracheal routes. *Veterinay record*, 157, pp.613–618.

McInerney, J., Small, K.J. & Caley, P., 1995. Prevalence of *Mycobacterium bovis* infection in feral pigs in the Northern Territory. *Australian veterinary journal*, 72(12), pp.448–51.

Michel, A.L. et al., 2006. Wildlife tuberculosis in South African conservation areas : Implications and challenges. *Veterinary Microbiology*, 112, pp.91–100.

Miller, R. et al., 2007. Spatial analysis of *Mycobacterium bovis* infection in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in Michigan, USA. *Preventive veterinary medicine*, 82(1-2), pp.111–22.

Miller, R.S., Farnsworth, M.L. & Malmberg, J.L., 2013. Diseases at the livestock-wildlife interface: status, challenges, and opportunities in the United States. *Preventive veterinary medicine*, 110(2), pp.119–32.

Miller, R.S. & Sweeney, S.J., 2013. *Mycobacterium bovis* (bovine tuberculosis) infection in North American wildlife: current status and opportunities for mitigation of risks of further infection in wildlife populations. *Epidemiology and infection*, 141(7), pp.1357–70.

Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt, 2013a. L'agriculture en Bourgogne. *Agreste Bourgogne*, 157, pp.1–4.

Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt, 2013b. Mémento de la statistique agricole Côte d'Or, Nièvre, Saône et Loire, Yonne. Agreste Bourgogne. 24 p

Moore, J. & Roper, T., 2003. Temperature and humidity in badger *Meles meles* setts. *Mammal Review*, 33(3), pp.308–313.

Morris, R.S., Pfeiffer, D.U. & Jackson, R., 1994. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Veterinary microbiology*, 40(1-2), pp.153–77.

Muldowney, J. et al., 2003. Relationships between earthworm populations, grassland management and badger densities in County Kilkenny, Ireland. *Pedobiologia*, 47(5-6), pp.913–919.

Mullen, E.M. et al., 2013. Foraging Eurasian badgers *Meles meles* and the presence of cattle in pastures. Do badgers avoid cattle? *Applied Animal Behaviour Science*, 144(3-4), pp.130–137.

Munoz-Mendoza, M. et al., 2013. Wild boar tuberculosis in Iberian Atlantic Spain: a different picture from Mediterranean habitats. *BMC veterinary research*, 9(176).

Munyeme, M. et al., 2010. Tuberculosis in Kafue lechwe antelopes (*Kobus leche Kafuensis*) of the Kafue Basin in Zambia. *Preventive veterinary medicine*, 95(3-4), pp.305–8.

Murphy, D. et al., 2010. The prevalence and distribution of *Mycobacterium bovis* infection in European badgers (*Meles meles*) as determined by enhanced post mortem examination and bacteriological culture. *Research in veterinary science*, 88(1), pp.1–5.

Naranjo, V. et al., 2008. Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Veterinary Microbiology*, 127(1-2), pp.1–9.

Newton-Cross, G., White, P.C.L. & Harris, S., 2007. Modelling the distribution of badgers *Meles meles*: comparing predictions from field-based and remotely derived habitat data. *Mammal Review*, 37(1), pp.54–70.

Nichols, J.D. et al., 2001. Hunting statistics: What data for what use? an account of an international workshop. *Game & wildlife science*, 18(2), pp.185–205.

Nishi, J.S., Shury, T. & Elkin, B.T., 2006. Wildlife reservoirs for bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in Canada: strategies for management and research. *Veterinary microbiology*, 112(2-4), pp.325–38.

Nugent, G., Whitford, J. & Young, N., 2002. Use of released pigs as sentinels for *Mycobacterium bovis*. *Journal of wildlife diseases*, 38(4), pp.665–77.

Nugent, G., 2011. Maintenance, spillover and spillback transmission of bovine tuberculosis in multi-host wildlife complexes: A New Zealand case study. *Veterinary microbiology*, 151(1-2), pp.34–42.

O'brien, D.J.. et al., 2001. Tuberculous Lesions in Free-Ranging White-Tailed Deer in Michigan. *Journal of Wildlife Diseases*, 37(3), pp.608–613.

O'brien, D.J. et al., 2002. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* in free-ranging white-tailed deer, Michigan, USA, 1995-2000. *Preventive veterinary medicine*, 54.

O'brien, D.J. et al., 2006. Managing the wildlife reservoir of *Mycobacterium bovis*: the Michigan, USA, experience. *Veterinary microbiology*, 112(2-4), pp.313–23.

OIE, 2010. *Code sanitaire pour les animaux terrestres. Volume 1. Dispositions générales*, Paris. 509 p.

Olea-Popelka, F.J. et al., 2005. Spatial relationship between *Mycobacterium bovis* strains in cattle and badgers in four areas in Ireland. *Preventive veterinary medicine*, 71(1-2), pp.57–70.

Olea-Popelka, F.J. et al., 2009. Targeted badger removal and the subsequent risk of bovine tuberculosis in cattle herds in county Laois, Ireland. *Preventive veterinary medicine*, 88(3), pp.178–84.

Palmer, M. V, Waters, W.R., Ave, D., et al., 2004. Investigation of the transmission of *Mycobacterium bovis* from deer to cattle through indirect contact investigation of the transmission through indirect contact. *American Journal of Veterinary Research*, 65(11), pp.1483–1489.

Palmer, M. V, Waters, W.R. & Whipple, D.L., 2004. Shared feed as a means of deer-to-deer transmission of *Mycobacterium bovis*. *Journal of wildlife diseases*, 40(1), pp.87–91.

Palmer, M. V et al., 2012. *Mycobacterium bovis*: a model pathogen at the interface of livestock, wildlife, and humans. *Veterinary medicine international*, 2012, p.236205.

Palmer, M. V, 2013. *Mycobacterium bovis*: characteristics of wildlife reservoir hosts. *Transboundary and emerging diseases*, 60 Suppl 1, pp.1–13.

Palphramand, K.L., Newton-cross, G. & White, P.C.L., 2007. Spatial organization and behaviour of badgers (*Meles meles*) in a moderate-density population. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61, pp.401–413.

Parrott, D. et al., 2011. Estimates of regional population densities of badger *Meles meles*, fox *Vulpes vulpes* and hare *Lepus europaeus* using walked distance sampling. *European Journal of Wildlife Research*, 58(1), pp. 23-33

Payne, A. et al., 2013. Bovine tuberculosis in "Eurasian" badgers (*Meles meles*) in France. *European Journal of Wildlife Research*, 59(3), pp.331–339.

Pellerin, M., 2005. Utilisation et sélection de l'habitat chez le chevreuil à différentes échelles spatio-temporelles.Thèse de doctorat universitaire. Université de Poitiers. 289 p

Pépin, D. et al., 2008. Individual variation in migratory and exploratory movements and habitat use by adult red deer (*Cervus elaphus* L.) in a mountainous temperate forest. *Ecological Research*, 23(6), pp.1005–1013.

Phillips, C.J.C. et al., 2003. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Research in veterinary science*, 74(1), pp.1–15.

Pope, L.C. et al., 2006. Isolation by distance and gene flow in the Eurasian badger (*Meles meles*) at both a local and broad scale. *Molecular ecology*, 15(2), pp.371–386.

Porphyre, T et al., 2008a. Influence of contact heterogeneity on TB reproduction ratio R_0 in a free-living brushtail possum *Trichosurus vulpecula* population. *Veterinary Research*, 39(31).

Porphyre, T, Stevenson, M. & McKenzie, J., 2008b. Risk factors for bovine tuberculosis in New Zealand cattle farms and their relationship with possum control strategies. *Preventive veterinary medicine*, 86(1-2), pp.93–106.

Radunz, B., 2006. Surveillance and risk management during the latter stages of eradication: experiences from Australia. *Veterinary microbiology*, 112(2-4), pp.283–90.

Ranjard, L. et al., 2003. Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 5(11), pp.1111–1120.

Reid, N. et al., 2012. Monitoring and population estimation of the European badger *Meles meles* in Northern Ireland. *Wildlife Biology*, 18, pp.46–57.

Reilly, L. a & Courtenay, O., 2007. Husbandry practices, badger sett density and habitat composition as risk factors for transient and persistent bovine tuberculosis on UK cattle farms. *Preventive veterinary medicine*, 80(2-3), pp.129–42.

Reveillaud, E., 2011. Point épidémiologique sur la tuberculose bovine dasn la faune sauvage en Dordogne en 2011- Evaluation du risque lié au blaireau (*Meles meles*).Thèse de doctorat vétérinaire. Ecole nationale vétérinaire, agroalimentaire et de l'alimentation Nantes Atlantique-ONIRIS. 188 p.

Reviriego Gordejo, F.J. & Vermeersch, J.P., 2006. Towards eradication of bovine tuberculosis in the European Union. *Veterinary microbiology*, 112(2-4), pp.101–9.

Rhyan, J.C. & Spraker, T.R., 2010. Emergence of diseases from wildlife reservoirs. *Veterinary pathology*, 47(1), pp.34–9.

Richomme, C. et al., 2010. Bovine tuberculosis in livestock and wild boar on the Mediterranean island, Corsica. *Journal of wildlife diseases*, 46(2), pp.627–31.

Richomme, C. et al., 2013. Exposure of wild boar to *Mycobacterium tuberculosis* complex in France since 2000 is consistent with the distribution of bovine tuberculosis outbreaks in cattle *PloS one*, 8(10), p e77842.

Rigaux, P. & Chanu, C., 2011. Densité du blaireau d'Eurasie (*Meles meles*) et répartition des terriers dans un paysage rural de moyenne montagne , entre Combrailles et Monts Dôme (Puy de Dôme, France), rapport d'étude. Groupe mammalogique d'Auvergne. Monétay sur Allier. 32 p.

Riordan, P. et al., 2011. Culling-induced changes in badger (*Meles meles*) behaviour, social organisation and the epidemiology of bovine tuberculosis *PLoS ONE*, 6(12), p.e28904.

Rivière, J. et al., 2012. La surveillance de la faune sauvage: de la théorie à la pratique avec l'exemple du réseau Sylvatub. *Epidemiologie et santé animale*, 61, pp.5–16.

Robinson, P. a et al., 2012. BCG vaccination against tuberculosis in European badgers (*Meles meles*): a review. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 35(4), pp.277–87.

Rodríguez-Prieto, V. et al., 2012. A Bayesian approach to study the risk variables for tuberculosis occurrence in domestic and wild ungulates in South Central Spain. *BMC veterinary research*, 8(148), pp.1-13

Le Roex, N. et al., 2013. Gene polymorphisms in African buffalo associated with susceptibility to bovine tuberculosis infection. *PloS one*, 8(5), p.e64494.

Roper, T.J., 2010. Badger. The New Naturalist Library. Ed Collins. London 386 p.

Roring, S., Scott, A. & Brittain, D., 2002. Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and. *Journal of clinical microbiology*, 40(6), pp.2126–2133.

Rosalino, L., Macdonald, D.W. & Santos-Reis, M., 2004. Spatial structure and land-cover use in a low-density Mediterranean population of Eurasian badgers. *Canadian Journal of Zoology*, 1502(2004), pp.1493–1502.

Ruette, S., Croquet V. & Albaret M., 2007 Comparaison de différentes méthodes de suivi du blaireau, *Meles meles*, en région Bourgogne et Franche-Comté. Rapport d'étude ONCFS/ FRC Bourgogne/ FRC Franche-Comté. 27 p.

Ryan, T.J. et al., 2006. Advances in understanding disease epidemiology and implications for control and eradication of tuberculosis in livestock: the experience from New Zealand. *Veterinary microbiology*, 112(2-4), pp.211–9.

Saïd, S. et al., 2011. Sex effect on habitat selection in response to hunting disturbance: the study of wild boar. *European Journal of Wildlife Research*, 58(1), pp.107–115.

Schiller, I. et al., 2011. Bovine tuberculosis in Europe from the perspective of an officially tuberculosis free country: trade, surveillance and diagnostics. *Veterinary microbiology*, 151(1-2), pp.153–9.

Schley, L., Schaul, M. & Roper, T.J., 2004. Distribution and population density of badgers *Meles meles* in Luxembourg. *Mammal Review*, 34(3), pp.233–240.

Schmitt, S. et al., 1997. Bovine tuberculosis in free-ranging white-tailed deer from Michigan. *Journal of wildlife diseases*, 33(4), pp.749–758.

Seaman, D.E. et al., 1999. Effect of sample size on kernel home range estimates. *Journal of Wildlife Management*, 63, pp.739–747.

Serraino, a et al., 1999. Monitoring of transmission of tuberculosis between wild boars and cattle: genotypical analysis of strains by molecular epidemiology techniques. *Journal of clinical microbiology*, 37(9), pp.2766–71.

Servanty, S. et al., 2009. Pulsed resources and climate-induced variation in the reproductive traits of wild boar under high hunting pressure. *The Journal of animal ecology*, 78(6), pp.1278–90.

Skuce, R.A. et al., 2005. Discrimination of isolates of *Mycobacterium bovis* in Northern Ireland on the basis of variable numbers of tandem repeats (VNTRs). *Veterinary Record*, 157, pp.501–504.

Sleeman, D.P. et al., 2009. How many Eurasian badgers *Meles meles* L. are there in the Republic of Ireland? *European Journal of Wildlife Research*, 55(4), pp.333–344.

Smith, G.C., 2001. Models of *Mycobacterium bovis* in wildlife and cattle. *Tuberculosis*, 81(1-2), pp.51–64.

Sobrino, R et al., 2008a. Carnivore population trends in Spanish agrosystems after the reduction in food availability due to rabbit decline by rabbit haemorrhagic disease and improved waste management. *European Journal of Wildlife Research*, 55(2), pp.161–165.

Sobrino, R et al., 2008b. Bovine tuberculosis in a badger (*Meles meles*) in Spain. *Canadian Journal of Zoology*, pp.1–2.

Spitz, F. & Janeau, G., 1990. Spatial strategies: an attempt to classify daily movements of wild boar. *Acta Theriologica*, 35, pp.129–149.

Stankowich, T., 2008. Ungulate flight responses to human disturbance: A review and meta-analysis. *Biological Conservation*, 141(9), pp.2159–2173.

Swann, D.E. et al., 2004. Infrared-triggered cameras for detecting wildlife: an evaluation and review. *Wildlife Society Bulletin*, 32(2), pp.357–365.

Thornton, P.D. et al., 2005. Preliminary comparison of four anaesthetic techniques in badgers (*Meles meles*). *Veterinary anaesthesia and analgesia*, 32(1), pp.40–7.

Tolhurst, B.. et al., 2008. The behavioural responses of badgers (*Meles meles*) to exclusion from farm buildings using an electric fence. *Applied Animal Behaviour Science*, 113(1-3), pp.224–235.

Tolhurst, B. et al., 2009. Behaviour of badgers (*Meles meles*) in farm buildings: Opportunities for the transmission of *Mycobacterium bovis* to cattle? *Applied Animal Behaviour Science*, 117(1-2), pp.103–113.

Tomlinson, a J. et al., 2013. Heterogeneity in the risk of *Mycobacterium bovis* infection in European badger (*Meles meles*) cubs. *Epidemiology and infection*, 141(7), pp.1458–66.

Tuyttens, F. et al., 2000. caused by a badger (*Meles meles*) culling operation: implications for the function of territoriality and the control of bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*). *Journal of Animal Ecology*, 32, pp.815–828.

Vaucoulon, P. & Chiffaut, A., 2004. La Bourgogne Paysages naturels, faune et flore. Delachaux et Niestlé, Coll. La bibliothèque du naturaliste. Paris, 324 p.

Van Laere, G. et al., 2008. Une nouvelle méthode pour le suivi du chevreuil à grande échelle: l'IK voiture. *Faune sauvage*, 282, pp.19–25.

Vial, F., Johnston, W.T. & Donnelly, C. a, 2011. Local cattle and badger populations affect the risk of confirmed tuberculosis in British cattle herds. *PloS one*, 6(3), p.e18058.

Vial, F. & Donnelly, C. a, 2012. Localized reactive badger culling increases risk of bovine tuberculosis in nearby cattle herds. *Biology letters*, 8(1), pp.50–3.

Vicente, J. et al., 2006. Wild boar and red deer display high prevalences of tuberculosis-like lesions in Spain. *Veterinary Research*, 37, pp.107–119.

Vicente, J. et al., 2007. Risk factors associated with the prevalence of tuberculosis-like lesions in fenced wild boar and red deer in south central Spain. *Veterinary Research*, 38, pp.451–464.

Vicente, J. et al., 2013. Temporal trend of tuberculosis in wild ungulates from mediterranean Spain. *Transboundary and emerging diseases*, 60 Suppl 1, pp.92–103.

Vidrih, M. & Trdan, S., 2008. Evaluation of different designs of temporary electric fence systems for the protection of maize against wild boar (*Sus scrofa* L., Mammalia, Suidae). *Acta agriculturae Slovenica*, 91(2), pp.343–349.

Virgos, E. & Casanovas, J.G., 1999. Badger *Meles meles* sett site selection in low density Mediterranean areas of central Spain. *Acta Theriologica*, 44(2), pp.173–182.

Vourc'h, G., Boyard, C. & Barnouin, J., 2008. Mammal and bird species distribution at the woodland-pasture interface in relation to the circulation of ticks and pathogens. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149, pp.322–5.

Ward, A.I. et al., 2009. Estimating the risk of cattle exposure to tuberculosis posed by wild deer relative to badgers in England and Wales. *Journal of wildlife diseases*, 45(4), pp.1104–20.

Ward, A I., Judge, J. & Delahay, R.J., 2010. Farm husbandry and badger behaviour: opportunities to manage badger to cattle transmission of *Mycobacterium bovis*? *Preventive veterinary medicine*, 93(1), pp.2–10.

Ward, A.I. & Smith, G.C., 2012. Predicting the status of wild deer as hosts of *Mycobacterium bovis* infection in Britain. *Journal of Animal Ecology*, pp.127–135.

Weber, N. et al., 2012. Denning behaviour of the European badger (*Meles meles*) correlates with bovine tuberculosis infection status. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 67(3), pp.471–479.

Welander, J., 2000. Spatial and temporal dynamics of wild boar (*Sus scrofa*) rooting in a mosaic landscape. *Journal of Zoology*, 252(2), pp.263–271.

White, P.C., Brown, J. a & Harris, S., 1993. Badgers (*Meles meles*), cattle and bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*): a hypothesis to explain the influence of habitat on the risk of disease transmission in southwest England. *Proceedings of the Royal Society of London Biological sciences*, 253(1338), pp.277–84.

White, P.C.L. et al., 2008. Control of bovine tuberculosis in British livestock: there is no "silver bullet". *Trends in microbiology*, 16(9), pp.420–7.

Wilson, G.J. & Delahay, R.J., 2001. using field signs and observation. *Wildlife Research*, 28, pp.151–164.

Wilson, G.J. et al., 2003. Quantification of badger (*Meles meles*) sett activity as a method of predicting badger numbers. *Journal of Zoology*, 259(1), pp.49–56.

Wobeser, G., 2009. Bovine tuberculosis in Canadian wildlife: An updated history. *Canadian Veterinary Journal*, 50, pp.1169–1176.

Woodroffe, R. et al., 2005. Spatial association of *Mycobacterium bovis* infection in cattle and badgers *Meles meles*. *Journal of Applied Ecology*, 42(5), pp.852–862.

Woodroffe, R. et al., 2006. Culling and cattle controls influence tuberculosis risk for badgers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(40), pp.14713–7.

Woodroffe, R. et al., 2009. Social group size affects *Mycobacterium bovis* infection in European badgers (*Meles meles*). *The Journal of animal ecology*, 78(4), pp.818–27.

Woolhouse, M.E.J., Taylor, L.H. & Haydon, D.T., 2001. Population Biology of Multihost Pathogens. *Science*, 292, pp.1109–1112.

Worton, B.J., 1995. Using Monte Carlo simulation to evaluate kernel-based home range estimators. *The Journal of Wildlife Management*, 59(4), pp.794–800.

Young, J., Gormley, E. & Wellington, E.M.H., 2005. Molecular detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium bovis* BCG (Pasteur) in soil. *Applied and environnemental Microbiology*, 71(4), pp.1946–1952.

Zanella, G., Durand, B., et al., 2008. *Mycobacterium bovis* in wildlife in France. *Journal of wildlife diseases*, 44(1), pp.99–108.

Zanella, G., Duvauchelle, A., et al., 2008. Patterns of lesions of bovine tuberculosis in wild red deer and wild boar. *Veterinary Record*, 163, pp.43–47.

Zanella, G. et al., 2012. Modelling transmission of bovine tuberculosis in red deer and wild boar in Normandy, France. *Zoonoses and public health*, 59 Suppl 2, pp.170–8.

Zuur, A.F. et al., 2009. Mixed Effects Models and Extensions in Ecology with R. Statistics for Biology and Health. Springer Science Buisness Media.. 574 p.

ANNEXE 1

Protocole de mise en culture des prélèvements pour isolement de mycobactéries chez l'animal

Système Qualité

DOCUMENT : Mode opératoire CODE : VM.M.C5.4.03 VERSION : 1.1

TITRE : **ISOLEMENT DES MYCOBACTERIES CHEZ L'ANIMAL**

- Conserver des ganglions congelés seulement en cas de lésions visibles.
- Réaliser ces manipulations à l'aide de pinces en plastique et de scalpels à usage unique, non stériles.
- Déposer les scalpels usagers dans une boîte à déchets Sharpsafe 4 litres stockée sous le PSM. Mettre le reste des déchets dans un sac plastique sous la hotte. Ce sac est fermé avant d'être déposé dans le bac jaune sous le PSM. Entre chaque ganglion, changer de boîte de Pétri, de scalpel et de pince.

↳ Cas avec lésions

→ Préparation en vue de la coloration de Ziehl

- A l'aide d'un scalpel, gratter les lésions pour récupérer des parties calcifiées.
- Les déposer sur une lame notée du numéro d'ordre interne et du ganglion (..., TB...).
- Ecraser avec la deuxième lame (notée également).
- Laisser sécher.
- Fixer les lames à la flamme.
- Les disposer sur le bac à coloration en attente de la coloration de Ziehl à froid.

→ Préparation en vue de la culture

- Après avoir éliminé le caséum, se débarraser du tissu graisseux, de la peau et du tissu ganglionnaire. Ne garder que la coque de l'abcès si possible. Si peu ou pas de coque, garder du tissu ganglionnaire. Le découper en morceaux très fins (hachés) dans le couvercle de la boîte de Pétri sans dépasser 5 g.
- Transvaser ce broyat dans le sac Stomacher identifié en faisant descendre la préparation au fond du sac.
- Le fermer à l'aide des barrettes.
- Déposer le sac Stomacher sur un petit panier métallique avant de la transférer en zone tuberculose par le passe-plat ou stocker le sac au congélateur à < - 16 °C. si la culture et la PCR sont différées.

→ Préparation en vue de l'histologie

- Déposer dans un TP 30 un ou plusieurs morceaux d'échantillon avec lésions d'environ 0,5 cm de large.
- Ajouter le fixateur (formol).
- Adresser dans les plus brefs délais ce prélèvement à l'ENV de Lyon.

- Ensemenceurs à usage unique
- Papier Benchkot
- Sacs autoclave

6.3. Echantillons : organes et tissus

6.3.1. Enregistrement de l'échantillon avant analyse

- Attribuer au prélèvement un numéro d'ordre sur le cahier d'enregistrements tuberculose faune sauvage.
- Remplir une fiche suiveuse (AQ.E.I.C5.8.01.03) et une feuille de paillasse (VM.E.C5.4.09).
- Remplir une fiche de suivi du prélèvement (VM.E.C5.4.07).
- Effectuer une photocopie de la demande d'analyses, y coller une étiquette de la fiche suiveuse. Cette copie est destinée à la D.D.P.P. 21 pour information car l'analyse dure trois mois.

6.4. Mode opératoire

6.4.1. Préparation de l'échantillon sous le PSM local n° 59

- Placer le sac contenant les pots de ganglions ou les barquettes de ganglions issus d'autopsie sous le PSM.
- Sortir les prélèvements du sac.
- A l'aide des fiches de surveillance (pour la faune sauvage), identifier les prélèvements et préparer le sac Stomacher noté de l'identification de l'animal (ex. : BLAIR 39) et du numéro d'ordre interne.
- Sur un papier Benchkot, déposer le ganglion dans une boîte de Pétri ronde. Décortiquer le prélèvement c'est à dire enlever le tissu graisseux et la peau, le couper dans sa longueur pour s'assurer de la présence ou non de lésions.

↳ Cas sans lésion

- Découper le tissu ganglionnaire en morceaux très fins (haché) dans le couvercle de la boîte de Pétri sans dépasser 5 g.
- Transvaser ce broyat dans le sac Stomacher identifié en faisant descendre la préparation au fond du sac.
- Le fermer à l'aide des barrettes.
- Congeler à < - 16 °C si la culture et la PCR sont différées ou transférer en zone tuberculose par le passe-plat sur un petit panier métallique.

→ Conservation de l'échantillon

- Conserver pendant un an quelques morceaux d'échantillon dans un TP 30 à < - 16 °C si présence de lésions.

6.4.2. Traitement de l'échantillon pour analyse sous le PSM

- Placer sous le PSM : les réactifs NaOH (6 %), H2SO4 (4 %), bleu de Bromothymol.

6.4.2.1. Traitement par H_2SO_4 à 4 % et NaOH à 6 %

- Sous le PSM (zone de tuberculose : local n° 61), ouvrir le sac Stomacher.
- Ajouter H_2SO_4 à 4 % en quantité suffisante pour recouvrir les prélèvements.
- Ajouter 2 à 3 gouttes de bleu de Bromothymol.
- Refermer le sachet à l'aide d'une barrette.
- Broyer les fragments de tissu pendant 3 minutes à l'aide du Stomacher (position HIGH, programmer 120 puis 60).
- Laisser agir le décontaminant 27 minutes.
- Pendant cette période, transvaser le contenu du sac Stomacher dans un TP 30.
- Le temps de contact total avec l'acide est de 30 minutes.
- Neutraliser avec NaOH à 6 % (virage du jaune au vert). Vortexer le TP 30 entre chaque ajout de NaOH car les particules ganglionnaires relarguent de l'acide. Par conséquent, si le virage n'est pas stable (au vert), continuer la neutralisation.
- Laisser déposer les grosses particules.
- Ensemencer.

6.4.2.2. Ensemencement

- Coller une étiquette dossier sur les tubes de culture (1 Coletsos, 1 Coletsos + osséine, 1 Löwenstein-Jensen). Les placer sous le PSM ou à proximité du bec Bunsen.
- Ensemencer à l'aide de la pastette le surnageant sur les milieux de culture adéquats :
  - 3 gouttes sur un tube de milieu de Lowenstein-Jensen. Incuber un tube à 37 °C ± 2°C,
  - 3 gouttes sur un tube de milieu Coletsos. Incuber à 37 °C ± 2 °C,
  - 3 gouttes sur un tube de milieu Coletsos + osséine. Incuber à 37 °C ± 2 °C.
- L'incubation doit s'effectuer en position inclinée sur un plateau sans visser les bouchons à fond.

Remarque : suite aux échanges avec l'ANSES de Maisons Alfort, concernant la faune sauvage (sangliers, cervidés, blaireaux...), la culture n'est pratiquée qu'à 37 °C (3 tubes).

ANNEXE 2

Protocole suivi pour la détection de *Mycobacterium bovis* par PCR à partir de tissus, utilisant le kit commercial TaqVet *Mycobacterium tuberculosis* complex 2 wells

The TaqVet® *Mycobacterium tuberculosis* Complex 2 wells Kit

For the detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* in tissues (lymph nodes...) by real-time PCR using TaqMan® probes

Ref: TUB2W

I – Introduction

Bovine tuberculosis is a well-known zoonotic disease with a worldwide distribution. It is mainly due to *Mycobacterium bovis*. This bacterium belongs to the "*Mycobacterium tuberculosis* complex" (MTBC) which includes animal and human pathogen species such as *M. tuberculosis* and *M. caprae*. *M. caprae*, whilst less frequently found in the field, is responsible for tuberculosis in both caprines and bovines.

The World organisation for animal health (OIE) classes bovine tuberculosis among bovine diseases. In infected countries the disease causes alarming problems of public health as well as socio-economic problems impacting on imports and exports of animals and animal products. As well as bovines, *M. bovis* and *M. caprae* infect other domestic and wild animal species.

The TaqVet® *Mycobacterium tuberculosis* Complex Kit, developed by LSI, enables the detection of *M. bovis* and *M. caprae* from tissues (lymph nodes...); it detects the IS6110 specific insertion sequence found in the genome of all MTBC members. Isolated strains from animals infected by *Mycobacterium bovis* have no more than 5 copies of this sequence (most isolates have only 1 copy). Primers and IS6110 TaqMan® probes has been selected to specifically detect *M. bovis* and *M. caprae*, the mycobacteria responsible for bovine tuberculosis. Tests with different AFSSA strains (Maisons-Alfort, France) and with other strains indicated that the kit does not amplify the following strains: *M. avium* complex (particularly, *M. avium subsp. paratuberculosis* and *M. avium subsp. avium*), *M. kansasii*, *M. vaccae and M. terrae*.

In the TaqVet® *Mycobacterium tuberculosis* Complex Kit, every sample (obtained after DNA isolation) is analysed in two wells:

- One well is used for the specific detection of the bacterial DNA.
- One well is used for the specific detection of IPC (Internal Positive Control).
- IPC is exogenous: it is added and extracted at the same time as *M. bovis* and/or *M. caprae*.
- IPC enables verification* of the absence of inhibitors, of the PCR amplification and of the extraction efficiency.

(* If Ct (Cycle threshold) value obtained for IPC is similar to that obtained during quality control testing).

The TaqVet® *Mycobacterium tuberculosis* Complex Kit contains:

- A **mix** (**Seq Tub**) containing:
  - 1 Set of MTBC Nucleotides:
    - 1 Forward Primer.
    - 1 Reverse Primer.
    - 1 MTBC probe – TaqMan® probe labelled with FAM - TAMRA.
- A **mix** (**Seq IPC**) containing:
  - 1 Set of IPC Nucleotides:
    - 1 Forward Primer.
    - 1 Reverse Primer.
    - 1 IPC probe – TaqMan® probe labelled with VIC-TAMRA.
- **1 EPC** (External Positive Control *Mycobacterium bovis*: **comprising extracted *M. bovis* DNA**).
- **1** bottle of **Master Mix** for DNA TaqMan® PCR.
- Bacterial DNA isolations are performed:
  - **On Columns**: using the QIAamp® DNA Mini Kit (Ref Qiagen 51304 or 51306).
- The TaqVet® *Mycobacterium tuberculosis* Complex Kit has been validated and can be used on ABIPRISM™ 7000/7300/7500 thermocycler or ABIPRISM™ 7700 or 7900 HT (Applied Biosystems). This Kit can also be used on other machines; please contact LSI to obtain the list of other thermocyclers that can be used with this kit.

- **Interpretation of results is based on the Ct (Threshold Cycle) for each sample tested:**
  - **If the Ct < 40**, the sample is scored as positive. For similar samples, the smaller the Ct is, the higher the bacterial load is.
  - **If the Ct > 40**, the sample is scored as negative.

II - Kit contents

The TaqVet® *Mycobacterium tuberculosis* Complex kit comprises 1 box (components for storage at -20°C) and a bag (components for storage at +4°C) containing sufficient reagents for 50 tests per kit, on two reactive wells.

Each kit contains the following components:

Name	Presentation	Conservation	Colour Code
Master Mix	1 Tube of 2 mL	**+4°C**	**White**
SEQ Tub	1 Tube of 0.5 mL	**-20°C**	Green
SEQ IPC	1 Tube of 0.5 mL	**-20°C**	Orange
EPC *M. bovis*	1 Tube of 0.5 mL	**-20°C**	**Blue**
IPC Tub	1 Tube of 0.5 mL	**-20°C**	Yellow

Important note: The **N**egative **C**ontrol **S**ample **(NCS)** is not included in the kit. LSI recommends using DNase RNase free water from the laboratory (eg: DEPC treated water) as the NCS.

2 types of negative controls can be used:

1/ NCS: Negative Control Sample: IPC + DNase RNase free water extracted as a sample. The results indicate that no contamination occurred during sample extraction and amplification.

2/ NC: Negative Control: 25 µL of « tub Mix» in a well and 25 µL of « IPC mix » in other well of MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate. Negative results for the 2 wells indicate that no contamination occurred during the preparation of the mix.

III - Recommended additional materials and reagents (not provided)

1/ For amplification:

- ABI PRISM™ 7000/7300/7500 thermocyclers (Applied Biosystems) or other suitable thermocycler with MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plates and Optical Adhesive Covers.

2/ For DNA isolation:

- A crusher (STOMACHER® type).
- Bags and zipper for crushing
- A centrifuge of Eppendorf® type (speed 8,000 – 15,000 g).
- A RiboLyser™ or Mixer Mill™.
- 2 mL DNase RNase free Microtubes (for RiboLyser™ or Mixer Mill™) with skirt, containing microballs and with separate screw caps.
- An incubator or a heat block (at 56°C).
- A vortex mixer or equivalent.
- Precision micropipette (scale of 0.5 or 1µL to 1000 µL) with RNase free tips with filter.
- 1.7mL DNase RNase free Microtubes without skirt and with separate screw caps.
- 1.5 ml DNase RNase free Microtubes (Eppendorf type or equivalent).
- 2 ml collection tubes.
- PBS.
- Ethanol (96-100%).
- DNase RNase free water (DEPC-H_2O) used as **Negative Control**.
- QIAamp® DNA mini kit (Qiagen : 51304 ou 51306)

For handling:

- Disposable latex gloves (talc free)

- **Adapted precautions must be taken for handling of samples potentially contaminated by mycobacteria responsible for tuberculosis (clothing, rooms...) and in particular during any handling that could produce aerosols.**

IV – Samples

Label tubes before each extraction stage.

Sample taken:

Every sample must only be opened under a class II laminar flow hood.

Sample Type	Starting Material
Tissues (Lymph nodes...)	**2-5 g max of tissues**

Aliquot preparation and purification from sample

Aliquot preparation

Take a few grams (< 5 g) of sample, cut it up and place it into a special bag for a Stomacher® type crusher.
Add PBS in sufficient quantity to enable sample to be recovered.
Pound the sample for 3 min with a crusher.
Allow the large particles to settle.
Transfer supernatant into a 2 mL DNase RNase free microtube.

Aliquot purification

Centrifuge aliquot 2 min at 12,000 g.
Discard supernatant.
Add 600 µL of PBS to the pellet and mix the microtube by suction and expulsion of the liquid.
Transfer sample into a 1.7 mL DNase RNase free microtubes containing microballs (for RiboLyser® or Mixer Mill®).
RiboLyse™ at 6 m/s for 45 s with RiboLyser™ or Mixer Mill™.
Centrifuge rapidly.

V - Extraction of DNA

1/ Required Kit

For DNA isolation use:

- QIAamp DNA Mini kit (Ref: 51304 or 51306)

Kits and components should be stored at RT (15-25°C).

2/ Positive and negative controls

EPC: **EPC is DNA extracted from *M. bovis***

NCS (Negative Control Sample):
Add 20 µl of proteinase K to an Eppendorf tube (not provided) and add 200 µl DNase RNase free water, 5 µl IPC and 200µl AL buffer.

NC (Negative Control): Add directly 25 µl of « Tub Mix » in a well and 25 µL of « IPC Mix» to another well.

3/ Protocol for isolation on column

1.

a. For **lymph nodes**, add to an Eppendorf tube:
- **200 µl AL Buffer**
- **20 µl proteinase K**
- **200 µl sample** (aliquot after RiboLysis®)
- **5µl IPC**

Vortex for 15 seconds

b. For **NCS**, add to an Eppendorf tube:
- **200 µl AL Buffer**.
- **20 µl proteinase K**
- **200 µl DNase RNase free water**
- **5µl IPC**

Vortex 15 seconds

2. **Incubate at 56°C overnight** (16 to 18 h)

3. After the tubes have cooled, add to the Eppendorf **200 µl Ethanol** 100%, and vortex for a few seconds.

4. **Label the column** and **transfer the content** of the Eppendorf tubes to the columns. **Centrifuge for 1 min** at 15,000 g. Discard the collection tube – **Retain the column.**

5. Add **500 µl Buffer AW1** - Close the tube gently - Centrifuge for 1 min at 15,000 g. Discard the collection tube - **Retain the column**.

6. Add **500 µl Buffer AW2** - Close the tube gently - Centrifuge for 1 min at 15,000 g. Discard the collection tube - **Retain the column**.

7. Place the column in a new collection tube and **centrifuge for 3 min** at 15,000 g. *(To dry the column)*

8. Transfer the column to a new 1.5 ml microtube – Add **100 µl Buffer AE** for DNA elution Incubate at room temperature **for 1 min**, and then centrifuge at 15,000 g for 1min.

9. Store the sample in ice (0°C +4°C) if the PCR is to be carried out immediately. For medium or long-term storage, freeze the DNA sample at - 20°C or at - 80°C.

VIII: Reconstitution of Reaction Mix

Before carrying out the PCR reaction it is necessary to prepare the reaction mix:
- « Tub mix » from the following reagents: Master mix, DNase RNase Free water and Seq Tub.
- « IPC mix » from the following reagents: Master mix, DNase RNase Free water and Seq IPC.

Prepare « Tub Mix » and « IPC Mix » according to the reconstitution Mix table included in the kit.

Vortex and centrifuge the different tubes briefly.

Do not store a reconstituted « Tub Mix » and « IPC Mix ».

Do not mix reagents from different TaqVet® batch numbers.

IX - Amplification protocol

1. Take a MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate + Adhesive Cover.
Create a plate sheet for the PCR run (using Abiprism SDS software or equivalent).

a. Indicate « ROX » as « Passive Reference » and create two « Detectors »:

> Tub: Reporter FAM, Quencher: TAMRA.
> IPC: Reporter VIC, Quencher: TAMRA.

b. Add « Detector » Tub to uneven columns.

c. Add « Detector » IPC to even columns.

d. Create a plate sheet:

	Mix *Tub*	Mix *IPC*	Mix *Tub*	Mix *IPC*	Mix *Tub*	Mix *IPC*	Mix *Tub*	Mix *IPC*	Mix *Tub*	Mix *IPC*	Mix *Tub*	Mix *IPC*
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	EPC *M. bovis*	EPC *M. bovis*										
B	NCS	NCS										
C	NC	NC										
D	Sample 1	Sample 1										
E	Sample 2	Sample 2										
F	Sample 3	Sample 3										
G	.../...	.../...										
H												

2. Vortex and centrifuge « Tub mix » and « IPC mix » briefly. The PCR is a one well reaction.

3. Add **20 µL of the « Tub mix »** into odd wells and **20 µL of the « IPC mix »** into even wells of the MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate.

   a. **EPC:** Add **5 µL of EPC** to dedicated wells.

   b. **NCS:** Add **5 µL of NCS** to dedicated wells

   c. **Samples**: Add **5 µL of samples** (DNA extract) to each well of the MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate used for the assay.

   d. **NC:** Add **5 µl of « Tub mix »** to a dedicated well and **5 µl of « IPC mix »** to a dedicated well.

4. Attach optical Adhesive Cover and put the MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate in a ABIPRISM 7000/7300/7500 thermocycler.
Program the amplification reaction as follows:

> **Step 1: 50°C – 2 min – Repeat: 1**
> **Step 2: 95°C – 10 min – Repeat: 1**
> **Step 3: 95°C – 15 s ; 60°C - 1 min – Repeat: 45**

5. Analyse the results after selecting « Analysis ». If you have any problems with the interpretation of your results, please send us your plate (as an SDS file) by email for help (lina@lsivet.com or sophie@lsivet.com).

X - Interpretation of results

Use the ABIPRISM SDS Software.
Analyse the PCR using the « amplification plot » sheet.

Validation of the test

Check that the EPC (« Tub Mix ») is positive:
> Ct EPC *M. bovis* / « Detector » Tub = Ct EPC *M. bovis* required (Cf. quality control value)

Check that the EPC (« IPC Mix ») is negative:
> Ct EPC *M. bovis* / « Detector » IPC > 40.

Check the negative controls (« Tub Mix » and « IPC Mix »):
Ct NCS / « Detector » IPC =Ct IPC required (Cf. quality control value)
Ct NCS / « Detector » Tub > 40.

Ct NC / « Detector » IPC > 40.
Ct NC / « Detector » Tub > 40.

Interpretation of the results

Interpretation	« Detector » Tub	« Detector » IPC
Positive *Mycobacterium bovis/caprae*	**Ct < 40**	Ct < 40 or Ct > 40
Negative *Mycobacterium bovis/caprae*	**Ct > 40**	Ct obtained = Ct required[a]
Invalid	Ct > 40	**Ct obtained ≠ Ct required**[b]

[a] Ct value for IPC obtained must be similar to that obtained during quality control testing
[b] Ct value for IPC obtained is different to that obtained during quality control testing

Management of Invalid samples:

In presence of inhibitors (negative IPC), **dilute the extracted DNA by 1/10** (e.g.: 10 µl of DNA to 90 µl of DNase RNase free water) and run a new PCR with the 5 µl diluted DNA sample.
For interpretation, Ct value obtained for IPC must be similar to Ct value required for IPC + 3.

If the presence of inhibitors is frequently found to be a problem within a laboratory, it may be considered advisable to routinely dilute DNA by 1/10.

ANNEXE 3

Article publié dans European Journal of Wildlife Research

Eur J Wildl Res (2013) 59:331–339
DOI 10.1007/s10344-012-0678-3

ORIGINAL PAPER

Bovine tuberculosis in "Eurasian" badgers (*Meles meles*) in France

Ariane Payne · Maria Laura Boschiroli · Eric Gueneau · Jean Louis Moyen · Thomas Rambaud · Barbara Dufour · Emmanuelle Gilot-Fromont · Jean Hars

Received: 5 April 2012 / Revised: 25 October 2012 / Accepted: 29 October 2012 / Published online: 14 November 2012
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

Abstract In France, several surveillance programmes have been carried out to monitor the presence of bovine tuberculosis (bTB) in badgers in regions where cattle or wildlife show high bTB prevalence (Seine-Maritime, Côte d'Or, Dordogne/Charente). Diagnostic methods include post-mortem examination, polymerase chain reaction (PCR) and/or microbiological culture. The frequency of visible lesions was significantly higher in Dordogne/Charente (14/283, 4.9 %) than in Côte d'Or (19/1146, 1.7 %) and Seine-Maritime (2/160, 1.25 %) (Fisher's exact test, $p<0.001$). Lesions were mainly located in cephalic and thoracic lymph nodes with one badger showing generalised tuberculosis. Near infected cattle farms or pastures, *Mycobacterium bovis* was detected using the culture method in roughly 1 % (1/103) of the badgers sampled in Seine-Maritime and in 5.6 % (49/878) of the badgers sampled in Côte d'Or. In Dordogne/Charente, the prevalence determined by PCR was 13.3 % (29/218). *M. bovis* was not found in badgers trapped in areas where there are no infected cattle. Spoligotyping and multiple locus variable number tandem repeat analysis showed that all *M. bovis* strains isolated from badgers were of the same genotype as those isolated from cattle in the vicinity, demonstrating an epidemiological link between both species. These are the first cases of bTB in badgers reported in France. Further surveys and research are needed to investigate the role badgers play in the epidemiology of bTB.

Communicated by C. Gortazar

A. Payne · J. Hars
Wildlife diseases unit, Research department,
National Game Hunting and Wildlife Agency (ONCFS),
Gières, France

A. Payne · E. Gilot-Fromont
CNRS, UMR 5558 Laboratoire de Biométrie et Biologie
Evolutive, Lyon University,
Villeurbanne, France

M. L. Boschiroli (✉)
French Agency for Food, Environmental and Occupational Health
& Safety (ANSES),
Maisons-Alfort, France
e-mail: maria-laura.boschiroli@anses.fr

B. Dufour
Epidemiology Unit epiMAI,
Alfort National Veterinary School (ENVA),
Maisons-Alfort, France

E. Gueneau
Laboratoire Départemental de la Côte d'Or,
Dijon, France

J. L. Moyen
Laboratoire Départemental d'Analyse et de Recherche de
Dordogne,
Coulounieix-Chamiers, France

T. Rambaud
Laboratoire Agro-Vétérinaire Départemental de Seine Maritime,
Rouen cedex 1, France

Keywords Badger (*Meles meles*) · Bovine tuberculosis · France · Diagnostic methods · Epidemiology

Introduction

Bovine tuberculosis (bTB) is a major worldwide disease caused mainly by *Mycobacterium bovis*, a bacterium that belongs to the *Mycobacterium tuberculosis* complex. This multi-host pathogen primarily infects cattle but can be transmitted to a wide range of mammals, including humans (Biet et al. 2005). The establishment of bTB reservoirs in wildlife may give rise to spillback transmission to livestock and thus hamper efforts deployed to eradicate the disease in cattle (Phillips et al. 2003).

In 2001, the European Commission declared cattle in France to be bTB-free. Nevertheless, since 2004, the number of infected herds has increased in a few French *départements*[1] (Côte d'Or, Dordogne, Charente, Pyrénées-Atlantiques and Corsica). The first cases of bTB in wildlife in France were detected in 2001 in the Brotonne forest (Seine-Maritime), where red deer (*Cervus elaphus*) and wild boars (*Sus scrofa*) were found to be infected. In 2006, the prevalence rate reached 24 % in red deer and 42 % in wild boars (Zanella et al. 2008a). In this case, red deer appears to act as the primary hosts, whereas wild boars are considered as spillover hosts (Zanella et al. 2008b). In 2002, an infected red deer was found in Côte d'Or and since 2007, grouped cases of wild boars have been regularly identified. Elsewhere in France, sporadic detection of bTB cases in wild boars suggests that infection persists in cattle and/or in the environment (ANSES 2011)

In the UK and in the Republic of Ireland (RoI), the Eurasian badger (*Meles meles*) is considered a bTB wildlife reservoir, involved in the transmission of *M. bovis* to cattle (Bourne et al. 2007; Murphy et al. 2010; Corner et al. 2011). In Spain, bTB in badgers has also been reported since 2008, but little is known about the epidemiology of the disease in this species there (Sobrino et al. 2008; Balseiro et al. 2011).

In this paper, we estimate the prevalence of bTB and describe lesions found during the surveillance programme set up to monitor *M. bovis* infection in badgers in three regions of France: the Seine-Maritime, Côte d'Or and Dordogne/Charente *départements* between 2001 and 2011.

Materials and methods

Sampling method

Badgers were studied in areas where cattle and/or wildlife have been found to be infected (Fig. 1). Surveys were conducted by the local veterinary services. The national status of the badger in France is a game status, which means it can be shot during the hunting period (from September to February). Furthermore, trapping and digging out were legally authorised by each *département* local authorities (Côte d'Or: AP No 570/DDPP; Dordogne: AP No 12095; Seine-Maritime: AP 10/11/10). Of the badgers studied, 95 % were trapped using snares by authorised certified trappers and then killed in a humane manner; 4 % were hunted or dug out; 1 % was collected from road kills.

In Seine-Maritime, badgers have been trapped since 2001 in the Brotonne forest (82 km^2), where infected red deer and wild boars have been found. In the areas surrounding the forest, no cattle outbreaks have been reported since 2006. The sample size varied from 15 to 55 badgers per year (except in 2006 and 2007 when no badgers were caught).

In Côte d'Or, from 2005 to 2010, 97 bTB cattle outbreaks were recorded. In 2010, a peak of bTB was reported, with 43 new outbreaks. Badgers were first trapped to monitor the presence of *M. bovis* around recently infected farms. Once some evidence of bTB infection had been found in badgers, they were culled within a 1 km radius from infected farms or pastures (infected areas), covering one single area of approximately 2,000 km^2. A total of 878 badgers have thus been analysed since 2009 in infected areas.

In Dordogne, where 114 bTB cattle outbreaks were recorded from 2005 to 2010, 199 badgers have been trapped since 2010 within a radius of 1 to 2 km from infected farms or pastures, representing an infected area of approximately 1,600 km^2 distributed over the *département*. In a small area in Charente, near its border with Dordogne, 19 badgers were trapped in 2010–2011 within a radius of 3 km from recently infected farms. These badgers were included in the Dordogne samples, given the vicinity to Dordogne's infected area and because they were analysed at the same laboratory.

In Côte d'Or and Dordogne/Charente, badgers were also sampled from non-infected areas to investigate the spread of the disease (Table 1). The present paper is based on data from these surveys up to June 2011.

Diagnostic method

Badgers were analysed in different local laboratories, where diagnostic methods consisted of post-mortem examination, polymerase chain reaction (PCR) and microbiological culture, although these methods were not standardised across the different laboratories (Table 1). When cultures resulted in isolation of mycobacteria, the strains were sent to the National Reference Laboratory (NRL) (ANSES Maisons-Alfort) to identify the mycobacterium species. When *M. bovis* was identified, the strain was then characterised by spoligotyping and by multiple locus variable number tandem repeat (VNTR) analysis.

[1] French administrative division; roughly equivalent to a county

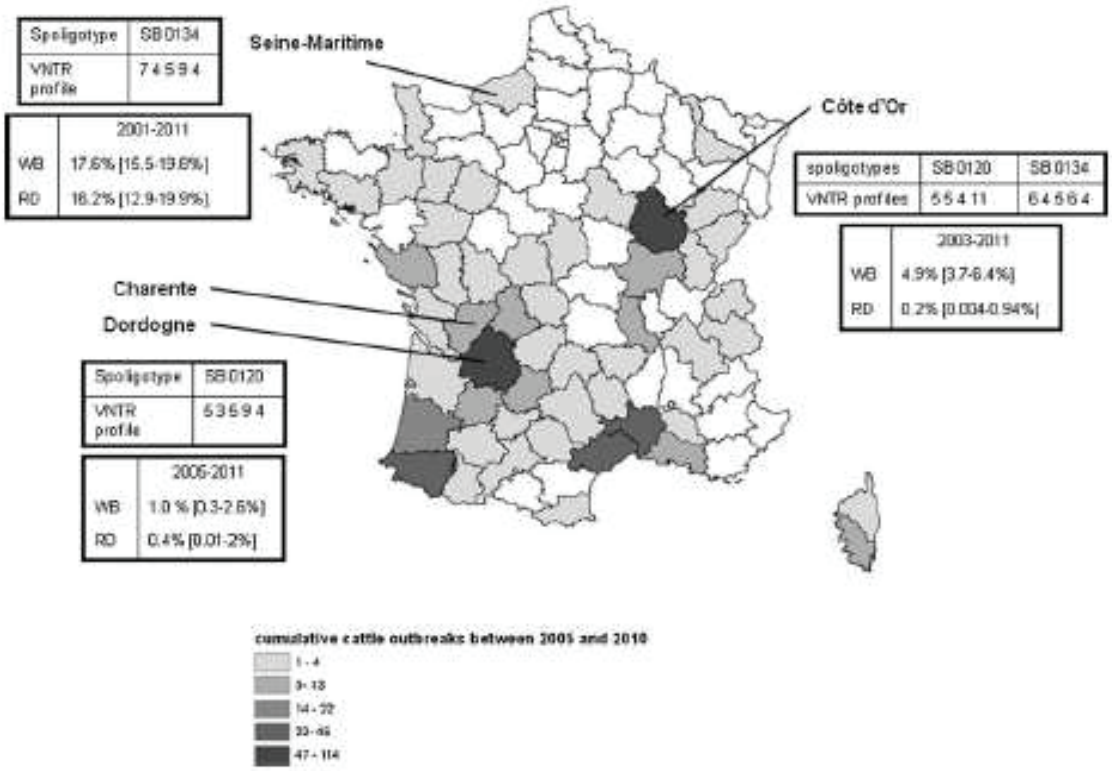


Fig. 1 Distribution of cattle bTB incidence in France. For each *département* where a bTB surveillance programme was conducted in badgers, the spoligotypes and the VNTR profiles found in cattle and wildlife are indicated as well as the prevalence of *M. bovis* infection detected in red deer (RD) and wild boar (WB) (Source: General Directorate for food of the Ministry of food, Agriculture and Fisheries)

Table 1 Sample sizes and diagnostic methods used to monitor bTB in badgers from different areas in France

	Period of survey	No. in infected areas	No. in non-infected areas	Post-mortem examination	PCR	Microbiological culture
Seine-Maritime	2001–2011	160	0	Yes	No	Yes, when visible lesions were observed[a]
Côte d'Or	2009–2011	878	268	Yes	Yes, systematically on a pooled sample of lymph nodes[b]	Yes, systematically on a pooled sample of lymph nodes[b]
Dordogne/Charente	2010–2011	218	65	Yes	Yes, systematically on a pooled sample of lymph nodes[c]	Only when PCR was positive, on a pooled sample of lymph nodes[c]

For each *département*, the survey period and the number of badgers studied in infected and non-infected areas are given along with details on the protocol used for necropsy, PCR and microbiological cultures

[a] Cultures were performed only when visible lesions were observed except in 2006 and 2011 when all badgers were analysed. Samples taken from the tissue where the lesion was observed, from retropharyngeal mediastinal, tracheal and mesenteric lymph nodes and from the lungs were seeded separately, except in 2010 and 2011 where cultures were carried out on pooled samples of retropharyngeal, bronchial, mediastinal and mesenteric lymph nodes

[b] Pooled sample included the submaxillary, retropharyngeal, bronchial and mediastinal lymph nodes

[c] Pooled sample was made up of submaxillary, retropharyngeal, bronchial and mediastinal, mesenteric and prescapular lymph nodes

Post-mortem examinations

An external examination was first performed. Gender and every injury, including bite wounds, trap-related injuries and bullet entry wounds, were recorded. After opening the carcass, tissue examination focused on the lymph nodes (cephalic, thoracic, mesenteric and peripheral) as well as thoracic and abdominal contents. Each lymph node was slit open and the cut surface examined. In the thorax, multiple incisions were made in the lungs. The mediastinum, the pleura and the pericardium were also inspected. In the abdomen, the liver and kidneys were incised in several places for internal examination. Every visible lesion was described and only bTB-like lesions were recorded and included in our analysis.

Preparation of the samples for PCR and culture

PCR and culture were performed on pooled lymph node samples or on individual lymph nodes as described in Table 1. In Seine-Maritime, samples from retropharyngeal, mediastinal, tracheal and mesenteric lymph nodes and from the lungs were analysed separately, except in 2010 and 2011 where cultures were carried out on pooled samples of retropharyngeal, bronchial, mediastinal and mesenteric lymph nodes.

In Côte d'Or, the pooled sample included the submaxillary, retropharyngeal, bronchial and mediastinal lymph nodes. In Dordogne/Charente, the pooled samples were made up of submaxillary, retropharyngeal, bronchial, mediastinal, mesenteric and prescapular lymph nodes. In each region, if a lesion was observed in another organ during tissue examination, it was analysed separately.

Prior to PCR or culturing, 2 to 5 g of sampled tissue was first crushed with a 4 % H_2SO_4 solution to decontaminate the tissue. After 10 min, the acid was neutralised by adding a 6 % NaOH solution. If the sample was degraded, the time of contact with H_2SO_4 was increased to 20 min to reduce the rate of contamination.

PCRs

A commercial kit (LSI taqvet *M. tuberculosis* complex 2 wells) was used. The targeted sequence was IS *6110*, which is present in all species of the *M. tuberculosis* complex (Thierry et al. 1990). The primers and the probe used in this kit can detect any of the mycobacterial species of the *M. tuberculosis* complex.

After mechanical lysis of tissue, DNA was extracted on a column by using the QIAamp DNA mini kit, following the manufacturer's instructions. Then, 5 µl of the extracted DNA was mixed with 20 µl of reaction mix and the reaction was carried out at 50 °C for 2 min (one cycle), followed by one cycle of 10 min at 95 °C and 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. Results were interpreted as negative, positive or invalidated, following the manufacturer's recommendations and by comparison with negative and positive controls.

Culture

Regional laboratories followed the protocol established by the French NRL (NF U 47-104) for isolation of *M. bovis*. After decontamination (see "Preparation of the samples for PCR and culture" section), the supernatant was seeded on two different media: Löwestein-Jensen and Coletsos (OIE 2008). All seeded media were incubated at 37±3 °C for 3 months and examined every 2 weeks. In Seine-Maritime, cultures were carried out only when visible lesions (in any organ) were observed (except in 2006 and in 2011, when all badgers were examined) as described in Table 1.

In Côte d'Or, cultures were performed systematically on the same samples of lymph nodes as for the PCR analyses. In Dordogne/Charente, only PCR-positive samples were cultured (Table 1).

Strain typing

Strains were genotyped by using two techniques: spoligotyping and VNTR analysis. For spoligotyping, *M. bovis* isolates were characterised by hybridisation of biotin-labelled PCR products on spoligotyping membranes supplied by Isogen Bioscience (Netherlands), following the protocol developed by Kamerbeek et al. (1997). Spoligotyping results were recorded in SB code according to the *M. bovis* Spoligotype Database website (Smith and Upton 2012).

Highly discriminating VNTR-type markers for typing *M. bovis* have been described (Roring et al. 2002). We used the loci ETRA, ETRB, ETRC and QUB11a and QUB11b, which provide the best discrimination for *M. bovis* (Zanella et al. 2008a). The markers were amplified by PCR using specific flanking primers. VNTR PCR products were then sized on agarose gels. The VNTR allele calls were based on the inferred tandem copy number derived from the predicted PCR product sizes (Skuce et al. 2005).

Statistical analysis

Proportions of badgers carrying lesions or with positive PCR or culture results were computed, as well as their 95 % confidence intervals. Cohen's kappa values were computed to estimate the agreement between results obtained by PCR and by culture. This was only possible in Côte d'Or, where both methods were systematically carried out on the same samples. Data analysis was performed using R software (2.9.1 version).

Table 2 Proportion of badgers with lesions and positive for *M. bovis* as determined by PCR and by culture in the different monitored regions in France (percentages are given with 95 % confidence interval (CI))

	No. of badgers with lesions/no. analysed [%; (95 % CI)]	No. of positive PCRs/no. analysed, [%, (95 % CI)]	No. of positive *M. bovis* cultures/ no. analysed, [%; (95 % CI)]	Spoligotypes/ VNTR profile
Seine-Maritime	2/160 (1.25 %; [0.15–4.4 %])		1/103 (0.97 %; [0.02–5.3 %])	SB 0134/7 4 5 9 4
Côte d'Or				
Infected area	17/878 (1.9 %; [1.1–3.1 %])	45/878 (5.1 %; [3.8–6.8 %])	49/878 (5.6 %; [4.1–7.3 %])	SB 0134/6 4 5 6 4
Non-infected area	2/268 (0.75 %; [0.1–2.7 %])	0/268 (0 %; [0–1.4 %])	0/268 (0 %; [0–1.4 %])	SB 0120/5 5 4 11
Total	19/1,146 (1.7 %; [1.0–2.6 %])	45/1,146 (3.9 %; [2.9–5.2 %])	49/1,146 (4.3 %; [3.2–5.6 %])	
Dordogne/Charente				
Infected area	14/218 (6.4 %; [3.5–10.5 %])	29/218 (13.3 %; [9.1–18.5 %])	13/29[a]	SB 0120/5 3 5 9 4
Non-infected area	0/65 (0 %; [0–5.5 %])	0/65 (0 %; [0–5.5 %])		
Total	14/283 (4.9 %; [2.7–8.1 %])	29/283 (10.2 %; [7.0–14.4 %])	13/29[a]	

[a] Only badgers with positive PCR results were analysed by culture; therefore, no prevalence could be estimated

Results

Gross pathology

Only 35 badgers out of 1,589 (2.2 %) examined showed visible lesions (Table 2). The frequency of the presence of lesions was higher in Dordogne/Charente (4.9 %) than in the other surveyed regions (1.25 to 1.7 %) (Fisher's exact test, $p<0.001$). In Côte d'Or, 12 % of the PCR-positive badgers and 18 % of the culture-positive badgers showed visible lesions. In Dordogne/Charente, visible lesions were detected in 41 % of the PCR-positive badgers.

Most lesions were found in the cephalic (retropharyngeal and submaxillar) and bronchial lymph nodes. Affected lymph nodes displayed pale yellow areas from 2 to 5 mm. After incision, infiltrated nodules were observed sometimes with caseum and mineralization. In Côte d'Or, one badger had a lesion on one salivary gland. The whole gland's consistency was modified and mineralization was present. In Dordogne/Charente, miliary lesions on the lungs were observed in two badgers (Fig. 2). One badger showed widespread tuberculosis with purulent pulmonary tubercles and caseous lesions in the retropharyngeal, thoracic and mesenteric lymph nodes (Fig. 3).

Regional prevalence

In Côte d'Or as well as in Dordogne/Charente, positive badgers were only found in the cattle bTB-infected area (in Seine-Maritime, no investigations were done outside the infected area). Regarding PCR results in infected areas, prevalence reached 13.3 % in Dordogne/Charente vs. 5.1 %

Fig. 2 Miliary lesions in the thoracic cavity in a badger from Dordogne (Source: Laboratoire Départemental d'Analyse et de Recherche de Dordogne)

Fig. 3 Lung tubercles observed in a badger from Dordogne (Source: Laboratoire Départemental d'Analyse et de Recherche de Dordogne)

Table 3 Agreement as measured by Cohen's kappa between culture and PCR results in Côte d'Or (infected area only) in all badgers sampled and in badgers with visible lesions only

		Culture positive	Culture negative	Total	Kappa
All badgers	PCR positive	22	23	45	0.44
	PCR negative	27	806	833	
	Total	49	829	878	
Badgers with visible lesions only	PCR positive	6	2	8	0.78
	PCR negative	0	9	9	
	Total	6	11	17	

in Côte d'Or, a significantly different rate (Fisher's exact test, $p<0.001$) (Table 2).

In regard to culture results, with respect to infected areas only, the prevalence tended to be higher in Côte d'Or (5.6 %) than in Seine-Maritime (0.97 %; Fisher's exact test, $p=0.053$). In Dordogne/Charente, only PCR-positive samples were cultured and no prevalence could be estimated from these results (Table 2).

Strain typing

The spoligotype of *M. bovis* strains in Seine-Maritime and in southern Côte d'Or was SB0134 and SB0120 in Dordogne/Charente and in northern Côte d'Or. The VNTR profiles provided better discrimination (Table 2). In each case, infected badgers shared the same spoligotype and the same VNTR profile as infected cattle in the vicinity (Fig. 1).

Agreement between the diagnostic methods

Kappa statistics revealed a moderate agreement (0.44) between PCR and culture when considering all badgers sampled in the infected areas of Côte d'Or. However, agreement was much higher (0.78) when only badgers with visible lesions were taken into account (Table 3).

Discussion

In each survey, the sampling method was opportunistic, i.e. was based on trappers' activity and was not performed at random. Some areas were overrepresented whereas others were underrepresented, depending on the number of the trappers and the intensity of their activity. This may have biased the prevalence results, but it is difficult to determine if the bias is positive or negative.

The time lapse during which the surveys were carried greatly varies between Seine-Maritime on one hand (10 years of surveillance with a small sample size each year) and Côte d'Or and Dordogne/Charente on the other hand (1 or 2 years of surveillance with bigger sample sizes). This discrepancy could be misleading and the results should be thus compared with caution.

The amount of time dedicated to post-mortem examinations and their thoroughness influence the detection of visible lesions (Crashaw et al. 2008; Corner et al. 2011). When comparing gross pathology between different regions and studies, the necropsy methods should be taken into account. In our study, badgers were not examined in a standardised way and the time allocated to post-mortem examination was less than 30 min. This may have resulted in an underestimation of the frequency of lesions.

In the UK, the presence of gross lesions detected through standard protocol (i.e. no more than 30 min devoted to the necropsy of each carcass and with focussing on prescribed set of tissues) have been shown to have a low sensitivity compared to the prevalence found by culture or histopathology (Crashaw et al. 2008; Jenkins et al. 2008; Corner et al. 2011). As a consequence, screening of the infection solely based on post-mortem examination of the badgers, as practised in Seine-Maritime in the first years of surveillance, may have led to an underestimation of the actual prevalence of *M. bovis* infection.

The sensitivities of PCR and culture probably depend on the concentration of bacteria in the sampled tissues, which is highly variable. The concentration of *M. bovis* in infected tissues ranges from 1 to 2 colony-forming units (cfu)/g in latently infected badgers to more than 10^3 cfu/g in the tissues and exudates of terminally ill badgers (Corner et al. 2011). In badgers with no visible lesions, analyses were carried out on a pooled sample of lymph nodes weighing 5 g. This dilution of the bacterial concentration may have led to decrease the sensitivity of both PCR and culture methods. It may also explain the low agreement between PCR and culture in Côte d'Or because the probability of having enough bacilli to give positive results in both analyses is low. On the contrary, the accuracy of PCR and culture is improved in later stages of the disease, when bacilli are highly concentrated and disseminated in the tissues. Agreement between culture and PCR results was better if only badgers with visible lesions were considered. This is probably due to the fact that lesion-presenting tissues selected for analysis were probably much more concentrated in bacilli. As a consequence, in Dordogne/Charente, the performance of PCR and culture may have been better because sampling was carried out on a population showing more visible lesions.

In a previous study, the performance of PCR on wildlife was assessed at a sensitivity of 81.5 % and a specificity of 98.1 % compared to culture methods (Hénault et al. 2006). However, the exact diagnostic value of the methods used in this study is unknown. These should be assessed by testing a large number of animals with the same, standardised methodology. Results yielded by PCR

may thus be underestimated, as in Dordogne/Charente, where this method was used to screen the positive badgers. Moreover, although specificity is excellent for mycobacteria of the *M. tuberculosis* complex, positive results can also be obtained if *M. microti* infections occurred, thus leading to a false bTB result (ML. Boschiroli, personal communication). To avoid this possibility, more specific genetic targets should be included in the PCR assay.

PCR has the advantage of being a rapid diagnostic tool, although culture is still considered as the gold standard for the diagnosis of *M. bovis* (Pritchard et al. 1986; Hénault et al. 2006; Zanella et al. 2008a; Collins 2011).

Our results suggest that visible gross lesions were more frequent in Dordogne/Charente than in Côte d'Or. Considering PCR results, which were carried out using the same kit (but not on the same pool of lymph nodes) in Côte d'Or and Dordogne/Charente, the prevalence was higher in Dordogne/Charente than in Côte d'Or. Nevertheless, these differences have to be confirmed using a standardised protocol in sampling and diagnostic methods.

The proportion of visible lesions in infected badgers was quite similar to what has been observed in the UK, where 20 to 40 % of infected badgers show visible lesions upon necropsy carried out in several counties in South-West England where TB incidence is high (Gallagher and Clifton-Hadley 2000; Jenkins et al. 2008). In the RoI, Murphy et al. (2010) found visible lesions in 12.1 % (26/215) of badgers analysed from broad geographical areas across 16 counties. In northern Spain (Asturias and Galicia, predominantly), only one badger among the 121 analysed has been found with a lesion in the mesenteric lymph node (Balseiro et al. 2011).

The locations of the lesions were consistent with previous studies carried out in the UK and in the RoI. The thoracic cavity (lungs and lymph nodes) and cephalic lymph nodes were the most common sites, followed by peripheral lymph nodes and abdominal cavity (visceral organs and mesenteric lymph nodes) (Bourne et al. 2007; Gallagher and Clifton-Hadley 2000; Murphy et al. 2010; Jenkins et al. 2008; Corner et al. 2011). As in the UK and in the RoI, the presence of only one visible lesion was the most frequent finding. Only one badger showed a generalised pathology in Dordogne. None of the badgers had visible lesions in the kidneys, in contrast to what has been found in the UK and in Spain. However, to our knowledge, this study provides the first report of lesions on the salivary gland (Bourne et al. 2007; Gallagher and Clifton-Hadley 2000; Murphy et al. 2010; Jenkins et al. 2008; Sobrino et al. 2008; Balseiro et al. 2011; Corner et al. 2011). The characteristics of the lesions were also similar to those observed in the UK and Spain, although mineralisation of the lymph nodes seems to occur more frequently in France than in the UK (Corner et al. 2011).

The prevalence found by culture during the randomised badgers culling trial, conducted between 1998 and 2006 in the UK, was between 1.6 and 37.2 %, with an average of 16.6 % (Bourne et al. 2007). In the RoI, 19.5 to 26.1 % of the badgers analysed by culture in the four study areas gave positive results (Griffin et al. 2005). A more recent study, where four anatomic pooled samples (head, thorax, peripheral and abdomen) made up of lymph nodes and other organs were analysed in each specimen, reported a prevalence of 36.3 % (Murphy et al. 2010). Prevalence rates seem to be lower in badgers in France than in the UK and the RoI, although the results obtained in Dordogne/Charente may be more similar if we consider that the first PCR assay underestimated actual prevalence. It should be noticed that the herd prevalence in cattle in the UK and in the RoI is much higher than in France (5–6 vs. 0.04 %) and that all the analysed badgers originated from areas with the highest prevalence in cattle (EFSA 2010).

In this study, all infected badgers were trapped in the vicinity (from 1 to 3 km) of a cattle farm that had experienced a recent tuberculosis outbreak. To check whether the disease had spread among badgers in the absence of nearby cattle infection, surveys were carried out in non-infected cattle areas, and no infected badgers were found during our study. However, the absence of bTB detection in non-infected areas should be interpreted with caution due to limited sample sizes (Table 2). In the UK, between 1972 and 1993, infected badgers were detected from non-bTB-infected cattle areas. In the RoI, this prevalence was estimated at 15 % in places where bTB has not been reported in cattle for 6 years (ANSES 2011).

In Spain, Balseiro et al. (2011) detected 8 positive cultures of 121 road-killed badgers analysed. They were from the Asturias where the prevalence of bTB in cattle is between 0 and 4.3 % depending on the council.

All the spoligotypes and the VNTR profiles found in badgers were shared by infected cattle from the same area. These results highlight the epidemiological relationship between badgers and cattle, suggesting that badgers and cattle belong to the same cluster of infection and that transmission occurs between both species. The same conclusions were drawn in the UK, RoI and Spain (Balseiro et al. 2011; Jenkins et al. 2007; Olea-Popelka et al. 2005; Woodroffe et al. 2005). In France, this is also the case for other wildlife species monitored in various regions (Zanella et al. 2008a; Richomme et al. 2010; ANSES 2011).

However, based solely on our results, it is difficult to assert if badgers act as a spillover or reservoir host for bTB in France. Other parameters, such as population density and the degree of interaction between species, should also be taken into account to estimate the risk of disease transmission (Corner 2006; Phillips et al. 2003). Furthermore, different epidemiological situations may exist in different areas, depending on local characteristics (prevalence rate in cattle, host species densities, cattle management and landscape).

Conclusions

The recent identification of badgers as a host for *M. bovis* in France reveals that this species participates in the multi-host system that includes wildlife and domestic species. Given that considerable efforts are made to control the disease in livestock sectors, assessing the risk of transmission between badgers and cattle is of paramount importance. A new national surveillance programme based on passive and active surveillance, enhanced in high-risk regions, was launched in November 2011. This programme should provide relevant information on the bTB status of badgers and other wildlife species throughout France and in a standardised manner. In association with further ecological and epidemiological investigations, this surveillance programme should help to better understand the role of badgers in the epidemiology of bTB in France.

Acknowledgments The authors would like to thank the Directorate General for Food of the Ministry of Food, Agriculture and Fisheries for funding these surveys, the local state veterinary services in Côte d'Or, Dordogne and Seine-Maritime and the National Game Hunting and Wildlife Agency for managing the surveillance programmes. We would like to thank the technicians from the Côte d'Or laboratory, Edouard Réveillaud and the technicians from the Dordogne laboratory, and the technicians from the Seine-Maritime laboratory. We are grateful to all the trappers and hunters without whom the surveys could not have taken place. The authors thank Gregory Payne for his help in improving our manuscript.

References

ANSES (2011) Tuberculose bovine et faune sauvage. Rapport. Edition scientifique Anses http://www.anses.fr/Documents/SANT2010sa0154Ra.pdf. Accessed 05 May 2011

Balseiro A, Rodriguez O, Gonzalez-Quiros P et al (2011) Infection of Eurasian badgers (*Meles meles*) with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* complex in Spain. Vet J 190(2):e21–e25. doi:10.1016/j.tvjl.2011.04.012

Biet F, Boschiroli ML, Thorel MF, Guilloteau LA (2005) Zoonotic aspect of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). Vet Res 36:411–436. doi:10.1051/vetres2005001

Bourne FJ, Cox DR, Donnelly CA Gettinby G, McInerney JP, Morrison WI, Woodroffe R (2007) Bovine tuberculosis: the scientific evidence. Final report of the independent scientific group (ISG) on cattle TB. DEFRA, London

Collins DM (2011) Advances in molecular diagnostics for *Mycobacterium bovis*. Vet Microbiol 151:2–7. doi:10.1016/j.vetmic.2011.02.019

Corner LA (2006) The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. Vet Microbiol 112:303–312. doi:10.1016/j.vetmic.2005.11.015

Corner LA, Murphy D, Gormley E (2011) Mycobacterial infection in the Eurasian badger (*Meles meles*): the disease, pathogenesis, epidemiology and control. J Comp Path 144:1–24. doi:10.1016/j.jcpa.2010.10.003

Crashaw TR, Griffiths IB, Clifton-Hadley MA (2008) Comparison of a standard and detailed post mortem protocol for detecting *Mycobacterium bovis* in badgers. Vet Rec 163:473–477. doi:10.1136/vr163.16473

EFSA (2010) The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. EFSA journal 8:410p

Gallagher J, Clifton-Hadley RS (2000) Tuberculosis in badgers; a review of the disease and its significance for other animals. Res Vet Sci 69:203–217. doi:10.1053/rvsc.2000.0422

Griffin JM, Williams DH, Kelly GE, Clegg TA, O'Boyle I, Collins JD (2005) The impact of badger removal on the control of tuberculosis in cattle herds in Ireland. Prev Vet Med 67:237–266. doi:10.1016/j.prevetmed.2004.10.009

Hénault S, Karoui C, Boschiroli ML (2006) A PCR-based method for tuberculosis detection in wildlife. Dev Biol (Basel) 126:123–132

Jenkins HE, Woodroffe R, Donnelly C et al (2007) Effects of culling on spatial associations of *Mycobacterium bovis* infections in badgers and cattle. J Appl Ecol 44(5):897–908. doi:10.1111/j.1365-2664.2007.01372.x

Jenkins HE, Morrison WI, Cox DR et al (2008) The prevalence, distribution and severity of detectable pathological lesions in badgers naturally infected with *Mycobacterium bovis*. Epidemiol Inf 136:1350–1361. doi:10.1017/S0950268807009909

Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A et al (1997) Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol 35:907–914

Murphy D, Gormley E, Costello E, O'Meara D, Corner LA (2010) The prevalence and distribution of *Mycobacterium bovis* infection in European badgers (*Meles meles*) as determined by enhanced post mortem examination and bacteriological culture. Res Vet Sci 88:1–5. doi:10.1016/j.rvsc.2009.05.020

OIE (2008) Bovine tuberculosis Chap 2.4.7. In: OIE (ed) Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees), 6th edn. OIE, Paris, pp 745–760

Olea-Popelka FJ, Flynn O, Costello E et al (2005) Spatial relationship between *Mycobacterium bovis* strains in cattle and badgers in four areas in Ireland. Prev Vet Med 71:57–70. doi:10.1016/j.prevetmed.2005.05.008

Phillips CJC, Foster CRW, Morris PA, Teverson R (2003) The transmission of *Mycobacterium bovis* to cattle. Res Vet Sci 74:1–15

Pritchard DG, Stuart FA, Wilesmith JW et al (1986) Tuberculosis in East Sussex. III. Comparison of post-mortem and clinical methods for the diagnosis of tuberculosis in badgers. J Hyg 97:27–36

Richomme C, Boschiroli ML, Hars J, Casabianca F, Ducrot C (2010) Bovine tuberculosis in livestock and wild boar on the Mediterranean Island, Corsica. J Wildl Dis 46(2):627–631

Roring S, Scott A, Brittain D et al (2002) Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. J Clin Microbiol 40(6):2126–2133. doi:10.1128/JCM.40.6.2126-2133.2002

Skuce RA, McDowell SW, Mallon TR et al (2005) Discrimination of isolates of *Mycobacterium bovis* in Northern Ireland on the basis of variable numbers of tandem repeats (VNTRs). Vet Rec 157:501–504

Smith NH, Upton P (2012) Naming spoligotype patterns for the RD9-deleted lineage of the *Mycobacterium tuberculosis* complex;

www.Mbovis.org. Infect Genet Evol 12 (4) : 873-876. doi:10.1016/j.meegid.2011.08.002

Sobrino R, Vicente J, Aurtenetxe O, Garrido JM, Gortázar C (2008) Bovine tuberculosis in a badger (*Meles meles*) in Spain. Vet Rec 163:159–160

Thierry D, Brisson-Noel A, Levy-Frebault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B (1990) Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* sequence, IS*6110* and its application in diagnosis. J Clin Microbiol 28:2668–2673

Woodroffe R, Donnelly CA, Johnston WT, Bourne FJ, Cheeseman CL, Clifton-Hadley RS et al (2005) Spatial association of *Mycobacterium bovis* infection in cattle and badgers *Meles meles*. J Appl Ecol 42:852–862. doi:10.1111/j.1365-2664.2005.01081.x

Zanella G, Durand B, Hars J et al (2008a) Tuberculosis in wildlife in France. J Wildl Dis 44:99–108

Zanella G, Duvauchelle A, Hars J, Moutou F, Boschiroli ML, Durand B (2008b) Patterns of bovine tuberculosis lesions in wild red deer and wild boar. Vet Rec 163:43–47

ANNEXE 4

Protocole suivi pour la détection de *Mycobacterium bovis* dans certains excretas

SOURCE : Elodie Barbier, pôle microbiologie environnementale et risques sanitaires, INRA DIJON

Composition du mélange réactionnel pour l'amplification de la PCR (volume :25 µl) :

- 4 µl d'eau Ultra pure
- 12.5 µl d'ABsolute qPCR ROX mix (Thermo Scientific)
- 1 µl de T4 bacteriophage Gene 32 product (T4 GP 32) (MPbio),
- 1µl de chaque amorce (concentrée à 10 µM)
- 1 et 0. 5 µl de la sonde (à 10 µM également)
- 5 µl d'ADN à amplifier

Cycles d'amplification :

Le thermocycleur utilisé : ABI 7900 (Life technologies).
La 1ère phase de dénaturation dure 15 minutes à 95°C. Elle est réalisée une seule fois.
Puis :
Un cycle à: 95℃ pendant 15 secondes puis un cycle à 60℃ pendant 1 min répétés 45 fois.

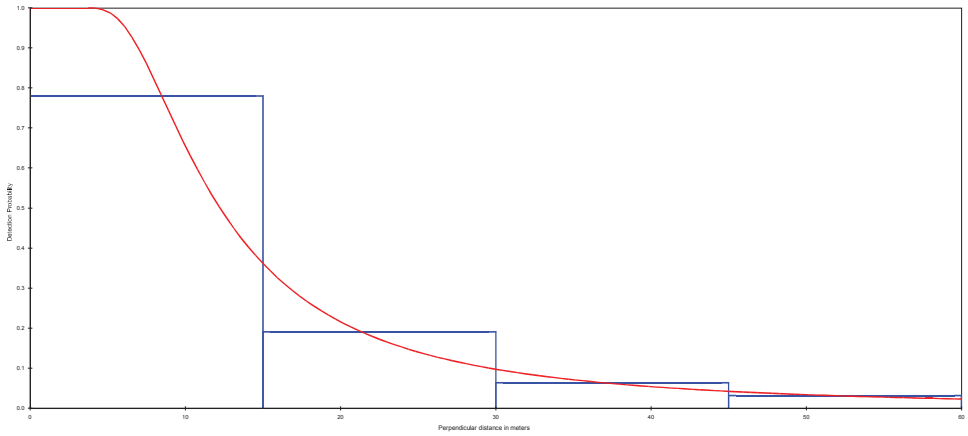
ANNEXE 5

Détermination sous R de la fonction de détection utilisée en distance sampling pour l'estimation des densités de blaireaux

```
Effort         :    341540.8 (m)
 # samples     :    401
 Width         :     60.00000
# observations:    67

Model
    Hazard Rate key, k(y) = 1 - Exp(-(y/A(1))**-A(2))

             Point        Standard    Percent Coef.        95 Percent
  Parameter  Estimate       Error      of Variation     Confidence Interval
  ---------  ----------  ----------  --------------  ----------------------
    A( 1)      10.30        5.501
    A( 2)      2.129       0.7883
    f(0)     0.62527E-01  0.20468E-01      32.73      0.33063E-01  0.11825
    p        0.26655      0.87254E-01      32.73      0.14095      0.50409
    ESW       15.993       5.2353          32.73       8.4568       30.245
  ---------  ----------  ----------  --------------  ----------------------
Pooled Estimates:
                        Estimate      %CV     df     95% Confidence Interval
                       ---------------------------------------------------------
 Hazard/Cosine
                m       2.0000
                LnL    -54.265
                AIC     112.53
                AICc    112.72    ..........................................
                BIC     116.94
                Chi-p  0.97380
                f(0)   0.62527E-01   32.73    65.00 0.33063E-01  0.11825
                p      0.26655       32.73    65.00 0.14095      0.50409
                ESW     15.993       32.73    65.00  8.4568       30.245
```



ANNEXE 6

Article soumis à European Journal of Wildlife Research

Title: Factors influencing the risk of indirect contact between badgers (*Meles meles*) and cattle in bovine tuberculosis infected areas in France

Authors :

Ariane Payne*[1,2,5], Sandrine Ruette[3] ; Lucile Millet[4] ; Jean Hars[1] ; Barbara Dufour[5], Emmanuelle Gilot-Fromont[2]

[1] Research department, National Game Hunting and Wildlife Agency (ONCFS), Gières, France
[2] Lyon University; CNRS, UMR 5558 Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, Villeurbanne, France
[3] Research department, National Game Hunting and Wildlife Agency (ONCFS), Birieux, France
[4] Bourgogne University, UFR des Sciences et de l'Environnement, 21000 Dijon, France
[5] Epidemiology Unit EPIMAI, Alfort National Veterinary School (ENVA), USC ANSES, Maisons-Alfort, France
*** corresponding author** : ariane_payne@hotmail.com Tel : +33 3 80 29 43 14 ; +33 6 84 20 99 48

ABSTRACT

Bovine tuberculosis (bTB) has been reoccurring in a few regions in France, notably in Côte d'Or where *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) is circulating within a multi-host system involving wildlife species, including badgers. This species is considered as a reservoir of infection in the British Isles hampering bTB eradication in livestock. Radio-tracking of ten badgers was carried out in the infected area of Côte d'Or between August 2011 and May 2012 to quantify indirect contacts between these individuals and domestic cattle that could lead to interspecific transmission of *M. bovis*. For each animal monitored, we calculated the number of locations per night in pasture and, for each month, the pasture area in the home range on the one hand, and in the core activity area on the other hand. The results showed a high variability which was analysed using generalized linear mixed models by testing the effect of different variables. The distance between the sett and pasture was a determinant of pasture use. Spring was more favourable than other periods for pasture frequentation, but seasonal pasture use was also influenced by the daily temperatures and the distance between the sett and the pasture. These results, associated with the knowledge of the infection rate, the persistence conditions of *M. bovis* in the environment and the densities of the wild populations studied, provide elements that enable a better assessment of the bovine tuberculosis transmission risk between this wild population and cattle.

Key words: *Mycobacterium bovis;* badger (*Meles meles*); cattle; habitat use; indirect transmission

Figure captions

Fig. 1 Location and identification of badger capture sites for the radio-tracking, distribution of bTB prevalence in the badger and cattle outbreaks per district in Côte d'Or. The location of the Côte d'Or in France and the situation regarding bTB in cattle in comparison with others *départements* are shown in the top right corner.

Fig. 2 Definition and characterization of the periods used in the analysis

Fig. 3 Representation of the home ranges (outline of 100% MCP in continuous line and 95% Kernel area represented by stripes) of 4 badgers monitored (B9 and B10 on top ; B1 and B2 at the bottom). Females are shown in white and the capture sett in triangle, males are in black and the capture sett is represented by a circle. Pastures appear in orange [color online].

Fig. 4 Predictions of the model explaining the number of locations per night on pasture (*nloc)* according to the minimum temperature (*TMin*) at the different periods. Only observed data are shown.

Fig. 5 Predictions of the model explaining the pasture area in the home range (*pat_hr)* according to the sett-pasture distance (*dist s-p*) at the different periods. Only observed data are shown.

Captions of appendices available online

Online ressource 1 Comparison of models explaining the number of locations per night on pasture after square-root transformation. The selected model is shaded.

Online ressource 2 Distribution of quantiles of the residuals of the model explaining the number of locations on pasture per night (*nloc*, circles) compared to the normal distribution (line).

Online ressource 3 Comparison of models explaining the pasture area in the home range per month after square-root transformation. The selected model is shaded.

Online ressource 4 Comparison of models explaining the pasture area in the core area per month after square-root transformation. The selected model is shaded.

I-Introduction

Bovine tuberculosis (bTB) is caused by *Mycobacterium bovis*, a bacteria belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex, which originally infects cattle but can be transmitted to a very large spectrum of hosts, including humans (Biet et al. 2005). In Europe, since the 1950s, surveillance and management measures have been put in place in the cattle industry to control the disease that was circulating enzootically. These measures have led to a reduction in the TB incidence and prevalence in domestic cattle herds in most countries (Reviriego Gordejo and Vermeersch 2006).

However, *M. bovis* also infects populations of various wildlife species, which can, according to demographic and geographic contexts, act as wild reservoirs, capable of retransmitting the bacteria to livestock. The circulation of *M. bovis* within a multi-host system involving these wildlife populations complicates infection control and may prevent bTB eradication in livestock (Phillips et al. 2003; Corner 2006).

France has acquired the bovine tuberculosis-free status in 2001 with the European Union. However since 2004, the infection has reoccurred in domestic cattle in some regions. In wildlife, grouped cases in the red deer (*Cervus elaphus*), the wild boar (*Sus scrofa*) and more recently the badger (*Meles meles*) have been detected in a few, *départements*[1] notably in Côte d'Or and in Dordogne (Zanella et al. 2008; Payne et al. 2013).

In the Côte d'Or *département*, 128 cattle herds have been declared infected between 2002 and 2011 (source DGAl) (Fig.1). We witness an increasing number of recurrent breakdowns where farms having undergone a total or partial slaughter and a disinfection are recontaminated sometimes several times and within a short period. In the infected area of this *département*, *M. bovis* prevalence in wild boars varied from 0 to 15% between 2003 and 2011 according to areas and years, and in the badger it has remained stable since 3 years at a level of 5.6% on average. Infected cattle and wildlife species share the same *M. bovis* strains and remain spatially associated, bearing out the epidemiological link between the two compartments (Payne et al. 2013).

The circulation of *M. bovis* in such a multi-host system raises the question of the epidemiological role of the different populations involved. In the British Isles, the badger has been identified as a reservoir of bovine tuberculosis, capable therefore of maintaining the infection and retransmitting it to cattle (Bourne et al. 2007; Murphy et al. 2010).

In France, the badger's epidemiological role is not established but, in the light of the British experience and given the efforts undertaken in the cattle industry to control the infection, there is a need to improve knowledge and notably to assess the risks of *M. bovis* transmission between badgers and cattle. The mechanisms of *M. bovis* transmission between badgers and cattle are not fully known, but interactions between the two populations, which underpin contaminating contacts, are considered as a key factor of this transmission (Corner 2006). Studies have shown that direct contacts between the two species are rare (Böhm et al. 2009; Drewe et al. 2013). On the other hand, we know that, according to the dose and the route of infection, cattle can excrete *M. bovis* through aerosols and in the faeces even in the absence of lesions, and thereby contaminate the environment (grass, soil, water, food) (Phillips et al. 2003; Mccorry et al. 2005). Similarly, the badger is capable of excreting *M. bovis* through aerosols, urine and faeces (Corner et al. 2010). The bacteria is capable of surviving several months in the environment and up to 6 months in cow dung in some climatic conditions (Phillips et al. 2003;

[1] French administrative division; roughly equivalent to a county

Sweeney et al. 2011). Hence, transmission by indirect contact would be the most frequent (Drewe et al. 2013). Acknowledging the extent of habitat overlap between the 2 species therefore becomes a key issue for the assessment of the interspecific transmission risk.

The aim of this study was to estimate which factors determined the use of pastures by badgers in the infected area of Côte d'Or in 2011-2012, to specify the conditions favouring indirect contacts between cattle and badgers. In mosaic and agropastoral landscapes like those of Côte d'Or, badger territories encompass most often open lands and woodlands. The distribution of the two types of habitat can influence pasture use which also depends on seasons and available food resources in these different habitats (Kruuk et al. 1979; Palphramand et al. 2007; Do Linh San et al. 2007). We hypothesized that the local landscape around the sett could impact on the use of pastures by the badgers. In particular, the closer the sett would be to pastures, the more the latter would be used by individuals from this sett. Conversely, the availability of other food resources such as crops near the sett could prevent badgers from using pastures. We investigated whether this use varied according to the sex of animals, space use being different between males and females (Kowalczyk et al. 2003a; Palphramand et al. 2007) and over the seasons, according to the activity rhythm Indeed, since badgers experience a peak of territorial activity and an increased nutritional need at the beginning of spring and in autumn (Roper 2010), we expected a higher frequentation of pastures during these periods. Conversely, during the coldest months, they have a slowed down activity, they do not or hardly emerge from their sett when temperatures are negative (Kowalczyk et al. 2003b; Roper 2010). It is also the period when females give birth (Roper 2010). Rainfall could also have an effect on pasture frequentation. It has been shown in England that the visit of farms for searching for food was less frequent following a rainy day than during dry weather, as the badgers probably change their feeding sites according to rainfall (Garnett et al. 2002; Tolhurst et al. 2009). These authors explain their results by a variability of earthworm accessibility according to weather conditions and notably precipitation which favours the coming up of earthworms at the soil surface. Earthworms are indeed an essential component of the badger diet in countries of northern and central Europe (Kruuk 1978; Kruuk and Parish 1981; Cleary et al. 2011). We therefore on the one hand investigated the effects of temperature and rainfall independently of each other, and on the other hand, knowing that pastures contain a significant earthworm biomass (Kruuk et al. 1979; Granval et al. 2000), we combined these variables to see whether favourable rainfall and temperature conditions for the accessibility of earthworths at the surface could favour pasture use by the badger.

II- Materials and methods

1. Study site and choice of setts

The study area corresponds to the cattle infection area of Côte d'Or. The cattle outbreaks reported since 2002 are distributed in an area extending over 80 km from north to south and 40 km from east to west, representing a coalescent area of about 2500 km^2 to the west of Dijon (Fig. 1). Two types of landscape can be distinguished: the southern half of the area is covered at 60% with mixed forest, the forests being broken by small valleys with pastures and crops. The northern half has a fragmented mosaic landscape dominated by open land which represents about 80% of the total area.

Due to this landscape, cattle farms are denser in the northern area whereas big game (wild boar and cervids) is more abundant in the south. Badger densities have been recently estimated and preliminary results seem to show

a more abundant population in the northern area than in the southern area, with between 3 and 9 adult badgers per km^2 (unpublished data).

These two areas also correspond to relatively distinct epidemiological entities since two different *M. bovis* strains were circulating at the beginning of the 2000s in these two areas both in domestic and wild hosts: SB0120 in the north and SB0134 in the south (Payne et al. 2013).

To determine the influence of the distance of the sett from the pasture on the use of the latter by the badger, setts were chosen according to the distance to the closest pasture with the aim of obtaining a gradient of distances from 10 to 500 m. Among the setts that were the closest to pastures, some also had cattle farms and farm buildings in their environment. Three sites in the northern area and four sites in the southern area were chosen, each having several setts meeting these criteria (Fig. 1). The pastures and the crops were identified in the study area from the 2011 graphic parcel register developed based on farmer statements (Source : DDT 21), including the spatial characteristics of all the agricultural parcels and their use.

2. Meteorological data and periods

The following meteorological dada were collected between 1^{rst} August 2011 and 31 May 2012: the daily minimum temperature in °C (*Tmin*) and the daily precipitation in mm (*Rain*) from two automatic stations of Météo France close to the capture sites (in southern area: 47.27N, 4.55E; in northern area: 47.49N, 4.33E ; WGS 1984). Since the temporal unit of badger monitoring was the night, we used the meteorological data of day D for each night between day D and day D+1. *Tmin* was retained to explain the daily use of pastures rather than the average or maximum temperature because it corresponds to the temperature at night and has therefore a more determining impact on the activity of badgers, which is slowed down when the temperature drops below a certain threshold (Kowalczyk et al. 2003b).

According to Kruuk and Parish (1981), favourable nights for the presence of earthworms at the ground surface are those when the maximum temperature lies between 8.5 and 14.5°C, the minimum temperature does not descend below 0°C and precipitation is either above 2 mm in the last 72h, or above 1 mm in the last 24h, or above 10 mm on that day or night. From these criteria, for each night during the study, a « worm night » variable (*WN*) coded as 0 (unfavourable night) or 1 (favourable night) was created. Then, the number of « worm nights » (*WNNb*) was calculated per month for the analyses (cf. § 4).

A period variable (*Per*), divided into 4 classes between the beginning of August 2011 and the end of May 2012 was defined according to criteria of homogeneity of weather conditions, to correspond to the different biological phases of the badger (rearing of young, winter low activity, territorial activity) and the different cattle breeding seasons (cows present on pastures or inside the buildings) (Fig. 2). The first period (P1, end of summer, beginning of autumn) extending from 1^{rst} August to 31 October 2011 was characterized by warm and dry weather. The second period (P2, autumn), between 1^{rst} November and 31 December 2011, was more wet and cool, and corresponded to the cows' return inside buildings. Between 1^{rst} January and 29 February 2012 (P3, winter), the weather was cold and dry, the temperatures having dropped to very low levels in February with a daily mean of 1.5 °C. Lastly, P4 designates the beginning of spring (March and April 2012), more warm and more wet, a period during which cattle were again turned out to pasture.

3. Captures and fitting of GPS collars and radio-tracking

The aim was to fit with GPS collars ten badgers from different groups with a balanced male / female ratio. For this, we placed two cages (dimensions: 154 x 81 x 52 cm) per sett, one near the openings, the other further away, on a badger trail. The cages were baited with maize grain, without setting the cage traps at first so that badgers could become accustomed to going inside the cages without suspicion. After three weeks, the cage traps were set. The capture period extended from August 2011 to February 2012 for a capture effort totaling 200 nights-traps.

Once captured, the badgers were anaesthetized by a veterinary using a blowpipe with a mixture of ketamine (Imalgène®) and medetomidine (Domitor®) with a dose of 0.1ml/kg of each product (Thornton et al. 2005). The badgers were weighed, sexed and identified individually using numbered ear tags. Only individuals weighing at least 10 kg, considered as adults, were fitted with GPS collars. The operations carried out during this study were authorized by the order of the Paris prefecture No. DEP-2011-81-1 authorizing the National Game Hunting and Wildlife Agency (ONCFS) to capture badgers at the national level for scientific purposes.

We used small wildcell GPS collars (LOTEK®) which have an automatic release system programmed in advance enabling the collar recovery without having to recapture the animal. The total weight of the collar was 300g, i.e. less than 3% of the animal's weight. Since badgers are animals with an essentially nocturnal activity and remain in their setts the rest of the time (Roper 2010), the collars were programmed to take a GPS fix every 30 minutes during the night (between 19:00 and 8:00 hours); we considered this schedule to be the best compromise between precision of the monitoring and total duration of the monitoring, which was theoretically estimated to be 214 d on average (134 d-305 d). The locations were recovered every day thanks to data retransmission by GSM.

4. Treatment of geolocation data and variables studied

We chose 2 estimators enabling us to estimate the level of pasture use by badgers both in temporal terms (time spent on pastures) and spatial terms (portion of the badgers' home range and of the core activity area made up of pastures). We chose to work on estimators in absolute values and not on proportions (proportion of time spent on pastures or proportion of pasture in the home range and in the core activity area), to better reflect the intensity of indirect contact by the level of pasture use.

First, for each individual, we calculated the number of locations in pasture per night (*nloc*), which was the variable to be explained for the temporal analysis. This time scale was chosen to test whether pasture use could depend on factors that varied from one night to another, such as weather factors and favourable conditions for the availability of earthworms at the soil surface. We also sought to test for variability in the daily use of pastures according to the sex, the period of the year and the proximity of pastures to the sett.

The GPS point recording success rate in open land was on average of 95% and the maximum margin of error on the GPS locations provided by the collars was assessed to be 10 m based on the tests performed prior to the fitting of radio-collars. We included in the analysis all the locations found on the pastures identified from the graphic parcel register and in a buffer zone of 10 metres around them, to take this error into account.

For the spatial analysis, we calculated the pasture area within the home range (*pat_hr*) and in the core activity area (*pat_ca*) per month for each individual monitored. The core activity area correspond to areas of intense activity, more frequently used, and contain most often refuge sites and regular feeding grounds (Kaufman 1962). For the spatial analyses, the chosen temporal unit was the month which is the minimum duration of monitoring,

generating a number of locations above 50, sufficient for calculating the home range (Seaman et al. 1999) and enabling us to obtain 2 to 3 values for each period. Each monthly home range and each monthly core area were generated from all the available locations for each animal to maximize the precision of the estimate (De solla et al. 1999; Pellerin et al. 2008). We estimated the home range using the fixed kernel method taking into account 95% of locations, considered as best representing the space utilization distribution (Worton 1995). The smoothing parameter value was determined by multiplying the reference parameter h by the factor 0.2; this multiplication factor was chosen visually with the aim of not overestimating the area really used. The core areas were determined by the 50% kernel (Calenge et al. 2002; Bodin 2005), with the same smoothing parameter as for the home range. The home range was also calculated with the minimum convex polygon, taking into account 100% of locations (100% MCP), on the one hand for the purpose of comparing our results with other studies and on the other hand to determine the areas and proportions of some available habitats for each badger (Aebischer, Robertson, and Kenward 1993). Hereafter in this article, the term « home range » designates the estimate provided by the 95% kernel and the « core area » corresponds to the estimate provided by the 50% kernel. These treatments were performed with the adehabitat R package (Calenge 2006). For each animal, the pasture areas overlapping the monthly home ranges and core activity areas (*pat_hr* and *pat_ca*) generated in this way were calculated using ArcGis 10.0.

5. Statistical analyses

For the temporal and spatial analyses, we used linear mixed models, enabling us to take into account individual variability (variable *ind)* as a random effect in the models (Dingemanse and Dochtermann 2013). They were adjusted and compared to explain the three indicators of pasture use by badgers: the number of locations in pasture per night per animal, *nloc*, the pasture area overlapping the monthly home range *pat_hr*, and the monthly core area *pat_ca*. The amount of variability explained by the random part was determined by the ratio of the interindividual variance and the total variance of the random part including the residual variance. The amount of variability explained by the fixed part of the model was estimated by calculating the ratio between the deviance of the model having a null fixed part and the deviance of the final model.

For the temporal analysis, the sex (*sex*), the distance between the sett and the pasture (*dist s-p*), the minimum temperature (*Tmin)*, the rainfall (*Rain*), the period (*Per*, comprising 4 classes: *P1* to *P4)* and the variable « worm night » (*WN*) were tested in the fixed part of the model as explanatory variables for *nloc*.

For the spatial analysis, we tested in the fixed part of each of the models, *sex*, *dist s-p* and *Per* to which we added the number of earthworm nights in the month (*WNNb*) and the proportion of available crops (*crop*).

The model selection was performed following Zuur et al.'s (2009) procedure. The random part of the model was determined by comparing the model with and without taking into account the random effect *ind*, by including in the fixed part all the chosen variables and the biologically plausible interactions of order 2. To choose the variables to be retained in the fixed part, we then fitted all the possible sub-models on the basis of the preceding one, and selected the models with the lowest AIC (Akaike information criterion) at each step. We also applied the parcimony principle (Burnham and Anderson 2002): when two models had similar AIC values (difference of less than 2), we chose the one with the fewest parameters. For the variable *nloc*, we checked for a temporal autocorrelation between the daily exits from the sett, i.e. whether badgers tended to have the same number of locations in pasture from one night to the other. This checking was made by observing the temporal

autocorrelation pattern of the residuals of the previously selected model. Then where required, the autocorrelation structure was identified to be taken into account in the final model by comparing the AIC between the model in the absence of autocorrelation, the model Ar (1) and the model ARMA (1,1). Lastly, the parameters were estimated with the penalized restricted maximum likelihood method (REML). The normality of residuals was checked visually and with a Shapiro test. After examination of the residuals, we chose to transform the initial variable to be explained (square-root transformation) to have normally distributed residuals. We checked whether this transformation did not alter the fixed and random parts of the selected model.

III-Results

1. Captures and telemetry monitoring

Fourty one individuals were captured, i.e. a capture rate of 0.205 captures/night-cage. Ten badgers, five adult males and five adult females, were fitted with GPS collars and tracked between August 2011 and May 2012. Most of them belonged to different groups but in view of the overlapping of their home ranges, the individuals B1 and B3 on the one hand and B7 and B9 on the other hand, may possibly have come from the same group (Fig. 3). These individuals were distributed equitably between the northern area and the southern area (Table 1). The radio-tracking lasted between 25 and 185 days with an average of 89.9±56.5 days (Table 1). The battery lifetime determined the stop of the tracking except for one badger (B7) that died during the data collection, possibly as a result of *M. bovis* infection. The postmortem examination showed a poor general body condition, an abscess and a pulmonary fibrosis. The culture was positive for *M. bovis*.

Seven individuals were monitored during the period 1, four during the period 2, five during the period 3 and five during the period 4 (Table 1). The setts of the radio-collared badgers were located at a distance from pasture that varied from 10 m to 500 m. The number of locations over the whole monitoring was between 248 and 1582 per animal. Monthly, the number of locations varied between 82 and 552, which was sufficient for the home range estimation (Seaman et al. 1999). Over the whole monitoring, the home ranges calculated measured on average 123.6 ha ± 99.3 ha as assessed by 100% MCP and 52.2± 52.2 with the 95% kernel method. The size of the core activity areas was on average 6.2±8.6 ha (Table 1). All these estimates showed large variations from one individual to another (Fig. 3).

Among all the locations collected on the 10 badgers, a single animal (B5) was detected visiting a farm building. This frequentation was sporadic since it concerned 22 locations distributed over 10 nights, among the 1167 recorded for this animal, i.e. 1.8% of locations.

2. Temporal analysis : number of locations per night on pasture

The variable *nloc* varied from 0 to 21, i.e. from 0 to 87.5% of the total locations collected in one night. The proportion of variability explained by the fixed effects of the selected model was 6% while 24 % of the variance was related to the random effect of the individual. The model presenting the smallest AIC included the effects of the sett-pasture distance (*dist s-p*), of the period (*Per*), of the minimum temperature (*Tmin*) and of the interaction between these two last variables. The structure ARMA (1, 1) provided the best model (Online resource 1). According to the selected model, the pasture frequentation varied according to the periods with, at equivalent temperature, a lower frequentation in autumn (P2) and in winter (P3) relative to spring (P4). Moreover, the

interaction between the temperature and the period had a significant effect: in autumn (*P2*) and in winter (*P3*), the frequentation of pastures decreased when the temperature was low, whereas the temperature did not alter pasture use in the other periods (Table 2, Fig.4). Pasture use did not differ between the end of summer (*P1)* and spring *(P4)*. Lastly, the distance between the sett and the pasture had a slight effect on pasture use (Table 2), with pastures being less used when the distance was large. The Shapiro test rejected the hypothesis of normality of the residuals ($P < 0.001$) but the distribution of the quantiles of the residuals was graphically close to the quantiles of the residuals following a normal distribution (Online resource 2).

3. Spatial analysis : pasture area in the home range and in the core area

The pasture area in the home range *pat_hr* calculated monthly was on average of 15.4 ± 21.5 ha. In the core area, the pasture area *pat-ca* was on average of 3.2 ± 5.4 ha. The fixed effects of the selected model for *pat_hr* explained 32.5% of the observed variability while for *pat-ca*, the fixed effects of the chosen model accounted for 45.3% of the observed variability. We noted besides a strong effect of the individual (random effect) since the proportion of variability related to the individual reached 81.1% and 74.9% for *pat_hr* and *pat-ca*, respectively.

The model selected for explaining the pasture area in the home range (*pat_hr*) included the sett-pasture distance (*dist s-p)*, the sex (*sex)*, the period (*Per)* and different interactions between these variables (Table 3, Online resource 3). The pasture area in the home range decreased as the sett-pasture distance increased, and the badgers living at the edge of pastures used the pastures less in summer (P1) and in autumn (P2) than in spring (P4). The interaction between *Per* and *dist s-p* showed however that badgers that were the most distant from pastures used the latter more in summer and especially in autumn *(P2),* compared to badgers living at the edge of pastures (Fig.5). At the end of summer and especially in autumn (*P1* and *P2*), the males used pastures less than females (Table 3),

For *pat_ca*, the best model included the same variables and the same interactions (Online resource 4). The significant effects were similar, except for the period (where *P3* was also significantly less favourable than P4 for the use of pasture) but the magnitude of these effects was less than in the case of *pat_hr* (Table 4).

IV- Discussion

We estimated the level of pasture use by badgers using radio-tracking. The variable capture success rate, combined with the premature discontinuation of some trackings (owing to the poor functioning of the radio-collar), did not enable us to track all the individuals over all the periods defined in the protocol. This imbalance in the sampling design could have influenced the result of the mixed model in that the factors inherent to individuals taken as explanatory variables (sex, proximity between the sett and pasture) could not be tested in a homogeneous manner over the whole duration of the monitoring. This could have resulted in a confusion between the effect of the temporal variables (period) and the effect of the individual variables (sex, sett-pasture distance or proportion of available crops).

We note that for the three selected models, the proportion of variability related to the individual taken as random variable is moderate for *nloc* to very large for *pat_hr* and *pat_ca*. This result reflects the importance of variations between individuals within a same species, emphasizing that each individual behaviour does not reflect all the behaviours of the population (Dingemanse et al. 2010). Besides the individual's personality, the behaviour is also determined by extrinsic environmental processes (Börger et al. 2006). The variables that we incorporated in the fixed part of the model reflect a part of these temporal factors (period), spatial factors (sett-pasture distance) and on a broader level, environmental factors (temperature, rainfall, earthworm nights). However for *nloc*, only 6% of the variability are explained by the fixed part of the model (against 32% and 45% for *pat_hr* and *pat_ca*, respectively). This could be the result of a strong spatiotemporal autocorrelation, which generally characterizes space use data (Börger et al. 2006) and which is enhanced here by the temporal scale chosen (daily time step)). The marked improvement of the model after taking into account temporal autocorrelation supports this hypothesis. Other factors that were not measured here could also affect the use of pastures, both internal (physiological condition of animals) and external (disturbance).

Our results show therefore that pasture use is very variable from one individual to another. Among the variables measured at the scale of the individual, the sett-pasture distance appears as a determining factor in this use especially if it is considered at the scale of the month. This result reflects the importance of the landscape structure and of the spatial context in habitat use (Börger et al. 2006), especially since this species is sedentary and territorial. The closer the badgers' sett to pastures, the more the latter are used.

Other studies report a relationship between landscape structure and home range size or territory size. In order to see whether the effect of the sett-pasture distance on pasture use was attributable to an effect on the size of the home range and of the core area, we tested them as a variable to be explained in a model including the same fixed and random parts (results not shown). It appears that the sett-pasture distance also explains the size of the home range and of the core area: the closer the sett is to a pasture, the larger the home range and the core area. This result is consistent with Kowalczyk et al. (2006) study carried out in Poland which shows that the more the habitat is fragmented, the larger the daily distances covered, resulting in a larger home range. On the other hand, this result is in contrast to Palphramand et al.'s (2007) study which reports, in England, that territory size increases when the proportion of pasture in the home ranges decreases. Similarly, Do Linh San (2007) noted in Switzerlands larger home ranges in forested areas than in mosaic landscape areas.

On balance, however, our analyses show that the sett-pasture distance has an influence of its own on pasture use which is not only attributable to its effect on the size of the home range and of the core area. From an epidemiological viewpoint, this result emphasizes the importance of taking into account the landscape structure, and in this case, the distribution of the setts in relation to pastures, in the interactions between cattle and badgers.

In England, several studies have shown that tuberculous badgers had an atypical space occupancy, characterized by a larger home range (50% larger than non-infected badgers), a longer time spent out of their main sett, and used secondary setts more. These behavioural changes could be due to the infection itself, to the weakening of infected animals and to their rejection by the rest of the group (Cheeseman and Mallinson 1981; Garnett et al. 2005; Weber et al. 2012). Among the ten badgers equipped in this study, four were trapped and analysed after the study within the framework of the tuberculosis surveillance and control measures (authorized by prefectoral order No.149/2012/DDPP issued by the prefect of Côte d'Or). None of these four badgers was found to be positive after analyses (post-mortem examination, PCR and culture on a pool of lymph nodes). A female badger that died during the study after 2 months of tracking was *M. bovis* positive, with lesions and a general body condition reflecting an advanced stage of infection. The home range of this badger, measuring 1.40 km^2 (100% MCP), does not correspond to the largest home range observed in the study but lies in the high end. Its last movements were limited and were located in a pasture 600 m from its main sett. It is difficult to draw conclusions from a single individual, but its behaviour possibly reflects what has been observed in England.

Our results also show that the period of the year influences pasture use by the badger. Badgers use pastures more in spring and in summer and in the beginning of autumn than in the end of autumn and in winter. Spring is the most favourable season for pasture use in their monthly home range and core area. Several hypotheses could be put forward to explain this result: the fact than in spring, territorial behaviours (exploration and marking of the territory) increase (Hutchings et al. 2001; Kowalczyk et al. 2006), which can lead badgers to use pastures more, and even more if the landscape is fragmented, as territorial marking is preferentially made on the edges and the limits between plots (White et al. 1993; Hutchings et al. 2001). In summer, earthworms are less available on pastures and badgers diversify their food sources, switching more to cereals, fruit, amphibians or insects found outside pastures (Krunk 1978; Kowalczyk et al. 2003b; Byrne et al. 2012). The sampling could have also possibly biased the analysis by overestimating the effect of spring on pasture use relative to the other periods. Indeed, among the five badgers tracked during the spring period, only two were also tracked in the summer-early autumn period and the three others had a sett that was relatively close to pastures (one was less than 150 m from pastures and 2 less than 50 m away), and the greater use of pastures can be accentuated by the proximity of the latter.

Besides, we demonstrated that the minimum temperature influences the daily use of pastures in autumn and in winter. Kowalczyk et al. (2003a) showed that badgers did not emerge from their sett below a mean monthly temperature of -4°C and that they came out each night only when the mean night temperature exceeded 5°C. During the winter period (*P3*), very low temperatures were registered in February (down to –15°C) and the average of temperatures during this period did not exceed 1.5°C. In November and December (*P2*), there were several nights with negative temperatures. It is therefore likely that the influence of temperature on pasture use during *P2* and *P3* was related to badgers' slowed down activity. In order to test this hypothesis, we modelled the

total number of locations obtained per night (i.e. the time spent outside the sett), by incorporating the same explanatory variables as for *nloc* : the effect of the minimum temperature interacting with the period is indeed similar to that observed in the model explaining *nloc* (results not shown).

We also showed that in summer and especially in autumn, badgers inhabiting forest areas were more attracted on pastures. These results agree with those of Palphramand et al. (2007) who showed that pasture was a habitat selected by badgers throughout the year but that it was more so in summer and in autumn relative to coniferous and deciduous forests. This could be explained by a lower food availability in forests at these periods, driving badgers to diversify their food sources by going in other habitats (Kruuk 1978, Kowalczyk et al. 2003b, Byrne et al. 2012). However, in the present study, a badger inhabiting a forest area at 300 m from the edge was never located in a pasture during the 7 months of its tracking. Furthermore, its home range was among the smallest of the study (100% MCP: 0.48 km^2). The forest environment therefore seems to be here sufficiently rich to meet the needs of the badgers living there throughout the periods studied here.

Our results show a difference between males and females, with females using more intensely pastures in the end of summer and especially in autumn (*P1* and *P2*). The small sample size leads us to interpret these results with caution. Palphramand et al. (2007) found a greater selection of pastures in males while Kowalczyk et al. (2003b) showed that females had larger home ranges than males in spring and in summer. In addition, the reproductive status of females influences their movements (Palphramand et al. 2007 ; Kowalczyk et al, 2006), but this status is unknown for the females tracked during our study.

Only one male badger visited sporadically a farm building located 500m from its sett during the study. Two other badgers were monitored on this same site (B6 and B8) between summer 2011 and spring 2012, their sett was located 500 and 700 m, respectively, from the same farm building with cowshed, maize silage, cereal storage sites (concentrated wheat and barley according to the season), all accessible to badgers. For the other individuals tracked, the closest farm was located more than 1000 m from the sett. This result contrasts with what is reported in England where radio-tracking studies have shown the presence of farm building within the core activity areas. In England, video surveillance monitoring has shown frequent visits by badgers in farms (between 53% and 71% of the nights monitored according to studies) mainly on sites of food storage or distribution with a peak of visits observed in spring (Garnett et al. 2002; Tolhurst et al. 2008; Tolhurst et al. 2009; Judge et al. 2011). Our results could be explained by the fact the setts of the badgers monitored in our study were located rather far from farms (1190 m on average), as the criterion for choosing was rather the distance from pastures. The choice of closer setts for radio-tracking as well as a study based on video surveillance on a large number of farms and points within them could enable us to know whether badgers living in the vicinity of farms visit them. However, it is also possible that the high badger densities found in England increase the food competition and drive these animals to diversify their resources by searching for food in farms.

Finally, we had hypothesized that given the predominance of earthworms in the badger diet, favourable weather conditions for their availability at the soil surface could attract these animals on pastures. Our results do not confirm this hypothesis, as the «worm nights » were not retained as an explanatory variable for pasture use. However, many authors attest to the predominance of the earthworm and particularly the species *Lumbricus terrestis* in the badger diet (Kruuk and Parish, 1981 ; Cleary et al. 2009 ; Palphramand et al. 2007 ; Roper 2010 ;

Byrne et al. 2012). The spatial organization and daily movements are partly determined by the availability of this food resource (Kowalczyk et al 2003b ; Kowalczyk et al. 2006). In England, where pastures have the greatest earthworm biomass relative to other habitats, the intensity of pasture use depends on this availability, which is itself related to rainfall (Kruuk 1978; Kruuk et al. 1979; Palphramand et al. 2007). However, Kruuk and Parish (1981) showed that in Scotland, earthworms dominate the diet of badgers throughout the year. When earthworms are less accessible (warm and dry or cold and dry weather), badgers increase their efforts to dig them up. As a result, weather conditions would have little influence on their earthworm consumption level and thus on their use of pastures for this purpose. In other ecosystems, as in eastern and northern Europe, the richest habitats in earthworms are represented by deciduous forests (Broseth et al. 1997; Kowalczyk et al. 2003b) and not pastures. In France, the richest earthworm communities are observed in meadows (1 to 5 tons/ha) but deciduous forests also contain large amounts (Granval et al. 2000). Some authors qualify the predominance of the earthworm in the badger diet which seems to depend on geographic areas: the more the regions are situated at the south of Europe, the less earthworms dominate the diet and the more they are replaced by insects, vertebrates and plants (Byrne et al. 2012; Roper 2010). The faeces or stomach analysis could confirm or invalidate this hypothesis. Finally, methodologically, it is possible that the situations concerning earthworm nights were not sufficiently uneven to reveal an effect. Given that the construction of this variable depends on precise temperature and rainfall conditions, it is also likely that the effect of earthworm nights is confounded with those of the weather and temporal (period) covariables. We notice that rainfall was not retained either in the model *nloc*. But this variable has an effect when the total number of locations outside the sett is modelled (results not shown). Rainfall has an impact on the time spent out of the sett but we did not find that it had an influence of pasture frequentation.

It appears from our results that badgers visit pastures more in spring and in summer and to a lesser extent in autumn. These periods coincide with the presence of cattle on pastures, as the turning out to pasture starts in March-April and ends in November. Mullen et al. (2013) showed that badgers, when they had the choice, preferred the paddocks without cattle and studies using proximity loggers indicate that direct contacts between cattle and badgers are very rare (Böhm et al. 2009 ; Drewe et al. 2013). We did not measure the effect of cattle presence or absence on pastures because the precise schedule of parcel occupancy by cattle was not taken into account. We observed however that some tracked badgers went on pastures in the presence of cattle. Moreover, the prehension of earthworms by badgers is facilitated and as a result favoured when the grass is short (Kruuk 1979), therefore potentially when cattle are grazing in the pastures.

Even if the effect of worn nights could not be demonstrated, it is very likely that the search for earthworms is a strong factor of pasture attractiveness for badgers. The badgers search for earthworms by searching the soil with their snout thanks to a very developed sense of smell (Roper 2010). If they are infected with bTB and are shedders, this activity can lead to an excretion of *M. bovis*, but they can also inhale or ingest the bacteria if the soil is contaminated. Moreover, the bacteria persists up to 6 months in cow dung (Philipps et al. 2003) under which badgers commonly search for earthworms (Roper 2010). Since the badger can excrete *M. bovis* through the faecal and urinary route (Corner et al. 2010), the latrines dug in pastures are potentially contaminating. Drewe et al. (2013) showed that cattle could have more than 100 distinct contacts with active latrines over a 6 month period. The temporality and the way badgers use pastures therefore favour interspecific transmission of *M. bovis*.

V- Conclusion

In the infected area of Côte d'Or, pastures are a habitat that is widely shared between badgers and cattle. Interactions are much more intense for badgers living near pastures and are favoured in spring. We did not show a frequentation of farm buildings contrary to what has been widely observed in England. This use of pastures therefore seems to reflect the majority of the potentialities for indirect contacts. This contact poses a risk of interspecific transmission of *M. bovis* which is all the more significant since badgers have on pastures a behaviour that is potentially excretory or during which they can become infected.

Besides these elements, the assessment and the management of this risk will have to take into account the densities and infection rates of the populations involved, at a local scale. Furthermore, the study of *M. bovis* persistence in the specific environmental compartment of this area should provide a key element to the understanding of the epidemiological cycle of *M. bovis*.

Acknowledgements

The authors thank the funders of this study : the *Ministère de l'Agriculture et de la Pêche*, the *Conseil Régional de Bourgogne*, the *Conseil Général de la Côte d'Or*, the *Fédération départementale des chasseurs de Côte d'Or*, the *Groupement de Défense Sanitaire de Côte d'Or*, the *Fédération nationale des chasseurs* and the Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage.

The authors also thank the field assistants Julien Philippe and Jonathan Fligny, the agents of the *Service Départemental 21* of ONCFS as well as Stéphane Barbier and all the voluntary trappers and hunters who participated in the capture and handling of animals.

Lastly, we thank Clément Calenge and Christophe Ferrier for their help in the spatial treatment of the data.

References

Aebischer NJ, Robertson PA, and Kenward RE. (1993). Compositional analysis of habitat use from animal radio-tracking data. Ecology 74 (5): 1313–1325. http://www.esajournals.org/doi/abs/10.2307/1940062.

Biet F, Boschiroli ML, Thorel MF, Guilloteau LA (2005) Zoonotic aspect of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). Vet Res 36: 411-436. doi: 10.1051/vetres2005001

Bodin C (2005) Partage de l'espace et relation de voisinage dans une population continentale de blaireaux européens. Ph.D. thesis. Université Montpellier II Sciences et techniques du Languedoc.

Böhm M, Hutchings MR, White PCL. (2009) Contact networks in a wildlife-livestock host community: identifying high-risk individuals in the transmission of bovine TB among badgers and cattle. PloSone 4 (4). doi:10.1371/journal.pone.0005016

Börger L, Franconi N, Ferretti F, Meschi F, De Michele G (2006) An integrated approach to identify spatiotemporal and individual-level determinants of animal home range size. Am Nat 168 (4) : 471-484

Bourne FJ, Cox DR, Donnelly CA Gettinby G, McInerney JP, Morrison WI, Woodroffe R (2007) Bovine Tuberculosis: the scientific evidence. Final report of the independent scientific group (ISG) on cattle TB. DEFRA London

Broseth HB, Knutsen B, Bevanger K (1997). Spatial organization and habitat utilization of badgers *Meles meles*: effects of food patch dispersion in the boreal forest of Central Norway. Z Saugetierkd 62: 12–22. http://ci.nii.ac.jp/naid/10008710208/.

Burnham KP, Anderson DR (2002) Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach. 2d Ed. Springer-Verlag, Heidelberg doi:10.1016/j.ecolmodel.2003.11.004..

Byrne AW, Sleeman DP, O'Keeffe J, Davenport J (2012) The ecology of the European Badger (*Meles Meles*) in Ireland: a review. Biol Environ: 112 (1): 105–132. doi:10.3318/BIOE.2012.02.

Calenge C (2006) The package ''Adehabitat'' for the R Software: a tool for the analysis of space and habitat use by animals Ecol Model 197: 516–519. doi:10.1016/j.ecolmodel.2006.03.017.

Calenge C, Maillard M, Vassant J, Brandt S (2002) Summer and hunting season home ranges of wild boar (*Sus Scrofa*) in two habitats in France. Game Wildl Sci 19 (4): 281–301.

Cheeseman CL, Mallinson PJ (1981) Behaviour of Badgers (*Meles meles*) Infected with bovine tuberculosis. J Zool 42: 284–.289.

Cleary GP, Corner LAL, O'keeffe J, Marples NM. (2011) Diet of the European Badger (*Meles meles*) in the Republic of Ireland: a comparison of results from an analysis of stomach contents and rectal faeces. Z Saugetierkd 76: 470–475. doi:10.1016/j.mambio.2010.10.012.

Corner LAL (2006) The Role of Wild Animal Populations in the Epidemiology of Tuberculosis in Domestic Animals: How to Assess the Risk Vet Microbiol 112 (2-4) 303–12. doi:10.1016/j.vetmic.2005.11.015.

Corner, LAL, Murphy D, Gormley E (2010) *Mycobacterium Bovis* infection in the Eurasian Badger (*Meles meles*): the disease, pathogenesis, epidemiology and control. J Comp Pathol 144: 1–24. doi:10.1016/j.jcpa.2010.10.003.

De solla SR, Bonduriansky R, Brooks RJ (1999). Eliminating autocorrelation reduces biological relevance of home range estimates. J Anim Ecol 68 (2): 221–234.

Dingemanse NJ, Dochtermann NA (2013) Quantifying individual variation in behaviour: mixed- effect modelling approaches. J Anim Ecol 82: 39–54. doi:10.1111/1365-2656.12013.

Dingemanse NJ, Kazem AJN, Réale D, Wright J (2010). Behavioural reaction norms: animal personality meets individual plasticity. Trends Ecol Evol 25 (2): 81–89. doi:10.1016/j.tree.2009.07.013.

Do Linh San E, Ferrari N, Weber JM.(2007) Socio-spatial organization of Eurasian Badgers (*Meles meles*) in a low-density population of Central Europe. Can J Zool 85 (9): 973–984. doi:10.1139/Z07-085.

Drewe JA, O'Connor HM, Weber N, McDonald RA, Delahay RJ (2013) Patterns of direct and indirect contact between cattle and badgers naturally infected with tuberculosis. Epidemiol Infect 141 (7): 1–9. doi:10.1017/S0950268813000691.

Garnett B, R Delahay, and T Roper. 2005. "Ranging behaviour of European Badgers (*Meles meles*) in relation to bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) Infection." *Applied Animal Behaviour Science* 94 (3-4) (October): 331–340. doi:10.1016/j.applanim.2005.02.013. http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168159105000614.

Garnett BT, Delahay RJ, Roper TJ (2002) Use of cattle farm resources by badgers (*Meles meles*) and risk of bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) transmission to Cattle. Proc R Soc Lond B 269: 1487–91. doi:10.1098/rspb.2002.2072.

Granval P, Muys B, Leconte D 2000. Intérêt faunistique de la prairie permanente pâturée Fourrages 162: 157–167.

Hutchings MR, Service KM, Harris S (2001) Defecation and urination patterns of badgers *Meles meles* at low density in South West England. Acta Theriol 46 (1): 87–96.

Judge J,. McDonald RA, Walker N, Delahay RJ (2011) Effectiveness of biosecurity measures in preventing badger visits to farm buildings. PLoS ONE 6 (12): e28941. doi:10.1371/journal.pone.0028941.

Kaufmann JH (1962) Ecology and social behavior of the coati, *Nasua narica*, on Barro Colorado Island, Panama. University of California Publications in Zoology 60:95-222.

Kowalczyk R, Jedrzejewska B, Zalewski A (2003a) Annual and circadian activity patterns of badgers (*Meles meles*) in Białowieza Primeval Forest (Eastern Poland) compared with other Palaearctic populations. J Biogeogr 30: 463–472.

Kowalczyk R, Zalewski A, Jedrzejewska B (2003b) Spatial organization and demography of badgers (*Meles meles*) in Bialowieza Primeval Forest , Poland , and the influence of earthworms on badger densities in Europe Can J Zool 81 (1): 74–87. doi:10.1139/Z02-233.

Kowalczyk R, Zalewski A, Jędrzejewska B (2006) Daily movement and territory use by badgers *Meles meles* in in Bialowieza Primaveral forest, Poland Wildl Biol 12 : 385–391.

Kruuk H, Parish T (1981) Feeding specialization of the European Badger *Meles meles* in Scotland J Anim Ecol 50: 773–788.

Kruuk H,. Parish T, Brown CAJ, Carrera J (1979) The use of pasture by the European Badger (*Meles meles*) J Appl Ecol 16: 453–459.

Kruuk H (1978) Foraging and spatial organisation of the European Badger, *Meles meles L*. Behav Ecol Sociobiol 4 (1): 75–89. doi:10.1007/BF00302562.

Mccorry T, Whelan AO, Welsh MD, Mcnair J, Walton E, Bryson DG, Hewinson RG, Vordermeier HM, Pollock JM (2005) Shedding of *Mycobacterium Bovis* in the nasal mucus of cattle infected experimentally with tuberculosis by the intranasal and intratracheal routes Vet Rec 157: 613–618.

Mullen EM, MacWhite T, Maher PK, Kelly DJ, Marples NM, Good M. (2013) Foraging eurasian badgers *Meles meles* and the presence of cattle in pastures. Do badgers avoid cattle? Appl Anim Behav Sci 144 (3-4): 130–137. doi:10.1016/j.applanim.2013.01.013.

Murphy DE, Gormley E, Costello E, O'Meara D, Corner LAL (2010) The prevalence and distribution of *Mycobacterium bovis* infection in European Badgers (*Meles meles*) as determined by enhanced post mortem examination and bacteriological culture. Res Vet Sci 88 (1): 1–5. doi:10.1016/j.rvsc.2009.05.020.

Palphramand KL, Newton-Cross G, White PCL (2007) Spatial organization and behaviour of Badgers (*Meles meles*) in a moderate-density population. Behav Ecol Sociobiol 61 : 401–413. doi:10.1007/s00265-006-0268-z.

Payne A, Boschiroli ML, Gueneau E, Moyen JL, Rambaud T, Dufour B, Gilot-Fromont E, Hars J (2013) Bovine tuberculosis in 'Eurasian' Badgers (*Meles meles*) in France. Eur J Wildl Res 59 (3): 331–339. doi:10.1007/s10344-012-0678-3.

Pellerin M, Saïd S, Gaillard JM (2008) Roe Deer *Capreolus capreolus* home-range sizes estimated from VHF and GPS Data Wildl Biol 14(1) :101-110. doi : http://dx.doi.org/10.2981/0909-6396(2008)14[101:RDCCHS]2.0.CO;2

Phillips CJC, Foster CRW, Morris PA, Teverson R (2003) The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. Res Vet Sci 74 (1) : 1–15.

Reviriego Gordejo FJ, Vermeersch JP (2006) Towards eradication of bovine tuberculosis in the European Union. Vet Microbiol 112 (2-4): 101–109. doi:10.1016/j.vetmic.2005.11.034.

Roper TJ (2010) Badger. The New Naturalist Library. Ed Collins. London

Seaman DE., Millspaugh JJ, Kernohan BJ, Brundige GC, Raedeke KJ, Gitzen RA (1999) Effect of sample size on kernel home range estimates. J Wildlife Manage 63: 739–747. doi:10.2307/3802664.

Thornton PD, Newman C, Johnson PJ, Buesching CD, Baker SE, Slater D, Johnson DDP, Macdonald DW (2005).Preliminary comparison of four anaesthetic techniques in Badgers (*Meles meles*). Veterinary Anaesthesia and Analgesia 32 (1) : 40–7. doi:10.1111/j.1467-2995.2004.00163.x.

Tolhurst BA, Delahay RJ, Walker NJ, Ward AI, Roper TJ (2009) Behaviour of Badgers (*Meles meles*) in farm buildings: opportunities for the transmission of *Mycobacterium bovis* to cattle? Appl Anim Behav Sci 117 (1-2): 103–113. doi:10.1016/j.applanim.2008.10.009.

Tolhurst BA, Ward AI, Delahay RJ, MacMaster AM, Roper TJ (2008) The behavioural responses of Badgers (*Meles meles*) to exclusion from farm buildings using an electric fence. Appl Anim Behav Sci 113 (1-3): 224–235. doi:10.1016/j.applanim.2007.11.006.

Weber N, Bearhop S, Dall SRX, Delahay RJ, McDonald RA, Carter SP (2012) Denning behaviour of the European Badger (*Meles meles*) correlates with bovine tuberculosis infection status. Behav Ecol Sociobiol 67 (3): 471–479. doi:10.1007/s00265-012-1467-4.

White PC, Brown JA, Harris S (1993) Badgers (*Meles meles*), cattle and bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*): a hypothesis to explain the influence of habitat on the risk of disease transmission in Southwest England. Proc R Soc Lond B 253 (1338): 277–284. doi:10.1098/rspb.1993.0114.

Worton BJ (1995) Using Monte Carlo simulation to evaluate kernel-based home range estimators J Wildlife Manage 59 (4): 794–800. doi:10.2307/3801959.

Zanella G, Durand B, Hars J et al (2008) Tuberculosis in wildlife in France. J Wildl Dis 44:99-108.

Zuur AF, Ieno EN, Walker NJ, Saveliev AA, Smith GM (2009) Mixed Effect Models and Extentions in Ecology with R. Ed. Springer, New York.