

# TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DES ABBREVIATIONS .....</b>	17
<b>LISTE DES ILLUSTRATIONS .....</b>	19
<b>INTRODUCTION .....</b>	21
<b>1. PRESENTATION DE L'ELEPHANT.....</b>	<b>23</b>
1.1.    Classification .....	23
1.2.    Effectifs et répartition géographique.....	24
1.2.1.    Eléphants d'Afrique .....	24
1.2.2.    Eléphants d'Asie .....	25
1.3.    Principales caractéristiques .....	26
1.3.1.    Caractéristiques anatomiques et morphologiques .....	26
1.3.2.    Caractéristiques physiologiques .....	28
1.3.3.    Caractéristiques éthologiques.....	28
a.    Structure sociale .....	29
b.    Communication intraspécifique .....	29
c.    Comportement vis-à-vis de l'homme .....	29
1.4.    Importance de l'éléphant.....	30
1.4.1.    Importance économique .....	30
1.4.2.    Importance culturelle.....	30
1.4.3.    Importance biologique.....	31
1.5.    Les éléphants : des espèces en danger.....	31
1.5.1.    Menaces pour les éléphants .....	32
1.5.2.    Statut international .....	33
1.5.3.    Programmes de conservation .....	35
1.6.    L'éléphant en captivité .....	37
1.6.1.    Données historiques .....	37
1.6.2.    Effectifs en captivité.....	37
1.6.3.    Programmes d'élevage en parc zoologique.....	39
1.6.4.    Intérêts de l'élevage en captivité .....	40
1.6.5.    Difficultés liées à l'élevage d'éléphants en captivité .....	40

<b>2. LA TUBERCULOSE : UNE ZOONOSE D'IMPORTANCE CAPITALE .....</b>	<b>43</b>
2.1    Importance de la tuberculose en médecine humaine.....	43
2.1.1    Données générales cliniques sur la maladie chez l'homme .....	43
2.1.2    Incidences mondiale et régionale de la tuberculose .....	44
2.1.3    Plan de lutte contre la tuberculose.....	45
2.1.4    Importance de la tuberculose zoonose .....	47
2.2    Importance de la tuberculose en médecine vétérinaire .....	48
2.2.1    Importance de la tuberculose au sein des troupeaux domestiques .....	48
2.2.2    Importance de la tuberculose au sein de la faune sauvage autochtone .....	49
2.2.3    Importance de la tuberculose dans les parcs zoologiques .....	50
2.3    Importance de la tuberculose chez l'éléphant .....	52
2.4    Importance réglementaire de la tuberculose.....	54
2.4.1    Obligations réglementaires lors d'apparition d'un cas de tuberculose chez un éléphant.....	54
2.4.2    Conditions nécessaires à l'agrément sanitaire des institutions zoologiques ....	56
<b>3. ETUDE DE LA TUBERCULOSE CHEZ L'ELEPHANT .....</b>	<b>59</b>
3.1    Etiologie de l'infection tuberculeuse.....	59
3.1.1    Classification générale des mycobactéries .....	59
a.    Les mycobactéries pathogènes .....	60
b.    Les mycobactéries atypiques.....	62
3.1.2    Caractéristiques générales des bacilles tuberculeux.....	63
a.    Morphologie microscopique .....	63
b.    Propriétés tinctoriales .....	64
c.    Caractères culturaux .....	65
d.    Caractéristiques biochimiques et génétiques.....	65
e.    Sensibilités et résistances .....	66
3.1.3    Principales mycobactéries isolées chez l'éléphant .....	67
3.2    Pathogénie de l'infection tuberculeuse chez l'éléphant .....	69
3.2.1    Influence des conditions de l'infection .....	70
3.2.2    Etapes de l'infection.....	72
a.    Constitution du complexe primaire : la primo-infection .....	72
b.    Evolutions possibles du complexe primaire.....	73
c.    La tuberculose secondaire .....	75

3.2.3	Mécanismes immunitaires mis en jeu .....	76
a.	Une immunité à médiation cellulaire prédominante .....	77
b.	Une apparition tardive d'anticorps sériques antituberculeux .....	78
3.3	Epidémiologie de la tuberculose chez l'Eléphant .....	79
3.3.1	Epidémiologie descriptive .....	79
a.	Historique et répartition géographique des cas de tuberculose rapportés chez les éléphants .....	79
b.	Estimation de la prévalence .....	81
c.	Prédispositions vis-à-vis de la tuberculose .....	83
3.3.2	Epidémiologie analytique .....	84
a.	Sources de contagion .....	84
b.	Modalités de la contamination .....	85
c.	Facteurs de réceptivité .....	86
3.3.3	Epidémiologie synthétique .....	86
a.	Origine de l'infection .....	86
b.	Modalités d'évolution .....	87
3.4	Etude symptomatologique et lésionnelle de la tuberculose chez l'éléphant .....	89
3.4.1	Symptomatologie de la tuberculose chez l'éléphant .....	89
3.4.2	Tableau lésionnel lors de tuberculose chez l'éléphant .....	91
3.5	Outils diagnostiques disponibles lors de tuberculose chez l'éléphant .....	94
3.5.1	Diagnostic clinique et anatomo-pathologique .....	95
a.	Diagnostic <i>ante-mortem</i> .....	95
i.	Examen clinique et diagnostic différentiel .....	95
ii.	Examens complémentaires .....	96
b.	Diagnostic <i>post-mortem</i> .....	98
i.	Recherche de lésions macroscopiques à l'autopsie .....	99
ii.	Recherche de lésions microscopiques à l'histopathologie .....	100
3.5.2	Diagnostic expérimental .....	102
a.	Méthodes de diagnostic direct .....	103
i.	Matériel utilisé lors de diagnostic direct .....	103
ii.	Méthodes bactériologiques classiques .....	108
iii.	Méthodes basées sur la détection des acides nucléiques .....	113
b.	Méthodes de diagnostic indirect .....	123
i.	Recherche de témoins de l'immunité cellulaire .....	124

ii. Recherche de témoins de l'immunité humorale .....	129
c. Discussion sur les méthodes diagnostiques.....	143
i. Difficultés d'interprétation des tests diagnostiques .....	144
ii. Des outils nombreux et variés : tests complémentaires ou répétitifs ?.....	145
iii. Recherche et avenir .....	147
3.6 Mesures prophylactiques contre la tuberculose de l'éléphant.....	149
3.6.1 Mesures de prophylaxie défensive .....	149
a. Maitrise du risque « introduction » .....	150
b. Maitrise du risque « résurgence ».....	151
c. Maitrise du risque « voisinage » .....	152
d. Maitrise du risque « Humain ».....	152
3.6.2 Mesures de prophylaxie offensive.....	154
a. Mesures de limitation immédiates.....	154
b. Estimation de l'impact du foyer tuberculeux .....	155
c. Désinfection de l'environnement .....	156
d. Enquête épidémiologique .....	157
e. Mesures d'assainissement .....	158
3.7 Outils thérapeutiques disponibles pour le traitement d'un éléphant tuberculeux ..	159
3.7.1 Principe général et recommandations lors de la mise en place d'un traitement antituberculeux chez l'éléphant.....	159
a. Principe général d'un traitement antituberculeux .....	160
b. Animaux candidats au traitement .....	161
c. Principaux antituberculeux disponibles .....	162
d. Données pharmacologiques sur les principaux antituberculeux .....	164
e. Schéma thérapeutique recommandé [128] .....	168
i. Choix des molécules.....	168
ii. Posologies des médicaments .....	169
iii. Fréquence d'administration.....	171
iv. Durée du traitement .....	171
v. Voies d'administration possibles .....	171
f. Efficacité des traitements chez l'éléphant .....	172
i. Efficacité réelle .....	172
ii. Indicateurs <i>ante-mortem</i> de l'efficacité du traitement .....	173
iii. Recommandations pour le suivi de l'efficacité d'un traitement.....	176

3.7.2	Difficultés et risques liés à la mise en place d'une thérapie.....	177
a.	Difficultés pratiques rencontrées lors d'un traitement .....	177
i.	Difficultés liées à l'isolement des animaux.....	178
ii.	Difficultés liées à l'administration des médicaments.....	178
iii.	Coût des molécules.....	179
iv.	Disponibilité des molécules .....	180
v.	Investissement humain .....	180
b.	Risques pour l'animal : l'existence d'effets secondaires .....	181
i.	Effets secondaires décrits chez l'homme .....	181
ii.	Effets secondaires décrits chez l'éléphant.....	182
iii.	Conséquences sur le suivi médical d'un éléphant sous traitement.....	184
c.	Risques pour les autres animaux et pour l'homme .....	185
i.	Sélection de souches résistantes aux antituberculeux .....	185
ii.	Risque de transmission à l'homme.....	187
d.	Recherche et avenir dans le domaine thérapeutique .....	189
<b>4.</b>	<b>DESCRIPTION D'UN CAS PRATIQUE AU SAFARI DE PEAUGRES .....</b>	<b>191</b>
4.1	D'un groupe d'éléphants en bonne santé à un groupe suspect de tuberculose.....	191
4.1.1	Description du troupeau .....	191
4.1.2	Survenue de l'infection .....	194
4.2	De la suspicion de l'infection à la décision d'euthanasie.....	195
4.2.1	Description des mesures immédiates mises en place .....	195
a.	Confirmation du statut infectieux de Myntrick .....	195
b.	Mesures visant à limiter la dissémination du bacille.....	196
c.	Alerte de la Direction des Services Vétérinaires.....	197
4.2.2	La décision d'euthanasier .....	198
a.	Les raisons de ce choix.....	198
b.	Difficultés logistiques rencontrées lors de l'autopsie .....	199
4.3	De l'autopsie aux levées des dernières restrictions .....	200
4.3.1	Conséquences suite à la confirmation de tuberculose .....	200
4.3.2	Conséquences à moyen et long termes.....	202
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>203</b>	
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>205</b>	

<b>ANNEXES .....</b>	219
<b>Annexe A : Protocole d'autopsie chez l'éléphant .....</b>	221
<b>Annexe B : Laboratoires de référence .....</b>	224
<b>Annexe C : Technique de lavage de trompe .....</b>	226
<b>Annexe D : Mode d'emploi du test ElephantTB StatPak® .....</b>	227
<b>Annexe E : Bon de commande européen ElephantTB StatPak®.....</b>	231
<b>Annexe F : Protocole de quarantaine chez l'éléphant .....</b>	232

## LISTE DES ABBREVIATIONS

- AAZA ou AZA** : Association of Zoos and Aquariums
- A.A.R.** : Acido-Alcoolo-Résistance
- ADN** : Acide Désoxy-Ribo-Nucléique
- ARN** : Acide Ribo-Nucléique
- ARNr** : Acide Ribo-Nucléique ribosomal
- ASAT** : Aspartate Amino-Transférase
- B.Tb.T** : Blood Tuberculosis Test
- EAZA** : European Association of Zoos and Aquaria
- BCG** : Bacille de Calmette et Guérin
- CG** : Cytosine Guanine
- CITES** : Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora
- DDASS** : Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales
- DGAL** : Direction Générale de l'Alimentation
- DOTS** : Directly Observed Therapy, Short course treatment
- DR** : Direct Repeat
- DSV** : Direction des Services Vétérinaires
- EAZA** : European Association of Zoos and Aquaria
- EDTA** : Acide Ethylène Diamine Tétra-acétique
- EEP** : Europäisches Erhaltungszucht Programm ou European Endangered Species Program
- ELISA** : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
- EMB** : Ethambutol
- FDA** : US Food and Drug Administration
- FIV** : Feline Immunodeficiency Virus
- F.P.A.** : Fluorescent Polarisation Assay
- GGT** : Gamma Glutamyl Transpeptidase
- H.P.A.** : Hybridization Protection Assay
- H.S.R.** : HyperSensibilité Retardée
- IFN  $\gamma$**  : Interféron Gamma
- INH** : Isoniazide
- IUCN** : International Union for the Conservation of Nature and natural resources
- L.C.S.** : Liquide Cérébro-Spinal

**LDH** : Lactate DesHydrogénase

**L.T.** : test de Transformation des Lymphocytes

**MAPIA** : MultiAntigen Print ImmunoAssay

**MDR-TB** : Multi Drug Resistant Tuberculosis

**MTD** : « GenProbe®-Amplified™ *Mycobacterium Tuberculosis* Direct Test »

**NVSL** : National Veterinary Services Laboratories

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**P.C.R.** : Réaction de polymérisation en chaîne

**PZA** : Pyrazinamide

**R.F.L.P.** : Restriction Fragment Length Polymorphism

**RIF** : Rifampicine

**RT** : Rapid Test (ElephantTB STAT-PAK®)

**SIDA** : Syndrome d'Immuno-Déficience Acquise

**SSP** : Species Survival Plan

**TCH** : Acide ThiophènediCarboxylique

**T.M.A.** : Transcription Mediated Assay

**TNF $\alpha$**  : Tumour Necrosis Factor alpha

**UFC** : Unité Formant Colonie

**USDA** : United States Department of Agriculture

**UV** : Ultra Violet

**VIH** : Virus de l'Immunodéficience Humaine

**WBC** : White Blood Cell

**WCS** : Whole Cell Sonicate

**WWF** : World Wide Fund for nature

**XDR-TB** : Extensively Drug Resistant Tuberculosis

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

<b>Figure 1</b> : Répartition géographique des éléphants d'Afrique en 2002 .....	24
<b>Figure 2</b> : Répartitions géographiques passée et actuelle de l'éléphant d'Asie .....	25
<b>Figure 3</b> : Mensurations (taille/poids) des différentes espèces d'éléphants à l'âge adulte.....	26
<b>Figure 4</b> : Principales différences morphologiques entre les éléphants d'Afrique et l'éléphant d'Asie.....	27
<b>Figure 5</b> : Eléphant d'Afrique et Eléphant d'Asie : des morphologies différentes .....	27
<b>Figure 6</b> : <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (microscopie électronique).....	64
<b>Figure 7</b> : Espèces mycobactériennes identifiées chez l'éléphant lors d'isolement par culture entre 1994 et 2005 .....	68
<b>Figure 8</b> : Granulome tuberculeux à nécrose caséuse centrale .....	92
<b>Figure 9</b> : Section d'un abcès pulmonaire caséux. ....	92
<b>Figure 10</b> : Analyseur d'échantillon de souffle .....	98
<b>Figure 11</b> : Description de la technique du lavage de trompe en six étapes .....	105
<b>Figure 12</b> : Principe de réalisation d'un test MAPIA .....	135
<b>Figure 13</b> : Test ElephantTB StatPak® .....	136
<b>Figure 14</b> : Performances du MAPIA et de l'Elephant TB StatPak® dans le sérodiagnostic de la tuberculose chez l'éléphant .....	138
<b>Figure 15</b> : Sensibilités de 34 souches de <i>M. tuberculosis</i> (33) et <i>M. bovis</i> (1) isolées chez l'éléphant vis-à-vis des principaux antituberculeux .....	185
<b>Figure 16</b> : Plan des enclos extérieur et intérieur des éléphants (Peaugres, déc 2004) .....	193
<b>Figure 17</b> : Plan des enclos avoisinant le parc des éléphants (Peaugres, déc 2004) .....	201



# INTRODUCTION

A l'heure où le VIH, le cancer et les maladies cardio-vasculaires font la une des journaux médicaux à travers le monde, la tuberculose fait figure de maladie oubliée... Pourtant, à l'échelle mondiale, elle demeure un problème majeur de santé publique chez l'homme et reste la première cause de mortalité d'origine infectieuse, avec le SIDA. C'est une maladie bactérienne complexe, causée par différents bacilles de la famille des Mycobactéries, et commune à l'homme et à l'animal.

La tuberculose est également d'une importance capitale en médecine vétérinaire. D'une part, c'est une maladie contagieuse mortelle, pouvant toucher l'ensemble des espèces de Vertébrés ; d'autre part, c'est une zoonose très grave qui fait l'objet de mesures strictes de prophylaxie sanitaire pour les espèces domestiques. Pour ces raisons, les maladies mycobactériennes ont toujours été une préoccupation majeure dans les parcs zoologiques.

Les éléphants d'Afrique (*Loxodonta africana*, *Loxodonta cyclotis*) et d'Asie (*Elephas maximus*) sont des espèces menacées dans leur habitat naturel. Bien que leur élevage soit très difficile, la domestication de cette espèce remonte à des millénaires et leur présence dans les parcs zoologiques occidentaux à deux siècles environ.

La tuberculose chez l'éléphant a été décrite pour la première fois il y a plus de 2000 ans et a fait l'objet de dizaines de publications au XXème siècle : l'ensemble des cas décrits concerne des individus captifs et aucun ne mentionne la présence de l'affection en milieu naturel. L'année 1996 est souvent considérée comme une date clé avec la découverte de nombreux éléphants infectés aux Etats-Unis et en Europe et la prise de conscience du potentiel zoonotique de la maladie. En effet, la mycobactérie la plus souvent impliquée lors de tuberculose chez l'éléphant est *Mycobacterium tuberculosis* qui est l'agent responsable de la maladie chez l'homme. Depuis, la tuberculose chez les Proboscidiens suscite l'intérêt de nombreux biologistes et d'importantes investigations ont été menées afin de préciser la pathogénie de l'infection et de mettre au point des outils diagnostiques et thérapeutiques performants chez cette espèce.

Ainsi, le véritable enjeu de la tuberculose chez l'éléphant est double : d'une part, elle concerne une espèce emblématique et menacée et d'autre part, il s'agit d'une maladie dangereuse pour l'ensemble des animaux d'un parc, pour le personnel et pour le public.

Ce travail rassemble les données récentes concernant l'épidémiologie, la pathogénie et la symptomatologie de la tuberculose chez l'éléphant, ainsi que les outils diagnostiques et thérapeutiques disponibles chez cette espèce. Cette synthèse bibliographique est précédée d'une présentation succincte des éléphants et d'un rappel sur l'importance de la tuberculose humaine et animale. Les difficultés pratiques de la gestion de la maladie en parc zoologique sont évoquées dans une quatrième partie, en s'appuyant sur la description d'un cas apparu sur un éléphant d'Afrique au Safari Parc de Peaugres (Ardèche, France) en décembre 2004.

# **1. PRESENTATION DE L'ELEPHANT**

## **1.1. Classification [105, 114]**

**Règne** : *Animalia*

**Embranchement** : *Chordata*

**Sous-Embranchement** : *Vertebrata*

**Classe** : *Mammalia*

**Sous-classe** : *Theria*

**Infra-classe** : *Eutheria*

**Ordre** : *Proboscidea*

**Famille** : *Elephantidae*

Seules 3 espèces de l'ordre des Proboscidiens existent encore à ce jour :

- l'éléphant d'Afrique de forêt (*Loxodonta cyclotis*)
- l'éléphant d'Afrique de savane (*Loxodonta africana*)
- l'éléphant d'Asie (*Elephas maximus*), dont on distingue souvent trois ou quatre sous espèces :
  - o l'éléphant d'Asie de Sumatra (*Elephas maximus sumatranus*)
  - o l'éléphant d'Asie de Bornéo (*Elephas maximus borneensis*)
  - o l'éléphant d'Asie continentale (*Elephas maximus indicus*)
  - o l'éléphant d'Asie de Sri Lanka (*Elephas maximus maximus*)

**Remarque** : Le nombre de sous espèces d'éléphant d'Asie est controversé : la distinction de sous-espèces est actuellement basée sur des aires de répartition différentes.

Ces trois espèces se distinguent par un biotope différent et quelques différences morphologiques. Cependant, le comportement et la physiologie des trois espèces sont très similaires.

## **1.2. Effectifs et répartition géographique**

Les populations d'éléphants sauvages sont difficiles à chiffrer en pratique, tant en Afrique qu'en Asie. Les estimations sont souvent contestées et de grandes différences existent selon les sources.

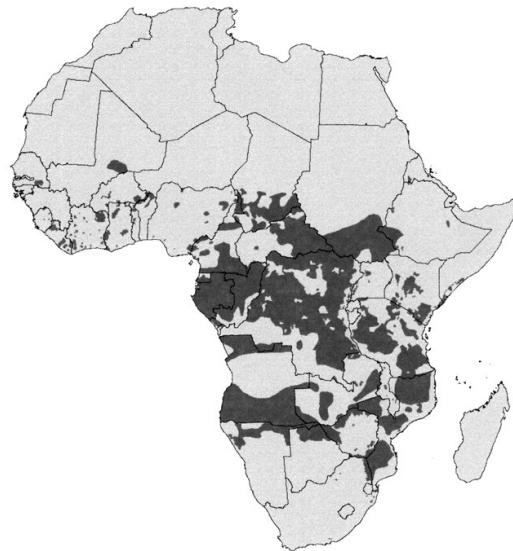
### **1.2.1. Eléphants d'Afrique**

#### **a. Effectifs**

L'IUCN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature) estimait à 1,3 millions le nombre d'éléphants présents en Afrique en 1979 [23]. Les estimations de 2007 oscillent entre 470 000 et 690 000 [7], dont approximativement deux tiers d'éléphants de savane et un tiers d'éléphants de forêt. Cet effectif est globalement stable depuis 1989, date de l'interdiction du commerce de l'ivoire.

#### **b. Répartition**

Les éléphants d'Afrique sont présents dans 37 états d'Afrique sub-saharienne, comme l'illustre la carte de répartition ci-dessous.



**Figure 1 : Répartition géographique des éléphants d'Afrique en 2002 [105, 118]**

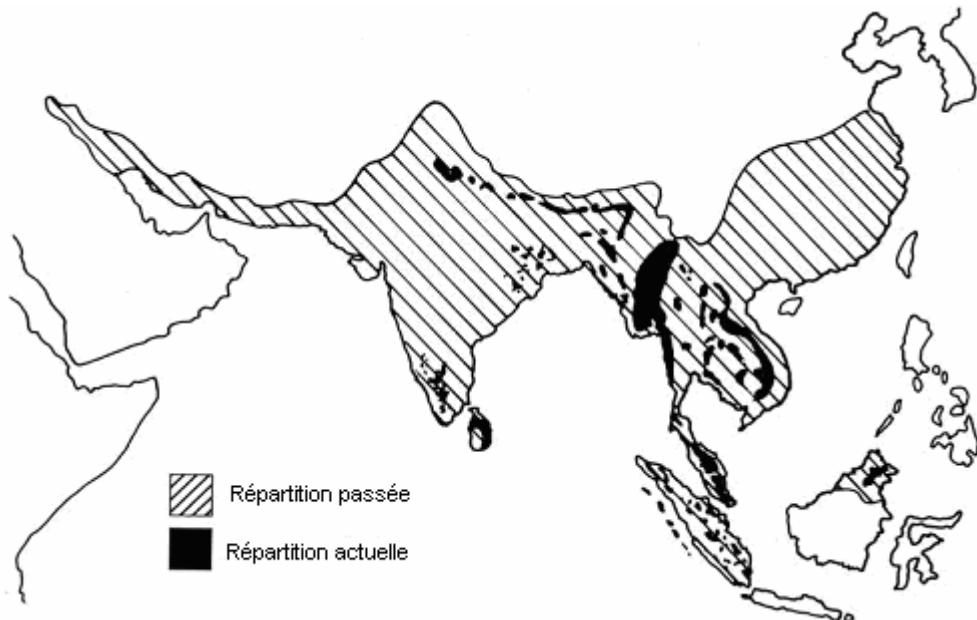
## **1.2.2. Eléphants d'Asie**

### **a. Effectifs**

Les données sur les populations d'éléphants d'Asie sont encore plus sujettes à controverse qu'en Afrique. Toutefois, on estime que plus de 100 000 éléphants étaient présents en Asie au début du siècle (Chadwick, 1991)[76] et qu'entre 35 000 et 50 000 spécimens sauvages vivaient sur le territoire asiatique en 2005 [61, 76], dont environ 18 000 en Inde. Il faut ajouter à cela environ 15 000 éléphants asiatiques domestiqués [95].

### **b. Répartition**

L'éléphant d'Asie est actuellement présent dans 13 états d'Asie à l'état sauvage. Réparties dans toute l'Asie du Sud au début du siècle, les populations actuelles se résument à de petits groupes épars, ce qui a donné lieu à la distinction de plusieurs sous-espèces.



**Figure 2 : Répartitions géographiques passée et actuelle de l'éléphant d'Asie [112, 118]**

### **1.3. Principales caractéristiques**

Seules sont énumérées dans ce paragraphe quelques caractéristiques très générales pouvant être utiles à une meilleure compréhension de la suite de l'exposé.

#### **1.3.1. Caractéristiques anatomiques et morphologiques**

##### **a. Mensurations**

L'éléphant est actuellement l'animal terrestre le plus lourd de la planète : un mâle africain peut atteindre 4 mètres et peser 7 tonnes ! L'éléphant continue de grandir tout au long de sa vie, même si la croissance est ralentie à partir de 25 ans, surtout chez les femelles.

Les poids et les tailles sont cependant très variables selon l'individu et diffèrent globalement selon l'espèce. Les moyennes des poids et des tailles sont données à titre indicatif chez les trois espèces d'éléphants dans le tableau ci-dessous.

		<i>L. africana</i>	<i>L. cyclotis</i>	<i>E. maximus</i>
Poids (en kg)	Mâle	4000-7000	2800-4000	3500-5500
	Femelle	2500-3500	1800-2500	2300-3700
Taille au garrot (en m)	Mâle	2,7-3,5	2,5-3,2	2,4-2,9
	Femelle	2,3-2,7	2,1-2,5	2,1-2,4

**Figure 3 : Mensurations (taille/poids) des différentes espèces d'éléphants à l'âge adulte**

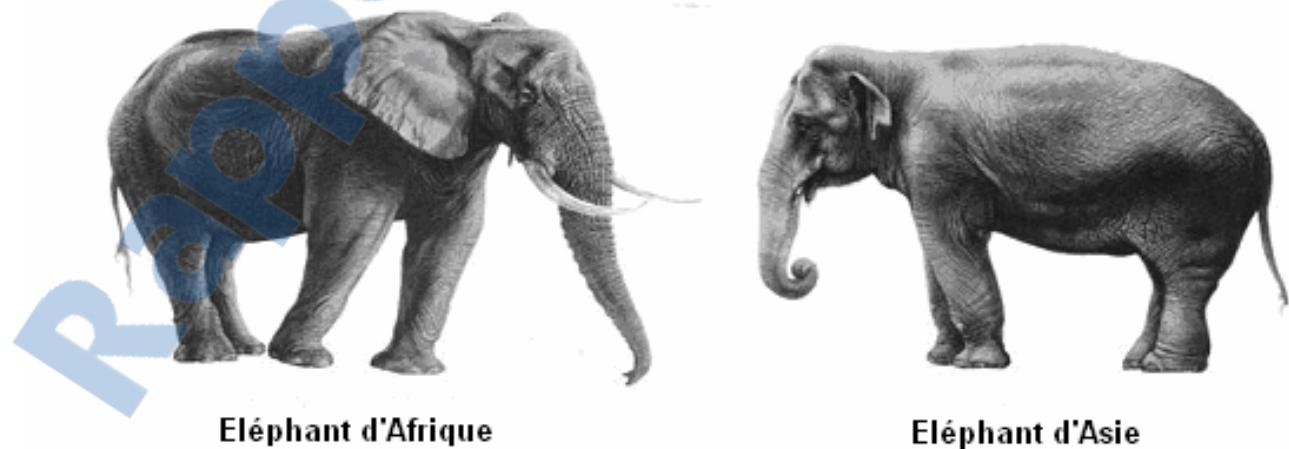
b. Quelques différences morphologiques selon l'espèce

i. Différences entre les éléphants d'Afrique et l'éléphant d'Asie

L'éléphant d'Asie se distingue des éléphants d'Afrique par certaines particularités morphologiques, dont la plupart sont énumérées dans le tableau ci-dessous.

	Eléphant d'Asie	Eléphants d'Afrique
Oreilles	Petites	Grandes
Trompe	à un doigt	à deux doigts
Point culminant	Front	Garrot
Défenses	absentes ou petites	plus grandes
Ligne du dos	Convexe	concave
Ligne de l'abdomen	point d'inflexion au centre	pente descendante des antérieurs aux postérieurs

**Figure 4 : Principales différences morphologiques entre les éléphants d'Afrique et l'éléphant d'Asie**



**Figure 5 : Eléphant d'Afrique et Eléphant d'Asie : des morphologies différentes [118]**

## ii. Différences entre les deux espèces d'éléphant d'Afrique

Les éléphants d'Afrique de forêt et de savane se distinguent également morphologiquement. Outre le fait que *Loxodonta cyclotis* soit plus petit que *Loxodonta africana*, d'autres différences morphologiques entre ces deux espèces existent mais sont plus subtiles : la forme des défenses et des oreilles, la couleur de la peau et le nombre d'ongles en sont les principaux exemples.

Remarque : Au sein des différentes sous-espèces d'éléphants d'Asie, les différences morphologiques sont trop minimes pour être réellement considérées comme des signes distinctifs.

### **1.3.2. Caractéristiques physiologiques**

Quelques caractéristiques physiologiques très générales pouvant être utiles à la compréhension de la suite de l'exposé sont indiquées ci-dessous :

- L'éléphant est un herbivore non ruminant, consommant environ 200 kg de nourriture et 100 litres d'eau par jour. L'efficacité de son système digestif est relative : une grande partie des aliments n'est pas absorbée.
- Sa longévité en milieu naturel est estimée à 50-60 ans pour les éléphants d'Afrique et à 60-70 ans pour l'éléphant d'Asie. Elle est un peu plus faible en captivité.
- Les femelles donnent naissance en moyenne à 8 petits (un seul éléphanteau par portée) tout au long de leur vie. La durée de gestation est de 21,5 mois, et l'intervalle entre deux naissances de 4 ans environ. Ces chiffres ne se retrouvent pas du tout en captivité où le succès de la reproduction est beaucoup plus faible (cf § 1.6.5.).
- L'éléphant est un pachyderme : sa peau est épaisse (de quelques millimètres au niveau des oreilles à plus de 3 cm dans certaines régions du corps).
- Sa température corporelle moyenne est de 36,6°C.

### **1.3.3. Caractéristiques éthologiques**

Certaines caractéristiques éthologiques, telles qu'une cohésion sociale forte au sein du groupe, l'existence d'une communication étroite entre les éléphants ou l'établissement de liens privilégiés ou non avec l'homme, peuvent avoir des conséquences indirectes sur la gestion d'un cas de tuberculose en parc zoologique.

### **a. Structure sociale**

L'éléphant est un animal social, peu territorial, où les liens familiaux et l'entraide entre individus sont des points importants. Les membres d'un même groupe sont rarement distants de plus de 20 mètres les uns des autres et sont très souvent en contact physique.

L'éléphant d'Afrique vit en hordes de 5 à 30 individus au sein d'une société matriarcale, composée des femelles, des jeunes et des mâles immatures. Les mâles adultes sont souvent solitaires. Les groupes asiatiques sont généralement plus petits mais la structure sociale est globalement la même.

### **b. Communication intraspécifique**

Les moyens de communication sont nombreux chez l'éléphant (barrissemens, ultrasons et phéromones en sont les principaux exemples). La communication tactile est notamment importante : les entrelacements de trompes lors de jeux ou de salutation, les poussées tête à tête lors des combats, les contacts étroits mère-enfant font partie du répertoire comportemental de base. La transmission d'agents infectieux entre les individus est ainsi facilitée par ces contacts étroits.

### **c. Comportement vis-à-vis de l'homme**

L'éléphant est un animal intelligent : il fait partie des quelques mammifères étant aptes à réussir le test du miroir de Gallup (reconnaissance de son image), d'utiliser des outils et de mémoriser des ordres. Cela en fait un animal curieux et peu craintif envers l'homme, dont voici les principales conséquences en milieu captif et non captif :

- Dans son milieu naturel, il ne constitue réellement un danger pour l'homme que dans des zones où la cohabitation est très étroite. Il est toutefois responsable de dizaines de morts humaines chaque année en Afrique et en Asie, ce qui est à l'origine de conflits délicats à résoudre [46, 48, 126].
- En captivité, le comportement des individus captifs vis-à-vis de l'homme est assez contradictoire. D'une part, les éléphants sont les animaux qui provoquent le plus d'accidents graves (voire mortels) en parcs zoologiques chaque année. D'autre part, il est indéniable qu'il se crée une complicité éléphant/homme au cours d'exercices

quotidiens de dressage (cirque) ou d'entraînement médical (parc zoologique). Un lien affectif se crée, ce qui complique parfois la prise de décisions médicales, telle que l'euthanasie par exemple.

## **1.4. Importance de l'éléphant**

L'éléphant est une espèce aux multiples facettes : incarnant de nombreux symboles culturels, il revêt également une importance économique non négligeable dans certaines régions du monde et demeure une espèce clé du point de vue de la biodiversité.

### **1.4.1. Importance économique**

L'éléphant est domestiqué en Asie depuis plusieurs millénaires et sa puissance a été mise à profit dans de nombreuses entreprises. Aujourd'hui, il est encore utilisé en Afrique comme en Asie pour la réalisation de travaux agricoles (chantiers forestiers essentiellement) et est devenu depuis peu une attraction touristique (safari à dos d'éléphant). Ces activités ont un impact économique et social non négligeable sur les populations locales.

### **1.4.2. Importance culturelle**

Peu d'autres animaux peuvent s'enorgueillir d'incarner autant de symboles que l'éléphant dans l'esprit des hommes. Il symbolise notamment la sagesse, le respect, la mémoire, la puissance ou encore la longévité.

L'image de l'éléphant est présente dans des domaines culturels très variés, tels que :

- la religion et la mythologie : l'éléphant est le symbole du baptême pour les chrétiens, de la connaissance pour les hindouistes, de l'incarnation de Bouddha (éléphant blanc) pour les bouddhistes. Il est également omniprésent dans les légendes orientales et africaines.
- l'histoire : l'exemple des éléphants d'Hannibal, véritables machines de guerre et symboles de puissance, illustre bien l'importance historique qu'ont parfois revêtu ces animaux.

- l'art : l'éléphant est très représenté dans l'art oriental et africain, ce qui a parfois eu des effets néfastes comme l'utilisation massive d'ivoire à des fins artistiques.
- le folklore : l'éléphant est une espèce clé dans de nombreux rites traditionnels africains, tantôt symbolisant le chef ou le père et tantôt symbolisant au contraire le danger ou l'affront. En Asie, il incarne la richesse et la gloire de l'Etat lors des parades.
- la culture populaire : du personnage fictif (Babar, Dumbo) à l'emblème politique (parti républicain américain), l'éléphant est dans tous les esprits.

### **1.4.3. Importance biologique**

Outre leur importance en termes de biodiversité, les éléphants ont un impact très fort sur leur environnement [113]. Ils participent notamment :

- à la dispersion de graines par les bouses,
- à la survie de certains insectes (les termites survivent dans les bouses par exemple),
- à la transformation des forêts en prairies,
- au forage de puits lors de sécheresse,
- au creusement de grottes,
- au délogement de petites proies lorsqu'ils marchent,
- à l'équilibre de la chaîne alimentaire, lorsqu'ils meurent.

Ainsi la survie de nombreuses espèces dépendent en partie de la présence ou de l'absence de l'éléphant dans son milieu naturel : l'éléphant est une espèce clé dans son écosystème, dont l'extinction aurait des conséquences importantes sur un ensemble d'espèces animales et végétales.

## **1.5. Les éléphants : des espèces en danger**

Si chacun a à l'esprit les massacres d'éléphants africains pour le braconnage de l'ivoire, les menaces pesant sur cette espèce sont en réalité plurifactorielles et plus complexes. De nombreuses mesures sont mises en place pour protéger les populations dans leur milieu naturel.

### **1.5.1. Menaces pour les éléphants**

Seuls les grands félins constituent des prédateurs occasionnels pour les éléphants. Les menaces proviennent donc quasi-exclusivement de l'homme, d'une manière directe (braconnage) ou indirecte (destruction de l'habitat).

Ainsi, les deux principales menaces à la survie de l'espèce sont schématiquement :

- La destruction de l'habitat naturel, qui entraîne :
  - Une réduction des effectifs d'éléphants, due au manque d'espace et de nourriture.
  - Un morcellement des populations en petits groupes épars.
  - Une proximité hommes-éléphants génératrice de conflits [92]: les éléphants tueurs d'hommes et dévastateurs de culture inspirent la crainte et la haine dans les populations locales. En Asie, rien qu'au nord du Bengale, on compte une cinquantaine de victimes humaines chaque année, auxquelles s'ajoutent environ 4 000 hectares de cultures détruites, et 1 200 maisons dévastées [97]. Ceci entraîne la colère des habitants qui, en réaction, tuent ou blessent des éléphants. Par ailleurs, ces rapports conflictuels constituent un frein à la mise en place des mesures de conservation de ces espèces [4].
- Le braconnage :
  - Pour l'ivoire essentiellement : l'ivoire aura été la principale cause de mortalité chez l'éléphant d'Afrique jusqu'en 1989. Environ 8 éléphants auraient été tués chaque heure entre 1979 et 1989, uniquement pour l'ivoire ! Le commerce illégal d'ivoire se poursuit toutefois à bas bruit, il est en recrudescence actuellement car le prix de cette matière a quadruplé ces deux dernières années. Par ailleurs, cette chasse intensive a provoqué un déséquilibre du sex-ratio, étant donné que les mâles, ayant des défenses beaucoup plus grandes, étaient les cibles privilégiées.
  - Pour la viande, la peau et les os, utilisés lors de rites traditionnels africains et surtout revendus au marché noir, pour la médecine chinoise essentiellement.
  - Pour la capture en vue de la domestication, essentiellement en Asie. Le prix d'achat d'un éléphant captif a récemment doublé en l'espace d'un an en Inde, suite à l'interdiction légale de capturer des spécimens sauvages, ce qui provoque actuellement une recrudescence de captures illégales souvent cruelles. A l'inverse de

ce qui se passe en Afrique pour l'ivoire, ce sont les femelles asiatiques, plus dociles, qui sont les principales cibles de ce type de braconnage.

Ainsi, on assiste d'une part à une diminution des effectifs globaux et d'autre part, à un appauvrissement génétique des populations et donc à une fragilisation des espèces. En effet, le morcellement des populations sauvages et le déséquilibre des sex ratio au sein de ces populations induit par le braconnage sélectif sont des facteurs qui participent à l'augmentation de la consanguinité et donc à la diminution de la diversité génétique au sein de l'espèce.

Le déclin progressif des populations d'éléphants a conduit les organisations internationales à adopter des mesures globales de protection, notamment quant à la régulation du commerce lié à ces espèces.

### **1.5.2. Statut international**

La convention de Washington ou CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of wild fauna and flora*) régule le commerce international des espèces de la faune et de la flore sauvages menacées d'extinction. Son but est de veiller à ce que la mise en circulation de ces espèces (et de leurs dérivés) ne constitue pas une menace à leur survie.

L'IUCN (*International Union for the Conservation of Nature*) est une organisation internationale non gouvernementale œuvrant pour la conservation de la biodiversité. Pour chaque espèce évaluée, une estimation du danger d'extinction qui la menace est formulée par des groupes d'experts : cette estimation est basée sur des critères bien définis, comme la taille de la population, la disparition de son habitat naturel et le nombre d'individus qui ont atteint la maturité sexuelle. La liste rouge de l'IUCN constitue ainsi l'inventaire mondial le plus complet de l'état de conservation globale des espèces végétales et animales. Les espèces sont classées selon neuf catégories, dont trois correspondent à des espèces menacées d'extinction : les espèces en danger critique d'extinction (CR), en danger d'extinction (EN) et vulnérables (VU).

Les éléphants d'Afrique sont classés en :

- Annexe I de la CITES depuis le 18/01/1990 ou en annexe II (pour le Botswana, la Namibie, l'Afrique du Sud et le Zimbabwe) depuis le 13/02/2003 : le commerce de

l'ivoire et l'abattage de spécimens sont interdits (annexe I) ou très réglementés (annexe II) [15].

- Espèce vulnérable (VU A2a) selon l'IUCN (depuis 2004) [51].

Les éléphants d'Asie sont classés en :

- Annexe I de la CITES depuis le 01/07/1975 [15].
- Espèce en danger d'extinction (EN A1cd) selon l'IUCN (depuis 1996) [51].

Des lois nationales viennent également se greffer sur ces textes pour préciser certains points. L'interdiction de capturer un éléphant sauvage en vue de le domestiquer est, par exemple, régie par une loi nationale en Inde.

*Remarque :* Ces classifications ont des conséquences pratiques directes lors de mouvements d'animaux (notamment lors d'échanges entre institutions) mais également lors d'envoi de prélèvements au laboratoire par exemple. L'éléphant étant une espèce inscrite en annexe I de la CITES, la mise en circulation de cette espèce ou de tout échantillon issu de cette espèce est soumise à une réglementation très stricte et contraignante. L'ensemble des documents exigés par la convention CITES doit être complété et doit constamment accompagner les prélèvements, sous peine de renvoi voire de destruction des échantillons (notamment lors des passages des frontières). Bien que ces démarches soient communes à de nombreuses espèces, elles restent cependant lourdes pour les vétérinaires de parcs zoologiques. Cette convention s'applique, en théorie, quelle que soit la nature de l'échantillon et quelle que soit la distance parcourue. En pratique, les échanges sont tout de même facilités lorsqu'ils ont lieu au sein d'un même pays, comparativement aux échanges intracommunautaires et surtout aux échanges internationaux (outre atlantiques notamment). En France par exemple, il existe une dérogation simplifiant la circulation d'échantillons issus d'une espèce classée en annexe I de la CITES lorsque les analyses sont faites à l'intérieur même du territoire français.

Ces statuts de protection internationale constituent la pierre angulaire des mesures de sauvegarde des éléphants, auxquels s'ajoutent des programmes de conservation très variés.

### **1.5.3. Programmes de conservation**

#### **a. Intérêts de la conservation**

Comme il l'a déjà été évoqué (§ 1.4.3), la préservation de l'éléphant dans son environnement naturel est primordiale pour l'équilibre de l'écosystème local et pour la conservation de la biodiversité. L'extinction de cette espèce aurait, par ailleurs, un impact économique et social très fort : le plus gros des « *Big Five* » (buffle, rhinocéros, éléphant, léopard, lion) attire en effet aujourd'hui de nombreux visiteurs dans des régions où le tourisme est l'une des principales ressources monétaires. De plus, la disparition d'un animal empreint d'autant de symboles et encore très présent dans la culture populaire, engendrerait un choc psychologique indéniable.

Cependant, malgré la nécessité aujourd'hui évidente de protéger de telles espèces, de nombreuses difficultés sont encore rencontrées lors de l'élaboration puis de la mise en place de projets de conservation des éléphants.

#### **b. Difficultés rencontrées**

Les programmes de conservation de l'éléphant sont particulièrement difficiles à mettre en place en raison :

- des situations politique et économique souvent peu stables des pays concernés.
- de la réticence des populations locales à sauvegarder une espèce qui leur semble nuisible (nombreux conflits hommes/éléphant, cf §.1.5.1., [4]).
- de la nécessité d'intégrer ces actions dans de vastes programmes de développement durable où les intérêts communs des hommes et des animaux sont pris en compte.
- de l'ampleur de tels projets, qui nécessitent des fonds monétaires très importants.

De nombreuses organisations (gouvernementales ou non) tentent de surmonter ces difficultés et sont impliquées dans des actions variées de conservation de l'éléphant.

### c. Acteurs des programmes de conservation

Bien que souvent les actions menées *in situ* et *ex situ* soient interdépendantes, il est fréquent de distinguer en théorie ces deux types d'action :

- Les programmes de conservation mis en place sur le terrain (*in situ*) sont fréquemment coordonnés par des institutions œuvrant pour la conservation de la nature d'une manière générale (IUCN, WWF) ou par des organismes spécialisés dans la sauvegarde des éléphants (*Elephant Conservation, Elephant Care International* en sont quelques exemples). Les actions peuvent être très larges, comme l'illustre le plan global de sauvegarde de l'éléphant d'Afrique pour la période 2007-2011, mis au point par WWF [117], ou plus ciblées : citons pour exemple les actions menées par *Elephant Care International* sur la tuberculose des éléphants en Asie [40].
- Les principaux acteurs de la conservation *ex situ* sont les institutions zoologiques, qui mènent des actions de recherche sur les individus captifs ainsi que des campagnes d'éducation du public. Ces programmes sont souvent coordonnés à l'échelle régionale (EAZA en Europe, AZA en Amérique du Nord)

Ces deux types d'action sont souvent complémentaires, l'exemple de la tuberculose chez l'éléphant illustre parfaitement cette interdépendance : la recherche en parc zoologique a permis la mise au point de techniques diagnostiques fiables et pratiques (tests sérologiques), qui peuvent à présent être utilisées sur le terrain en Asie [76].

Ainsi l'élevage d'éléphants en captivité s'inscrit aujourd'hui comme l'une des mesures participant à la sauvegarde de l'espèce.

## **1.6. L'éléphant en captivité**

Après avoir exposé quelques données générales sur l'origine et le nombre d'éléphants captifs, l'intérêt des programmes d'élevage en parc zoologique est détaillé, ainsi que les principales difficultés rencontrées par ces institutions.

### **1.6.1. Données historiques**

Les premiers éléphants d'Asie ont été importés à la fin du XVIIIème aux Etats-Unis et en Europe. Il faut attendre le courant du XIXème siècle pour voir des éléphants d'Afrique dans les parcs zoologiques et les cirques occidentaux (en 1824 pour les USA et en 1862 pour l'Europe). Selon les registres EEP, 83 % des éléphants d'Afrique et 60 % des éléphants d'Asie, qui sont actuellement en captivité, ont été prélevés dans la nature [16].

La détention d'éléphants dans des institutions zoologiques fait l'objet de nombreux débats depuis des décennies, notamment en raison de la taille imposante des individus comparativement à l'espace qui leur est souvent dédié. De nos jours, les parcs zoologiques présentant des éléphants s'exposent ainsi à de nombreuses critiques et controverses. Les conditions de captivité ont souvent été dénoncées mais de grands progrès ont été faits (et imposés) dans la plupart des parcs zoologiques occidentaux ces dernières années. Les enclos sont à présent plus grands et aménagés conformément aux besoins des animaux (présence de points d'eau, de boue et de jeux) et la composition des groupes d'individus tente de respecter une certaine logique quant à la structure sociale rencontrée en milieu naturel.

### **1.6.2. Effectifs en captivité**

Parmi les éléphants qualifiés de « captifs », il est important de distinguer :

- Les éléphants d'Asie domestiqués dans leur pays d'origine : leur nombre est estimé à environ 15 000 individus, répartis dans 11 pays différents (Myanmar, Inde, Sri Lanka, Thaïlande, Indonésie, Malaisie, Népal, Bangladesh, Laos, Cambodge, Vietnam).
- Les éléphants présents en captivité dans les parcs zoologiques et les cirques du monde, qui représentent, au total, environ 1700 individus [16].

- En Amérique du Nord, il y avait 236 (34.202\*) éléphants d'Afrique en 2002 et 259 (18.241\*) éléphants d'Asie en 2005 [118]. 284 de ces éléphants (toutes espèces confondues) vivaient dans des institutions accréditées par l'AZA.
- En Europe, il y avait 319 (63.256\*) éléphants asiatiques et 207 (50.157\*) éléphants d'Afrique en 2006, d'après les Studbooks européens [119].
- Parmi eux, en France, il y avait 26 (6.20\*) éléphants asiatiques et 19 (6.13\*) éléphants d'Afrique en 2006, d'après les Studbooks européens [119].

\* correspond à la nomenclature scientifique pour désigner un décompte de mâles et de femelles : (34.202) signifie par exemple 34 mâles et 202 femelles

L'association américaine des zoos et aquariums (AZA) estime que si les taux actuels de natalité et de mortalité de la population captive persistent, les populations nord-américaines d'éléphants (parcs zoologiques et cirques) seront démographiquement éteintes dans quelques décennies [7]. Face à ce constat, deux options sont envisagées :

- Augmenter le taux de succès de la reproduction en procédant à des échanges d'individus entre établissements, en améliorant les conditions de captivité et en poursuivant les recherches fondamentales dans ce domaine.
- Importer des animaux sauvages, qui posent problème dans leur milieu naturel : cette politique du « sang neuf » fait débat et la réglementation stricte de la CITES (ainsi que de nombreuses organisations telles que WWF ou IUCN) considèrent que les espèces doivent être avant tout protégées dans leur milieu naturel [48].

Remarque : La situation dans les parcs européens est moins sérieuse qu'aux Etats-Unis car le succès de la reproduction y est un peu meilleur. Cependant, le taux de renouvellement n'est pas encore suffisant pour maintenir assurément une population stable à long terme. A titre d'exemple, il y a eu 32 naissances pour 35 décès d'éléphants dans les zoos accrédités européens entre janvier 2004 et décembre 2007, contre 12 naissances et 20 décès dans les institutions équivalentes nord-américaines [61].

Devant ce constat alarmant quant au déclin progressif des populations captives, les institutions zoologiques ont intégré les éléphants dans des programmes d'élevage spécifiques où la priorité est donnée au maintien des effectifs captifs grâce à la réalisation d'accouplements raisonnés.

### **1.6.3. Programmes d'élevage en parc zoologique**

Les éléphants d'Afrique et d'Asie sont des espèces menacées. Dans la plupart des parcs zoologiques, ils sont ainsi intégrés à des programmes de sauvegarde particuliers, notamment :

- les programmes d'élevage européens pour les espèces menacées (EEP) en Europe,
- les « Species Survival Plan » (SSP) en Amérique du Nord.

Remarque : Divers autres programmes existent également sur les autres continents.

De tels programmes ont pour but de conserver une population captive en bonne santé, stable démographiquement et de diversité génétique maximale afin de permettre une réintroduction éventuelle dans la nature. Ainsi, en Europe, les différents coordinateurs des EEP mènent des actions variées dans le but :

- De recenser tous les individus présents dans les parcs zoologiques accrédités et de créer un registre contenant l'arbre généalogique de chaque animal.
- De coordonner les programmes de reproduction afin d'éviter les problèmes de consanguinité (grâce notamment à des échanges d'individus entre parcs zoologiques et la réalisation d'accouplements raisonnés) et de conserver une population captive génétiquement viable.
- D'améliorer les pratiques d'élevage en identifiant les besoins spécifiques de l'espèce concernée et en formulant des recommandations à son égard (*Husbandry guidelines*).
- De participer à des actions de conservation *in situ*, de recherche *ex situ* et d'éducation du public concernant cette espèce.

La coordination de ces programmes à l'échelle européenne (ou régionale) laisse néanmoins un peu moins de liberté aux institutions zoologiques dans la gestion des individus concernés. Ainsi, même si ces recommandations ne sont que des suggestions et qu'aucune notion de contrainte n'y est associée, la décision de déplacer un éléphant ou de réaliser un accouplement précis dépend grandement du coordinateur du programme, qui doit être consulté avant chaque décision.

L'apport des recherches effectuées sur les éléphants de parcs zoologiques a déjà été évoqué (cf §.1.5.3.c). A cela s'ajoutent d'autres intérêts relatifs à l'élevage de ces espèces en captivité.



#### **1.6.4. Intérêts de l'élevage en captivité**

La garde d'éléphants en captivité, bien que souvent controversée, revêt plusieurs intérêts majeurs :

- Un intérêt en termes de conservation *ex situ* : la sauvegarde en captivité d'un pool génétique viable rendrait possible la réintroduction de l'espèce dans le cas extrême d'une extinction en milieu naturel.
- Un intérêt scientifique pour les biologistes : la connaissance de l'espèce est nécessaire à sa préservation en milieu naturel. Or, les études sont plus facilement réalisables en captivité et un grand nombre de données (notamment physiologiques) sont transposables du milieu captif au milieu d'origine. Une meilleure compréhension de la physiologie de la reproduction chez l'éléphant permettrait, par exemple, d'assurer la survie de l'espèce en captivité et de limiter les captures de spécimens sauvages (notamment en Asie pour la domestication).
- Un intérêt pédagogique pour les visiteurs : l'éléphant est une espèce symbolique, souvent qualifiée de « porte-drapeau ». Le plus imposant des « Big Five » est idéal pour sensibiliser le public à l'importance de la conservation de la biodiversité, aux nuisances du braconnage ou à l'impact de l'homme sur le milieu naturel. De par son caractère emblématique, l'éléphant suscite donc la curiosité du public et attire les visiteurs, ce qui revêt par ailleurs un intérêt économique pour l'institution zoologique.

Malgré ces différents intérêts, l'élevage d'éléphants en captivité est associé à de nombreuses difficultés.

#### **1.6.5. Difficultés liées à l'élevage d'éléphants en captivité**

L'éléphant étant une espèce à la fois fragile et imposante, l'élevage de spécimens captifs est synonyme de nombreuses contraintes et constitue souvent un challenge passionnant pour les parcs zoologiques :

- D'une part, les éléphants sont des animaux dangereux : les responsabilités portées par les détenteurs de l'animal vis-à-vis du public et du personnel zoologique sont très lourdes. Rappelons que les éléphants sont responsables d'accidents graves voire

mortels chaque année en parcs (sur le personnel principalement). De 1850 à 1950, de nombreux mâles captifs ont été abattus, soit parce qu'ils avaient tué quelqu'un, soit parce qu'ils avaient causé d'importants dommages matériels [16, 48, 126]. Le *musth*, défini comme un état d'extrême agressivité et d'excitation sexuelle chez le mâle (testostéronémie jusqu'à 60 fois plus élevée qu'à la normale), est une période particulièrement dangereuse, ce qui explique que très peu de mâles soient détenus par des institutions zoologiques (sex-ratio de 1:4 dans les zoos européens et de 1:6 dans les zoos nord-américains [16, 118, 119]). Par ailleurs, des infrastructures sécuritaires sont nécessaires, ce qui représente des frais non négligeables, auxquels s'ajoutent les investissements en termes de personnel (entraînement médical, soins, nettoyage) et d'alimentation, très importants comparativement à la plupart des autres espèces. En effet, les recommandations quant au ratio du nombre de soigneurs qualifiés par le nombre d'éléphants avoisinent 1 sur 2, soit un coût humain très important.

- D'autre part, l'élevage d'éléphants en parc zoologique est très difficile :
  - La reproduction est très aléatoire : le taux de fécondité est dix fois plus faible que dans leur milieu d'origine (seules 21% des femelles captives sexuellement matures mettent bas, contre 96 % dans la nature), la mortalité des jeunes est trois fois plus importante et de très nombreuses inconnues persistent dans ce domaine [16].
  - Les interactions sociales étant souvent limitées (petits groupes), des troubles comportementaux (stéréotypie notamment) sont fréquemment observés et très compliqués à faire disparaître.
  - Le manque d'exercice peut être à l'origine d'affections podales récidivantes et de problèmes d'obésité : les éléphants captifs seraient 31 à 72 % plus lourds que leurs congénères sauvages [16].
  - Certaines affections, telles que la tuberculose, sont particulièrement difficiles à gérer en pratique chez cette espèce.

Après cette présentation générale de l'éléphant, des dangers qui les menacent et du défi que représente leur élevage en captivité, la suite de l'exposé met l'accent sur une affection particulièrement importante chez cette espèce comme chez l'homme : la tuberculose.



## **2. LA TUBERCULOSE : UNE ZONOSE D'IMPORTANCE CAPITALE**

La tuberculose est définie comme étant une maladie infectieuse et contagieuse, commune à l'homme et à de nombreuses espèces animales [5]. Elle est due à diverses espèces bactériennes appartenant au genre *Mycobacterium* et est caractérisée :

- Cliniquement, par une évolution le plus souvent chronique et un grand polymorphisme.
- Anatomiquement, par des lésions inflammatoires typiques : les tubercules.

La tuberculose est une maladie d'importance capitale en médecine humaine et en médecine vétérinaire du fait de son potentiel zoonotique.

### **2.1 Importance de la tuberculose en médecine humaine**

Quelques données concernant la tuberculose de l'homme sont exposées ici afin de prendre conscience du risque que constitue l'apparition d'un cas de tuberculose sur un éléphant captif, constamment entouré par des membres du personnel zoologique (soigneurs animaliers, vétérinaires) et par des visiteurs.

Après avoir donné quelques informations générales sur la maladie elle même, l'impact mondial de la tuberculose et les plans de lutte qui lui sont associés sont évoqués, ainsi que la part de responsabilité de la tuberculose zoonotique dans l'espèce humaine.

#### **2.1.1 Données générales cliniques sur la maladie chez l'homme**

Il est évidemment impossible de synthétiser les données concernant la tuberculose humaine en quelques lignes. Ce paragraphe a ainsi pour seul objectif d'évoquer les principaux symptômes, les modalités de dispersion de la maladie et les principaux tests diagnostiques utilisés chez l'homme.

La tuberculose est une maladie chronique touchant principalement l'appareil respiratoire profond. Chez l'homme, les symptômes caractéristiques d'une tuberculose pulmonaire active regroupent de l'anorexie, une toux chronique productive, une douleur thoracique, une fièvre

légère, des suées nocturnes et une perte de poids. En l'absence d'un traitement approprié ou lors d'immunodépression, la tuberculose est fréquemment mortelle.

La plupart des infections sont toutefois latentes : l'observation de signes cliniques à un moment de la vie du patient infecté survient dans seulement 4 à 10% des cas. Les personnes porteuses de la tuberculose représentent une source d'infection et la mycobactéries se disperse d'individu en individu par contact étroit. La contamination se fait principalement par voie aérienne lors d'inhalation d'aérosols contenant des sécrétions respiratoires produites lors de toux ou d'expectoration ou par voie digestive. En l'absence de traitement, une personne atteinte de tuberculose évolutive infecte en moyenne 10 à 15 autres personnes en l'espace d'une année [96].

Le diagnostic de la tuberculose humaine repose essentiellement sur la détection d'une réaction d'hypersensibilité retardée après injection intradermique de tuberculine (test de Mantoux). Il existe, par ailleurs, d'autres tests diagnostiques de plus en plus utilisés en médecine humaine : les examens cytologiques, les mises en culture de sécrétions respiratoires, les radiographies, la tomodensitométrie de la cavité thoracique et les méthodes sérologiques récemment mises au point (test Interféron Gamma notamment) en sont les principaux exemples. Les traitements mis en place sont variés, requièrent l'utilisation de plusieurs molécules et sont adaptés à la souche mycobactérienne isolée. La pratique de la vaccination anti-tuberculeuse (BCG) est courante et dépend grandement des politiques sanitaires nationales. Obligatoire en France pendant plus de 20 ans, elle est aujourd'hui controversée dans les pays à faible incidence car elle gène au dépistage de l'infection d'une part et peut être à l'origine d'une réaction inflammatoire sérieuse d'autre part.

La tuberculose est donc une maladie grave, contagieuse et difficile à diagnostiquer, à prévenir comme à traiter.

### **2.1.2 Incidences mondiale et régionale de la tuberculose**

La tuberculose et le SIDA demeurent les premières causes de mortalité d'origine infectieuse à travers le monde et constituent des problèmes majeurs de santé publique.

La tuberculose a fait 30 millions de victimes ces dix dernières années (1995-2005) et on compte dans le monde une nouvelle infection par le bacille tuberculeux chaque seconde ! De nos jours, environ deux milliards de personnes (soit le tiers de la population mondiale)

hébergent en elles un bacille tuberculeux : 4 à 10 % de ces personnes déclareront un jour la maladie et seront alors excréteurs et contagieux.

En 2004, l'incidence mondiale de la tuberculose était estimée à 140 cas pour 100 000 habitants (pcm) et progressait à raison de 0,6 % par an au niveau mondial.

La situation est particulièrement grave dans les pays en voie de développement, qui représentent 95% des nouveaux infectés. En 2004, l'OMS estime que c'est dans la région de l'Asie du Sud-est que les nouveaux cas ont été les plus nombreux, avec 33 % de l'incidence mondiale (soit une incidence moyenne de 182 pcm) [96].

Toutefois, l'incidence par habitant est deux fois plus élevée en Afrique subsaharienne avec près de 400 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants, et ce chiffre progresse encore. L'Afrique regroupe par ailleurs les taux de mortalité les plus élevés, s'expliquant principalement par les co-infections tuberculose-VIH et le manque de ressources nécessaires au traitement et à la surveillance de ces maladies.

Les pays occidentaux, bien que globalement épargnés, sont également concernés par la tuberculose. En France, le taux d'incidence nationale de la tuberculose humaine était estimé à 11 pcm en 2002 (contre 60 pcm en 1972) [5]. Aux Etats-Unis, 10 à 15 millions d'américains sont porteurs du bacille. En Europe de l'Est, la situation reste préoccupante avec une forte prévalence dans les pays de l'ex Union Soviétique.

Devant ce tableau alarmant, des stratégies de limitation de l'avancée de la tuberculose sont mises en place à l'échelle internationale : c'est l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) qui coordonne la plupart de ces programmes de lutte.

### **2.1.3 Plan de lutte contre la tuberculose**

Dès 1993, l'OMS considère la tuberculose comme une priorité mondiale. En 2006, elle lance la nouvelle stratégie « Halte à la tuberculose », qui repose essentiellement sur la méthode DOTS (*Directly Observed Therapy, Short course treatment*, ce qui signifie Traitement de Courte durée sous Surveillance Directe). Ce programme vise à inverser la tendance à la hausse de l'incidence de la tuberculose d'ici 2015 et à réduire de moitié les taux de prévalence et de mortalité dans toutes les régions du monde (comparativement aux niveaux de 1990) [96].

Cependant, deux problèmes majeurs compromettent ces objectifs :

- Les co-infections VIH / Tuberculose : en effet, les sujets immunodéprimés étant plus susceptibles de développer une infection tuberculeuse, le VIH et la tuberculose forment une association meurrière en accélérant mutuellement leur progression. La tuberculose est ainsi une cause majeure de mortalité chez les VIH-positifs : elle est responsable d'environ 13 % des décès par SIDA dans le monde. Ces co-infections sont un frein à l'efficacité des mesures de lutte mises en place, essentiellement en Afrique.
- Les tuberculoses pharmaco-résistantes : elles sont définies comme étant des tuberculoses résistantes à au moins un antituberculeux et représentent environ 20 % des cas de tuberculose humaine. Les tuberculoses multirésistantes (MDR-TB) sont des formes particulièrement dangereuses car elles sont causées par des bacilles résistants au moins à l'isoniazide et à la rifampicine, les deux antituberculeux les plus efficaces chez l'homme. Il est donc beaucoup plus difficile de soigner ce type de tuberculose : la chimiothérapie est plus longue, plus toxique et beaucoup plus chère (jusqu'à cent fois le prix d'un traitement usuel). Ces tuberculoses multirésistantes représentent aujourd'hui environ 5 à 10 % des cas dans le monde (avec une forte incidence en Russie, en Chine, au Mexique, au Vietnam et à Haïti) [79]. Elles se rencontrent fréquemment dans les milieux socialement défavorisés ou chez les patients ne respectant pas les doses ou les durées de traitements. Ces multirésistances sont de plus en plus préoccupantes car elles conduisent à de nombreux échecs thérapeutiques et à des taux de mortalité élevés. Environ un cinquième de ces tuberculoses multirésistantes sont également résistantes à la fluoroquinolone et à au moins un tiers des agents de seconde ligne : elles sont qualifiées d'extra-résistantes (XDR-TB) et sont mortelles dans 70 % des cas.

Sur le plan hygiénique, il est possible de distinguer les tuberculoses interhumaines (causées par la contamination à partir d'un humain infecté) des tuberculoses zoonotiques, dont l'origine est un animal tuberculeux excréteur.

## **2.1.4 Importance de la tuberculose zoonose**

La tuberculose zoonotique représente 5 à 10 % des cas de tuberculose humaine dans les pays en voie de développement, notamment à cause de la forte prévalence au sein des troupeaux domestiques. Elle reste cependant très faible en France, de l'ordre de 0,5 % des cas enregistrés chez l'homme [5].

L'interdépendance des tuberculoses animales et humaines dépend de la nature du bacille tuberculeux en cause. *Mycobacterium tuberculosis* est la cause classique de la tuberculose humaine, mais il a été montré que l'homme pouvait être contaminé par d'autres bacilles tuberculeux, bacilles dont les réservoirs et les hôtes habituels sont des animaux : ces bacilles sont alors qualifiés d'agents zoonotiques.

Ainsi, *M. bovis* (dont les bovins sont les hôtes naturels) est l'agent classique de la tuberculose zoonotique, avec une contamination par ingestion de lait ou de viande contaminés ou lors de contacts étroits avec un animal excréteur. Cependant, cette mycobactéries tuberculeuse n'est pas la seule responsable de zoonose : *M. pinnipedii* (dont les otaries sont les hôtes naturels) et *M. caprae* (dont les chèvres sont les hôtes naturels) sont également responsables de cas de tuberculose humaine [28].

L'absence de cas rapportés de *M. tuberculosis* chez les animaux en liberté suggère que la tuberculose causée par cette mycobactéries est une maladie humaine à l'origine et que les animaux infectés ne sont que des hôtes accidentels. Cependant, *M. tuberculosis* pouvant être transmis de l'animal à l'homme, il est également considéré comme un agent zoonotique.

La transmission de la tuberculose de l'animal à l'homme suppose qu'il existe des contacts longs, fréquents et étroits entre les deux individus. C'est notamment le cas des éleveurs (pour les animaux domestiques), des propriétaires (pour les animaux de compagnie) et des soigneurs animaliers et dresseurs (pour les animaux sauvage de parcs zoologiques ou de cirques).

Ainsi le risque zoonotique est réel et doit être constamment à l'esprit du vétérinaire lorsqu'il est face à un cas de tuberculose animale. C'est ce potentiel zoonotique et les considérations en termes de santé publique qui l'accompagnent qui expliquent l'importance capitale de la tuberculose en médecine vétérinaire.

## **2.2 Importance de la tuberculose en médecine vétérinaire**

La tuberculose pouvant toucher toutes les espèces de Vertébrés, elle concerne tous les domaines de la médecine vétérinaire. La maîtrise de la maladie au sein des cheptels domestiques est primordiale et la surveillance de la faune sauvage non captive y est souvent intimement associée.

### **2.2.1 Importance de la tuberculose au sein des troupeaux domestiques**

Longtemps qualifiée de "fléau d'élevage", la tuberculose bovine (et caprine) revêt une triple importance :

- Une importance économique : la tuberculose entraîne des pertes non négligeables en viande et en lait lors de saisies. Elle constitue par ailleurs une restriction incontournable à la circulation des animaux et des denrées alimentaires d'origine animale.
- Une importance réglementaire : les tuberculoses bovines et caprines étant des maladies légalement réputées contagieuses (MLRC), les mesures de prophylaxie (dépistage, abattage) sont réglementées.
- Une importance sanitaire : bien qu'aujourd'hui rare dans la majorité des pays "économiquement avancés", la tuberculose demeure tout de même au cœur des préoccupations sanitaires de tous les pays. Quelques foyers de tuberculose ressurgissent par exemple en France chaque année et les troupeaux concernés sont alors entièrement abattus.

Pour l'ensemble de ces raisons, la tuberculose demeure un obstacle majeur au développement de l'élevage bovin dans de nombreux pays en voie de développement.

Les problématiques d'éradication de la tuberculose dans les troupeaux domestiques sont complexes et multifactorielles : l'un des facteurs clés de ces programmes est la maîtrise de la maladie au sein de la faune sauvage autochtone, souvent en contact direct avec les cheptels.

## **2.2.2 Importance de la tuberculose au sein de la faune sauvage autochtone**

Des mycobactéries tuberculeuses ont été identifiées chez de nombreuses espèces sauvages vivant en liberté : il s'agit essentiellement de *Mycobacterium bovis*. Ces espèces peuvent n'être que des hôtes accidentels mais peuvent également servir de réservoir naturel au bacille et persister dans l'écosystème : elles jouent alors un rôle épidémiologique important dans le cycle de la maladie. La gestion de ces cas de tuberculose n'est pas aisée car les moyens diagnostiques sont limités et les mesures prophylactiques très difficiles à mettre en œuvre.

En voici les exemples les plus marquants [21]:

- L'opossum (*Trichosurus vulpecula*) en Nouvelle Zélande,
- Le blaireau (*Meles meles*) en Grande Bretagne et en Irlande,
- Le bison d'Amérique (*Bison bison*) au Canada et aux Etats-Unis,
- Le buffle africain (*Syncerus caffer*) en Afrique du Sud,
- Le cerf de Virginie (*Odocoileus virginianus*) aux Etats-Unis.

Ces animaux sauvages, lorsqu'ils constituent des réservoirs de la maladie, sont souvent considérés comme en partie responsables de l'échec des programmes d'éradication de la tuberculose bovine dans certains pays (en Grande Bretagne notamment).

Dans le sud de l'Europe (Espagne, Italie), la tuberculose à *M. bovis* est responsable d'une mortalité non négligeable chez le cerf, le sanglier, le blaireau, le renard et le lynx. En France, plusieurs cas de tuberculose ont été rapportés dans des élevages de cervidés et de récentes études ont montré qu'il existait d'importants foyers de tuberculose au sein de la faune sauvage autochtone française : *M. bovis* a été isolé sur 28 % (n=84) des sangliers autopsiés en Seine Maritime (forêt de Brotonne) entre 2001 et 2002 et sur 25 % (n=100) des cerfs entre 2005 et 2006 [43, 44].

Par ailleurs, ces bacilles tuberculeux représentent une menace pour les espèces sauvages considérées de grande valeur : l'exemple du Parc National Kruger où les grands prédateurs (lions, léopards) sont maintenant contaminés par *M. bovis* illustre bien l'enjeu que peut parfois revêtir la maîtrise de la maladie chez des animaux sauvages non captifs.

La problématique de la tuberculose dans les parcs zoologiques combine, en quelque sorte, l'ensemble de ces aspects : à la possibilité de transmission de la maladie à l'homme et aux autres animaux du parc, s'ajoute la grande valeur que peuvent représenter certaines espèces en termes de diversité génétique et de conservation.

### **2.2.3 Importance de la tuberculose dans les parcs zoologiques**

#### **a. Une importance multiple**

La tuberculose est d'une importance unique en médecine zoologique dans la mesure où :

- C'est une maladie chronique grave à l'échelle de l'individu,
- Elle peut causer des séquelles sur l'ensemble du troupeau,
- Elle bénéficie d'un cadre réglementaire précis (bien que mal défini chez les espèces non domestiques),
- C'est une zoonose majeure, constituant ainsi un risque pour la santé publique.

Les mycobactéries ont été d'une importance historique majeure dans les collections de parcs zoologiques pendant plus de 150 ans. En effet, la tuberculose a été une cause importante de mortalité chez les animaux captifs le siècle dernier : des pertes allant jusqu'à 40% des primates non humains sont rapportées dans certaines collections [88]. Dans ce groupe d'espèces, la tuberculose est probablement la zoonose la mieux connue et la plus documentée. Par ailleurs, la perte d'un animal appartenant à une espèce menacée ou de grande valeur génétique pour le groupe peut représenter un coût important en termes de conservation de l'espèce.

L'infection tuberculeuse se déclare chez certaines espèces en parcs zoologiques alors qu'elle n'est pas (ou peu) rapportée dans la nature. C'est notamment le cas des éléphants et des primates. Ceci s'explique principalement par deux raisons :

- D'une part, les animaux gardés en captivité sont soumis à des conditions d'élevage (confinement, promiscuité, changement de climat, stress multiples) favorisant le développement de maladies infectieuses.
- D'autre part, la mycobactéries est probablement introduite dans une collection à partir d'un humain infecté (personnel, visiteurs).

Chez ces animaux, la tuberculose doit ainsi être considérée comme le révélateur d'une contamination humaine, à l'image de ce qui est constaté chez les carnivores domestiques.

D'un point de vue pratique, l'apparition d'un foyer de tuberculose dans une collection d'animaux sauvages est toujours très difficile à gérer. Les moyens diagnostiques et thérapeutiques sont souvent peu développés chez ces espèces et leur mise en œuvre est compliquée par des difficultés de contention notamment.

### **b. Principales espèces concernées**

Bien que principalement décrite chez les primates non Humains, la tuberculose concerne théoriquement l'ensemble des vertébrés et peut donc toucher la plupart des espèces d'une collection zoologique.

Dans la littérature, la tuberculose a été rapportée chez plus de 70 espèces de mammifères sauvages et captifs non domestiques ; elle est décrite chez quasiment tous les ruminants et est fréquente chez les bovidés et les cervidés ; de nombreux oiseaux sont par ailleurs victimes de la forme aviaire de la maladie [21, 49, 88].

La prévalence est cependant très souvent mal connue dans les institutions zoologiques, notamment à cause du manque de fiabilité des tests diagnostiques et des difficultés pratiques liées au dépistage. Il a néanmoins été établi que la sensibilité d'un animal à la tuberculose dépend fortement de l'espèce à laquelle il appartient : les Equidés semblent, par exemple, très peu sensibles à l'affection alors que certains primates (*Macaques rhésus*, *Macaca mulatta*, notamment) y sont particulièrement réceptifs.

Bien que la menace de la tuberculose reste omniprésente chez les primates non humains, ce sont les otaries, les éléphants et les tapirs qui soulèvent le plus d'interrogations actuellement dans les parcs zoologiques [34]. Soulignons à présent l'ampleur du problème chez l'éléphant.

## 2.3 Importance de la tuberculose chez l'éléphant

Des lésions osseuses spécifiques de tuberculose ont été observées sur 59 des 113 squelettes de mammouths (*Mammut americanum*) découverts en Amérique du Nord et datant de l'âge de glace [45]. Etant donné que ce type de lésions n'est pas systématique, il est possible que la tuberculose ait été véritablement pandémique à cette époque et puisse avoir joué un rôle dans l'extinction de cette espèce de Proboscidiens [41].

Par ailleurs, bien que la maladie fasse des ravages actuellement sur de nombreuses espèces sauvages en Afrique, **aucune publication ne semble rapporter à ce jour l'existence de la tuberculose chez l'éléphant en milieu naturel [75, 88]**. Pourtant, l'affection est aujourd'hui un grave problème pour les individus captifs et la maîtrise de la tuberculose constitue l'un des enjeux de l'élevage d'éléphants en parc zoologique. Comme il l'a déjà été évoqué (§.2.2.3.a), la présence de l'affection uniquement chez les spécimens captifs peut s'expliquer par une immunodépression (souvent induite par la captivité) combinée à l'exposition à des pathogènes nouveaux (souvent absents dans le milieu d'origine).

D'un point de vue historique, certains auteurs suggèrent que la tuberculose chez l'éléphant existe en Asie depuis plus de 2000 ans [52, 73]. Le premier rapport « moderne » publié sur la tuberculose de l'éléphant remonte à l'année 1875 au parc zoologique de Londres [32]. Les publications se sont multipliés ensuite dans le milieu des années 70 et l'intérêt suscité par cette affection chez les Proboscidiens a été relancé en 1996 aux Etats-Unis lorsque ont été confirmés deux cas de tuberculose sur des éléphants de cirque et que les mycobactéries isolées appartenaient à la même espèce que celle le plus souvent responsable de l'affection chez l'homme : *M. tuberculosis*.

Entre 1994 et 2006, 36 cas avérés de tuberculose ont été décrits chez des éléphants captifs aux Etats-Unis. Plusieurs cas ont également été confirmés dans d'autres parcs zoologiques (Europe, Afrique du Sud et Asie). Une étude américaine a estimé que la prévalence de la tuberculose chez l'éléphant d'Asie était de 12 % au sein de la population captive aux Etats-Unis [79, 85]. Il n'y a par ailleurs aucune raison de penser que ces chiffres soient inférieurs au sein des effectifs européens. Il est fort probable que les prévalences soient actuellement sous-estimées en raison du manque de performance des tests de dépistage employés jusqu'à récemment ou tout simplement parce que la maladie n'est pas recherchée de manière systématique.

L'impact de la tuberculose chez l'éléphant en Asie du Sud Est est également inquiétant : en 1997, la situation au Myanmar était déjà qualifiée de sérieuse, étant données la concentration en éléphants domestiqués (4000 à 6000 individus sont utilisés pour l'extraction de bois de construction) et la prévalence importante de la tuberculose dans la population humaine et dans les troupeaux domestiques ; ces trois populations étant en contact étroit [31]. La prévalence au sein des éléphants est alors inconnue, à cause du manque de moyens humain, matériel et financier. De récentes études ont été menées depuis dans la région et suggèrent que la prévalence de la tuberculose au sein des éléphants domestiqués est élevée, de l'ordre de 13 % au Népal [39, 80]. Des investigations à plus large échelle, notamment en Inde, sont actuellement en cours [41, 76]. Il est évident que la promiscuité qui existe entre les cornacs et les éléphants ainsi que l'importante pression mycobactérienne environnante (hommes et troupeaux domestiques) sont deux raisons de suspecter et de redouter des transmissions homme-animal fréquentes. L'éléphant peut alors constituer un relai épidémiologique pour la maladie chez l'homme et être à l'origine de contamination d'autres personnes ou d'autres animaux. Dans ces régions du monde, l'éléphant fait aujourd'hui partie intégrante de l'immense problème de santé publique que constitue la tuberculose.

Par ailleurs, un autre problème majeur se dessine en Asie : les contacts entre les éléphants domestiqués et les individus sauvages se multiplient et le risque de transmission de la maladie est réel. En effet, face aux faibles taux de reproduction en captivité comparativement aux populations sauvages, il est fréquent que les femelles domestiquées soient attachées en forêt la nuit afin d'augmenter les chances d'accouplement avec des mâles non captifs. Ceci constitue un grave problème en matière de tuberculose chez l'éléphant car le risque d'introduction de la maladie dans la population sauvage apparemment naïve est important au vu des contacts répétés entre les individus et pourrait être dévastateur.

La tuberculose de l'éléphant est donc, à ce jour, avant tout un problème associé à la captivité, problème d'autant plus important qu'il est intimement lié à la maladie chez l'homme. Son potentiel zoonotique en fait une maladie importante d'un point de vue législatif et soumise à de nombreuses réglementations, parfois difficiles à mettre en oeuvre.

## **2.4 Importance réglementaire de la tuberculose**

L'importance réglementaire de la tuberculose en parc zoologique est double :

- d'une part, l'apparition d'un cas de tuberculose sur un éléphant impose des démarches particulières en matière de déclaration ;
- d'autre part, la tuberculose est une maladie clé dans l'obtention de l'agrément sanitaire pour une institution zoologique.

### **2.4.1 Obligations réglementaires lors d'apparition d'un cas de tuberculose chez un éléphant**

La tuberculose étant une maladie d'importance majeure en santé publique, elle fait l'objet d'une réglementation détaillée pour l'homme et les espèces domestiques. Peu de directives spécifiques existent en revanche pour les animaux de parcs zoologiques.

Pour l'homme, la législation française en matière de tuberculose est appliquée par l'intermédiaire de la « Médecine du travail », que l'origine de la contamination soit interhumaine ou zoonotique. Ainsi, lorsqu'un risque de transmission de la maladie de l'animal à l'homme est suspecté, c'est aux autorités vétérinaires sanitaires d'en informer la DDASS, qui mettra alors en œuvre des mesures adéquates en collaboration avec la Médecine du travail.

Pour les animaux, les autorités sanitaires vétérinaires françaises font l'objet d'une décentralisation : ce sont les directions départementales des services vétérinaires (D.D.S.V.) qui décident des politiques à appliquer dans chaque département. Ces politiques sont coordonnées à l'échelle nationale par la Direction Générale de l'Alimentation (D.G.A.L.) mais peuvent être, en pratique, sensiblement différentes d'un département à l'autre en matière de tuberculose, comme cela s'est déjà vu sur des cervidés captifs en l'an 2000 par exemple.

Pour les cheptels domestiques, les tuberculoses bovine et caprine sont des Maladies Légalement Réputées Contagieuses (MLRC) et font donc l'objet d'une réglementation européenne très précise. Les mesures de prophylaxie sont notamment très codifiées : la priorité étant donnée à la protection des élevages indemnes et de la santé publique, l'abattage total est la règle en France lors de déclaration d'un cas de tuberculose dans un élevage. La France, comme plusieurs autres pays européens, est reconnue « Etat officiellement indemne de tuberculose bovine » par l'Union Européenne depuis 2000.

Pour les espèces sauvages, la tuberculose ne fait pas l'objet d'une réglementation européenne précise : ce sont donc les législations nationales qui sont en vigueur. Cependant, aucun texte français ne traite explicitement de la tuberculose chez les espèces sauvages. Ainsi, les choix pris lors de l'apparition d'un foyer de tuberculose dans un parc zoologique sont souvent le fruit de concertations entre les autorités sanitaires nationales, la médecine du travail et l'institution concernée. Il faut tout de même garder à l'esprit que **la décision finale appartient aux autorités sanitaires** : c'est donc la direction des services vétérinaires qui aura le dernier mot, en France par exemple.

Même si aucun texte ne traite spécifiquement de la tuberculose chez les espèces sauvages, certains articles plus généralistes peuvent tout de même être appliqués à l'éléphant. L'alinéa 2 de l'article 224 du Code Rural (modifié par le DM du 20 février 2002) précise que : « lorsqu'elle est mise en évidence (...), la tuberculose due à *Mycobacterium bovis* ou à *Mycobacterium tuberculosis* est une maladie à déclaration obligatoire chez toutes les espèces animales domestiques ou sauvages (...) » [59]. Ainsi, l'apparition d'un cas confirmé de tuberculose chez un éléphant doit être déclarée aux autorités compétentes (c'est-à-dire à la direction départementale des services vétérinaires, pour la France). En revanche, la législation ne précise pas quelles sont les démarches à effectuer lorsqu'un cas est suspecté.

Par ailleurs, aucune loi ne régit spécifiquement la prophylaxie de la maladie chez les Proboscidiens : les mesures de dépistage et de limitation des risques d'apparition de la tuberculose sont définies par le vétérinaire en charge de l'institution zoologique. C'est en réalité la DSV qui délègue ses pouvoirs au vétérinaire sanitaire, qui doit, en contre partie, pouvoir justifier à tout moment, que ses choix sont les plus appropriés. Pour cela, une validation « officielle » de la méthode n'est pas forcément nécessaire, le vétérinaire peut s'appuyer sur des publications scientifiques (dans l'idéal) ou sur les recommandations formulées par les EEP (*Husbandry guidelines*).

Ainsi, mise à part la déclaration obligatoire lors de confirmation du cas, la tuberculose chez l'éléphant n'est soumise à aucun texte réglementaire précis. Or la tuberculose est une maladie clé dans l'obtention des agréments sanitaires des parcs zoologiques.

## **2.4.2 Conditions nécessaires à l'agrément sanitaire des institutions zoologiques**

La directive 92/65/CEE, nommée communément « directive Balai » définit les conditions de police sanitaire régissant les échanges et les importations dans la Communauté d'animaux, de spermes, d'ovules et d'embryons. Les annexes de cette directive ont été modifiées par le règlement n° 1282/2002 afin de clarifier certains points concernant notamment l'obtention de l'agrément sanitaire pour les parcs zoologiques [27].

En théorie, seuls des animaux provenant d'organismes agréés peuvent être introduits dans un établissement agréé. Les animaux provenant d'autres institutions doivent faire l'objet de mesures strictes de quarantaine sous surveillance sanitaire étroite. Sur le terrain, certaines conditions restent difficilement applicables à la lettre et de nombreuses dérogations sont accordées. En France, cette directive n'est même pas en vigueur à l'heure actuelle. En pratique, c'est la DSV qui accorde un certificat sanitaire à chaque transfert d'animal attestant que le parc serait conforme à la « directive Balai » si elle était appliquée.

D'après cette directive (annexe C), afin d'être officiellement agréé, un organisme doit satisfaire un certains nombre d'exigences administratives et sanitaires. Cet agrément est théoriquement indispensable à tout échange d'animaux entre parcs. Sont évoquées ici uniquement les exigences concernant la tuberculose. Pour être « agréé » :

- Un parc zoologique doit être indemne des maladies énumérées à l'annexe A, parmi lesquelles figure la tuberculose (quelle que soit l'espèce).
- Des mesures appropriées de surveillance et de lutte contre ces maladies doivent être prises (notamment un plan de surveillance annuel et des tests *ante-mortem* et *post-mortem* des animaux suspects).
- La présence de tout symptôme suspect doit être déclarée immédiatement à l'autorité compétente (à savoir la DSV en France). L'agrément de l'institut est alors suspendu jusqu'à ce que la suspicion ait été officiellement écartée, et les mesures nécessaires pour confirmer la suspicion et pour éviter toute propagation de la maladie doivent être prises rapidement. Si la maladie est confirmée, l'institut ne récupère son agrément qu'après l'éradication de la maladie et des foyers d'infection dans les installations (comprenant une désinfection et un nettoyage adéquats des bâtiments).

De plus, l'annexe 9 de l'Arrêté du 19 juillet 2002 s'applique lorsqu'un éléphant est importé en France d'un pays tiers : il s'agit d'un certificat sanitaire nécessaire à l'importation et au transit sur le territoire métropolitain des éléphantidés en provenance des pays tiers et destinés à des établissements de présentation au public. Ce certificat doit obligatoirement accompagner l'animal lors de son transfert et atteste, entre autres, que les animaux sont originaires de troupeaux ou d'établissements dans lesquels la tuberculose n'a pas été détectée cliniquement au cours des 3 dernières années [59].

Ces deux textes ne sont cependant pas applicables à la lettre en parc zoologique. En effet, la déclaration d'un cas de tuberculose entraînerait le blocage de l'ensemble des échanges d'animaux, quelle que soit leur espèce et quelle que soit leur proximité géographique au sein du parc avec le cas déclaré ; et ceci, jusqu'à éradication de l'épidémie. Or cette éradication est impossible à prononcer avec certitude dans le cas de la tuberculose étant donnée la possibilité de persistance de l'infection à bas-bruit dans une population, sans que celle-ci puisse être décelée par les moyens diagnostiques actuellement disponibles chez les espèces sauvages. En pratique donc, de nombreuses dérogations sont accordées par les autorités sanitaires au cas par cas.

En conclusion, la tuberculose est une maladie d'importance capitale tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire, et soumise à une réglementation complexe. Chez l'éléphant, c'est une affection fréquente, encore mal connue mais faisant l'objet de nombreuses recherches dont une synthèse est proposée dans la partie suivante.



### **3. ETUDE DE LA TUBERCULOSE CHEZ L'ELEPHANT**

Cette partie a pour objectif d'exposer les données bibliographiques récentes sur la tuberculose de l'éléphant et d'en souligner les lacunes. L'étiologie, la pathogénie et l'épidémiologie de l'affection sont passées en revue puis les outils diagnostiques, prophylactiques et thérapeutiques sont détaillés.

#### **3.1 Etiologie de l'infection tuberculeuse**

Une présentation générale de la classification et des caractéristiques des mycobactéries est ici faite afin de connaître les principaux agents infectieux pouvant interférer avec les bacilles tuberculeux, notamment dans les tests diagnostiques. Les principales mycobactéries rencontrées chez l'éléphant sont ensuite synthétisées dans un tableau récapitulatif.

##### **3.1.1 Classification générale des mycobactéries**

Les bacilles tuberculeux sont des bactéries classées dans [5] :

- l'ordre des *Actinomycetales*,
- le sous ordre des *Corynebactérieae*,
- la famille des *Mycobacteriaceae*,
- le genre *Mycobacterium*, qui contient lui-même plus de 100 espèces différentes.

La taxonomie du genre *Mycobacterium* repose sur la classification en 4 groupes de Runyon (1954), basée sur la pigmentation et la vitesse de croissance des colonies isolées lors de mise en culture.

Cependant, dans la pratique courante, on distingue les mycobactéries pathogènes, responsables d'affections variées, et les mycobactéries atypiques, souvent moins dangereuses. Cette distinction arbitraire ne fait toutefois pas l'unanimité chez les microbiologistes.

## a. Les mycobactéries pathogènes

Les mycobactéries pathogènes sont typiquement scindées en deux catégories selon qu'elles appartiennent ou non au « complexe d'espèces *Mycobacterium tuberculosis* ».

### i. Les mycobactéries appartenant au « complexe *M. tuberculosis* »

Ce complexe regroupe les mycobactéries responsables de la tuberculose chez différents groupes d'espèces : ces bactéries sont souvent qualifiées de « bacilles tuberculeux ». Ces agents sont indiqués ci-dessous [28] ; l'hôte naturel principal (correspondant souvent au réservoir épidémiologique de la maladie) est indiqué entre parenthèses :

- *M. tuberculosis* (homme)
- *M. bovis* (ruminants)
- *M. microti* (campagnol)
- *M. africanum* (homme, surtout présent en Afrique)
- *M. pinnipedii* (otarie)
- *M. canetti* (homme)
- *M. caprae* (chèvre)

Remarque : La souche vaccinale dérivée de *M. bovis* (*M. bovis* BCG) est parfois considérée comme une espèce à part entière, faisant partie de ce complexe d'espèces.

Toutes les espèces de Vertébrés peuvent être atteintes spontanément par des bacilles tuberculeux. Par ailleurs, bien que les bacilles tuberculeux aient des hôtes préférentiels, ils peuvent contaminer une large variété d'espèces et se propager facilement d'une espèce à l'autre. Le pouvoir pathogène de la mycobactérie en cause est différent selon l'espèce hôte touchée.

**Chez l'éléphant, la mycobactérie la plus souvent isolée chez les individus tuberculeux est *Mycobacterium tuberculosis*.** Toutefois, un cas de tuberculose à *M. bovis* a été décrit chez cette espèce [65, 75, 78]. Il est intéressant de remarquer que cette maladie de captivité, apparemment absente dans la nature, est causée par un pathogène « humain ». Il est ainsi hautement probable que ces infections aient **pour origine une transmission à partir d'un homme infecté** (cf §.2.2.3.a.).

D'une manière générale, les infections animales dues à *M. tuberculosis* concernent essentiellement les animaux domestiques ou captifs et ne semblent pas se déclarer naturellement chez les mammifères en liberté.

Ainsi, la présence de la tuberculose chez un éléphant de parc zoologique est d'autant plus grave en termes de santé publique qu'elle implique une mycobactéries « humaine » : elle représente donc une zoonose grave pour le personnel et le public en contact avec l'animal infecté.

## ii. **Les mycobactéries pathogènes n'appartenant pas au « complexe *M. tuberculosis* »**

Ces mycobactéries sont responsables de maladies graves (indiquées entre parenthèses) mais différentes de la tuberculose, ce sont principalement [5] :

- *M. leprae* (lèpre humaine)
- *M. lepraeumurium* (lèpre murine)
- *M. farcinogenes* (farcin du bœuf)
- *M. avium* (« tuberculose » aviaire)
- *M. avium paratuberculosis* (paratuberculose des ruminants, maladie de Crohn humaine)

Chez l'éléphant, seul *Mycobacterium avium* est fréquemment isolé lors de culture sur lavage de trompe (cf §.3.1.3) [98].

Remarque : Par convention, le terme « tuberculose » est utilisé pour désigner une maladie causée par les mycobactéries appartenant au « complexe d'espèces *Mycobacterium tuberculosis* ». Cependant, les termes de tuberculose aviaire (causée par *M. avium*) et de tuberculose du poisson (causée notamment par *M. marinum*) sont fréquemment rencontrés dans la littérature.

S'ajoutent à ces mycobactéries pathogènes, de nombreuses autres espèces de mycobactéries, qualifiées d'atypiques.

## b. Les mycobactéries atypiques

Les mycobactéries atypiques sont fréquemment séparées en deux sous-catégories : les mycobactéries opportunistes et les mycobactéries saprophytes.

### i. les mycobactéries opportunistes

Les mycobactéries opportunistes provoquent des infections peu ou pas contagieuses, souvent bénignes, mais cliniquement identiques à la tuberculose (localisations pulmonaire, ganglionnaire, mammaire, cutanée) [5]. Citons pour exemples *M. chelonae*, *M. intracellulare*, *M. marinum*, *M. fortuitum*, *M. gordoneae*, *M. ulcerans* et *M. xenopi*.

Chez l'éléphant, les quatre dernières mycobactéries citées ont déjà été isolées lors de culture sur échantillons de lavage de trompe (cf §.3.1.3) [98].

### ii. les mycobactéries saprophytes

Les mycobactéries saprophytes sont très nombreuses dans l'environnement (eau, sol, herbe, tube digestif, peau, muqueuse, lait...) et souvent très peu pathogènes [5]. Citons pour exemples *M. gastri*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. terrae* et *M. elephantis*.

Chez l'éléphant, ces cinq mycobactéries ont également déjà été mises en évidence lors de culture bactériologique (lavage de trompe ou matériel *post-mortem*) (cf §.3.1.3) [98].

Ces mycobactéries atypiques sont importantes à connaître car elles peuvent être à l'origine d'erreurs d'interprétation des tests diagnostiques. En effet, elles peuvent être responsables de [5] :

- Réactions positives par excès lors de dépistage allergique de la tuberculose par le test tuberculinique (surtout les mycobactéries opportunistes).
- Contamination des prélèvements (surtout les mycobactéries saprophytes) et conduire à des erreurs d'interprétation lors de mise en culture.

Ainsi, il est important de retenir que [5]:

- Toute mycobactérie isolée doit faire l'objet d'une identification d'espèce, afin de permettre l'évaluation de son rôle pathogène dans le cas étudié.
- Le simple isolement d'une mycobactérie atypique ne permet pas d'en déduire une responsabilité quelconque dans le processus étudié : cette conclusion est toujours à soumettre à discussion au cas par cas (possibilités de portage asymptomatique, de contamination du prélèvement).

L'ensemble de ces mycobactéries (pathogènes et atypiques) ont des caractéristiques communes et d'autres qui permettent de les distinguer les unes des autres et ainsi d'identifier l'agent en cause. Les caractéristiques générales des bacilles tuberculeux sont présentées ci-dessous.

### **3.1.2 Caractéristiques générales des bacilles tuberculeux**

La connaissance combinée des caractéristiques morphologiques, culturelles et moléculaires de la mycobactérie impliquée permet souvent d'en identifier l'espèce.

#### **a. Morphologie microscopique**

D'un point de vue morphologique, les mycobactéries sont des organismes [5]:

- droits ou légèrement incurvés,
- parfois ramifiés,
- longs et fins, en forme de bâtonnet ( $1,5-4 \times 0,2-0,6 \mu\text{m}$ ),
- asporulés et acapsulés,
- immobiles,
- présents tant à l'intérieur qu'à l'extérieur des cellules.



**Figure 6 : *Mycobacterium tuberculosis* (microscopie électronique, image CDC, [10])**

Ces caractéristiques morphologiques sont semblables pour toutes les mycobactéries et ne permettent donc pas de les distinguer les unes des autres. Le recours à d'autres moyens (caractères culturaux, biochimiques ou génétiques) est nécessaire afin d'identifier l'espèce en cause.

### **b. Propriétés tinctoriales**

Les mycobactéries se colorent très mal par les techniques conventionnelles : leur paroi, riche en lipides, rend difficile la pénétration des colorants. Après coloration de Gram, elles apparaissent quelques fois Gram positives mais sont, le plus souvent, non observables. Cette coloration classique ne présente donc pas d'intérêt pour leur étude ou leur identification.

Cependant, toutes les bactéries de l'ordre des *Actinomycetales* possèdent une propriété tinctoriale particulière : elles ne se décolorent pas sous l'action combinée d'un acide fort et de l'alcool et sont ainsi qualifiées d'acido-alcoolo-résistantes (A.A.R.). Cette propriété est liée à la structure même de leur paroi cellulaire (riche en acides mycoliques) qui forme une véritable enveloppe cireuse et protectrice du fait de sa richesse exceptionnelle en lipides.

Des techniques spéciales ont été mises au point pour mettre en évidence cette propriété et sont mises à profit dans les techniques diagnostiques chez l'éléphant : ce sont principalement les colorations de Ziehl-Neelsen, de Kinyoun et la coloration à l'Auramine. Cependant, elles ne permettent en aucun cas d'identifier l'espèce mycobactérienne en cause.

### c. Caractères culturaux

Les mycobactéries se différencient entre elles par leurs caractères culturaux : selon le groupe de mycobactéries, la croissance est rapide ou lente, les colonies pigmentées ou non et le milieu utilisé est plus ou moins exigeant.

En ce qui concerne les bacilles tuberculeux impliqués dans la tuberculose chez l'éléphant (c'est-à-dire *M. tuberculosis* et *M. bovis* dans une moindre mesure) [29] :

- La mise en culture nécessite un milieu adapté, toujours enrichi (milieu de type Lowenstein-Jensen) et une température d'incubation de 37°C.
- Leur croissance est lente (temps de génération proche de 20 heures) : 12 jours d'incubation sont au minimum nécessaires avant le premier repiquage.
- Les colonies sont non pigmentées, mates, peu bombées et souvent irrégulières.
  - *M. tuberculosis* donne des colonies rugueuses de teinte beige (en vieillissant, aspect en choux fleur de couleur chamoisée) et présente une croissance qualifiée d'eugonique.
  - *M. bovis* donne de petites colonies lisses (taille d'une tête d'épingle) et présente une croissance dysgonique (c'est-à-dire d'aspect différent de celle de *M. tuberculosis*).

Ces caractères culturaux permettent d'obtenir une orientation sur l'espèce de mycobactérie en cause mais ne permettent pas son identification certaine. La réalisation de tests biochimiques et/ou moléculaires complète ce tableau et permet d'aboutir à l'identification définitive du bacille.

### d. Caractéristiques biochimiques et génétiques

Les mycobactéries sont des organismes aérobies stricts, parfois micro-aérophiles (*M. bovis*) à l'isolement. Elles possèdent une proportion de bases CG (cytosine guanine) compris entre 61 et 71 %, ce qui est caractéristique de cette famille.

Leurs caractéristiques biochimiques permettent de les identifier lors d'isolement [29] :

- *M. tuberculosis* : accumule de l'acide nicotinique (test à la niacine positif), croît en présence de TCH (acide thiophènedicarboxylique), est positif au test de la nitrate réductase et possède une catalase thermolabile.
- *M. bovis* : ne croît pas en présence de TCH, est négatif aux tests de la niacine et de la nitrate réductase et possède une catalase thermolabile.

Les travaux concernant la génétique de certaines mycobactéries ont permis d'accomplir de grandes avancées dans la compréhension de la pathogénie de ces organismes et dans la mise en place d'outils diagnostiques performants. Le séquençage entier du génome de *M. tuberculosis* (1998) a permis, par exemple, de découvrir que le gène codant pour la protéine ESAT-6 était essentiel au pouvoir pathogène chez l'homme comme chez l'animal : cette protéine, lorsqu'elle est sécrétée, déclenche une forte production d'interférons Gamma [129]. Il semble que cette caractéristique soit identique chez l'éléphant : la protéine ESAT-6 est ainsi largement utilisée aujourd'hui dans la mise au point de techniques diagnostiques indirectes (cf §.3.5.2.b.iii) [64, 66].

#### e. Sensibilités et résistances

Les caractéristiques structurales des bacilles tuberculeux, et notamment le fait que leur paroi contienne des acides mycoliques, expliquent les propriétés particulières de sensibilité et de résistance de cette famille. Citons quelques unes de ces propriétés :

- Les mycobactéries sont résistantes :
  - au froid,
  - à la dessiccation (environ 5 années de survie à l'état desséché),
  - dans l'air et les poussières,
  - aux antibiotiques usuels (pénicilline, tétracycline, chloramphénicol...),
  - à certains antiseptiques et désinfectants chimiques (notamment aux acides et bases en solution).

- Les mycobactéries sont néanmoins sensibles :
  - à la chaleur (20 minutes à 60°C, 20 secondes à 75°C),
  - aux rayons Ultra Violet (UV),
  - à la lumière naturelle (temps de survie à la lumière naturelle : 40 jours, contre 5 mois à l'obscurité),
  - à certains antibiotiques, seul ou en association (dont l'isoniazide, l'éthambutol, la rifampicine et la pyrazinamide sont les principaux exemples), qualifiés d'antituberculeux (cf §.3.7.1.c),
  - à certains désinfectants utilisés à des doses adéquates (iode, alcool, dérivés phénoliques, hypochlorites, formol).

Il faut donc garder à l'esprit que la résistance des bacilles tuberculeux est toujours élevée, que ce soit dans le milieu extérieur ou dans les produits d'origine animale. Ces propriétés de sensibilité et de résistance sont importantes à connaître afin d'adapter au mieux les mesures prophylactiques lors d'assainissement (désinfection rigoureuse des locaux contaminés et pasteurisation du lait notamment).

L'ensemble de ces caractéristiques permet aux bactériologistes d'identifier la mycobactérie impliquée lors d'infection. Bien que *Mycobacterium tuberculosis* soit le principal responsable de la tuberculose chez l'éléphant, de nombreuses autres mycobactéries ont déjà été isolées chez les Proboscidiens.

### **3.1.3 Principales mycobactéries isolées chez l'éléphant**

Entre 1997 et 2005, 8715 lavages de trompe ont été réalisés aux Etats-Unis (dépistages annuels systématiques ou prélèvements effectués dans un contexte épidémiologique suspect) puis analysés dans les laboratoires vétérinaires nationaux américains : 423 de ces mises en culture ont permis l'isolement d'une mycobactérie, dont seuls 38 appartenaient au « complexe *M. tuberculosis* » [79]. De nombreuses mycobactéries autres que tuberculeuses sont ainsi isolées chez l'éléphant, comme l'illustre le tableau ci-après.

Espèce mycobactérienne	Nombre d'échantillons	Espèce mycobactérienne	Nombre d'échantillons
<i>M. spp<sup>a</sup></i>	114	<i>M. gastri</i>	2
<i>M. avium</i>	142	<i>M. chitae</i>	3
<i>M. tuberculosis</i>	<b>35</b>	<i>M. scrofulaceum</i>	3
<i>M. terrae complex</i>	9	<i>M. phlei</i>	2
<i>M. gordonaiae</i>	6	<i>M. xenopi</i>	2
<i>M. fortuitum</i>	7	<i>M. szulgai</i>	3
« <i>M. tuberculosis</i> complex <sup>b</sup> »	<b>2</b>	<i>M. bovis</i>	<b>1</b>
<i>M. ulcerans</i>	2	Runyon Group IV	5
<i>M. smegmatis</i>	2	<i>M. interjectum</i>	2

a- Les premières cultures et certains isolats n'ont pas été identifiées.

b- l'identification exacte n'est pas connue

**Figure 7 : Espèces mycobactériennes identifiées chez l'éléphant lors d'isolement par culture entre 1994 et 2005 (J. Payeur, NVSL) [79]**

Chez l'éléphant, la tuberculose, à proprement parler, est causée par *Mycobacterium tuberculosis* (ou *M. bovis*). Peu de données sont disponibles sur les autres mycobactérioses pouvant survenir chez l'éléphant : arrêtons-nous, toutefois, sur trois d'entre elles :

- ***Mycobacterium avium*** est la mycobactérie la plus fréquemment isolée lors de lavages de trompe. Cette forte prévalence peut s'expliquer par le fait que les mycobactéries du « complexe *M. avium-intracellulare* » n'ont pas besoin d'un hôte pour survivre dans l'environnement (à la différence des bacilles du « complexe *M. tuberculosis* »). Ainsi, il est possible que ces isolements fréquents soient dus à des contaminations des prélèvements plutôt qu'à des mycobactéries réellement hébergées dans l'appareil respiratoire de l'éléphant. Toutefois, le pouvoir pathogène de *M. avium* n'est pas connu avec précision chez les Proboscidiens : il ne semble cependant pas virulent au vu des données rétrospectives cliniques et anatomo-pathologiques.
- ***Mycobacterium szulgai*** est une mycobactérie atypique peu commune, isolée habituellement chez l'homme, notamment chez les sujets immunodéprimés et provoquant, entre autres, des lésions pulmonaires [25, 69, 124] . *M. szulgai* a récemment été la cause d'infections fatales chez deux éléphants africains du Zoo de Lincoln (Illinois, 2003-2005) [55]. La mycobactérie a été isolée de lésions granulomateuses pulmonaires et ganglionnaires chez les deux individus et de lésions d'ostéomyélite coxo-fémorale chez l'un d'entre eux. La prévalence de cet agent infectieux dans l'environnement est inconnue et aucune transmission (interhumaine) n'a été décrite.

- *Mycobacterium elephantis* est une mycobactérie à croissance rapide découverte récemment (Shojaei, 2000) : elle a été isolée, pour la première fois, d'un abcès pulmonaire présent chez un éléphant adulte, mort de maladie respiratoire chronique [111]. Aucune précision supplémentaire n'est connue concernant le tableau clinique et anatomo-pathologique chez cet individu.

Ce même organisme a été récemment isolé à 11 reprises chez l'homme : dix fois à partir d'un crachat et une fois à partir d'un nœud lymphatique [125]. Cependant, aucun lien épidémiologique n'a pu être établi entre ces deux foyers.

Remarque : En ce qui concerne le risque et le pouvoir de contagiosité des mycobactéries non tuberculeuses, l'infection par l'un de ces agents n'est pas considérée comme représentant un risque pour la santé publique ou pour les autres animaux ; de plus, aucune donnée ne suggère que ces mycobactéries sont transmissibles, c'est-à-dire peuvent se propager de l'animal à l'homme ou d'un animal à un autre animal [79].

Voyons à présent comment la mycobactérie pénètre dans l'organisme hôte puis comment l'infection tuberculeuse progresse chez l'éléphant.

### **3.2 Pathogénie de l'infection tuberculeuse chez l'éléphant**

La pathogénie de la tuberculose semble être schématiquement la même quelle que soit l'espèce hôte, bien qu'il soit évident que certains points diffèrent selon l'espèce en cause.

Par ailleurs, les mécanismes mis en jeu sont extrêmement complexes et leur connaissance n'est pas encore totale à l'heure actuelle pour l'espèce humaine. Il serait donc utopique de considérer que la pathogénie de la maladie chez l'éléphant est acquise, d'autant plus qu'aucune étude n'a été menée spécifiquement chez cette espèce. Il semble cependant que le schéma général se rapproche fortement de ce qui est observé dans l'espèce humaine [78] (ou chez les bovidés), beaucoup plus que ce qui est décrit chez les carnivores domestiques par exemple.

Les conditions de l'infection, le déroulement de la maladie et les mécanismes immunitaires impliqués sont présentés ici avec pour fil conducteur les données disponibles chez l'homme et/ou chez les bovins.

### **3.2.1 Influence des conditions de l'infection**

La pathogénie d'une affection tuberculeuse est conditionnée par un certain nombre de facteurs qualitatifs et quantitatifs. Ces facteurs sont les mêmes quelle que soit l'espèce hôte et souvent quelque soit l'agent pathogène en cause.

#### **a. Facteurs qualitatifs**

Les facteurs qualitatifs, pouvant influer sur l'infection tuberculeuse chez l'éléphant, sont principalement [5] :

- **Le pouvoir pathogène du bacille** : il dépend à la fois de l'espèce mycobactérienne en cause et de sa virulence et participe à la détermination de la nature des lésions, de leur localisation et de leur extension. Chez l'éléphant, l'agent principal de la tuberculose est *M. tuberculosis*. L'unique cas de *M. bovis* décrit n'a pas permis pas de mettre en évidence des différences significatives entre les deux espèces mycobactériennes ayant trait à la pathogénie de la maladie (cf §.3.1.1.a.i.) [65, 75, 78]. Par ailleurs, diverses souches de *M. tuberculosis* ont été identifiées par génotypage et aucune différence de virulence entre ces souches ne semble exister [60, 74, 79, 81, 132].
- **La réceptivité et la sensibilité de l'hôte** : ces deux facteurs dépendent habituellement de l'espèce hôte et de son âge. Il est dorénavant reconnu que les Proboscidiens sont des espèces particulièrement sensibles à la tuberculose en captivité, comparativement à beaucoup d'autres groupes. Par ailleurs, chez l'éléphant, aucune prédisposition d'âge, de sexe et d'espèce n'a pu être rigoureusement établie, en raison de la petitesse de l'échantillon (cf § 3.3.1.c.). La susceptibilité de l'individu dépend également de son état général (lié aux conditions d'élevage et d'alimentation), de son statut immunitaire et de certains facteurs tissulaires locaux (structure du tissu, vascularisation, système macrophagique local, lésions préexistantes) [5].

- **La voie de pénétration du bacille** : par exemple, une contamination par voie aérienne sera responsable de lésions de localisation différente d'une contamination par voie digestive. Même si la voie de contamination la plus fréquente chez l'éléphant demeure la voie respiratoire (au vu des données lésionnelles), la possibilité d'autres voies de contamination doit être envisagée.

A ces facteurs qualitatifs s'ajoutent des facteurs quantitatifs, qui influent également sur la pathogénie de l'infection tuberculeuse chez l'éléphant.

### **b. Facteurs quantitatifs**

Les facteurs quantitatifs, pouvant influer sur l'infection tuberculeuse chez l'éléphant, sont principalement :

- **La dose**, c'est-à-dire le nombre de particules infectieuses contaminantes : une dose minimale (variable) est nécessaire à l'infection et cette dose conditionne ensuite le déroulement de la maladie. Chez l'éléphant, la dose infectieuse exacte est inconnue mais il semble que cette dose soit relativement importante. En effet, plusieurs cas d'éléphants positifs et excréteurs (isolement du bacille à partir d'échantillons de lavages de trompe), vivant depuis de nombreuses années en contact étroit avec des congénères ont été décrits sans que ces derniers ne soient infectés [81, 132]. Habituellement, on note également un parallélisme entre la quantité de bactéries inoculées et la gravité de l'évolution clinique. Ceci n'a pas pu être mis en évidence chez l'éléphant.
- **La répétition des doses infectieuses** : des doses faibles mais répétées dans le temps favorisent une tuberculose évolutive, ce qui explique le danger du contact permanent avec un animal tuberculeux contagieux. Bien qu'hautement probable, ceci n'a pas été spécifiquement prouvé chez les Proboscidiens. Ce principe s'applique également à la pathogénie de la maladie chez l'homme et explique pourquoi le personnel de parcs zoologiques, en contact étroit et quotidien avec les animaux, est beaucoup plus exposé au risque de transmission que les visiteurs du parc.

Lorsque le bacille tuberculeux a pénétré dans l'organisme, l'infection progresse et plusieurs étapes peuvent être distinguées.

### **3.2.2 Etapes de l'infection**

Il est possible de distinguer schématiquement deux ou trois étapes dans le déroulement de la tuberculose, quelle que soit l'espèce en cause [5] :

- La constitution du complexe primaire, correspondant à la primo-infection.
- L'évolution de ce complexe primaire, selon trois possibilités.
- L'éventuelle réactivation du complexe, correspondant à la tuberculose dite secondaire.

Ces différentes étapes sont calquées sur les connaissances acquises pour l'espèce bovine car les étapes précises de l'infection tuberculeuse chez les éléphants sont inconnues mais semblent très proches de celles des bovidés, au vu des données épidémio-cliniques et anatomo-pathologiques.

#### **a. Constitution du complexe primaire : la primo-infection**

Après pénétration dans un organisme vierge (le plus souvent par la trompe), les bacilles tuberculeux sont rapidement phagocytés par les macrophages [5]:

- Une partie de ces bacilles se multiplie dans les cellules qui les ont phagocytés. Cette multiplication locale conduit en 8 à 15 jours (chez les bovins) à la formation d'une lésion initiale : le chancre d'inoculation. Cette lésion se double systématiquement, à la faveur du drainage lymphatique des bacilles, d'une lésion tuberculeuse du nœud lymphatique locorégional (loi de l'adénopathie satellite de Parrot).  
Cette association (chancre d'inoculation + adénopathie satellite) constitue le complexe primaire dont la localisation révèle la porte d'entrée de l'agent infectieux (pulmonaire ou digestive). Chez l'éléphant, cette adénopathie est également présente (souvent retrouvée *post-mortem*) : il est ainsi très probable que le mécanisme de constitution du complexe primaire soit le même.
- L'autre partie de ces bacilles est détruite. Cette destruction provoque la libération locale d'antigènes : il se développe alors une réaction d'hypersensibilité spécifique des protéines bacillaires qui constitue le premier signe diagnostique de l'infection tuberculeuse. Chez l'éléphant, cette propriété n'est pas exploitable pour le diagnostic (cf § 3.5.2.b.) : cela ne signifie pas pour autant que l'hypersensibilité n'existe pas, elle ne peut juste pas être détectée par les moyens conventionnels.

Sur le plan biologique, la primo-infection s'accompagne donc de l'apparition de deux phénomènes importants :

- l'allergie tuberculinique, parfois utilisable pour le diagnostic (pas chez l'éléphant),
- l'immunité tuberculeuse : état de prémunition grâce auquel l'organisme peut être réfractaire à une nouvelle infection ou à la dissémination de l'infection en cours.

## **b. Evolutions possibles du complexe primaire**

Le complexe primaire initialement formé peut évoluer selon trois modalités : la stabilisation, la guérison ou la généralisation précoce [5]. Prédire quelle va être l'évolution dans un cas précis est impossible. Cependant, l'espèce hôte est un facteur à prendre en compte : la stabilisation est l'évolution la plus fréquente chez l'homme et les bovidés alors que les formes d'emblée évolutives sont courantes chez les équidés, les carnivores et les suidés. Chez l'éléphant, il semble que le schéma évolutif le plus fréquent soit la stabilisation.

### **i. Evolution vers la stabilisation**

L'hypersensibilité aux protéines bacillaires provoque une nécrose de caséification des lésions, ce qui va interrompre l'évolution du complexe primaire et entraîner une raréfaction des bacilles. Les lésions se rétractent, se calcifient ou s'enkystent et peuvent demeurer ainsi pendant toute la vie de l'animal. Ce tableau anatomo-pathologique est décrit à plusieurs reprises chez l'éléphant *post-mortem*. Cette stabilisation caractérise la « tuberculose-infection » ou « tuberculose latente ». Cet état infectieux est très probablement sous-diagnostiquée chez l'éléphant, et ces porteurs latents, non excréteurs, représentent des bombes épidémiologiques à retardement très difficiles à gérer. En effet, les lésions hébergent toujours des bacilles vivants et les bactéries, bien que séquestrées, pourront être réactivées à tout moment. La stabilisation n'est donc pas définitive : un réveil infectieux est toujours possible après un délai variable et conduira vers un état de maladie évolutive qui caractérise la tuberculose secondaire (cf § 3.2.2.c.).

## ii. Evolution vers la guérison

La guérison est marquée par une destruction du bacille tuberculeux et une cicatrisation des lésions après résorption du caséum. Elle est suivie d'une disparition de l'état d'hypersensibilité retardée spécifique (H.S.R.) et de l'immunité antituberculeuse. L'organisme n'héberge alors plus aucune mycobactéries et il n'existe donc aucun risque de résurgence. On ignore si cette possibilité d'évolution existe chez l'éléphant et quelle en est sa fréquence. Cependant, il est possible qu'un certain nombre d'éléphants aient totalement éliminé le bacille de leur organisme, notamment ceux ayant été longtemps en contact avec des congénères tuberculeux, mais n'ayant jamais été dépistés positifs.

## iii. Evolution vers la généralisation précoce

Cette troisième possibilité d'évolution résulte d'une multiplication bacillaire active suivie de l'embolisation du bacille dans les voies lymphatiques et/ou sanguines (bactériémie fugace). Elle est favorisée par le ramollissement du caséum et l'ouverture de la lésion dans un vaisseau sanguin ou lymphatique. Cela correspond au passage d'emblée à la « tuberculose maladie ». Il y a alors deux possibilités selon l'état d'immunité de l'hôte :

- En l'absence de toute résistante de l'organisme, le bacille tuberculeux peut gagner de nombreux organes et leurs ganglions en même temps. Les lésions sont alors toutes au même stade évolutif : il s'agit d'une généralisation aigüe précoce. La tuberculose miliaire aigüe en est l'exemple le plus imagé.
- S'il existe un état de résistance partielle, la dissémination du bacille et la généralisation de la tuberculose se déroulent par vagues successives. Les lésions sont alors à des stades évolutifs différents : il s'agit d'une généralisation précoce ralenti.

Bien que la forme miliaire n'ait pas été véritablement décrite chez l'éléphant, des cas de tuberculose disséminée, atteignant plusieurs organes simultanément sont rapportés chez cette espèce : selon les cas, les lésions étaient au même stade évolutif ou à des stades légèrement différents [75].

### c. La tuberculose secondaire

La tuberculose secondaire correspond à un réveil infectieux après stabilisation du complexe primaire. Les facteurs déclenchants de cette réactivation ne sont pas précisément connus : une baisse d'immunité, un stress, des modifications hormonales peuvent favoriser cette réactivation, de même qu'une nouvelle exposition à la maladie.

La tuberculose secondaire résulte d'une prolifération sur place du bacille tuberculeux marquée par l'extension de proche en proche des formes stabilisées, prolifération qui peut se cantonner à l'organe en question ou se généraliser :

- Les lésions secondaires sont souvent regroupées dans un seul organe : il s'agit de tuberculose chronique d'organe, qui peut alors se stabiliser à nouveau.
- Ces lésions peuvent aussi s'ouvrir sur une voie de drainage ou confluer entre elles, créant des cavités contenant fréquemment du caséum liquéfié : ces formes sont alors qualifiées de tuberculose ouverte et sont fortement contagieuses. Il s'agit de généralisation aigüe tardive. Ces formes sont observées chez l'éléphant en fin d'évolution, alors que des symptômes cliniques sont déjà visibles [75, 77, 78, 88].

Cette recrudescence potentielle de la maladie, et notamment la réactivation de l'excrétion, constitue un danger permanent lorsque des éléphants tuberculeux subissent une thérapie antituberculeuse sans surveillance étroite (cf §.3.7.1.f.iii).

En conclusion, l'infection d'un éléphant par un bacille tuberculeux n'est donc pas nécessairement associée à l'apparition d'une maladie active, c'est-à-dire contagieuse. Différents scénarios sont possibles après l'exposition d'un individu à *M. tuberculosis* [75] :

- Toutes les bactéries sont tuées et éliminées.
- Les bactéries se multiplient dans l'organisme et sont excrétées : la tuberculose est qualifiée d'active et les éléphants sont contagieux pour l'homme et pour les autres animaux.

- Les bactéries sont présentes mais ne se multiplient pas (phase de dormance) et ne provoquent pas de signes cliniques : la tuberculose est qualifiée de latente, les individus sont infectés mais non excréteurs (et donc non contagieux).
- Les mycobactéries latentes, déjà présentes dans l'organisme, sont réactivées et à l'origine d'une tuberculose (secondairement) active : les individus sont contagieux pour l'Homme et pour les autres animaux.

Les proportions respectives de ces différentes formes sont très difficiles à estimer à l'heure actuelle chez l'éléphant. A titre indicatif, chez l'homme, 4 à 10 % des personnes infectées (sur les deux milliards de porteurs latents) présenteront un jour une tuberculose active (d'emblée ou secondairement à un réveil infectieux) et seront donc contagieuses.

Il est important de comprendre que les bacilles tuberculeux sont eux-mêmes atoxinogènes et que les différentes étapes de l'infection sont conditionnées par la réponse immunitaire de l'hôte. C'est cette réponse immunologique qui est également à l'origine de l'essentiel de la symptomatologie clinique et lésionnelle observée.

### **3.2.3 Mécanismes immunitaires mis en jeu**

Les mécanismes immunitaires impliqués lors d'infection tuberculeuse sont complexes et les détails sont encore mal connus, même dans l'espèce humaine [109]. L'objectif de cet exposé n'est pas de fournir une explication approfondie de ces mécanismes ; le but est d'indiquer les données nécessaires à une bonne compréhension ultérieure des méthodes diagnostiques, dont la plupart reposent sur la détection d'une réponse immunologique cellulaire ou humorale.

La réponse immunitaire mise en place lors d'infection tuberculeuse fait appel à la fois à l'immunité à médiation cellulaire et humorale. Les mécanismes mis en jeu chez l'éléphant semblent très proches de ceux impliqués chez l'homme [75]. Ainsi, bien qu'il existe vraisemblablement des variations selon l'espèce, les données exposées ci-dessous sont en grande partie extrapolées à partir des recherches effectuées en immunologie humaine. Ces informations demeurent d'une grande utilité pour la compréhension globale de la pathogénie chez l'éléphant, ainsi que pour la mise au point de techniques diagnostiques chez cette espèce.

### a. Une immunité à médiation cellulaire prédominante

En tout premier lieu, lorsqu'un bacille tuberculeux pénètre dans un organisme, l'immunité de l'hôte se manifeste par [5]:

- une mobilité accrue des macrophages,
- une plus grande activité de phagocytose,
- une capacité accrue de lyser des corps bactériens phagocytés.

Les macrophages et les lymphocytes T impliqués sont alors les témoins d'une réaction à médiation cellulaire. C'est une immunité dite de surinfection, c'est-à-dire qu'elle ne persiste que tant que le bacille continue de vivre dans l'organisme.

Les mécanismes cellulaires impliqués lors de l'exposition d'un organisme à un pathogène intracellulaire (tel qu'un bacille tuberculeux) requièrent l'action de cytokines de type TH1, à savoir les interleukines-2, les interférons gamma (IFN $\gamma$ ) et les TNF $\alpha$ . Cette immunité cellulaire est toutefois relative et facilement vaincue à la suite d'une atteinte de l'état général ou de réinfections massives ou répétées [5]. Le fait que l'immunité ne soit que partielle explique en grande partie le risque de résurgence de la maladie (réveil infectieux).

Dans un second temps, une réaction d'hypersensibilité retardée (H.S.R.) spécifique se met en place (recrutement local de cellules T) et témoigne du pouvoir allergène des bacilles tuberculeux (lié essentiellement à la présence des protéines bacillaires). Cette hypersensibilité cellulaire est habituellement décelable de manière précoce grâce à des tests *in vivo* (tuberculination) ou *in vitro* (test de transformation lymphocytaire). Chez l'éléphant, les tests ne permettent pas actuellement de déceler cette réaction d'H.S.R., ce qui ne signifie pas pour autant qu'elle n'existe pas. Par ailleurs, l'évolution de l'allergie suit des modalités particulières, dont les répercussions sur le diagnostic sont essentielles.

Bien que les mécanismes immunitaires mis en place lors de tuberculose soient essentiellement à médiation cellulaire, il existe également une immunité à médiation humorale moins bien connue.

## b. Une apparition tardive d'anticorps sériques antituberculeux

Jusqu'à très récemment, les chercheurs pensaient que la réaction immunitaire mise en place lors d'infection tuberculeuse était quasi-exclusivement cellulaire et que la réaction humorale ne survenait qu'à un stade avancé de la maladie, lorsque l'immunité à médiation cellulaire baissait à cause de l'anergie ou que l'animal n'était plus capable de fournir une réponse cellulaire correcte. La production d'anticorps par des individus infectés par la tuberculose était donc considérée comme faible, variable et très souvent non détectable dans les premiers stades (sub-cliniques) de la maladie [18]. On estimait ainsi souvent que la détection de la réponse humorale était un indicateur faible de l'infection tuberculeuse et que lorsqu'elle était détectée, l'animal devait être déjà considéré comme excréteur actif du bacille.

Ces théories semblent être remises en question aujourd'hui. Il est probable que de nombreux chercheurs aient conclu hâtivement à une faible production d'anticorps car ils recherchaient alors un anticorps unique. Depuis que les recherches sont basées sur l'exposition de l'individu à des cocktails d'antigènes et donc sur la détection d'anticorps multiples, il apparaît que la réponse humorale anti-tuberculeuse n'est pas si tardive. On sait par exemple que, chez le renne (*Rangifer tarandus*), les anticorps peuvent être détectés dès 4 semaines après l'infection expérimentale par *M. bovis* [131]. Le pouvoir antigénique d'un bacille tuberculeux repose sur la présence de molécules diverses telles que des protéines ou des polysaccharides.

Chez l'éléphant, la réponse humorale est caractérisée par une grande variabilité inter-individuelle dans la reconnaissance des antigènes. Cette hétérogénéité dépend à la fois de l'individu concerné et de la souche mycobactérienne impliquée [66]. Toutefois, il a été récemment montré que certains antigènes sont immuno-dominants : l'ESAT-6 et le CPF-10 sont notamment détectés précocément et retrouvés chez quasiment tous les éléphants tuberculeux (culture bactériologique positive) [64].

D'un point de vue immunologique, il reste beaucoup d'incertitudes concernant la réponse humorale, notamment quant à la cinétique de production des anticorps et aux fluctuations de concentrations en immunoglobulines qui sont importantes et dont le déterminisme reste mal connu. Ces variations, ainsi que l'existence de communautés antigéniques avec de nombreuses mycobactéries compliquent tout de même l'interprétation des tests sérologiques lors de tuberculose, bien que les performances de ces tests soient très prometteuses sur le terrain [57, 58, 65, 66, 75].

La pathogénie de l'infection tuberculeuse est ainsi très complexe et encore mal connue chez l'éléphant. Elle est cependant importante à retenir car elle constitue la base de la compréhension de l'épidémiologie, de la symptomatologie clinique et lésionnelle et des techniques diagnostiques utilisées chez cette espèce.

### **3.3 Epidémiologie de la tuberculose chez l'Eléphant**

Un état des lieux de la tuberculose chez l'éléphant retracant l'historique des principaux cas rapportés et leur localisation est exposé dans la partie descriptive. Puis les sources de l'infection et les modalités de la contagion font l'objet du paragraphe analytique. Enfin, l'épidémiologie synthétique fait le point sur les différentes origines possibles lors de l'apparition d'un cas de tuberculose chez un éléphant, les caractéristiques d'évolution du foyer et les risques qui lui sont associés pour l'homme et les autres espèces.

#### **3.3.1 Epidémiologie descriptive**

Après avoir passé en revue les principaux cas de tuberculose décrits chez l'éléphant dans la littérature, une estimation de la prévalence de la maladie est ensuite donnée à titre incatif et les tendances quant aux prédispositions de sexe et d'espèce sont discutées.

##### **a. Historique et répartition géographique des cas de tuberculose rapportés chez les éléphants**

La tuberculose n'a été rapportée en milieu naturel ni chez les deux espèces africaines ni chez l'éléphant d'Asie [88]. Elle est donc, à ce jour, **exclusivement décrite chez les éléphants captifs ou domestiqués**. Cette situation est cependant à surveiller de près pour deux raisons :

- D'une part, la tuberculose (à *M. bovis*) fait actuellement des ravages sur la faune sauvage dans plusieurs pays du sud de l'Afrique, pays reconnus pour abriter un grand nombre d'éléphants.
- D'autre part, les nombreux contacts entre les éléphants domestiqués et les éléphants libres en Asie laissent à craindre que la maladie puisse être introduite dans les populations sauvages (cf § 2.3.).



Remarque : Deux cas de tuberculose ont été suspectés à ce jour chez l’éléphant d’Afrique dans son milieu naturel en Ouganda et en Israël, mais ces cas n’ont pas été confirmés par une culture bactériologique [89].

Bien que de nombreux auteurs suggèrent que la tuberculose existe chez les éléphants domestiqués en Asie depuis plus de 2000 ans [2, 8, 20, 52, 73, 91, 120], le premier rapport « moderne » rapportant un cas de tuberculose sur un éléphant de parc zoologique date de 1875 au Zoo de Londres [32]. Cependant, les archives du groupe européen spécialisé en éléphants mentionnent un cas sur un mâle asiatique mort en 1802 au jardin des plantes à Paris [26]. Plusieurs cas sont ensuite décrits dans les parcs zoologiques européens et américains avant 1950 [2, 8, 20, 91, 120], puis les rapports se multiplient à partir des années 60-70 [22, 35, 36, 38, 100, 107, 110]. La maladie est alors également largement rapportée chez les éléphants domestiqués ou captifs en Asie [8, 11, 12, 13, 91, 102, 103].

L’année 1996 est parfois considérée comme marquant une « réémergence » de la tuberculose chez l’éléphant. L’apparition de deux cas aux Etats Unis sur des femelles asiatiques utilisées dans des cirques et issues du même groupe [30] pousse les vétérinaires à investiguer l’ensemble du troupeau d’origine. L’isolement de *M. tuberculosis* sur 7 des 20 éléphants de ce groupe (1996-1997) laisse alors à penser que l’affection pourrait être largement sous-diagnostiquée en captivité [78]. Par ailleurs, la communauté scientifique prend conscience que cette maladie peut être responsable d’une zoonose grave, aux conséquences importantes en termes de santé publique, ce qui relance l’intérêt des autorités sanitaires.

Une campagne de dépistage à grande échelle est alors amorcée aux Etats-Unis. Le problème du manque de fiabilité des techniques diagnostiques se pose rapidement et aboutit, en 1997, à la constitution d’un groupe de travail sur la tuberculose en parc zoologique, le *National Tuberculosis Working Group for Zoo and Wildlife Species* mis en place par le ministère américain de l’agriculture (USDA). L’édition d’un *guideline* facilitant le contrôle de la tuberculose chez l’éléphant constitue alors le premier objectif de ce groupe de travail : les critères de dépistage, de surveillance et de traitement y sont définis et les recommandations concernant les éléphants captifs en Amérique du Nord y sont précisées. Le premier *guideline* a été édité en 1997, puis il a été réactualisé en 2000 et 2003 [128] ; une nouvelle version sera probablement disponible en 2008 ou 2009. Ainsi, les données chez l’éléphant sont relativement récentes : la première étude rétrospective sur l’épidémiologie, la clinique et le diagnostic est publiée en 2001, elle concerne 18 cas répartis dans 6 troupeaux [81].

Depuis 1996, de nombreux cas de tuberculose ont été dépistés en Amérique du Nord chez des éléphants [6, 24, 77, 81] : le dernier rapport fait état de 36 cas de tuberculose confirmés par culture entre 1994 et 2006 aux Etats-Unis [85]. En Europe, plusieurs foyers récents ont également été décrits : 5 cas de tuberculose sur des éléphants d'Asie ont été rapportés en 2002 [33, 60], auxquels s'ajoutent deux cas sur des éléphants d'Afrique en 2005 [87].

### **b. Estimation de la prévalence**

Plusieurs études rétrospectives sur la prévalence de la tuberculose chez les éléphants en parcs zoologiques ont été réalisées en Amérique du Nord :

- Au Zoo de Philadelphie [116], sur dix autopsies d'éléphants réalisées entre 1901 et 1975, quatre présentaient des lésions tuberculeuses (2/3 sur la période 1901-1920 et 2/7 sur la période 1920-1975).
- L'analyse rétrospective, publiée en 1994, des dossiers médicaux de 379 éléphants morts aux Etats-Unis entre 1908 et 1994 [82] aboutit à cette conclusion : seuls huit cas de tuberculose ont pu être décelés (dont quatre avant 1941), parmi lesquels trois ont été confirmés par culture. Ces résultats concluent donc à une prévalence de la tuberculose égale à 2,1 % de la population d'éléphants captifs en Amérique du Nord, toutes espèces confondues.
- Une étude un peu plus récente, publiée en 2000, estimait cette même prévalence à 3,3 % [77].
- Les 36 cas confirmés de tuberculose survenus entre 1994 et 2006 (dont 33 sur des éléphants asiatiques) portent à environ 12 % la prévalence de la maladie chez les éléphants d'Asie présents en captivité en Amérique du Nord [85].

Ces grandes différences de prévalence peuvent s'expliquer par plusieurs raisons. D'une part, les échantillons étudiés lors d'analyse rétrospective (sur dossiers médicaux) ne sont pas représentatifs : ils excluent les éléphants appartenant aux particuliers et ne prennent en compte que les éléphants des institutions zoologiques américaines agréées. D'autre part, la surveillance de la tuberculose chez l'éléphant n'est « codifiée » que depuis récemment : le

dépistage *ante-mortem* a longtemps reposé sur les résultats du test tuberculinique, que l'on sait à présent non fiable, et la réalisation d'autopsie minutieuse n'est faite systématiquement que depuis quelques années [75].

Ainsi, non seulement les techniques diagnostiques sont plus sensibles qu'auparavant, mais les recherches de tuberculose sont également beaucoup plus actives. Les prévalences réelles sont probablement encore supérieures aux dernières indications : la mise au point de méthodes permettant de dépister les porteurs latents (et non plus uniquement les excréteurs) aboutira certainement à une révision à la hausse de ces estimations dans les prochaines années.

Par ailleurs, aucune estimation ne permet d'indiquer les prévalences de la tuberculose au sein de la population captive européenne. Il est cependant très probable que les chiffres soient comparables aux statistiques nord-américaines. Il n'y a a priori pas de raison de penser que la maladie soit moins fréquente dans les parcs européens. Il est évident que tant que les dépistages ne se feront pas à grande échelle et hors contexte épidémiologique suspect, peu de cas seront déclarés (puisque les signes cliniques sont généralement absents ou peu spécifiques) et l'infection tuberculeuse restera sous-diagnostiquée chez les Proboscidiens.

Enfin, des études sur le terrain sont actuellement en cours afin d'estimer la prévalence de l'affection au sein des populations domestiquées en Asie. Une étude pilote a été réalisée au Népal en 2007 sur 120 individus et a révélé une prévalence de la maladie d'environ 13 % [41, 80]. Une étude à plus large échelle sur 800 individus en Inde fait l'objet d'un important projet coordonné par *Elephant Care International* [41]. La connaissance de ces prévalences est particulièrement importante dans ces pays où la tuberculose humaine est encore un grave problème de santé publique au quotidien et où les éléphants pourraient servir de réservoir épidémiologique à la maladie et faire échouer les programmes d'enrayement de l'infection chez l'homme.

Voyons à présent s'il existe des prédispositions diverses vis-à-vis de la tuberculose chez l'éléphant.

### c. Prédispositions vis-à-vis de la tuberculose

Si l'on observe les données épidémiologiques descriptives américaines, il apparaît clairement, à première vue, que ce sont les femelles asiatiques qui sont le plus souvent concernées par la tuberculose. En effet, sur les 36 cas confirmés de tuberculose ces dix dernières années aux Etats Unis, 33 étaient des éléphants d'Asie et la plupart des femelles [76, 79, 85].

Cependant de nombreuses raisons, autres qu'une prédisposition réelle du sexe ou de l'espèce, pourraient expliquer cette tendance : les femelles asiatiques sont, d'une part, les plus nombreuses en captivité (sex-ratio de 1:6 dans les parcs zoologiques nord-américains, cf §.1.6.5.) ; elles sont, d'autre part, plus dociles (par rapport aux mâles asiatiques et par rapport aux éléphants d'Afrique), ce qui explique que les contacts vis-à-vis de l'homme soient souvent plus étroits et plus fréquents et qu'elles soient préférentiellement utilisées lors des spectacles ou des tours : le risque de transmission de la maladie de l'homme à l'animal est ainsi plus élevé.

Par ailleurs, bien qu'aucun cas de tuberculose n'ait été décrit chez des individus de moins de 10 ans, aucune prédisposition d'âge n'a pu être mise en évidence en raison notamment de la faible taille de l'échantillon.

Enfin, il est très difficile de conclure quant à une éventuelle prédisposition du lieu ou des conditions de captivité pour différentes raisons : même si la majorité des cas de tuberculose sur des éléphants ont été décrits aux Etats-Unis, ceci est avant tout lié au fait que la maladie soit activement recherchée en Amérique du Nord mais peu ailleurs. Il est, par ailleurs, intéressant de constater que les institutions hébergeant des individus tuberculeux sont indifféremment accrédités ou non par l'AZA : parmi les 26 cas confirmés aux Etats-Unis entre 1996 et avril 2002, 6 des 13 parcs concernés étaient accrédités par l'AZA [78].

En conclusion, aucun facteur réellement prédisposant n'a pu être mis en évidence pour la tuberculose de l'éléphant : il faut donc retenir que les trois espèces peuvent être touchées, quel que soit leur âge, leur sexe ou leur localisation géographique. La probabilité qu'un éléphant soit infecté par un bacille tuberculeux est en fait surtout liée à la pression mycobactérienne environnante, à la fréquence d'exposition à un individu tuberculeux (humain ou animal) et à des facteurs de réceptivité individuels, dont l'ensemble fait l'objet du paragraphe analytique de l'étude épidémiologique.

### **3.3.2 Epidémiologie analytique**

Après avoir exposé quelles sont les sources de contagion possibles pour un éléphant (individus vecteurs et matières virulentes), les principaux modes de transmission du bacille sont présentés et les facteurs individuels de réceptivité sont rappelés.

#### **a. Sources de contagion**

Les tissus, les liquides physiologiques et les supports environnementaux hébergeant des bacilles vivants capables de se multiplier dans l'organisme hôte après ingestion ou inhalation peuvent être à l'origine de la tuberculose chez l'animal et sont donc des matières virulentes.

Les excréptions issues d'individus présentant une tuberculose active sont les principales matières virulentes à l'origine de la maladie : la salive, les expectorations, le jetage nasal, les féces, le lait, le colostrum, l'urine (lors de tuberculose rénale ou généralisée), le sperme (lors d'atteinte de l'épididyme ou du testicule) et les sécrétions utérines en sont les principaux exemples. Chez l'éléphant, *M. tuberculosis* a déjà été isolé à partir de sécrétions respiratoires (toux et expectorations), de lavages de trompe, de féces, et d'écoulements vaginaux [75].

Les organes et les ganglions, sièges du foyer tuberculeux, les muscles proches de ce foyer et le sang (bien que la bacillémie soit rare et transitoire) contiennent également des bacilles vivants et sont donc des potentielles sources d'infection.

Par ailleurs, la résistance du bacille tuberculeux étant élevée dans l'environnement, l'eau, la nourriture et le matériel d'élevage peuvent être considérés comme des sources d'infection s'ils ont été antérieurement contaminés par des particules infectieuses.

**Les individus tuberculeux excréteurs constituent ainsi la principale source de contagion pour un éléphant.** Ces individus peuvent être un autre éléphant mais également n'importe quelle espèce de Vertébrés excrétant *M. tuberculosis* (ou *M. bovis*), notamment l'homme. Rappelons que les réservoirs naturels de la tuberculose sont l'homme pour *M. tuberculosis* et les bovins pour *M. bovis*.

Comme il l'a déjà été évoqué (cf §.3.2.2.b.i.), un éléphant peut être infecté par la tuberculose (c'est-à-dire héberger des bacilles vivants) sans pour autant excréter de mycobactéries (car elles sont enfermées dans des foyers profonds entourés d'une coque fibreuse ou calcifiée): ces individus ne sont pas contagieux. Seuls sont donc contagieux les tuberculeux actifs, évolutifs, excrétant des bacilles. La contagiosité est par ailleurs plus ou moins importante selon la forme de la tuberculose, les formes respiratoires ouvertes constituant le plus gros danger.

Chez les espèces où des études rigoureuses ont été menées concernant l'excration mycobactérienne (Homme, Bovins), il apparaît que l'excration est précoce, durable, importante (surtout dans les formes ouvertes) et intermittente [5]. De nombreuses inconnues demeurent quant aux modalités d'excration chez l'éléphant mais il semble cependant que l'excration du bacille soit également discontinue [50]. Ceci explique notamment les difficultés diagnostiques (risque de faux négatifs) rencontrées lorsque l'on cherche à mettre directement en évidence le bacille (cf 3.5.2.a).

Pour que l'animal soit infecté, ces matières virulentes doivent pénétrer dans l'organisme. Les modalités de cette contamination sont l'objet du paragraphe suivant.

## **b. Modalités de la contamination**

Il n'y a pas de transmission congénitale de la tuberculose. Cependant, les contacts étroits mère-éléphanteau et la transmission possible du bacille par le lait et le colostrum rendent la période post-partum particulièrement propice à la transmission de la maladie. Il n'en reste pas moins qu'isolé dès la naissance, un jeune issu d'une mère tuberculeuse peut être gardé.

La transmission de la maladie est donc uniquement horizontale : elle peut être directe (contacts étroits entre les individus, lactation) ou indirecte (via les locaux, le matériel d'élevage, l'eau ou les aliments).

**La voie de pénétration du bacille est principalement respiratoire** et correspond à l'inhalation de microparticules (contenant des mycobactéries) excrétées par des organismes tuberculeux. Une contamination par voie digestive (lait, viande, coprophagie) est également possible mais reste moins fréquente. Les voies vénériennes, cutanées et conjonctivales sont décrites mais anecdotiques.

A l'image de ce qui est décrit chez les carnivores, les bovidés et l'homme, la voie respiratoire est la plus commune chez les éléphants [49] : elle est d'une efficacité redoutable car les bacilles pénètrent alors par la trompe, progressent le long de la trachée et sont déposés dans les alvéoles pulmonaires, où les défenses immunitaires sont les plus faibles. La bactérie provoque des lésions qui sont très riches en germes, ce qui permet une dissémination importante de l'agent infectieux par les voies respiratoires, lors des violentes quintes de toux qui accompagnent parfois la maladie dans sa forme pulmonaire.

### **c. Facteurs de réceptivité**

D'une manière générale, rappelons que quelle que soit l'espèce concernée, les facteurs environnementaux, c'est-à-dire les conditions d'élevage et d'alimentation, jouent un rôle non négligeable dans la susceptibilité de l'individu vis-à-vis de la maladie (cf §.3.2.1.a.). De même, certains facteurs physiologiques (lactation, gestation, chaleurs) ou pathologiques (immunodépression, stress, lésions pulmonaires préexistantes) peuvent favoriser la contamination par un bacille tuberculeux ou la réactivation d'une infection latente.

En conclusion sur l'épidémiologie analytique, la grande majorité des éléphants tuberculeux ont été contaminés par inhalation de sécrétions respiratoires provenant d'individus excréteurs. D'un point de vue synthétique, voyons à présent quelle peut être l'origine d'un foyer tuberculeux et quelles en sont les modalités d'évolution.

## **3.3.3 Epidémiologie synthétique**

### **a. Origine de l'infection**

D'une manière générale, quatre origines sont possibles lors d'apparition d'un foyer de tuberculose dans une collection zoologique :

- l'introduction d'un animal infecté (à partir d'une autre institution zoologique),
- la présence de l'infection dans le « voisinage » (proximité d'élevages positifs, faune sauvage autochtone disséminatrice du bacille),

- la résurgence d'un précédent foyer (récidive liée à la persistance du bacille dans l'environnement ou à sa circulation à bas bruit au sein du troupeau).
- la transmission du bacille à partir d'un humain infecté (personnel ou visiteur).

L'importance respective de ces quatre sources possibles d'introduction de la maladie dans un groupe d'éléphants dépend grandement du contexte épidémiologique local. La prophylaxie défensive (cf § 3.6.1.) visera à limiter chacun de ces risques.

Chez l'éléphant, l'analyse de l'empreinte génétique par R.F.L.P. des souches de mycobactéries impliquées dans la tuberculose chez l'éléphant en Amérique du Nord a montré qu'au moins 7 souches différentes de *M. tuberculosis* étaient retrouvées chez des éléphants de 6 zones géographiques distinctes [79, 132]. Ceci a permis d'exclure l'hypothèse selon laquelle un individu unique serait à l'origine de l'ensemble des cas décrits sur le sol américain et suggère qu'il y a eu plusieurs sources d'infection plutôt qu'un unique cas index s'étant disséminé.

Une fois introduit dans la collection, le bacille peut se disséminer à d'autres éléphants, à d'autres animaux du parc et à l'homme. Les modalités de cette propagation sont discutées dans le paragraphe suivant.

### b. Modalités d'évolution

L'évolution de la maladie chez l'éléphant dépend aussi grandement des conditions épidémiologiques locales. Chez cette espèce, la **tuberculose est classiquement enzootique**, ce qui s'explique notamment par le délai variable d'incubation, le mécanisme de propagation de la maladie dans la population et l'alternance de phases de stabilisation et de réactivation.

La propagation de la maladie d'éléphant en éléphant est possible : l'analyse de l'empreinte génétique des souches de mycobactéries impliquées dans la tuberculose chez l'éléphant a montré que les individus d'une même institution étaient globalement infectés par la même souche de mycobactérie. Cela suggère qu'il existe bien une transmission entre les différents éléphants, à moins que la contamination n'ait eu lieu à partir d'une source commune (ce qui est moins probable) [79]. L'importance de cette transmission éléphant-éléphant reste

inconnue : elle ne semble cependant pas aisée car tous les éléphants en contact avec un éléphant infecté (appartenant au même troupeau par exemple) ne sont pas pour autant infectés [81, 132].

D'autre part, la transmission à l'homme et à d'autres animaux en contact même étroit semble faible, au vu des connaissances actuelles [24, 60, 87]. Cependant, la plupart des études ont été faites avec des méthodes diagnostiques peu sensibles et de plus amples informations devraient rapidement être disponibles.

Toutefois :

- Des transmissions inter-espèces sont décrites : des transmissions girafe-éléphant et tapir-éléphant ont pu, par exemple, être mises en évidence par génotypage (cf §.3.5.2.a.iii. pour la description des méthodes) lors d'un récent foyer de tuberculose dans un parc zoologique suédois [60, 87]. D'autres rapports suggèrent que des souches semblables de *M. tuberculosis* ont été partagées par des éléphants et d'autres espèces du parc [94].
- Une transmission homme-éléphant a été décrite : une même souche de *M. tuberculosis* a été isolée chez plusieurs éléphants et leur soigneur, sans que le sens de la transmission (homme à éléphant ou éléphant à homme) n'ait pu être élucidé. (cf §.3.6.1.d.) [74].

Lors de l'apparition d'un cas de tuberculose chez un éléphant, la capacité de dissémination zoonotique du bacille et les inter-relations complexes qui peuvent exister entre les différentes espèces du parc sont les deux facteurs clés à intégrer aux mesures de limitation de la propagation de la mycobactéries (cf §.3.6.2.).

Bien que de nombreuses inconnues demeurent, les données épidémiologiques sur la tuberculose de l'éléphant progressent à mesure que des cas se déclarent à travers le monde. Il en est de même pour le tableau clinique et lésionnel associé à l'infection chez les Proboscidiens.

### **3.4 Etude symptomatologique et lésionnelle de la tuberculose chez l'éléphant**

Les données cliniques et nécropsiques sont souvent les seuls paramètres directement accessibles au vétérinaire praticien dans un parc zoologique. Connaître la symptomatologie clinique et lésionnelle de la tuberculose chez l'éléphant permet ainsi d'être attentif aux signes évocateurs de la maladie afin de la suspecter précocément.

#### **3.4.1 Symptomatologie de la tuberculose chez l'éléphant**

D'une manière générale, la tuberculose est une maladie infectieuse à évolution chronique typique, c'est-à-dire caractérisée par [5] :

- Une évolution lente et progressive, s'étendant sur des mois voire des années.
- La survenue de poussées aigües, qui peuvent accélérer et/ou aggraver l'évolution.
- L'existence de formes asymptomatiques.

Par ailleurs, comme chez de nombreuses autres espèces, la tuberculose-maladie chez l'éléphant est caractérisée par [5] :

- Une grande variété des signes cliniques, qui peuvent toucher tous les organes (localisation plus ou moins fréquente notamment selon le mode de contamination).
- Des manifestations cliniques peu caractéristiques, dominées en fin d'évolution par un amaigrissement marqué des animaux (syndrome de déperissement).
- Un défaut de corrélation entre l'intensité des signes cliniques et l'importance des lésions.

Chez l'éléphant, de nombreuses formes sont cliniquement silencieuses, il est très important de retenir qu'il y a beaucoup plus d'individus infectés que d'individus malades. L'infection tuberculeuse peut rester latente pendant des années voire pendant toute la vie de l'animal. Sur les 34 cas de tuberculose confirmés aux Etats-Unis entre 1994 et 2005, 12 éléphants étaient totalement asymptomatiques de leur vivant. Le diagnostic a été posé lors de l'autopsie, et a même été considéré comme une découverte *post-mortem* « accidentelle » pour plusieurs d'entre eux [75].

Les signes cliniques, lorsqu'ils sont présents, sont habituellement tardifs et regroupent des symptômes non spécifiques, associés ou non à des symptômes respiratoires. De nombreux articles s'accordent sur le fait que ces signes ne sont présents qu'en fin d'évolution de la maladie chez l'éléphant et qu'aucun signe pathognomonique prémonitoire n'est habituellement visible [88].

Les signes cliniques non spécifiques rapportés chez les éléphants tuberculeux sont les suivants [5, 38, 49, 73, 81, 88, 107] :

- Perte de poids, amyotrophie et syndrome de dépérissement,
- Perte d'appétit,
- Léthargie et faiblesse,
- Intolérance à l'exercice.

Néanmoins, bien que rarement observés, des signes spécifiques d'affection respiratoire ont été décrits en fin d'évolution de la maladie chez l'éléphant [49, 88, 100, 106, 110] :

- Des cas de dyspnée sont rapportés : les animaux respirent alors laborieusement et peuvent également présenter une toux parfois forte. De l'halitose y est quelquefois associée.
- Des écoulements muco-purulents, oculaires ou nasaux, ont été décrits dans plusieurs cas très avancés (la mort est survenue généralement dans les jours suivant l'apparition de ces signes) [16, 38, 75].
- Plusieurs observations d'oedème ventral ont été rapportées chez des éléphants tuberculeux [100, 110]. Cependant, de nombreuses autres causes peuvent y être associées.

Lorsque ces signes sont présents et marqués, ils sont les témoins d'une atteinte pulmonaire sévère. Cela signifie fréquemment que l'animal est porteur et excréteur du bacille depuis un temps suffisant pour avoir été une menace pour ses congénères et pour l'homme [75].

*Remarque* : Même si l'atteinte pulmonaire est la localisation la plus fréquente chez l'éléphant, d'autres appareils peuvent également être impliqués : des désordres digestifs ou génito-urinaires peuvent notamment survenir dans de très rares cas [75].

Ainsi les signes cliniques sont discrets, non spécifiques et donc difficiles à interpréter. Le tableau lésionnel, quant à lui, est habituellement plus évocateur.

### **3.4.2 Tableau lésionnel lors de tuberculose chez l'éléphant**

D'un point de vue macroscopique, quelle que soit l'espèce concernée, la tuberculose est caractérisée par des lésions [5] :

- Soit localisées et bien délimitées : les tubercules.
- Soit étendues et mal délimitées : les infiltrations et épanchements tuberculeux (de nature exsudative).

A l'échelle microscopique, la lésion la plus représentative, considérée comme hautement spécifique de la tuberculose, est le follicule tuberculeux [5] constitué :

- d'un centre nécrotique homogène (caséum),
- d'une première couronne de cellules (histiocytes, macrophages), associées ou non à des cellules géantes multinucléées, les cellules de Langhans.
- d'une seconde couronne purement lymphocytaire.

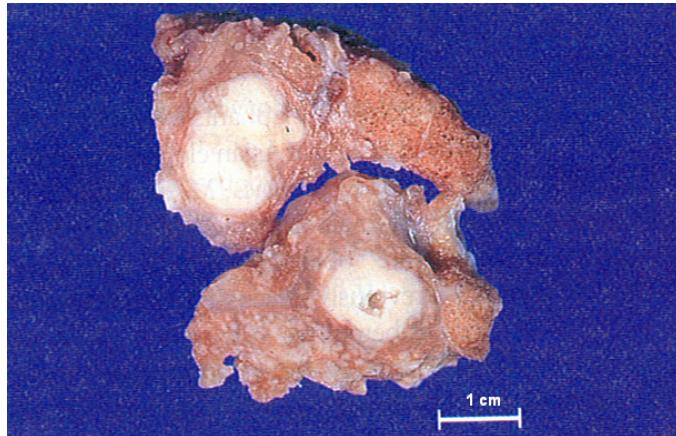
L'évolution de cette lésion se réalise fréquemment dans le sens d'une calcification du caséum avec fibrose périphérique.

Chez l'éléphant, les lésions sont souvent limitées aux poumons et aux nœuds lymphatiques thoraco-bronchiques [88] ; des lésions trachéales sont également parfois présentes [35]. Cependant, l'implication de sites extra-thoraciques, bien que moins fréquente, est rapportée : des tuberculoses extra-pulmonaires ou disséminées ont ainsi été décrites chez l'éléphant [2, 38, 75, 91]. Le foie, les reins, la rate, les surrénales et le tractus génito-urinaire doivent notamment faire l'objet d'une attention particulière. Les lésions peuvent être très volumineuses : des abcès de 15 cm de diamètre, ainsi que des nœuds lymphatiques infiltrés atteignant 30 cm ont été rapportés [35].

Il est important de retenir que toutes les lésions viscérales (microscopiques et/ou macroscopiques) sont systématiquement accompagnées de lésions ganglionnaires (ganglions satellites, cf §.3.2.2.a). Ces dernières étant parfois les seules présentes, il est primordial de rechercher activement les lésions dans les nœuds lymphatiques, et ceci, même en l'absence de lésions pulmonaires [5].

Malgré le polymorphisme des lésions tuberculeuses rencontrées chez l'éléphant, il est possible de distinguer deux tableaux lésionnels différents selon le stade d'évolution de la maladie :

- Dans les formes non extensives : des lésions de type nodulaire s'exprimant par le

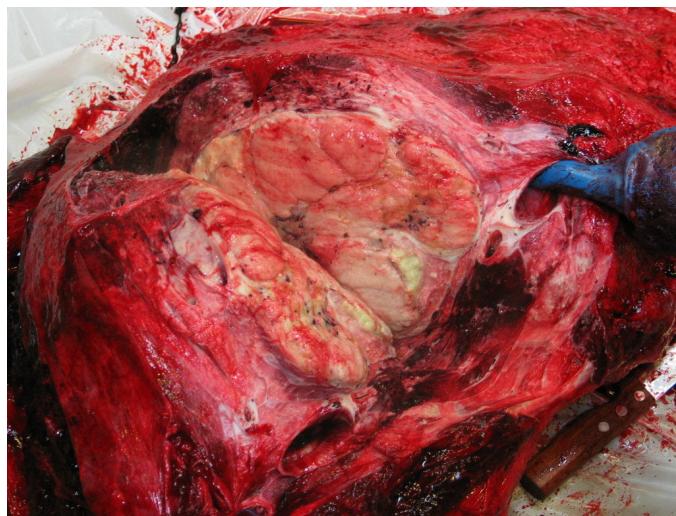


**Figure 8 : Granulome tuberculeux à nécrose caséuse centrale. Les gros nódulos sont entourés par des granulomes épithélioïdes satellites plus petits. *E. maximus*, femelle, 45 ans.**

(Photo : Hailu Kinde, UC Davis, 2001, [88])

- Dans les formes extensives (cas avancés) : des lésions sévères caséo-calcaires et

développement de tubercules plus ou moins volumineux, grossièrement sphériques, nettement perceptibles et bien délimités sont les plus fréquentes. Ces nódulos granulomateux renferment parfois un centre caséux nécrotique et sont notés, la plupart du temps, dans le tissu pulmonaire et les nœuds lymphatiques thoraco-bronchiques (qui apparaissent ainsi hypertrophiés).



**Figure 9 : Section d'un abcès pulmonaire caséux.**

***L. africana*, femelle, 21 ans.**

(Photo : C.Vitaud, Safari parc de Peaugres, 2005)

cavaires sont observées dans le parenchyme pulmonaire et impliquent souvent l'ensemble des lobes. Ces lésions résultent fréquemment en de larges abcès pulmonaires (jusqu'à 15 cm de diamètre), colonisés par *M. tuberculosis*, mais également par des bactéries opportunistes, telles que *Pseudomonas aeruginosa* [75, 77].

Le tableau histologique typique lors de tuberculose chez un éléphant est donc composé de granulomes épithélioïdes à cellules géantes (parfois à nécrose caséeuse centrale) dans le noeud lymphatique initial et les jeunes lésions pulmonaires et d'une pneumonie caséeuse et pyogranulomateuse extensive dans les formes avancées. Bien que distribués de manière éparse, les BAAR sont plus facilement trouvés dans les aires centrales caséeuses des poumons, que dans les nœuds lymphatiques, où ils sont typiquement rares [75, 77, 88].

Bien qu'il soit difficile d'établir des statistiques concernant les prévalences des différents tableaux lésionnels, il semble que les formes extensives prédominent. Cependant, il est très important de noter que *M. tuberculosis* a été isolé plusieurs fois d'un nœud lymphatique sans qu'aucune lésion (ni macroscopique, ni microscopique, ni viscérale, ni ganglionnaire) n'ait pu être mise en évidence à l'autopsie.

Entre 1996 et avril 2002, sur les 10 cas confirmés et morts de tuberculose en Amérique du Nord [78] :

- 6 présentaient une affection extensive pulmonaire et/ou viscérale,
- 2 présentaient une affection localisée pulmonaire associée à de la fibrose,
- 2 ne présentaient aucune lésion à l'autopsie. La mycobactéries a alors été isolée « accidentellement » d'un nœud lymphatique unique.

Par ailleurs, s'il est vrai que les éléphants cliniquement malades de leur vivant présentent très fréquemment des lésions extensives (impliquant une grande partie du tissu pulmonaire) à l'autopsie, la réciproque n'est pas toujours vérifiée : l'observation de lésions sévères chez des individus asymptomatiques a été plusieurs fois rapportée. Cette absence de corrélation entre l'expression clinique et la sévérité du tableau lésionnel constitue évidemment l'une des difficultés diagnostiques de la tuberculose chez l'éléphant.

Enfin, des plaques tuberculeuses trachéales et bronchiques ainsi qu'un exsudat caséux ou mucopurulent tapissant les voies respiratoires supérieures (fortement évocateur d'une excrétion active de la mycobactéries) ont été rapportés dans des stades précoce comme tardifs de tuberculose. Ces observations suggèrent que l'excrétion de *M. tuberculosis* pourrait survenir à n'importe quel stade de la maladie, et pas uniquement dans les formes tardives, contrairement aux idées reçues [75, 77].

En conclusion, les symptômes cliniques et le tableau lésionnel associés à la tuberculose chez l'éléphant sont donc relativement peu spécifiques. Le diagnostic de l'affection ne peut ainsi reposer sur ces seules observations et il est nécessaire de recourir à des moyens expérimentaux pour pallier ces insuffisances. De nombreux outils diagnostiques ont été mis en place récemment pour la détection de cette maladie chez les Proboscidiens. La présentation de ces différentes techniques et la discussion de leurs performances font l'objet de la partie suivante.

### **3.5 Outils diagnostiques disponibles lors de tuberculose chez l'éléphant**

Le diagnostic de la tuberculose chez l'éléphant est très difficile à établir, notamment du vivant de l'animal. De nombreux tests existent mais très peu d'entre eux ont été validés chez cette espèce. La mise au point d'outils diagnostiques performants est le véritable enjeu de cette maladie chez les Proboscidiens car ces outils ont plusieurs intérêts capitaux :

- Confirmer la présence d'une maladie lors de suspicion clinique ou épidémiologique,
- Connaître le statut sanitaire de l'animal en dehors de toute suspicion (dépistage),
- Permettre un suivi de l'efficacité des traitements lors de la mise en place d'une thérapie antituberculeuse.

Dans ce chapitre, les outils diagnostiques cliniques et anatomo-pathologiques sont arbitrairement séparés des outils expérimentaux. Cependant, il est évident que le praticien doit combiner l'ensemble de ces tests afin d'établir le diagnostic le plus probable pour l'animal en question.

### **3.5.1 Diagnostic clinique et anatomo-pathologique**

Les symptômes cliniques (*ante-mortem*) et les lésions anatomo-pathologiques (*post-mortem*) rencontrées chez les éléphants tuberculeux ont été décrits dans la partie précédente (cf § 3.4.). Seules sont reprises ici les grandes lignes de ces anomalies afin de comprendre en quoi elles peuvent permettre l'établissement d'un diagnostic de tuberculose, et surtout afin d'illustrer les limites de ces diagnostics clinique et anatomo-pathologique.

#### **a. Diagnostic *ante-mortem***

L'établissement du diagnostic clinique *ante-mortem* chez un éléphant comprend avant tout un examen clinique approfondi, complété ensuite par des examens complémentaires appropriés.

##### **i. Examen clinique et diagnostic différentiel**

Comme évoqué précédemment (cf § 3.4.1.), les signes cliniques de la tuberculose chez l'éléphant sont inconstants :

- Les formes silencieuses sont fréquentes,
- Les signes (lorsqu'ils sont présents) sont souvent tardifs et non spécifiques,
- Les localisations sont variées (pulmonaire ou extra-pulmonaire).

Les signes cliniques étant peu spécifiques, de nombreux diagnostics différentiels peuvent être formulés. Lorsque seul un amaigrissement, une anorexie ou un abattement est noté (ce qui illustre le tableau clinique le plus fréquemment rencontré), différentes affections peuvent y correspondre, notamment une affection dentaire, un phénomène néoplasique, du parasitisme gastro-intestinal ou une maladie dégénérative.

Par ailleurs, certaines localisations sont sources d'erreur : il est en effet plus fréquent de suspecter une affection locomotrice (d'origine osseuse ou articulaire) lors de boiterie ou une infection urogénitale (vaginite par exemple) lors d'écoulement vulvaire que de suspecter une tuberculose.

Bien qu'il existe d'autres agents infectieux à localisation pulmonaire pouvant induire une pneumonie chez l'éléphant, des signes cliniques en faveur d'une affection respiratoire (dyspnée, jetage, toux) doivent faire figurer la tuberculose au premier rang des hypothèses diagnostiques chez cette espèce.

Dans tous les cas, la tuberculose doit rester constamment à l'esprit du vétérinaire lorsqu'un éléphant présente une affection chronique ou d'origine inconnue. Tous les examens complémentaires doivent alors être mis en œuvre pour confirmer ou infirmer cette suspicion.

## ii. **Examens complémentaires**

Les examens complémentaires sont limités chez l'éléphant en raison notamment des difficultés de contention, des risques à l'anesthésie et de l'inadaptation du matériel. Bien qu'ils ne permettent pas d'établir un diagnostic définitif chez cette espèce, ces examens complémentaires peuvent fournir des indications intéressantes pour l'orientation diagnostique.

### **Détermination des paramètres hématologiques et biochimiques**

Bien que la biologie clinique ne permette l'établissement d'un diagnostic de certitude de tuberculose chez aucune espèce, de nombreux praticiens ont cherché à savoir s'il existait une corrélation entre les valeurs des paramètres hémato-biochimiques d'un éléphant et son statut infectieux vis-à-vis de la tuberculose.

Une étude, réalisée en 2001, avait montré qu'il existait des différences significatives pour certains paramètres hématologiques et biochimiques entre des individus sains et des individus infectés par la tuberculose [42]. Ainsi, en comparant les valeurs déterminées chez 20 éléphants en bonne santé (et négatifs à la culture mycobactériologique) avec celles d'éléphants positifs à la culture (et excréteurs au moment du prélèvement sanguin), il était apparu que :

- Les valeurs des ratios A/G (albumine/globuline) et urée/créatinine, de l'hémoglobinémie et de la glycémie étaient plus basses chez les éléphants infectés.
- La calcémie et les concentrations sanguines en plaquettes, en neutrophiles, en éosinophiles et en bicarbonates étaient plus élevées chez les éléphants infectés.

Une étude plus récente et plus large, menée sur 115 éléphants asiatiques (Népal, janvier 2006) conclut que seuls deux de ces changements sont statistiquement significatifs [39]. Ainsi, comparativement aux témoins négatifs, les animaux tuberculeux semblent avoir :

- Un rapport urée/créatinine significativement plus élevé ( $p=0,047$ ).
- Un ratio A/G significativement plus faible ( $p=0,012$ ).

Toutefois, ces différences biochimiques ne peuvent constituer un critère crédible de suspicion, étant donné qu'elles ne sont aucunement spécifiques de la tuberculose :

- Une augmentation du rapport urée/créatinine est difficile à interpréter : elle peut être liée à des désordres d'origine rénale comme à une simple augmentation de l'urémie.
- De nombreuses affections chroniques (processus inflammatoires, infectieux, ou néoplasiques) provoquent par ailleurs une diminution du rapport A/G (souvent due à une augmentation des  $\gamma$ -globulines).

Ainsi l'apport de la biologie clinique dans le diagnostic de la tuberculose reste limité chez l'éléphant. Cependant, le suivi des paramètres hémato-biochimiques reste un examen de choix dans la surveillance de l'état général de l'animal, notamment tout au long du traitement anti-tuberculeux lorsque celui-ci est mis en place.

### Clichés radiographiques

La réalisation de clichés radiographiques du thorax fait partie des examens couramment réalisés lors de suspicion d'une tuberculose chez l'homme. La localisation et l'aspect radiographique des lésions fournissent des indications précieuses permettant souvent de confirmer le diagnostic et d'estimer le stade clinique de la maladie.

Chez l'éléphant, la réalisation de radiographies thoraciques n'est pas faisable en pratique à l'heure actuelle chez un adulte, pour des raisons d'inadaptation du matériel radiologique. Cependant, elle est décrite sur des jeunes éléphants, mais reste réservée aux structures très équipées[81]. Par ailleurs, l'interprétation des clichés est délicate et les valeurs prédictives de cet examen sont inconnues, étant donné le peu de données actuellement disponibles.

## Analyse d'échantillon de souffle : “Breath sampling Method”[76]



Ce test est basé sur la mise en évidence directe des antigènes mycobactériens dans le souffle lors d'une expiration forcée (« *breath sampling method* »). Cette méthode est utilisée expérimentalement chez l'Homme et semble prometteuse.

Elle est en cours d'investigation chez l'éléphant. Si ce test est validé, il pourrait être très utile pour détecter les animaux excréteurs et constituerait un outil diagnostique de terrain non invasif, automatisé et avec lecture des résultats sans délai [76].

**Figure 10 : Analyseur d'échantillon de souffle (Mikota, 2007, [76])**

Différents prélèvements (sang, urine, selles, échantillons de lavage de trompe) sont réalisables *in vivo*. Les examens effectués sur ces échantillons (bactériologie et sérologie notamment) peuvent également être considérés comme des examens complémentaires. Ils sont traités ci-après dans la partie « diagnostic expérimental » pour des raisons de convenance.

En conclusion, du fait de la fréquence des infections inapparentes, de l'absence de spécificité des symptômes et des possibilités limitées d'examens complémentaires, le diagnostic clinique *ante-mortem* est difficile et toujours insuffisant. L'apport des données *post-mortem* peut, au contraire, permettre une orientation diagnostique quasi certaine.

### **b. Diagnostic post-mortem**

Après la mort de l'animal, des lésions évocatrices de la tuberculose peuvent être découvertes directement à l'autopsie (lésions macroscopiques) et/ou lors de l'analyse histopathologique des organes (lésions microscopiques). L'objet de ce paragraphe n'est pas de décrire les lésions observées (ce qui a été fait précédemment, cf § 3.4.2.) mais de comprendre ce que peuvent apporter les données anatomo-pathologiques dans le diagnostic de la tuberculose chez l'éléphant.

## i. Recherche de lésions macroscopiques à l'autopsie

Principe : A l'autopsie, le diagnostic de la tuberculose repose avant tout sur l'observation de tubercules, présents à la fois dans l'organe lésé et/ou dans les ganglions satellites de cet organe. Les lésions ganglionnaires doivent être systématiquement recherchées car elles peuvent être présentes sans qu'aucune lésion viscérale n'y soit associée (cf §.3.4.2.).

Lors de tuberculose chez l'éléphant, le tableau nécropsique typique consiste en la présence de tubercules volumineux dans le parenchyme pulmonaire et dans les nœuds lymphatiques thoraco-bronchiques. Bien que ce schéma type soit le plus fréquemment rencontré, il existe un grand polymorphisme des lésions tuberculeuses tant dans leur forme que dans leur taille ou leur localisation :

- Du tubercule bien délimité, purulent, calcifié ou fibrotique à l'infiltration exsudative, les lésions peuvent revêtir des aspects très divers en fonction de l'individu et du stade de l'infection.
- Les lésions peuvent être discrètes et éparses comme volumineuses et étendues.
- Des cas de tuberculose extra-pulmonaire ou disséminée ont été décrits chez l'éléphant [75].

### Performances :

Bien que d'autres affections puissent provoquer des lésions macroscopiques semblables, l'observation de tubercules (ou de lésions précédemment citées) chez un éléphant, quel que soit l'organe concerné, constitue une suspicion de tuberculose devant être prise très au sérieux. Par ailleurs, bien que cela ait déjà été décrit [78], il est rare de diagnostiquer une tuberculose sur un éléphant sans qu'aucune lésion ne soit décelée à l'autopsie : l'examen nécropsique est ainsi considéré comme étant hautement sensible. Cependant, le pourcentage d'éléphants infectés sans pour autant présenter de lésions *post-mortem* pourrait également être sous-évalué par un manque d'investigation complémentaire lorsque l'autopsie ne révèle pas d'anomalie macroscopique.

La réalisation d'une autopsie systématique, à chaque fois qu'un éléphant meurt, a longtemps été le seul moyen fiable de dépister la maladie chez cette espèce et reste un excellent outil dans la surveillance globale de l'affection chez les Proboscidiens. Les valeurs prédictives de l'examen nécropsique sont d'autant meilleures que l'autopsie est associée à l'analyse histologique et bactériologique d'échantillons prélevés.

En pratique : La carcasse doit donc être examinée dans son ensemble et les poumons, le foie, les reins, la rate, les surrénales et le tractus génito-urinaire, ainsi que les ganglions associés à ces organes, doivent être inspectés avec soin. Des prélèvements de ces organes doivent être effectués et envoyés au laboratoire d'histopathologie.

La réalisation d'une autopsie sur un éléphant doit être un acte minutieux, effectué avec rigueur et précision. Il est souhaitable que de nombreuses personnes puissent aider, que des vétérinaires expérimentés (pathologistes et vétérinaires ayant déjà assisté à une autopsie d'éléphant) soient présentes et qu'un protocole pré-établi soit respecté tout au long de la procédure. Un protocole d'autopsie a été édité par des spécialistes américains, les grandes lignes y sont rapportées en **annexe A** de ce manuscrit.

Les recommandations américaines quant aux démarches à accomplir lorsqu'un éléphant meurt ou est euthanasié, que l'animal soit suspect ou non de tuberculose, sont discutées dans la quatrième grande partie de ce document.

Conclusion : Bien que l'autopsie ne soit pas un moyen diagnostique parfaitement sensible ni hautement spécifique, elle permet d'orienter fortement les hypothèses diagnostiques en faveur d'une tuberculose lorsque des tubercules sont décelés chez un éléphant. L'envoi de pièces anatomiques au laboratoire d'histopathologie afin d'effectuer une analyse microscopique des lésions permet d'affiner la suspicion.

## ii. Recherche de lésions microscopiques à l'histopathologie

Principe : L'examen histopathologique a pour but de détecter la réponse pathologique de l'hôte. Lors de suspicion de tuberculose, cet examen est fondé sur la recherche de lésions microscopiques fondamentales présentes au sein de prélèvements faits au cours de l'autopsie. Chez l'éléphant, la lésion la plus représentative est le follicule tuberculeux (décris précédemment, cf § 3.4.2.). Cependant, selon le stade de l'infection, les lésions peuvent prendre des aspects très variés et les mycobactéries peuvent être rares ou disséminées.

Par ailleurs, les prélèvements font également l'objet de colorations spécifiques et immunohistochimiques (type Ziehl-Neelsen, cf 3.5.2.a.), qui ont pour but de mettre en évidence les mycobactéries : ce sont des tests d'orientation rapides mais moins performants que la mise en culture. De plus, il existe dorénavant une technique de P.C.R. utilisable sur des tissus fixés dans du formol et donc directement exploitable par les laboratoires d'histopathologie [83,

84] : les résultats préliminaires sont encourageants lorsque la méthode est employée en combinaison avec la mise en culture [88]. Ces techniques de diagnostic direct sont reprises en détail dans la partie « diagnostic expérimental » ci-après (cf § 3.5.2.a.).

Remarque : L'examen histologique peut également être réalisé à partir de matériel provenant d'un animal vivant (biopsie ganglionnaire ou tissulaire, cytologie d'un liquide d'épanchement) mais ces échantillons ne sont, à l'heure actuelle, pas disponibles chez l'éléphant en raison des difficultés de prélèvement.

#### Performances :

L'examen histologique n'est pas spécifique de la tuberculose : de nombreuses autres mycobactéries (notamment les mycobactéries opportunistes, cf §.3.1.1.b.) peuvent provoquer des granulomes. Il est alors impossible d'affirmer qu'ils sont dus à un bacille tuberculeux plutôt qu'à n'importe quelle autre mycobactérie. Il s'agit donc d'un élément de présomption et non de certitude.

La sensibilité de cet examen n'est pas parfaite non plus, elle dépend d'une part des compétences du pathologiste et d'autre part de la qualité du matériel observé. En effet, la pertinence des échantillons envoyés ainsi que leurs modalités de prélèvement, de conservation et de transport influent fortement sur les résultats de l'examen. C'est ce qui explique l'importance de former les vétérinaires de terrain aux techniques de prélèvements ou de disposer de pathologistes sur place lors d'une autopsie sur un éléphant.

En pratique : Des sections représentatives de toutes les lésions macroscopiques doivent être effectuées ainsi que des prélèvements de poumons, de foie, de rate et de nœuds lymphatiques mésentériques et bronchiques (même si aucune lésion n'est visible macroscopiquement). Ces échantillons doivent être fixés dans du formol à 10 %, disposés dans des conteneurs étanches puis envoyés dans des centres agréés, en y joignant le rapport d'autopsie détaillé. Les documents CITES adéquats (l'éléphant appartenant à l'annexe I de la Convention de Washington) doivent également accompagner les prélèvements bien que les mesures soient allégées étant donné que les échantillons sont formolés (cf §.1.5.2.).

De nombreux laboratoires d'anatomo-histopathologie sont capables de réaliser ce type d'examen dans un délai d'une semaine environ. Il n'existe pas réellement de laboratoires de référence. Les coordonnées des pathologistes spécialistes (USA) sont tout de même indiquées à titre indicatif en **annexe B**.

Conclusion : Bien que l'examen histopathologique ne permette pas d'affirmer avec certitude que l'animal est tuberculeux, il reste un excellent diagnostic d'orientation chez l'éléphant.

Le diagnostic clinique *ante-mortem* est donc toujours insuffisant et les lésions macroscopiques et microscopiques *post-mortem*, bien qu'intéressantes, ne sont pas pathognomoniques. Ainsi, il est nécessaire d'associer à ces examens une ou plusieurs épreuves de diagnostic expérimental.

### **3.5.2 Diagnostic expérimental**

Afin de diagnostiquer la tuberculose chez un éléphant, les vétérinaires ont actuellement une panoplie de tests *in vitro* à leur disposition. De nombreuses techniques innovantes ont été mises au point au cours des dix dernières années : elles sont fondées sur la détection des acides nucléiques, sur l'immunité à médiation cellulaire ou sur la détection d'anticorps et viennent compléter efficacement la culture bactériologique, méthode de référence en mycobactériologie.

Cependant, aucune de ces techniques n'est fiable à 100% et aucune ne le sera jamais ! Le test parfait n'existe pas, en particulier chez une espèce sauvage et pour une maladie aussi complexe du point de vue de la pathogenèse que la tuberculose. Le praticien doit donc connaître et maîtriser l'ensemble de ces tests afin de choisir quelle combinaison sera la plus pertinente en fonction du contexte clinique et épidémiologique.

Les techniques diagnostiques peuvent être scindées en méthodes :

- directes : elles reposent alors sur la mise en évidence du bacille, de l'un de ses composants ou de l'une de ses propriétés.
- indirectes : elles reposent alors sur la mise en évidence de la réponse de l'hôte, le plus souvent sur une réaction immunitaire à médiation cellulaire ou humorale.

Après avoir détaillé les différentes techniques (directes puis indirectes), une synthèse sur les différentes options est proposée ainsi qu'une discussion sur la fiabilité de ces tests et sur les pistes de recherche à développer dans l'avenir.

## a. Méthodes de diagnostic direct

Les techniques de diagnostic direct sont basées sur la détection de l'organisme mycobactérien lui-même (ou de l'un de ses composants ou de l'une de ses propriétés). Ces méthodes ont toujours été les méthodes de référence (« *gold standard* ») en mycobactériologie : leur très haute spécificité explique qu'elles constituent souvent un diagnostic définitif lors de résultat positif. Cependant, l'important délai d'obtention des résultats et parfois leur manque de sensibilité témoignent des limites de ces tests.

Les méthodes bactériologiques classiques (mise en évidence de l'acido-alcoolo résistance, culture mycobactériologique) restent les méthodes les plus couramment utilisées. Cependant, de nouvelles techniques bactériologiques, qui tendent à diminuer les délais des méthodes classiques, sont actuellement disponibles. Il s'agit notamment de méthodes basées sur la détection des acides nucléiques de la mycobactéries.

Par ailleurs, la qualité et la pertinence des prélèvements et la richesse de l'échantillon en mycobactéries sont les principaux facteurs limitant les performances de ces techniques. Les différents échantillons utilisables (ainsi que leurs techniques de prélèvement) sont présentés ci-dessous, préalablement à l'exposition des techniques bactériologiques classiques puis moléculaires.

### i. Matériel utilisé lors de diagnostic direct

Les tests de diagnostic direct sont réalisés à partir de matériel clinique ou pathologique hébergeant des mycobactéries. Le choix de l'échantillon et les précautions à prendre lors des prélèvements sont d'une importance capitale. Il est par ailleurs indispensable d'être conscient des aléas liés à ces prélèvements afin de comprendre les limites inhérentes à toute technique de diagnostic direct.

#### Echantillons utilisables

Etant donné que la localisation des lésions peut être variée lors de tuberculose (cf §.3.4.2.), les échantillons biologiques (cliniques ou pathologiques) dans lesquels il est possible de mettre en évidence la mycobactéries impliquée sont très divers :

- Lors d'une autopsie sur un l'éléphant, tous les organes hébergeant des lésions macroscopiques suspectes doivent être envoyés en analyse bactériologique et histopathologique (cf § 3.5.1.b.ii).
- In vivo, les possibilités sont plus limitées chez l'éléphant. Chez l'homme, de nombreux prélèvements sont réalisés lors de suspicion de tuberculose : crachat, lavage broncho-alvéolaire, lavage gastrique, urine, pus, biopsie (tissulaire ou ganglionnaire), L.C.S., moelle et liquides de ponction (liquide pleural, péritonéal, péricardique, ascite) en sont les principaux exemples. Cependant, la majorité de ces échantillons ne peut être prélevée chez l'éléphant pour des raisons techniques (les ponctions et les biopsies étant difficilement réalisables chez cette espèce).

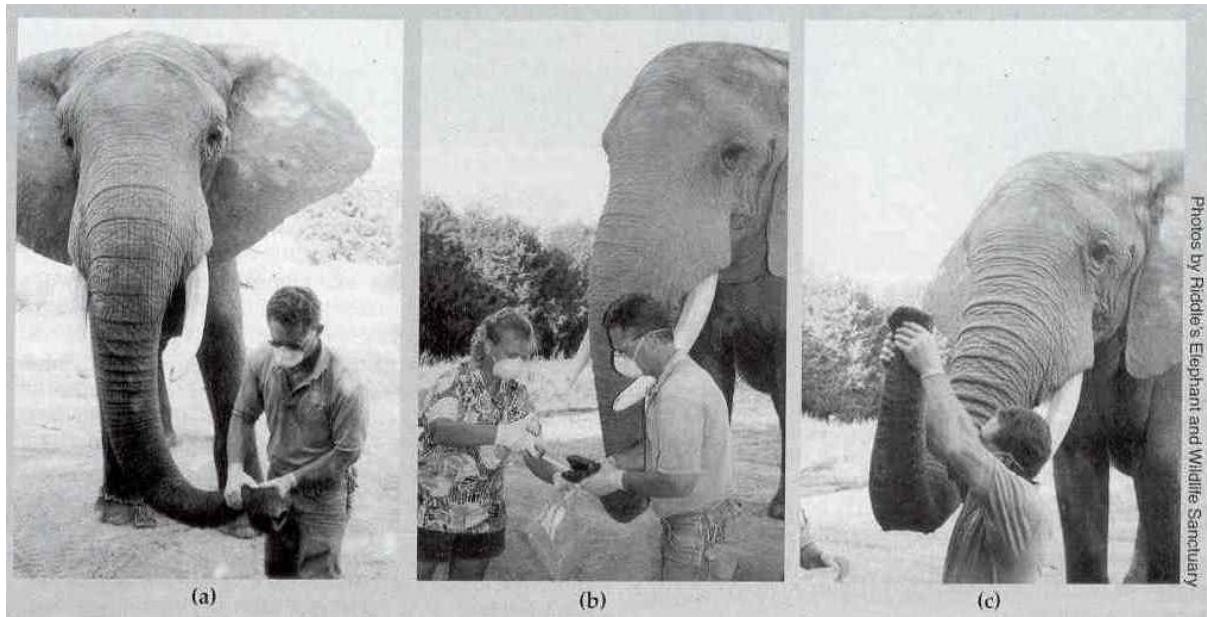
Chez l'éléphant, les matériaux susceptibles de contenir des mycobactéries et étant facilement accessibles pour le vétérinaire sont principalement : les expectorations (lors de toux ou d'éternuement), l'urine et les fèces. Des recherches de mycobactéries ont également été décrites sur du liquide de ponction articulaire et des prélèvements vaginaux (lors d'écoulement). Il est évident que les échantillons les plus pertinents restent ceux provenant de l'appareil respiratoire, l'excrétion urinaire et fécale étant faible. Les expectorations spontanées étant rares, une technique de lavage de trompe permettant l'exploration de l'appareil respiratoire distal de l'éléphant (sans anesthésie) a été mise au point (cf paragraphe suivant). Ainsi, **le matériel de choix lors d'une recherche in vivo de mycobactéries chez l'éléphant est l'échantillon de lavage de trompe.**

Remarque : La bacillémie étant transitoire et très brève, le sang n'est pas un échantillon utilisable lors de recherche directe de l'antigène.

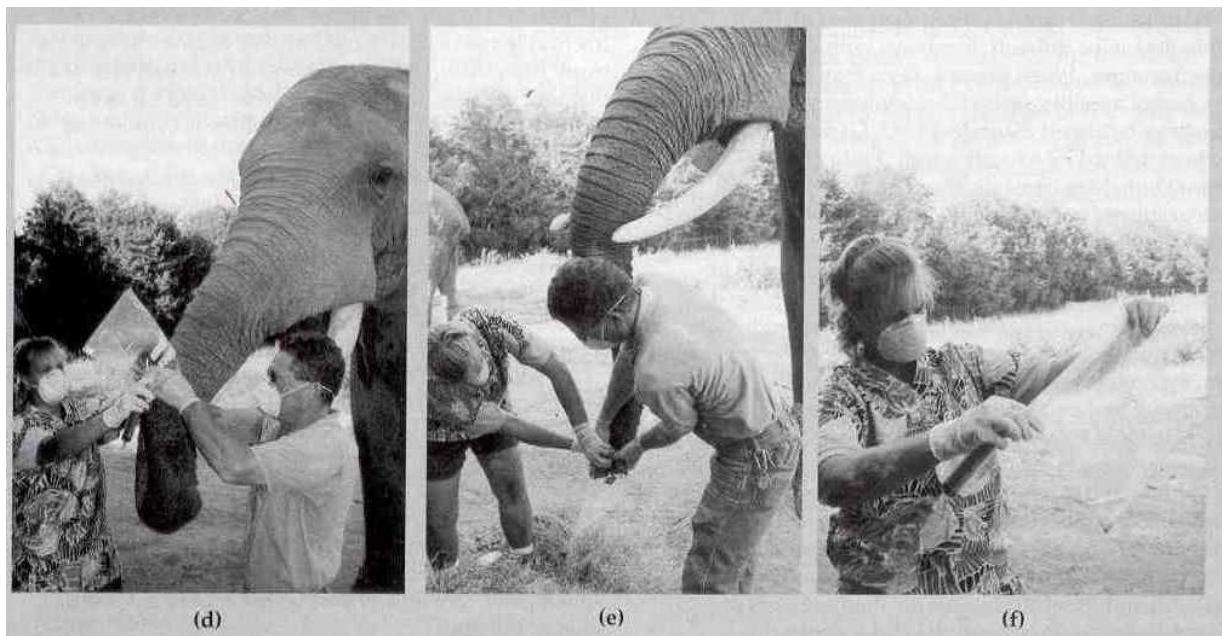
### Principe de la technique de lavage de trompe [50]

La description précise de cette méthode est détaillée dans l'**annexe C** ; les grandes lignes de cette technique sont exposées ci-dessous en 6 étapes :

- L'extrémité de la trompe est saisie par l'entraîneur (a)
- Une seringue contenant 60 mL de solution saline stérile à 0,9 % est introduite dans l'une des narines de l'éléphant et les 60 mL sont instillés rapidement (b)
- La trompe est soulevée pendant 20 à 30 secondes environ par l'entraîneur ou par l'éléphant lui-même (sur ordre) afin que la solution s'écoule aussi profondément que possible dans la trompe (c)



- Un sac plastique stérile est ensuite placé à l'extrémité de la trompe (d)
- La trompe est abaissée afin de récolter le liquide (20 à 40 mL doivent être approximativement récupérés et du mucus doit être idéalement présent dans l'échantillon). Dans la mesure du possible, l'animal doit souffler (sur ordre) dans le sac afin d'explorer l'ensemble de l'appareil respiratoire supérieur (e)
- Le prélèvement est enfin transféré avec précaution dans un pot stérile de 50 mL puis envoyé au laboratoire pour analyse bactériologique (f)



**Figure 11 : Description de la technique du lavage de trompe en six étapes (figures (a) à (f)) [50]**

Cette procédure doit être effectuée, dans l'idéal, le matin afin d'obtenir un échantillon représentatif de la flore nasale de la nuit précédente ; par ailleurs, l'animal ne doit pas avoir eu accès à l'eau dans les deux heures précédant la collecte afin d'éviter un effet de dilution.

L'excrétion étant très probablement intermittente, la « *triple sample method* » est de règle : trois lavages de trompe sont effectués sur une semaine, à jours alternés (lundi, mercredi et vendredi par exemple). Cette technique permet de limiter le risque d'obtenir des résultats faussement négatifs (sans pour autant s'en affranchir).

Cette technique ne nécessite aucune sédation et n'induit pas un stress démesuré chez l'animal. Cependant, elle impose que l'éléphant soit coopératif et préalablement entraîné à cet exercice : il doit accepter que l'extrémité de sa trompe soit manipulée et être capable de souffler sur ordre de l'entraîneur. Si un entraînement médical est fait régulièrement sur l'animal, ces deux nouveaux ordres peuvent être acquis en 2 à 4 semaines selon l'individu. Il est évidemment judicieux d'entraîner les éléphants à cet exercice à tout moment. En effet, dans un contexte de suspicion épidémio-clinique de tuberculose, ce délai de 2 à 4 semaines peut s'avérer très long. Par ailleurs, la technique est réalisable que l'entraînement se déroule en contact libre ou en contact protégé (à travers les barreaux).

Cependant, la technique est difficile à maîtriser parfaitement et il est probable qu'un grand nombre de prélèvements ne soient pas effectués dans des conditions optimales. Il est notamment fréquent que :

- L'éléphant ne souffle pas suffisamment dans le sac et donc que le prélèvement ne soit pas représentatif de l'ensemble du tractus respiratoire supérieur.
- L'échantillon contient des restes de nourriture et/ou une flore bactérienne importante. Bien que cela ne gêne que très rarement les analyses ultérieures, il est conseillé de procéder à un deuxième lavage de trompe si ces contaminants semblent trop abondants [50].

## Recommandations pour les prélèvements

La règle n°1 lors de prélèvement ou de manipulation d'échantillons susceptibles d'héberger une mycobactéries est de garder à l'esprit que la tuberculose est une zoonose grave. Ainsi, il est indispensable de prendre toutes les précautions nécessaires afin de minimiser les risques de transmission à l'homme : le port de gants et d'un masque et une bonne aération des locaux constituent le strict minimum (notamment lors de lavage de trompe où le risque de transmission est très important).

La règle n°2 concerne le fait que l'éléphant soit une espèce inscrite en annexe I de la Convention de Washington (CITES) (cf § 1.5.2.). Ainsi tout échantillon, qu'il soit prélevé *in vivo* ou *post-mortem*, doit être accompagnés de certificats CITES autorisant sa mise en circulation.

Par ailleurs, quel que soit l'échantillon prélevé, il est recommandé :

- d'effectuer les prélèvements avant la mise en place de toute thérapie antituberculeuse (sauf si l'objectif est de surveiller l'efficacité du traitement).
- d'éviter les prélèvements par écouvillonnage (ils ne permettent que très rarement d'isoler la mycobactéries)
- de réaliser les prélèvements dans des conditions optimales de « stérilité » (ou du moins de propreté), car la flore environnementale contaminante, saprophyte ou non, est gênante.
- d'utiliser de l'eau stérile tout au long de la procédure (notamment lors de lavage de trompe), l'eau du robinet pouvant contenir des mycobactéries atypiques et être à l'origine d'erreurs par excès.
- d'utiliser des récipients stériles, non cassables, à fermeture hermétique, à usage unique et sans additif.
- de ne pas utiliser d'EDTA, qui inhibe la croissance mycobactérienne.
- de conserver les échantillons à l'abri de la chaleur et de la lumière du jour.
- d'envoyer les prélèvements identifiés au laboratoire, sous couvert du froid (emballés dans des packs de glace), dans l'idéal le jour de la collecte. Si ce n'est pas possible, les échantillons seront réfrigérés à 4°C (si l'envoi a lieu dans les deux jours) ou congelés à - 20 °C ou - 80 °C (dans le cas contraire).

De plus, pour les collectes in vivo, il est important :

- d'effectuer des prélèvements multiples (à jours consécutifs ou alternés) car l'émission des bacilles est probablement intermittente (cf § 3.3.2.a.). Les différents échantillons récoltés ne doivent pas être mélangés, sous peine de créer un effet de dilution et de diminuer la sensibilité des analyses effectuées par la suite : chaque prélèvement fera ainsi l'objet d'examens individuels. Ils peuvent cependant être envoyés le même jour (les autres prélèvements doivent être réfrigérés ou congelés en attendant).
- d'effectuer des prélèvements d'un volume conséquent, car les échantillons sont souvent pauvres en bacille et doivent être soumis à des procédés (centrifugation, fluidification) permettant la concentration des mycobactéries, ce qui permet d'augmenter la sensibilité des techniques utilisées ensuite.

Ces précautions conditionnent la qualité des échantillons soumis à la bactériologie et donc les résultats des différentes techniques de diagnostic direct, exposées ci-après. Un test, aussi performant soit il, ne peut déceler l'infection chez un animal tuberculeux uniquement dans le cas où l'échantillon analysé contient des mycobactéries. Ceci signifie que l'animal doit être excréteur au moment du prélèvement, ce qui n'est pas le cas de tous les éléphants infectés (cf § 3.2.2.).

## ii. **Méthodes bactériologiques classiques**

Le diagnostic bactériologique classique d'une tuberculose comprend un examen microscopique direct (avec recherche de la propriété d'acido-alcoolo-résistance) et une culture mycobactériologique.

### Examen direct et mise en évidence de l'acido-alcoolo-résistance

**Principe** : Toutes les bactéries de l'ordre des *Actinomycetales* possèdent une propriété tinctoriale particulière due à la richesse en lipides de leur paroi (cf § 3.1.2.b.) : l'acido-alcoolo-résistance (A.A.R.). La mise en évidence de cette propriété peut être réalisée grâce à plusieurs techniques de coloration, suivies d'un examen microscopique direct :

- La méthode de Ziehl-Neelsen qui utilise la fuchsine : les B.A.A.R. apparaissent alors comme des fins bâtonnets rouges.
- La méthode de Degommier qui utilise l'Auramine : les B.A.A.R. apparaissent alors en vert jaune, brillants sur un fond rouge orangé.
- D'autres méthodes existent (Kinyoun notamment) mais les B.A.A.R. apparaissent pâles et les colorations manquent de contraste : elles ne sont pas à conseiller en routine.

#### Avantages :

- Ces techniques sont pratiques : elles sont rapides (lecture en 20 minutes environ), faciles à réaliser et peu couteuses.
- Ces techniques sont de bons indicateurs épidémiologiques : la présence de B.A.A.R. à l'examen direct signale la présence d'un grand nombre de bacilles, souvent synonymes de lésions évoluées et/ou contagieuses.

#### Inconvénients :

- Ces techniques sont peu sensibles : la valeur limite de détection est d'environ 1000 à 10 000 UFC (unités formant colonies) par millilitre de prélèvement (contre 100 UFC/mL lors de mise en culture). La sensibilité de cette coloration est estimée à 50 % chez l'homme, cette valeur étant fortement liée à la présence et la richesse en mycobactéries de l'échantillon. Cependant, des techniques d'immunofluorescence semblent actuellement améliorer le seuil de détection des mycobactéries en microscopie directe [29].
- L'observation directe est une technique peu spécifique : il est en effet impossible de distinguer morphologiquement les mycobactéries du « complexe *Mycobacterium tuberculosis* » des autres mycobactéries, ni d'identifier quelle mycobactérie est à l'origine de l'acido-alcoolo-résistance. D'autres organismes du même ordre (notamment les bactéries du genre *Nocardia*) sont également acido-alcoolo-résistants et sont une source de résultats faussement positifs chez l'éléphant, notamment dans les aires géographiques où des mycobactéries atypiques sont fréquemment isolées [75].

Conclusion : Ces techniques d'observation microscopique directe sont très insuffisantes mais permettent une orientation diagnostique rapide. L'observation d'éléments A.A.R. après coloration ne peut conduire qu'à la conclusion suivante : « présence de bacilles A.A.R. » (en quantité importante) et ne peut en aucun cas conclure au diagnostic de tuberculose. Il est alors essentiel de procéder à une identification précise de la mycobactéries en cause, au moyen d'autres méthodes.

L'observation microscopique est très rarement effectuée seule. Elle constitue, la plupart du temps, un examen préalable à la mise en culture de l'échantillon.

### Culture bactériologique

Le diagnostic bactériologique de la tuberculose chez l'éléphant repose sur l'isolement et l'identification des bacilles responsables de la maladie, à savoir *M. tuberculosis* (ou *M. bovis*).

Principe [29] : L'isolement de bacilles tuberculeux à partir d'un échantillon clinique ou pathologique se déroule en plusieurs étapes :

- Le prélèvement subit un traitement préalablement à toute mise en culture : le matériel est homogénéisé, fluidifié et décontaminé.
- L'échantillon est ensuite inoculé sur des milieux enrichis adaptés (type Lowenstein-Jensen), puis incubé à 37°C et analysé au bout d'une semaine, puis tous les 14 jours pendant 6 à 10 semaines.
- Lorsque des colonies apparaissent, elles sont alors immédiatement repiquées sur le même milieu de culture et les isolats obtenus sont analysés et identifiés.
- L'identification de *M. tuberculosis* ou de *M. bovis* se déroule alors en deux temps : certaines caractéristiques (aspect des colonies, pigmentation, vitesse de croissance) constituent une première orientation, qui sera ensuite complétée par des tests biochimiques. Ces derniers se résument principalement à 4 tests : tests à la niacine et à la nitrate réductase, mise en évidence d'une catalase et ensemencement d'un tube TCH.
- Une évaluation de la sensibilité de la mycobactéries isolée aux principaux antituberculeux est finalement réalisée dans un but à la fois diagnostique (confirmation de l'espèce mycobactérienne) et thérapeutique (antibiogramme indispensable à la mise en place d'une thérapie).

Remarque : L'identification de l'espèce en cause s'effectue, traditionnellement, à l'aide de tests biochimiques mais peut également être réalisée plus rapidement à l'aide de sondes nucléiques spécifiques.

Les échantillons les plus fréquemment soumis à la culture mycobactériologique lors de suspicion de tuberculose sur un éléphant sont les pièces anatomiques prélevées lors de l'autopsie et les échantillons de lavages de trompe, réalisés *in vivo*.

#### Avantages :

- La spécificité du test est excellente : les seuls faux positifs sont les résultats d'une erreur de laboratoire ou de la contamination accidentelle de l'échantillon.
- La reproductibilité du test est très bonne.
- La culture permet l'identification de l'espèce mycobactérienne en cause.
- L'obtention d'isolats mycobactériens est l'étape préliminaire indispensable à :
  - o La réalisation d'un génotypage de la mycobactéries par R.F.L.P. ou *spoligotyping* (cf § 3.5.2.a.iii.).
  - o La détermination de la sensibilité de la mycobactéries aux principaux antituberculeux, l'antibiogramme étant un pré-requis indispensable à toute mise en place d'un traitement.

#### Inconvénients :

- La culture mycobactériologique est un test particulièrement lent : les temps de croissance très longs des mycobactéries (une division toutes les 20 heures pour *M. tuberculosis*, contre une division toutes les 20 minutes pour la majorité des germes banaux) imposent d'importants délais à l'obtention des résultats bactériologiques. Il faut un minimum de 4 semaines pour isoler *M. tuberculosis* d'un prélèvement et 3 semaines supplémentaires pour identifier l'espèce en cause et en effectuer l'antibiogramme. Ainsi l'identification définitive de l'espèce mycobactérienne et de sa sensibilité aux antibiotiques ne sera connue qu'au mieux sept semaines après le recueil des prélèvements.

Néanmoins, de nouveaux dispositifs, tels que BACTEC<sup>®</sup>, Septi-Chek<sup>®</sup>, MB/BacT system<sup>®</sup> et MGIT<sup>®</sup> (tube indicateur de croissance mycobactérienne) permettent de légèrement diminuer le temps de détection de la croissance des mycobactéries [53].

- La sensibilité de la culture bactériologique, bien que trois fois supérieure à l'observation microscopique directe, est médiocre. Comme toute technique diagnostique directe, ce test ne peut s'affranchir des difficultés relatives à l'obtention d'échantillons représentatifs du statut infectieux de l'animal. Un résultat négatif ne peut donc jamais être considéré comme étant diagnostique.
- Le phénomène de surcroissance bactérienne peut également être à l'origine de résultats faussement négatifs : de nombreuses autres bactéries pathogènes ou non, présentes dans l'échantillon peuvent croître et gêner l'identification de la mycobactéries en cause.

#### Performances chez l'éléphant :

Chez l'éléphant, une étude en Suède a montré que sur 177 cultures réalisées à partir de lavage de trompe issus d'éléphants diagnostiqués positifs à l'autopsie, seules 6 se sont révélées positives [41, 60]. De plus, des éléphants peuvent avoir de très nombreuses cultures négatives sur lavage de trompe (jusqu'à 54 !) avant d'avoir un résultat positif, ce qui illustre les limites de cette méthode.

Par ailleurs, chez une femelle présentant une mycobactérose utérine, moins de 30 % des cultures faites à partir d'échantillons vaginaux étaient positives [79].

Ainsi, l'existence de tuberculose à localisation extra-pulmonaire, de porteurs latents (non excréteurs) et d'une excrétion de mycobactéries intermittente ainsi que les difficultés de réalisation du lavage de trompe sont autant de facteurs pouvant expliquer ces faibles performances chez l'éléphant [50].

En pratique, les précautions à prendre lors de prélèvements pour analyse bactériologique doivent être respectées (cf ci-dessus, § 3.5.2.a.i.). Les échantillons doivent notamment être envoyés (frais ou congelés) le plus rapidement possible et les prélèvements *post-mortem* doivent être emballés individuellement, étiquetés et accompagnés du rapport d'autopsie détaillé.

Le laboratoire européen de référence en matière de tuberculose est l'AFSSA Alfort, dont les coordonnées sont indiquées en **annexe B** de ce document. Bien que de nombreux laboratoires (dont certains laboratoires départementaux vétérinaires) soient susceptibles d'effectuer ces analyses, il est recommandé que ce type d'échantillon soit toujours adressé au laboratoire de référence afin de faciliter la centralisation ultérieure des données.

Les tarifs pratiqués par l'AFSSA en 2007 sont donnés à titre indicatif :

- Coût de la mise en culture mycobactériologique : 33 € / échantillon
- Identification (biochimique) de l'espèce mycobactérienne en cause (en cas de culture positive) : 82 €
- Réalisation d'un antibiogramme : 30 à 45 €

Remarque : En France, il est possible que certains frais puissent être pris en charge par la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL).

**Conclusion : L'isolement de la mycobactérie tuberculeuse par culture bactériologique reste la méthode de référence pour la confirmation de l'infection à *M. tuberculosis* ou à *M. bovis* chez l'éléphant** en raison de son excellente spécificité (diagnostic de certitude). Elle est par ailleurs une étape indispensable lors de la mise en place d'un traitement, qui ne peut avoir lieu sans détermination préalable de la sensibilité de la mycobactérie aux antituberculeux. Cependant, le manque de sensibilité de la méthode (notamment sur échantillons de lavage de trompe) justifie qu'elle ne soit plus considérée comme un moyen de dépistage suffisant.

Par ailleurs, les délais très longs nécessaires à l'obtention des résultats lors d'une mise en culture mycobactériologique explique l'attrait que constituent les méthodes plus rapides de diagnostic direct, basées sur la détection des acides nucléiques.

### **iii. Méthodes basées sur la détection des acides nucléiques**

De l'analyse par amplification des acides nucléiques à l'analyse par R.F.L.P., les techniques basées sur la détection du génome mycobactérien, sont clairement prometteuses. Elles permettent non seulement la détection d'une mycobactérie, mais également la distinction des différentes espèces au sein du « complexe *M. tuberculosis* » et l'identification des souches en cause. Ces méthodes ne sont pas encore très facilement accessibles, elles ont, pour la plupart, été validées chez les espèces domestiques et sont en cours d'investigation pour les espèces sauvages.

Dans le diagnostic de la tuberculose chez l'éléphant, les méthodes moléculaires principalement utilisées sont les méthodes d'amplification génomiques (P.C.R., N.A.T.T.) et les méthodes permettant le génotypage des souches mycobactériennes (R.F.L.P., *spoligotyping*).

Remarque : Des techniques d'hybridation avec des sondes spécifiques (sondes nucléiques) ont également été développées pour la détection du « complexe *M. tuberculosis* » et du « complexe *M. avium* » mais il semble que ces sondes n'arrivent pas à distinguer *M. tuberculosis* et *M. bovis*, ce qui explique qu'elles aient pour l'instant un intérêt limité en médecine vétérinaire [121].

### Méthodes d'amplification génomique

Les méthodes d'amplification génomique consistent à amplifier et à détecter une séquence nucléique spécifique. Le processus est en théorie extraordinairement puissant et rapide. Ces méthodes sont potentiellement capables d'identifier spécifiquement les bacilles de la tuberculose en quelques heures, a priori sans que le préalable d'une culture mycobactérienne soit nécessaire. Elles regroupent différentes techniques variant par leurs procédés d'amplification : les plus répandues sont la réaction de polymérisation en chaîne (P.C.R) et le test d'amplification des acides nucléiques (N.A.A.T.).

#### ▪ P.C.R. (Polymerase Chain Reaction)

Principe : La P.C.R. (réaction de polymérisation en chaîne) est une technique *in vitro* de biologie moléculaire qui consiste en l'amplification de séquences spécifiques d'ADN grâce à l'emploi d'une polymérase thermostable. Elle permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et/ou peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN cible. Il s'agit de réaliser une succession de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en œuvre deux amores oligonucléotidiques nécessaires à l'accrochage de la polymérase. Ces amores ("primer") bornent la séquence à amplifier. Les produits de chaque étape de synthèse ("amplicons") servent de matrices pour les étapes suivantes. Ainsi, au lieu d'être linéaire, l'amplification obtenue est exponentielle.

Chaque cycle de réplication comprend trois étapes : la dénaturation des brins d'ADN (par la chaleur), l'hybridation des amorces sur un fragment d'ADN et la synthèse des brins à partir des amorces hybridées (extension).

### Performances

Chez l'homme, la P.C.R. est utilisée en mycobactériologie à partir d'échantillons cliniques (crachat, lavage broncho-alvéolaire, écouvillon nasal, biopsie tissulaire, L.C.S., liquide pleural, pus) soit après culture, soit directement à partir des spécimens cliniques. Cependant, cette technique est controversée : une récente publication indique que la valeur prédictive positive d'une P.C.R réalisée sur un crachat de patient tuberculeux dont le frottis est négatif (pas d'observation de B.A.A.R. en microscopie directe) est 50 %, c'est-à-dire que l'on a une chance sur deux de se tromper, autant que si l'on se prononçait au hasard. Ceci s'expliquerait notamment par la présence d'un très grand nombre d'autres bactéries dans ce type d'échantillon, qui interfèreraient avec les résultats du test.

Chez l'éléphant, la technique a été utilisée sur des échantillons de lavages de trompe pour détecter *M. tuberculosis* et a montré une bonne spécificité et une sensibilité modérée après culture [49]. Une étude est en cours afin de préciser la fiabilité de la technique. Cependant, l'intérêt de la technique reste limité si celle-ci n'est réalisable qu'après l'étape de mise en culture.

Pour l'instant, des expériences ont été réalisées en utilisant des échantillons de lavage de trompe directement (sans culture préalable) auxquels *M. bovis* avait été ajoutés : cette méthode a permis de détecter des concentrations très faibles en mycobactéries, de l'ordre de 100 mycobactéries/100 µL de prélèvement [56]. Des études complémentaires sont nécessaires afin d'évaluer la sensibilité et la spécificité de la technique sur lavage de trompe provenant notamment d'éléphants de statut inconnu [79].

### Avantages

- La P.C.R est une technique d'examen direct très spécifique (à condition de choisir des amorces adéquates) et plus sensible que la culture car la valeur limite de détection est plus basse (le seuil de sensibilité *in vitro* est théoriquement d'une molécule d'A.D.N.).

- C'est une technique rapide car elle s'affranchit du temps de génération des bacilles en ne mettant en œuvre que des réactions enzymatiques. Cependant, elle n'est intéressante d'un point de vue rapidité que si le test est effectué directement sur l'échantillon et non après une mise en culture préalable.

### Inconvénients

- Bien que le test lui-même soit performant, sa capacité à détecter les animaux tuberculeux est discutable en raison de la présence aléatoire de mycobactéries dans les échantillons provenant d'animaux infectés (comme pour tout diagnostic direct).
- La technique n'a pas encore fait ses preuves chez l'éléphant lorsque l'échantillon n'a pas été mis en culture au préalable. Le délai d'obtention des résultats reste donc long, de l'ordre d'un mois.
- Bien que la sensibilité de la méthode soit théoriquement bonne, la présence d'un grand nombre d'autres bactéries dans les échantillons utilisés (lavage de trompe notamment) semble parfois masquer la présence de bacilles.

En pratique, les conditions de prélèvement et d'envoi des échantillons sont les mêmes que pour la mise en culture (cf ci-dessus). Le laboratoire de référence en Europe est l'AFSSA Alfort (peu d'autres laboratoires européens sont habilités à faire des P.C.R. « mycobactérie »), dont les coordonnées sont indiquées en **annexe B** et les tarifs 2007 donnés à titre indicatif ci-dessous :

- Identification de mycobactéries du « complexe *M. tuberculosis* » par P.C.R. (après mise en culture) : 76 €
- Recherche de *Mycobacterium spp* par P.C.R. conventionnelle (directement sur prélèvement) : 67 €

Conclusion : Bien que prometteur, le test P.C.R. n'est pas encore validé chez l'éléphant pour une utilisation directe sans phase de culture préalable. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de préciser les performances de la technique sur les échantillons de lavage de trompe, notamment sur des animaux de statut inconnu. En règle générale, la P.C.R. est un outil complémentaire intéressant mais elle ne peut jamais être utilisée en tant qu'outil diagnostique principal.

Un second test diagnostique basé sur la détection des acides nucléiques mycobactériens a également été testé sur l'éléphant : il s'agit du test d'amplification des acides nucléiques (N.A.A.T.)

- Test d'Amplification des Acides Nucléiques

Principe : Le test d'amplification des acides nucléiques (N.A.A.T.) permet la réplication spécifique de l'ARN ribosomal des mycobactéries du « complexe *M. tuberculosis* » (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. canetti*, *M. caprae*). Il utilise pour cela deux technologies complémentaires mises au point récemment [75] :

- la technologie T.M.A. (Transcription Mediated Assay) qui amplifie l'ARNr après une transcription inverse en ADN complémentaire,
- la technologie H.P.A. (Hybridization Protection Assay) qui détecte les produits de l'amplification par hybridation protégée.

Ce test s'effectue sur des échantillons cliniques directement et il permet de détecter les organismes vivants comme morts (c'est-à-dire cultivables comme non cultivables).

Le test d'amplification des acides nucléiques le plus fréquemment utilisé à l'heure actuelle dans la détection de la tuberculose est le « GenProbe®-Amplified™ *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test » (MTD ; Gen-Probe, San Diego, CA 92121 USA). C'est de ce test dont il est question dans la discussion des performances ci-dessous.

Performances :

Chez l'homme, pour les patients positifs au frottis (observation de B.A.A.R. en microscopie directe), le MTD est comparable à la culture (BACTEC 460) et les deux tests montrent une sensibilité et une spécificité proches de 96 % [75]. Chez les patients négatifs au frottis, la sensibilité est moins bonne (72 %) et la spécificité reste excellente (99 %).

Chez l'homme, ce test est validé aux Etats-Unis par la FDA (US Food and Drug Administration) uniquement à partir de matériel clinique (expectoration, aspiration bronchique, aspiration trachéale, crachat, L.C.S., liquide pleural, pus). Les performances du test n'ont, à ce jour, pas été évaluées sur des prélèvements provenant de patients en cours de

traitement anti tuberculeux, ni dans le but de réaliser un suivi thérapeutique ou de confirmer une guérison.

Chez l'éléphant, plus de 1000 MTD ont été réalisés sur des échantillons de lavage de trompe par les laboratoires nationaux vétérinaires américains (NVSL). Une analyse rétrospective des résultats a mis en évidence le défaut de corrélation entre cette technique et la culture mycobactériologique [98]. En effet,

- 15 éléphants sont MTD-positifs alors qu'aucune mycobactérie n'a été isolée du prélèvement lors de la mise en culture,
- 6 éléphants sont MTD-négatifs alors que *M. tuberculosis* a été isolé lors de la mise en culture.

Un résultat positif au MTD et négatif à la culture pourrait s'expliquer par un portage discret et une excrétion faible de la mycobactérie (à des taux non décelables par la culture) ou par l'excration de mycobactéries non viables. Cependant, l'échec du MTD à détecter 6 prélèvements positifs à la culture est difficile à expliquer (erreur de laboratoire, présence d'inhibiteurs, conservation inadéquate de l'échantillon).

De récents travaux ont montré que la dilution des prélèvements cliniques à 1/10<sup>ème</sup> augmentait la sensibilité du MTD pour les échantillons humains [101]. La même expérience chez l'éléphant n'a pas encore été menée : on ignore donc si les performances du test en seraient également améliorées.

#### Avantages :

- Comparativement à la mise en culture, ce test est rapide : les résultats sont habituellement disponibles en moins d'une semaine.
- Le seuil de détection de la mycobactérie est bas : des taux faibles de mycobactéries ont été décelés par cette technique chez l'homme.
- La réalisation de ce test est peu couteuse (environ 30 \$).

#### Inconvénients :

- Ce test est très spécifique pour les mycobactéries appartenant au « complexe *M. tuberculosis* » mais il ne permet pas de distinguer l'espèce au sein de ce complexe. Un résultat positif permet donc uniquement de conclure que l'ARN d'une

mycobactérie appartenant au « complexe *M. tuberculosis* » est présent dans l'échantillon.

- Comme tout test indirect, la capacité du test à détecter une mycobactérie dépend avant tout de la présence de cette mycobactérie dans l'échantillon... De plus, les premières données concernant la sensibilité du test chez l'éléphant ne sont pas concluantes.
- Ce test permet, par ailleurs, la détection d'organismes vivants comme morts. Ainsi, l'intérêt du test est limité dans la surveillance de l'efficacité des thérapies lors de mise en place d'un traitement.

En pratique : Pour l'éléphant, le test s'effectue en général sur échantillon de lavage de trompe et est demandé en parallèle d'une mise en culture. Les conditions d'envoi sont les mêmes que lors d'une analyse bactériologique classique (cf ci-dessus). En France, le MTD-Gen Probe est commercialisé par Biomérieux et disponible dans certains laboratoires bactériologiques. Aux Etats-Unis, ce sont les laboratoires nationaux vétérinaires (NVSL) qui effectuent ce test, pour environ 30 \$. Les coordonnées de la personne à contacter pour de plus amples informations sont indiquées en **annexe B**.

Conclusion : Bien que performant chez l'homme, le test d'amplification des acides nucléiques MTD n'est pas validé chez l'éléphant. Son manque de sensibilité et de spécificité chez cette espèce n'en fait pas un outil recommandé à ce jour.

L'application des méthodes basées sur les acides nucléiques à la mycobactériologie clinique est donc prometteuse quant à la réduction des délais nécessaires aux examens bactériologiques. Cependant, ces techniques appliquées directement aux échantillons cliniques, n'ont pas fait la preuve de leur efficacité et présentent des défauts de sensibilité comme de spécificité chez l'éléphant. Ces tests font l'objet de recherches intensives en vue d'améliorer leurs performances.

Les techniques moléculaires reposant sur la détection de matériel génétique sont ainsi utilisées dans l'élaboration de méthodes de diagnostic et de dépistage de la tuberculose chez l'animal. Cette technologie peut également être mise à profit pour génotyper les différentes souches de mycobactéries au sein d'une même espèce.

## Méthodes de génotypage : R.F.L.P. et spoligotyping

Les méthodes de génotypage sont des techniques permettant d'identifier les différentes souches d'une même espèce mycobactérienne. Ces nouvelles méthodes de typage moléculaire complètent efficacement les enquêtes épidémiologiques classiques autour des cas de tuberculose, permettant d'envisager une approche globale de la dissémination de l'infection. Une même souche retrouvée chez deux individus est ainsi en faveur d'une transmission interindividuelle ou d'une contamination à partir de la même source.

De nombreuses techniques sont décrites dans la littérature, seules sont développées ici le R.F.L.P. (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) et le *spoligotyping*, qui ont déjà été mises à contribution chez l'éléphant.

Principe du R.F.L.P. [9]: La technique R.F.L.P. (encore appelée « empreinte ADN ») est une méthode de génotypage récente (1980, Bolstein) utilisée pour identifier et différencier les différentes souches mycobactériennes. Elle est basée sur la présence, dans le génome des espèces appartenant au « complexe *M. tuberculosis* », d'éléments d'insertion (par exemple IS6110), présents en nombre et en position variables d'une souche à l'autre.

L'ADN mycobactérien est d'abord extrait (à partir d'une culture), purifié, puis amplifié par P.C.R. Cet ADN est ensuite coupé en fragments par une enzyme de restriction, coupant l'ADN au niveau de sites qui lui sont spécifiques (sites de restriction) et qui correspondent à la présence dans le génome d'éléments d'insertion. Les fragments d'ADN obtenus (fragments de restriction) sont ensuite séparés selon leur longueur par électrophorèse sur gel d'agarose. Le gel obtenu est finalement analysé par Southern Blot et révélé avec une ou plusieurs sondes.

La distance entre deux éléments d'insertion étant variable selon les individus, le nombre et la longueur des fragments de restriction varient également. Les positions des bandes d'ADN sur le gel d'électrophorèse seront donc différentes d'un individu à l'autre et détermineront le profil génétique des souches analysées.

Principe du spoligotyping : Le *spoligotyping* (nommé parfois typage par oligonucléotides des espaces du locus DR) est une forme de P.C.R. permettant la détermination des relations entre différentes souches de mycobactéries. Elle est basée sur la présence ou l'absence, dans le génome mycobactérien, de séquences oligonucléotidiques situées entre des séquences

répétitives conservées ("direct repeat", DR) dans le locus d'insertion de l'élément IS6110. Ce locus est présent chez toutes les mycobactéries appartenant au « complexe *M. tuberculosis* ». La méthode comporte une P.C.R. suivie d'une hybridation inverse avec des sondes spécifiques.

Performances : Le génotypage des mycobactéries isolées lors de tuberculose chez un éléphant n'a pas de répercussion directe sur le diagnostic ou le traitement de cet individu : l'intérêt est purement épidémiologique. En voici deux exemples :

- L'analyse par *spoligotyping* a permis de retracer l'historique de l'infection lors d'un récent foyer de tuberculose dans un parc zoologique suédois [60] : des transmissions inter-espèces ont pu être mises en évidence et les hypothèses sur l'origine de la contamination ont pu être reformulées.
- L'analyse par R.F.L.P. de différentes souches isolées chez les éléphants tuberculeux dans plusieurs parcs aux Etats Unis a permis d'exclure l'hypothèse selon laquelle un individu unique serait à l'origine de l'ensemble des cas sur le sol américain [79, 132].

En pratique, ces techniques de génotypage (R.F.L.P. ou *spoligotyping*) nécessitent une quantité importante d'ADN génomique, qui sera extrait d'une culture abondante de mycobactéries. La mise en culture de l'échantillon est donc une étape préalable indispensable à la réalisation d'une analyse génotypique.

Les laboratoires de bactériologie travaillent souvent avec l'une ou l'autre de ces techniques : l'AFSSA Alfort effectue les génotypages par *spoligotyping* au tarif de 102 €. Les laboratoires américains travaillent plus fréquemment avec l'analyse par R.F.L.P. Les coordonnées de ces différents laboratoires sont disponibles en **annexe B**.

Conclusion : Les techniques de génotypage sont d'une aide précieuse lors d'enquête épidémiologique relative à un cas de tuberculose chez l'éléphant. N'étant pas des outils diagnostiques à proprement parler, les problèmes de délai et de spécificité/sensibilité ne se posent pas réellement.

## **Conclusion sur les méthodes directes**

Dans le diagnostic de la tuberculose chez l'éléphant, les méthodes bactériologiques directes demeurent fondamentales pour :

- la confirmation définitive de l'infection (*ante comme post-mortem*),
- l'identification des individus excréteurs (et donc contagieux),
- la réalisation d'antibiogrammes.

Cependant, quelles que soient les performances de la technique utilisée *in vivo*, aucune ne permet de s'affranchir du fait qu'un grand nombre de prélèvements (lavages de trompe essentiellement) provenant d'animaux tuberculeux ne contient pas de mycobactéries.

En effet, outre le fait que l'excrétion mycobactérienne soit probablement discontinue, il existe des éléphants porteurs de l'agent infectieux mais non excréteurs (cf § 3.2.).

Ainsi, les méthodes directes ne permettant de détecter que les éléphants excréteurs au moment de la collecte de l'échantillon, un résultat négatif ne permet en aucun cas d'exclure la possibilité d'infection. Il faut garder à l'esprit que, chez l'homme, l'infection tuberculeuse est démontrée par la mise en évidence directe du bacille (méthodes classiques ou moléculaires) dans seulement 50 % des cas chez l'adulte [70]. De plus, de nombreux désaccords persistent entre les chercheurs et les « dogmes » faisant l'unanimité un jour sont souvent réfutés dix années plus tard !

Par conséquent, le développement de méthodes diagnostiques indirectes permettant d'identifier les éléphants ayant été en contact avec la mycobactérie, qu'ils soient excréteurs ou non, prend tout son sens. Les porteurs latents pourraient ainsi être identifiés et traités avant le développement de signes cliniques et la dispersion de la maladie à l'homme et aux autres espèces.

## b. Méthodes de diagnostic indirect

Le diagnostic indirect de la tuberculose chez l'éléphant repose sur la détection de témoins de l'infection mycobactérienne, autres que l'agent infectieux lui-même. Des témoins de la mise en place d'une réaction immunitaire à médiation cellulaire ou humorale sont ainsi recherchés.

Ces méthodes indirectes ont souvent l'avantage d'être plus rapides, moins coûteuses et plus faciles à réaliser que les tests bactériologiques directs. Par ailleurs, elles permettent, en théorie, de s'affranchir du fait que l'animal soit excréteur ou non de mycobactéries et de la localisation des lésions puisqu'elles reposent sur les témoins systémiques indirects de cette infection.

Cependant, certaines limites sont inhérentes à toutes les techniques de diagnostic direct.

Ainsi :

- La sensibilité du test peut être altérée:
  - Il existe un délai entre le moment de l'infection et le moment où l'organisme met en place une réaction immunitaire. Ces délais sont, par ailleurs, inconnus chez l'éléphant.
  - Certaines substances peuvent interférer avec les tests en masquant la réaction immunitaire (stéroïdes notamment).
- La spécificité du test peut être altérée : l'existence de réactions croisées peut notamment être due à la vaccination, au phénomène d'accoutumance ou à la présence d'autres foyers infectieux.
- Le profil de sensibilité de l'agent infectieux vis-à-vis des principaux antituberculeux est impossible à obtenir.

Les techniques diagnostiques indirectes sont séparées en deux sous parties, selon qu'elles reposent sur la recherche de témoins de l'immunité :

- à médiation cellulaire : réaction d'hypersensibilité retardée ou production d'interférons gamma.
- à médiation humorale : production d'anticorps spécifiques.

Remarque : Même si l'échantillon prélevé ne représente parfois que quelques millilitres de sang, l'envoi du prélèvement doit néanmoins être toujours accompagné des documents CITES adéquats (cf § 1.5.2.).

### i. **Recherche de témoins de l'immunité cellulaire**

Bien que de nombreuses inconnues persistent dans ce domaine, il est communément admis que la réponse immunitaire prédominante lors d'infection mycobactérienne est une réponse à médiation cellulaire plutôt qu'humorale (Cf § 3.2.3.). Ainsi, le développement de tests basés sur la détection des témoins de l'immunité cellulaire a été le fil directeur de la recherche diagnostique en mycobactériologie pendant des décennies et reste aujourd'hui une voie prometteuse.

Il est possible de détecter deux « types » de réaction à médiation cellulaire :

- Une réaction cellulaire locale d'hypersensibilité retardée, recherchée lors de la réalisation d'un test tuberculinique intradermique.
- Une réaction cellulaire systémique, traduite notamment par un relargage d'interférons gamma par les cellules T dans la circulation sanguine.

#### **Test tuberculinique intra-dermique**

Principe : Ce test consiste à injecter dans l'épaisseur du derme une certaine quantité de tuberculine(s) et à apprécier la réaction obtenue au point d'inoculation. Chez l'animal infecté, il se produit une réaction d'hypersensibilité retardée (à médiation cellulaire) dirigée contre les antigènes mycobactériens. C'est une réaction inflammatoire tardive, progressive et durable, provoquant une tuméfaction douloureuse et chaude au point d'injection.

Remarque : Une tuberculine est une substance capable de révéler l'état d'hypersensibilité retardée, sans pour autant induire une réaction immunogène ou allergène. En théorie, ce test n'interfère donc pas avec les autres méthodes basées sur la détection d'une réaction immunologique.

En pratique : Chez l'éléphant, l'injection se fait le plus souvent en intra dermique sur la face dorsale de l'oreille, au niveau d'une zone indemne de toute blessure ou d'anomalie. Il est possible d'utiliser une tuberculine bovine seule (intra-dermo-réaction simple) ou une tuberculine bovine et une tuberculine aviaire (intra-dermo-réactions comparatives), qui doivent être conservées au frais, à l'abri de l'air et de la lumière.

Avantages : C'est une méthode peu couteuse, rapide (les résultats sont disponibles en 72h), inoffensive (non sensibilisante) et techniquement réalisable sur un éléphant entraîné.

Inconvénients : Bien que largement utilisé comme test de dépistage chez l'homme et les bovins, le test tuberculinique est considéré comme faiblement performant chez l'éléphant en raison de la faible corrélation entre les résultats de l'I.D.R. et les résultats des cultures bactériologiques sur lavage de trompe [18, 60, 81]. Ces faibles performances s'expliquent par :

- Un manque de sensibilité : Une étude a montré que la sensibilité de l'I.D.R. chez l'éléphant n'était que de 16,7% [81]. Deux grandes causes peuvent expliquer ce chiffre :
  - o Il existe des périodes où l'animal apparaît faussement négatif : la période antiallergique et les périodes d'anergie (vraie, transitoire, post-tuberculisation ou post-tuberculeuse). Ceci est vrai quelle que soit l'espèce testée.
  - o Le test est inapproprié chez l'éléphant, notamment en raison de l'épaisseur de la peau (réaction non décelable) et du volume de l'animal. En effet, la réaction d'H.S.R. nécessite un recrutement cellulaire local et il est ainsi possible qu'un test effectué en périphérie, loin du foyer infectieux (souvent pulmonaire) ne permette pas un recrutement suffisant de lymphocytes pour provoquer une réaction d'H.S.R. Par ailleurs, il a été montré, chez les primates non humains, que les résultats des tests tuberculiniques étaient sensiblement différents selon le lieu d'inoculation de la tuberculine (paupière versus abdomen). La variabilité de la réponse à ce test semble donc d'autant plus importante que l'animal est volumineux.
- Un manque de spécificité : l'I.D.R. est un test peu spécifique par nature : de nombreuses mycobactéries atypiques peuvent provoquer des réactions croisées et les erreurs techniques (conservation des tuberculines et technique d'injection) sont fréquentes.
- Un manque de standardisation de la technique : les lieux d'injection, les types et les quantités de tuberculine(s) ainsi que les critères de lecture n'ont pas été déterminés chez l'éléphant. Ainsi, l'interprétation des résultats est extrêmement subjective.

Conclusion : Bien que longtemps utilisé chez les Proboscidiens par défaut d'autre outil diagnostique performant, **le test tuberculinique** ne peut être considéré comme un moyen fiable de diagnostic ou de dépistage de la maladie chez cette espèce et **n'est donc à ce jour pas recommandé** [68, 122].

L'immunité cellulaire locale est ainsi difficilement détectable par injection de tuberculine, voyons à présent si les témoins systémiques de cette immunité cellulaire sont plus facilement mis en évidence.

### Le test Interféron gamma

Principe : La réponse à médiation cellulaire est la composante majeure de la réponse immunitaire à l'égard de *M. tuberculosis*; l'induction d'une réponse protectrice se traduit par la synthèse de cytokines de type TH1, notamment d'interférons gamma (IFN  $\gamma$ ). Après stimulation par des antigènes mycobactériens (incubation de sang total avec des dérivés de protéines purifiées sélectionnés), les lymphocytes T spécifiques de *M. tuberculosis* synthétisent et relarguent des IFN  $\gamma$ . Ces interférons sont alors détectés au moyen d'anticorps monoclonaux et d'enzymes (principe de la technique ELISA). Le résultat est qualitatif.

#### Remarques :

- Des tests basés sur le même principe mais mesurant un autre type de cytokine de type TH1, les Interleukine 2, existent également mais ne sont pas décrits chez l'Eléphant.
- Bien que les interférons soient classiquement détectés par des techniques ELISA, il est également possible de mettre en évidence directement l'ARNm de ces interférons. Cette voie devrait être explorée en France dès l'année prochaine, notamment pour l'éléphant.

En pratique [128] : Le test nécessite 6 à 10 mL de sang total dans un tube hépariné. Ce sang doit être frais, prélevé sur un animal vivant et rester à température ambiante (15-20°C). Le prélèvement doit être emballé pour le protéger des températures extrêmes, mais il ne doit pas être congelé. Le laboratoire doit être contacté au préalable et doit recevoir l'échantillon dans les 16 heures post-prélèvement. A l'heure actuelle, le test n'est pas validé chez l'éléphant et aucun laboratoire en Europe n'effectue ce test. Le laboratoire américain de référence effectue

pour le moment le test gratuitement, le temps de la mise au point de la technique. Les coordonnées de ce laboratoire sont indiquées en **annexe B**.

Avantages : Ce test étant basé sur la détection d'une réponse à médiation cellulaire, il permet théoriquement l'établissement d'un diagnostic plus précoce que les tests détectant l'immunité humorale. A l'inverse, de nombreuses inconnues subsistent, notamment quant au temps de persistance de la réponse TH1 après le début de l'infection et quant à la capacité des lymphocytes T à sécréter ces IFN $\gamma$  (pas de recul après 45 semaines chez l'homme). Les progrès concernant ce test vont de pair avec l'avancée des connaissances sur les mécanismes immunitaires précisément mis en jeu lors d'infection tuberculeuse (cf § 3.2.3.).

Inconvénients : L'inconvénient majeur de ce test est qu'il repose sur l'observation d'une réaction cellulaire et donc qu'il nécessite l'obtention de cellules vivantes. Il est ainsi indispensable de prélever du sang total, frais, en quantité relativement importante (6 à 10 mL) et sur un animal vivant. Ceci a deux conséquences principales :

- Les laboratoires doivent disposer de l'échantillon rapidement et à l'état frais (pas de congélation possible). Ces contraintes d'envoi du prélèvement limitent, pour l'instant, la réalisation de ce test à certaines aires géographiques : il est en effet difficile d'envoyer un tube de sang frais outre atlantique en moins de 16 heures. Toutefois, la possibilité d'effectuer une stimulation standardisée proche du lieu de collecte de l'échantillon, de récupérer le surnageant, de le congeler puis de l'envoyer pour analyse sous couvert du froid est actuellement à l'étude.
- Ce test ne peut être fait à titre rétrospectif, sur des échantillons d'une sérothèque, lors d'enquête épidémiologique par exemple.

Par ailleurs, c'est un test qui va être extrêmement difficile à valider pour deux raisons :

- La validation de cette technique diagnostique suppose de la tester sur un échantillon comprenant des témoins positifs, c'est-à-dire sur des éléphants infectés, vivants et non traités, ce qui est plutôt difficile à trouver !
- Les études nécessaires à la mise en place de la technique sont longues et extrêmement coûteuses : il faut notamment sélectionner des antigènes mycobactériens adaptés à chaque espèce ainsi que des anticorps monoclonaux capables de reconnaître les interférons de l'espèce en question.

Cependant, de récentes données tendent à penser qu'il existe des anticorps monoclonaux anti-interférons communs à plusieurs espèces, ce qui pourrait alléger les recherches pour les espèces sauvages.

Performances: Bien que les performances des tests interférons soient pour l'instant mal connues chez les espèces de parcs zoologiques, ces tests sont des outils diagnostiques très prometteurs en mycobactériologie :

- Deux tests ont été récemment approuvés chez l'homme : le QuantiFERON-TB Gold®, disponible aux Etats-Unis et le T-SPOT.TB®, disponible en Europe [75]. En médecine humaine, ces tests ont une sensibilité supérieure ou égale à l'I.D.R. et ils permettent de distinguer une infection d'une réaction vaccinale (car les antigènes mycobactériens sélectionnés sont absents de la souche du BCG).
- Le test Bovin (Bovigam®) a été utilisé avec succès dans les programmes d'éradication de la tuberculose au sein des troupeaux domestiques aux Etats-Unis (en complément de l'I.D.R.) et chez le buffle dans le Parc National Kruger (Afrique du Sud) [37].
- Des tests destinés aux Cervidés (Cervigam®) et aux primates (Primagam®) sont disponibles et ont également fait leurs preuves.
- Des études sur l'utilisation de ce test chez le Rhinocéros et l'Eléphant sont actuellement en cours [89, 90, 104] : le gène codant pour l'IFN $\gamma$  a été cloné, séquencé et purifié pour chacune des deux espèces et un anticorps monoclonal dirigé contre ces interférons a pu être produit. L'élaboration d'un test ELISA permettant de révéler les complexes « anticorps-IFN $\gamma$  » et les essais cliniques nécessaires à la validation de ce test font actuellement l'objet d'un projet de recherche (PhD) à l'Université de Préatoria (Afrique du Sud).

Conclusion: Chez l'éléphant, le test interféron gamma est encore à l'étape de développement et ses performances sont encore inconnues. Par ailleurs, il est probable qu'il ne sera pas disponible en routine avant plusieurs années [79].

En conclusion sur les témoins de l'immunité cellulaire, ces techniques ne sont pas encore d'une aide précieuse dans le diagnostic de la tuberculose chez l'Eléphant puisque :

- Le test intradermique n'est pas recommandé chez cette espèce,
- Le test interféron, bien que prometteur, ne sera pas disponible avant plusieurs années.

D'autres tests indirects sont cependant utilisables et performants chez l'éléphant : ils reposent sur la mise en évidence des témoins de l'immunité humorale.

## ii. Recherche de témoins de l'immunité humorale

Le diagnostic sérologique chez un animal tuberculeux a pour but de détecter des anticorps sériques, témoins de la mise en place d'une réaction immunitaire à médiation humorale. Ces tests constituent donc une preuve indirecte de l'infection ou de l'exposition de l'organisme à la mycobactéries.

La production d'anticorps par des individus infectés par un bacille tuberculeux est variable et soumise à de nombreuses controverses (cf § 3.2.3.). Bien qu'il ait été longtemps considéré que l'apparition d'anticorps était tardive et donc que la réponse humorale était un indicateur faible de l'infection tuberculeuse, les performances sur le terrain des tests sérologiques sont aujourd'hui très prometteuses [57, 58, 65, 66, 75].

D'une manière générale, le délai d'obtention des résultats de ces tests est court comparativement à la culture bactériologique (de quelques minutes à une semaine environ). Par ailleurs, ces techniques requièrent souvent la réalisation d'une simple prise de sang sur l'animal, c'est-à-dire d'un geste rapide, peu invasif et « facilement » réalisable (sur un éléphant coopératif).

Cependant, certains aspects communs à tout test sérologique direct constituent des limites à l'élaboration, la diffusion ou l'interprétation de ces méthodes :

- La détermination des antigènes susceptibles de discriminer les individus sains des individus infectés est la principale difficulté lors de l'élaboration de tels tests : le haut degré de polymorphisme dans la reconnaissance des antigènes, l'existence de communautés antigéniques avec d'autres espèces ainsi que les probables hétérogénéités de *M. bovis* et de *M. tuberculosis* sont autant d'obstacles à l'identification d'antigènes spécifiques et pertinents. La combinaison d'antigènes sélectionnée est le principal facteur conditionnant les sensibilités et spécificités des tests employés.

- Certaines difficultés technico-économiques sont une entrave à la diffusion de ces méthodes auprès d'un nombre important de laboratoires. Outre le fait que la préparation des antigènes ne soit pas rentable économiquement au dessous d'un certain niveau de demande, des problèmes de standardisation des méthodes se posent : les laboratoires ne disposent en effet pas tous des mêmes souches antigéniques et certains antigènes sont même la propriété exclusive de firmes privées. En France, aucun laboratoire n'est actuellement capable de répondre rapidement à une telle demande avec un degré de fiabilité acceptable.
- De nombreuses lacunes persistent quant à la cinétique des anticorps produits par l'animal et nuisent à une interprétation raisonnée des résultats des tests (notamment lorsqu'ils sont négatifs) : les temps de séroconversion (délai séparant l'infection et la production d'anticorps) et de persistance des anticorps circulants et des lymphocytes mémoires sont notamment inconnus chez l'éléphant.

Plusieurs méthodes sérologiques récentes ont été développées et sont en cours d'investigation sur différentes espèces de parcs zoologiques. Chez l'éléphant, les tests ELISA, Immunoblot, MAPIA et le test rapide ElephantTB StatPak® sont les plus aboutis.

### ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Principe : Ce test est une épreuve immuno-enzymatique, basée sur la détection des anticorps anti-mycobactériens sériques : il mesure donc la réponse immunitaire à médiation humorale de l'animal. Si ce dernier est infecté (et qu'il a réalisé une séroconversion), l'ajout d'un (ou de plusieurs) antigène(s) spécifique(s) de la mycobactérie dans son sérum entraîne la formation de complexes immuns (complexe « anticorps de l'animal / antigènes ajoutés »). Ces complexes sont alors détectés par l'ajout d'une solution contenant des anticorps spécifiquement dirigés contre ces complexes et liés à une enzyme, permettant la mise en évidence indirecte de la présence d'anticorps antituberculeux dans le sérum de l'animal.

Des tests ELISA ont été mis au point afin de diagnostiquer la tuberculose chez certaines espèces sauvages, exposées de manière significative au risque tuberculeux, dont les éléphants.

Les premiers essais ont été réalisés en utilisant un antigène unique et se sont révélés peu concluants. Les versions récentes des tests ELISA chez les animaux de parcs zoologiques incorporent une combinaison d'antigènes (ELISA Multi antigen), permettant d'augmenter les performances (sensibilité et spécificité) de ces tests.

Chez l'éléphant, trois tests, employant trois combinaisons différentes d'antigènes, sont aujourd'hui utilisés :

- Le test actuellement utilisé aux Etats Unis (test n°1) inclut une combinaison de 6 antigènes provenant de *M. bovis* (CF, PPD, MPB-70), de *M. tuberculosis* (ERD, RA) et de *M. avium* (AV-PPD) [79].
- Une version modifiée de ce test (test n°2) est actuellement en cours d'investigation aux Etats Unis et inclut une autre combinaison de 6 antigènes issus de *M. bovis* (CF, MPB70) et de *M. tuberculosis* (ESAT-6, Ag85, MTP-64, MPT-32) [18, 79].
- Le test communément utilisé en Europe (test n°3) utilise 3 antigènes différents, issus de *M. avium* (ELIP) et de *M. bovis* (ELIB, MB70).

Comme pour tout test sérologique, la difficulté principale de la mise en place de ces tests consiste à déterminer quels sont les antigènes les plus discriminatifs entre un animal sain et un animal infecté :

- Une étude sérologique, réalisée sur 47 éléphants dont 7 individus positifs, a montré que chacun des antigènes présents dans le test n°1, excepté MPB-70, entraînait des différences significatives de séro-réactivité entre les individus infectés et ceux non-infectés [58] ; *M. bovis* CF semble être le plus discriminant [64].
- Une autre étude a été menée sur un échantillon de 25 éléphants d'Asie (dont 6 positifs), tous soumis au test n°2 [79]. Elle conclut que les antigènes qui semblent être les plus discriminatifs entre un individu infecté et un individu non infecté sont les antigènes CF, MPB-70 et ESAT-6.

Performances : Les sensibilité et spécificité précises de l'ELISA chez l'éléphant sont pour l'instant mal connues. Cependant, les premières données sont indiquées ci-dessous, en fonction du test utilisé [18] :

- En utilisant la combinaison d'antigènes CF et RA du test n°1, la spécificité et la sensibilité du test dans le cadre d'une étude sur 47 éléphants étaient proches de 100 % [58].
- Une autre étude menée sur 68 individus (dont 16 positifs) a montré qu'en utilisant la combinaison d'antigènes CF et ESAT-6 du test n°2, la spécificité et la sensibilité du test étaient respectivement de 100 % et de 94 % [79]. Cette étude a également montré que ces deux antigènes combinés permettaient de détecter l'infection précocement, à savoir des mois voire des années avant que les cultures sur lavage de trompe ne soient positives.
- En ce qui concerne le test n°3, les performances ne sont pas précisément connues chez l'éléphant. Même si elles semblent encourageantes, plusieurs cas faussement positifs sont décrits chez l'éléphant et la technique reste incertaine chez de nombreuses autres espèces sauvages : des résultats contradictoires ont notamment été décrits récemment sur des otaries en Suède [34].

Par ailleurs, le fait que l'animal soit sous traitement antituberculeux ou qu'il ait subi un test tuberculinique récent semble influer sur le profil de séro-réactivité de l'ELISA [79]. Cela ouvre ainsi des perspectives quant aux capacités de ce test à être un indicateur potentiel de l'efficacité d'un traitement [58].

En pratique : La réalisation d'un test ELISA nécessite environ 4 mL de sérum, qu'il est préférable d'envoyer congelé au laboratoire. Les tests n°1 et 2 ne sont actuellement réalisables qu'aux Etats-Unis et ne sont pas encore commercialisés, ils sont donc effectués gratuitement à titre expérimental. Le test n° 3 est effectué par un laboratoire néerlandais, à Lelystadt. Les coordonnées des laboratoires de référence et des personnes à contacter sont indiquées en **annexe B**.

Conclusion : Au vu des résultats préliminaires concernant les performances du test, l'ELISA est très prometteur pour le diagnostic rapide de la tuberculose chez l'éléphant. Cependant, des données supplémentaires sont encore nécessaires à la validation finale de cette technique, notamment en ce qui concerne sa capacité à détecter *M. bovis* et ses performances chez l'éléphant d'Afrique [79]. L'ELISA reste donc en cours d'investigation et il est pour l'instant recommandé de l'effectuer en complément d'autres tests. Il devrait bientôt être commercialisé aux Etats-Unis [75].

Présentons à présent un autre test sérologique utilisé chez l'éléphant : l'Immunoblot (ou Western-Blot).

### Test Immunoblot

Principe : L'Immunoblot consiste à mettre en évidence les anticorps dirigés contre un antigène mycobactérien sélectionné. L'antigène utilisé pour le Western blot chez l'éléphant est un WCS (whole cell sonicate) de *Mycobacterium bovis* séparé sur un gel polyacrylamide puis transféré sur des membranes de nitrocellulose [79]. Ces membranes sont incubées avec du sérum puis révélées par un système de détection classique : les anticorps sériques de l'animal infecté se lient de façon spécifique à cet antigène et apparaissent comme une bande discrète sur la membrane de nitrocellulose après électrophorèse [75].

Performances : Expérimentalement, ce test a détecté des réponses en anticorps anti-WCS de *M. bovis* chez l'éléphant quatre ans avant la mise en évidence de la mycobactérie par culture sur lavage de trompe [18, 130].

Des études sur des éléphants positifs au lavage de trompe, avant, pendant et après le traitement ont montré des changements dans les résultats de l'Immunoblot, avec notamment une augmentation du titre en anticorps lors de recrudescence de la maladie [79].

En pratique : La réalisation d'un test Immunoblot se fait sur sérum (3 à 5 mL sont nécessaires), qu'il faut envoyer frais ou congelé aux laboratoires habilités.

Conclusion : Bien que les performances de l'Immunoblot lors de tuberculose chez l'éléphant ne soient pas précisément connues à ce jour, il pourrait être un outil diagnostique utile, notamment dans la surveillance de la réactivation de l'infection après la mise en place d'un traitement [18].

Etudions pour finir deux test sérologiques récemment mis au point par le même laboratoire et faisant actuellement l'objet de nombreuses publications chez l'éléphant : le test MAPIA et l'ElephantTB StatPak®.

## MAPIA (Multi-Antigen Print Immunoassay) et ElephantTB StatPak®

Le test MAPIA et le test ElephantTB StatPak® (encore appelé *Rapid Test* ou *RT*) sont deux tests sérologiques : l'un (MAPIA) est une procédure de laboratoire et l'autre (ElephantTB StatPak®) est un test de terrain. Ces deux tests sont traités dans un même paragraphe car ils reposent sur le même principe global et ont été développés en parallèle l'un de l'autre par le même laboratoire (Chembio Diagnostic Systems, Inc., Medford, New York 11763 USA) : le MAPIA a en réalité été mis au point afin de servir d'outil à la validation du test ElephantTB StatPak®. Les principes et déroulements de ces deux tests sont présentés séparément puis leurs performances sont décrites et discutées ensemble.

### Principe du MAPIA [66]

Le MAPIA (*Multi-Antigen Print ImmunoAssay*) est un test récemment mis au point, basé sur l'exposition des anticorps sériques d'un animal infecté à un cocktail d'antigènes sélectionnés pour leur immunogénicité et rassemblés dans un seul test.

Chez l'Eléphant, ces antigènes sont actuellement au nombre de douze et sont des antigènes recombinants purifiés de *M. tuberculosis* (ESAT-6 ; CFP-10 ; MPB-59 ; MPB-64 ; MPB-70 ; alpha-crystallin, 38kDaProtein, Mtb-8, Mtb-48), des fusions de polyprotéines (TBF-10 ; CFP-10/ESAT-6 ; Acr-1/MPB-83) et des filtrats de culture de *M. bovis* (CF) [79].

Chacun de ces antigènes est imprégné séparément, côté à côté, par micro-aérosolisation semi-automatique sur une membrane de nitrocellulose, coupée ensuite en bandes étroites. Ces bandelettes, contenant chacune tous les antigènes, sont ensuite incubées avec les prélèvements de sérum ou de sang total. Si l'animal est infecté, des complexes antigène-anticorps sont formés et sont alors immuno-détectés en utilisant un conjugué non spécifique d'espèce puis une méthode de révélation chromogénique standard.

Ces quatre étapes clés de la réalisation d'un test MAPIA sont illustrées schématiquement ci-dessous.

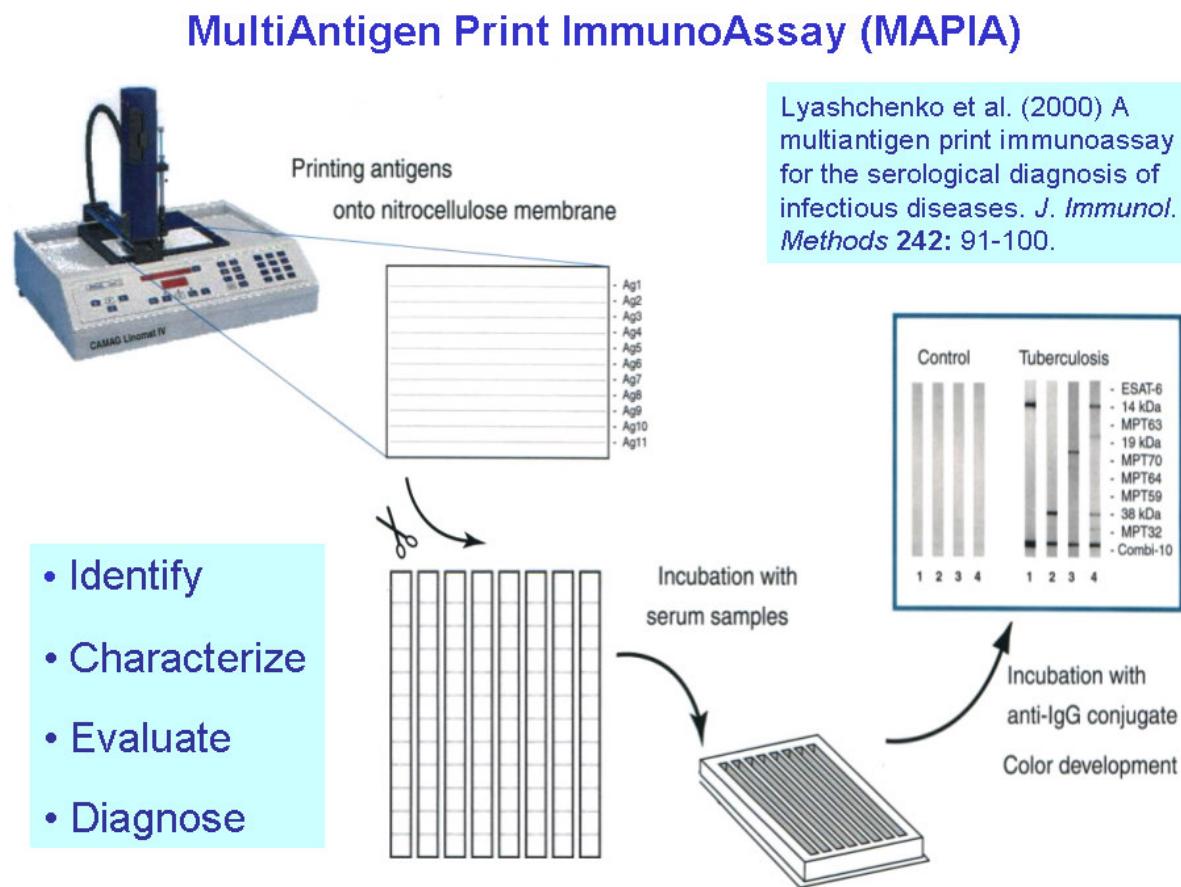


Figure 12 : Principe de réalisation d'un test MAPIA (K. Lyashchenko, Chembio) [66]

La difficulté pour le MAPIA était de déterminer la combinaison d'antigènes qui témoignait le mieux du statut infectieux chez les animaux malades : la détermination de ce cocktail a pu être faite en analysant les cultures positives d'animaux tuberculeux [49].

Une étude évaluant les réponses en anticorps vis-à-vis de chacun des antigènes inclus dans le MAPIA actuel a montré que les antigènes immuno-dominants étaient ESAT-6 (100% de sensibilité, détecté très précocément au cours de l'infection), CPF-10 (75% de sensibilité) puis MPB83, Mtb-48, Acr-1/MPB-83 et 38kDaProtein [64, 79].

En pratique, le test MAPIA requiert environ 4 mL de sérum ou de sang total. Pour l'instant, ce test ne peut s'effectuer qu'à Chembio, New York : les prélèvements doivent être envoyés sous couvert du froid et le plus rapidement possible. Les coordonnées du laboratoire sont indiquées en **annexe B**.

### Principe de l'ElephantTB StatPak® [14, 79] :

L'ElephantTB StatPak® est un test sérologique rapide, reposant sur la détection d'anticorps et basé sur l'immuno-chromatographie (*lateral flow technology*). Ce test incorpore un cocktail unique de protéines recombinantes issues de *M. tuberculosis* et/ou de *M. bovis*, également sélectionnées pour leurs capacités à discriminer les individus sains des individus infectés par la tuberculose. La composition exacte de ce cocktail est inconnue, mais il est probable qu'elle soit très proche de la combinaison utilisée pour le MAPIA. Ces antigènes sont imprégnés sur une phase solide (membrane de nitrocellulose), représentée par une bandelette test unique, placée dans une petite cassette en plastique. Le système de révélation des anticorps est simple : des particules de latex bleu sont conjuguées aux protéines détectant les complexes anticorps-anticorps formés. Cette technique de révélation ressemble globalement au principe d'un test de grossesse.

La réalisation de ce test se déroule en deux étapes :

- 30 microlitres de sérum, de plasma ou de sang total sont déposés à l'aide d'une pipette dans une petite cuvette,
- puis trois gouttes de diluants sont ajoutées dans cette même cuvette.

Le diluant entraîne alors la migration du sérum le long de la bandelette test. Lors de la formation de complexes immuns (témoignant de la présence d'anticorps), les protéines conjuguées au latex migrent avec ces complexes et entraînent l'apparition d'une ligne bleue dans la fenêtre « test ».

Les résultats doivent être lus entre 20 et 30 minutes après le dépôt du diluant :

- Si une ligne bleue apparaît dans la fenêtre « test » (T), le test est positif quelle que soit l'intensité de coloration de la ligne.
- Si aucune ligne bleue n'apparaît, le test est négatif.

Dans tous les cas, une ligne bleue doit apparaître dans la fenêtre « control » (C), qui témoigne du bon fonctionnement des réactifs.

Le mode d'emploi du test est détaillé dans l'annexe D, dans laquelle sont également indiquées les conditions de conservation du dispositif et ses précautions d'emploi.

### **Chembio TB test**



**Figure 13 :**  
**Test ElephantTB StatPak®**  
(K. Lyashchenko, Chembio) [79]

En pratique, le test ElephantTB StatPak® requiert 30 microlitres de sang total (prélevé sur tube EDTA ou tube hépariné), de sérum ou de plasma. Le sang ne doit pas être hémolysé. Dans l'idéal le test doit être effectué immédiatement après la collecte de l'échantillon. Dans le cas contraire, l'échantillon peut être réfrigéré (2-8°C), s'il est utilisé dans les trois jours suivants, ou congelé (-20°C) s'il est utilisé au delà. Il convient par ailleurs d'éviter de congeler/décongeler plusieurs fois le même prélèvement [79].

Si le test n'est pas fait dans l'institution d'origine, l'échantillon doit être envoyé réfrigéré et emballé dans des packs de glace. Pour toutes les questions techniques, Chembio se met à la disposition des vétérinaires, les coordonnées sont indiquées dans l'**annexe B**.

### Performances du MAPIA et de l'ElephantTB StatPak®

Les performances de ces deux tests concernent :

- leur sensibilité et leur spécificité,
- leur reproductibilité,
- leur précocité,
- les aspects quantitatifs et qualitatifs des résultats,
- leur complémentarité.

#### ○ **Sensibilité et spécificité des deux tests**

A ce jour, 99 éléphants d'Asie et 72 éléphants d'Afrique ont été testés par le MAPIA et l'ElephantTB StatPak® en Europe, Afrique du Sud, Australie et Etats-Unis [62, 75]. Parmi ces 171 individus, 21 éléphants étaient confirmés positifs à la culture mycobactériologique. En utilisant la culture (sur échantillon de lavage de trompe ou *post-mortem*) comme méthode de référence, l'analyse des données préliminaires des résultats de ces deux tests a montré que :

- Le MAPIA avait une spécificité de 100% et une sensibilité de 100 %.
- l'ElephantTB StatPak® avait une spécificité de 97 % et une sensibilité de 100 %.

Ces résultats sont détaillés dans le tableau ci-dessous.

Résultats de culture	Nombre d'éléphants	Rapid Test positif	MAPIA positif
Culture(s) négative(s), animal non exposé à la TB, en bonne santé (ou autre maladie que TB)	115	4*	0
Culture positive pour la tuberculose	21	21	21
Culture(s) négative(s), animal exposé à un cas avéré de TB, asymptomatique	35	18**	13**

**Figure 14 : Performances du MAPIA et de l'Elephant TB StatPak® dans le sérodiagnostic de la tuberculose chez l'éléphant (K Lyashchenko, Chembio) [75]**

\* Les résultats faux positifs incluent :

- Deux cas d'infection à *M. szulgai* (cf § 3.1.3.). Cependant, les caractéristiques de séro-réactivité au MAPIA étaient différentes (bandes de séropositivité différentes) des caractéristiques habituellement observées lors d'une infection à *M. tuberculosis* [55].
- Un cas d'un éléphant atteint d'une ostéomyélite chronique, ayant pu interférer avec le test. De plus, l'investigation *post-mortem* a été jugée insuffisante pour conclure catégoriquement à l'exclusion du diagnostic de tuberculose.

\*\* Sur les 35 individus exposés à un animal positif mais négatifs à la culture sur lavage de trompe, 18 éléphants ont réagi positivement au RT et 13 au MAPIA. Outre la possibilité que ces résultats soient faussement positifs (ce qui reste peu probable au vu des autres résultats), l'explication la plus plausible serait que ces individus soient infectés mais non excréteurs (infection récente ou latente).

Par ailleurs, une étude sérologique a été menée sur des éléphants chez lesquels des mycobactéries n'appartenant pas au « complexe *Mycobacterium tuberculosis* » avaient été isolées lors de lavages de trompe, afin de déterminer si ces mycobactéries pouvaient interférer sur les résultats des tests par des réactions croisées. Les deux tests (MAPIA et ElephantTB StatPak®) se sont avérés hautement spécifiques : aucun résultat positif n'a été décelé [85].

La sensibilité et spécificité de ces deux tests semblent donc excellentes, d'autant plus que d'autres études corroborent ces performances [3].

### ○ Reproductibilité des deux tests

La reproductibilité du test ElephantTB StatPak® semble très bonne : une étude réalisée auprès de trois laboratoires différents, sur trois lots de dispositifs différents, a montré une reproductibilité égale à 98,5 % [14].

Aucune étude, à ce jour, n'a été publiée quant à la reproductibilité du test MAPIA.

### ○ Précocité des deux tests dans l'établissement du diagnostic

Des séroconversions ont été mises en évidence sur l'ElephantTB StatPak® et le MAPIA plusieurs mois voire des années avant que les cultures (sur lavage de trompe ou *post-mortem*) ne se soient révélées positives [41, 81].

Chez un éléphant qui a été euthanasié et dont le statut tuberculeux a pu être établi *post-mortem*, l'évaluation rétrospective de ses sérum par ces deux tests indique une séroconversion huit ans avant sa mort !

### ○ Aspects quantitatifs et qualitatifs des résultats de ces deux tests

Même s'il a été établi que l'intensité de la ligne bleue (résultat positif) n'était pas la même lors d'une tuberculose active avec excrétion massive que lors d'un portage discret sans excrétion de la mycobactéries, l'aspect quantitatif de l'ElephantTB StatPak® est trop subjectif pour être validé. Par ailleurs, l'ElephantTB StatPak® détectant la séro-réactivité de tous les antigènes cibles simultanément, ce test ne peut distinguer les différents types de profil de séro-réactivité, contrairement aux tests MAPIA et ELISA.

Ainsi, l'intérêt réel du MAPIA, outre avoir permis le développement de l'ElephantTB StatPak®, est qu'il permet d'obtenir des données qualitatives et quantitatives sur la réaction sérologique de l'animal. En effet, la connaissance des profils de séro-réactivité permet d'avoir une idée plus précise sur le stade de l'infection, sur le fait que l'animal est excréteur ou non et sur une éventuelle réactivation de la maladie. Ainsi, une diminution des anticorps spécifiques dirigés contre certains antigènes a été observée sur le MAPIA chez 5 éléphants positifs à la culture et mis sous traitement. A l'inverse, une augmentation des titres en anticorps a été observée sur des éléphants chez qui la tuberculose était en recrudescence [64]. Ceci suggère que cette technologie pourrait être également mise à profit dans la surveillance de la réponse au traitement et de la réactivation de l'infection (cf §.3.7.1.f.ii.) [75, 79].

- **Complémentarité de l'ElephantTB StatPak® et du MAPIA**

L'ElephantTB StatPak® et le MAPIA sont deux tests pouvant être utilisés en combinaison, à l'image de ce qui est fait pour le dépistage du HIV [79] :

- un test très sensible pour un dépistage rapide sur le terrain,
- puis un test de laboratoire très spécifique pour la confirmation du diagnostic et afin d'obtenir les caractéristiques du profil de séro-réactivité de l'animal.

Au vu des performances de ces deux tests, la précision de cette combinaison est de 100 % (en prenant la culture mycobactériologique comme méthode de référence)

#### Distribution et commercialisation [85]

Le test MAPIA est encore expérimental, aucune licence n'est pour l'instant accordée à Chembio pour ce test. Pour l'instant, les analyses doivent donc être obligatoirement réalisées par le laboratoire à New York jusqu'à ce que leur soit accordée une licence, qui autorisera alors les autres laboratoires à utiliser la technique brevetée.

Toutefois, il est probable que ce test ait été développé uniquement dans le but de mettre au point l'ElephantTB StatPak®, de le valider et de le commercialiser. Ainsi, il est possible qu'aucun brevet ne soit jamais déposé par Chembio et donc que la technique puisse être utilisée par d'autres laboratoires dans les prochaines années. La méthode employée étant proche de certains tests utilisés actuellement pour le dépistage du VIH (notamment), il n'est pas impossible que certains laboratoires européens disposent du matériel nécessaire à la réalisation de ce test : un « MAPIA » serait ainsi potentiellement réalisable à Oxford.

Cependant, la firme new-yorkaise étant le propriétaire exclusif de certains antigènes insérés dans le test MAPIA de l'éléphant, l'utilisation de ces antigènes purifiés par d'autres compagnies est assujettie à l'accord (financier) de Chembio. Reste donc à savoir quand (et à quel prix) ces antigènes spécifiques seront mis à disposition des laboratoires européens.

A l'inverse, le test rapide ElephantTB StatPak® vient d'être breveté par Chembio et est commercialisé depuis septembre 2007. A ce jour, tout vétérinaire peut se procurer le test en s'adressant directement au laboratoire new yorkais (cf coordonnées dans l'**annexe B**). Cependant, un canal européen de distribution existe depuis quelques semaines (avril 2008) :

Zootest coordonne les ventes des tests rapides ElephantTB StatPak® (et PrimaTB StatPak®) en Europe et en Russie et y ajoute un conseil épidémiologique [135]. Les commandes s'effectuent par internet, le prix d'un test revient à environ 100 US \$ et trois modes de livraison sont disponibles : une livraison normale, « Express » (notamment utile lors d'une urgence sanitaire) ou à l'unité. Un bon de commande Zootest figure en **Annexe E** de ce document pour information.

Le fait d'associer la distribution du test à une expertise épidémiologique et à une collecte des résultats est intéressant à la fois pour le parc zoologique et pour le distributeur :

- Pour le « client » : D'une part les démarches administratives sont simplifiées (Zootest servant d'interface avec Chembio) et d'autre part, Zootest fournit un support scientifique et une aide à l'interprétation des résultats du test.
- Pour Zootest : la constitution d'une base de données intégrant à la fois les résultats des tests et les différents profils épidémiologiques circulants permet de préciser les performances du test (notamment sur les espèces non ciblées). Ainsi, un formulaire en ligne permet de collecter (de manière volontaire et anonyme) la date du test, l'espèce testée, le type de test utilisé, le numéro du lot et le résultat obtenu.

De plus, le risque de vendre (et d'acheter !) « anonymement » un simple test comporte deux risques de dérive conséquents :

- Penser que ce test est « parfait » et donc négliger les limites du test, notamment en ce qui concerne le délai nécessaire à la séroconversion (encore inconnu).
- Penser, au contraire, que ce test est « aléatoire » puisqu'il peut être difficile à interpréter selon le contexte épidémiologique associé (à l'image du SNAP® Test FIV).

Eclairer certaines inconnues (composition exacte du cocktail d'antigènes, nature des antigènes immuno-dominants, proportions de ces antigènes, bases de la réactivité) permettrait d'expliquer au mieux les forces et les limites du test et ainsi d'en augmenter la crédibilité. Cependant, il est évident qu'une partie de ces informations resteront cachées afin de protéger le « secret de fabrication » d'un point de vue concurrentiel.

## Conclusion sur ces deux tests

Les qualités du MAPIA sont remarquables : ce test est, à l'heure actuelle, **l'outil diagnostique le plus performant pour la tuberculose chez l'éléphant, tant pour le diagnostic que pour la surveillance du traitement.** Cependant, il n'est pas réalisable sur le terrain et n'est pour l'instant disponible qu'à titre expérimental à New York.

Par ailleurs, il est indéniable que le **test ElephantTB StatPak®** révolutionne le diagnostic de la tuberculose chez l'éléphant : **c'est un test performant, rapide** (résultats définitifs en 20 minutes), **simple à interpréter, non invasif, réalisable facilement sur le terrain et ne nécessitant aucun matériel spécifique.** Cependant, le fait qu'il ne soit pas quantitatif et qu'il ne permette pas de connaître le profil de séro-réactivité de l'animal explique qu'il ne puisse se suffire à lui-même. D'autres tests peuvent lui être associés : les autres tests sérologiques (MAPIA, ELISA, Immunoblot) constituent notamment de très bons outils afin de confirmer et de préciser le diagnostic.

### Remarques :

- *Chembio Diagnostic System* travaille au développement de tests diagnostiques sérologiques variés : une gamme de tests rapides (reposant sur le principe d'immuno-chromatographie) est en cours de développement pour aider au diagnostic de la tuberculose chez les espèces de parcs zoologiques. Outre l'ElephantTB StatPak®, le test pour les primates (PrimaTB StatPak®) est commercialisé depuis peu et ceux des cervidés (CervidTB StatPak®), des bovidés (BovidTB StatPak®), des blaireaux (BrockTB StatPak®) et des camélidés (CamelidTB StatPak®) devraient l'être en 2008 [14].
- De plus, la capacité multi-spécifique des tests sérologiques rapides, notamment celui de l'éléphant, est en cours d'évaluation : le cocktail d'antigènes présents dans l'ElephantTB StatPak® est potentiellement adapté à révéler les anticorps sériques chez d'autres espèces. Ainsi, 10 rhinocéros noirs, 23 tapirs malais, 18 otaries et 8 jaguars ont récemment été testés avec succès [63, 135]. Cependant, plus d'essais sont nécessaires à la validation de ces premiers résultats encourageants.

Pour conclure sur les méthodes sérologiques, deux points sont à souligner :

- les tests ELISA, MAPIA, Immunoblot et le test rapide ElephantTB StatPak® permettent une détection plus précoce de l'infection tuberculeuse chez l'éléphant que les méthodes directes.
- Les caractéristiques des profils de séro-réactivité des tests qualitatifs (ELISA, MAPIA et Immunoblot) semblent être intéressantes dans la surveillance de l'efficacité des traitements et de la réactivation de l'infection.

Ces tests sont dorénavant des outils incontournables dans le diagnostic de la tuberculose chez l'éléphant : ils viennent d'être officiellement admis (depuis décembre 2007) comme tests complémentaires de la culture pour le dépistage annuel des éléphants, réalisé dans les institutions américaines [85].

### **Conclusion sur les méthodes indirectes**

Le test tuberculinique n'étant pas validé chez l'éléphant, ce sont les tests indirects réalisés in vitro qui révolutionnent véritablement le diagnostic de la tuberculose chez l'éléphant. Ces tests sont rapides, précoces et sont capables de déceler l'ensemble des animaux infectés (et pas uniquement les individus excréteurs). Néanmoins, de nombreuses inconnues persistent quant à la cinétique de production des anticorps et de libération des interférons  $\gamma$  : **il est donc primordial que ces tests indirects soient répétés à intervalles réguliers.**

Par ailleurs, aucun de ces tests ne permet d'établir un diagnostic positif avec 100 % de certitude, ni d'évaluer la sensibilité de la mycobactéries aux différents antituberculeux : aucun de ces tests ne permet donc de s'affranchir totalement des tests directs. Les différentes techniques demeurent complémentaires et c'est au clinicien d'adapter ses choix en fonction du contexte épidémio-clinique, ce qui est l'objet de la discussion suivante.

### **c. Discussion sur les méthodes diagnostiques**

Le nombre de tests disponibles pour le diagnostic de la tuberculose chez l'éléphant est en constante augmentation. Les difficultés d'interprétation de ces tests, quels qu'ils soient, sont omniprésentes et sont rappelées dans un premier temps. La question de savoir si ces tests sont complémentaires ou répétitifs est discutée dans un second temps. Enfin, les pistes de recherche en la matière sont énumérées afin de se tourner vers l'avenir.

### i. **Difficultés d'interprétation des tests diagnostiques**

Au vu des progrès considérables effectués ces dernières années en matière de tuberculose chez l'éléphant, le piège est de croire que certains tests diagnostiques sont « 100% fiables ». Or, le test idéal, à savoir un test performant, peu coûteux, facilement réalisable et standardisable, n'existe pas. Il faut retenir qu'aucun test n'est parfaitement sensible et parfaitement spécifique pour le diagnostic de la tuberculose chez l'éléphant (et quelle que soit l'espèce d'ailleurs). Les tests diagnostiques sont très souvent réalisés et interprétés sans une connaissance parfaite de la fiabilité et des limites du test utilisé. Les sources d'erreurs sont souvent différentes selon qu'on utilise un test direct ou un test indirect [47].

Les performances exactes des tests sont souvent inconnues chez l'éléphant. En effet, pour évaluer précisément la sensibilité et la spécificité d'un test, il faudrait avoir un échantillon représentatif d'individus, ce qui est quasiment impossible chez une espèce rare ou menacée, pour laquelle l'infection expérimentale n'est pas envisageable. Ainsi, les performances citées ci-dessus ne sont que des indications faites à partir d'études restreintes chez l'éléphant ou des extrapolations des performances de ces tests chez l'homme ou les espèces domestiques (sans forcément tenir compte des différences d'épidémiologie ou d'immunité entre espèces) [47].

Par ailleurs, les valeurs prédictives (positives et négatives) d'un résultat dépendent à la fois des performances du test et de la prévalence de la maladie dans la population. Or la prévalence de la tuberculose dans un troupeau donné d'éléphants est très souvent inconnue, il est donc difficile d'estimer les valeurs prédictives des tests, ce qui constitue une limite à l'interprétation des résultats [47]. De plus, pour les espèces domestiques, les performances médiocres des tests à l'échelle individuelle sont souvent compensées à l'échelle du troupeau. Or, en parc zoologique, ces tests sont souvent réalisés de manière isolée (test à l'introduction par exemple) ou au sein d'un petit groupe (le plus grand troupeau d'éléphants captifs étant composé d'une quinzaine d'individus).

D'une manière générale, les résultats doivent donc être interprétés en connaissance de cause et en faisant preuve d'esprit critique, quelle que soit la méthode employée. Cette règle fondamentale s'applique à de très nombreuses situations en médecine zoologique.

## ii. Des outils nombreux et variés : tests complémentaires ou répétitifs ?

De nombreux tests sont disponibles pour le diagnostic de la tuberculose chez l'éléphant, ils peuvent être séparés schématiquement en deux catégories [58, 64] :

- Des tests directs : très spécifiques mais lents et peu sensibles.
- Des tests indirects : plus précoces, rapides et indépendants de l'excration mycobactérienne.

Au sein de ces tests, certaines techniques sont très ressemblantes ou aboutissent au même résultat (génotypage, profils de séro-réactivité). Citons les tests N.A.T.T. et P.C.R. ou R.F.L.P. et *spoligotyping* pour les méthodes directes, et les tests MAPIA, Immunoblot et ELISA pour les tests indirects. Il est évident qu'il est inutile d'utiliser deux méthodes différentes de génotypage ou deux tests sérologiques successifs si les techniques sont aussi performantes les unes que les autres.

Cependant, chez l'éléphant, les tests n'étant pas tous validés, il peut être justifié d'effectuer plusieurs tests « ressemblants » afin de conforter les résultats du premier test. Par ailleurs, les performances de ces différents tests ne sont pas forcément exactement les mêmes. Bien que les données n'aient pas été prouvées chez l'éléphant, il a par exemple été montré chez le renne (*Rangifer tarandus*) qu'une infection expérimentale par *M. bovis* était décelée au bout de 4 semaines par le MAPIA, de 8 semaines par l'Immunoblot et de 15 semaines par l'ELISA [131].

De plus, il est évident que certaines considérations économiques et/ou commerciales entrent également en jeu et expliquent l'existence de plusieurs tests très proches : les tests ELISA et MAPIA en sont un bon exemple. Par ailleurs, la « course à la validation » de chacune de ces techniques a probablement été à l'origine de la forte implication des différents laboratoires dans la problématique de la tuberculose chez l'éléphant, ce qui a permis de belles avancées en matière de diagnostic.

Ainsi, il est évident que l'établissement d'un diagnostic de tuberculose chez l'éléphant ne nécessite pas la réalisation successive de chacun des tests précédemment décrits, dont certains feraient double-emploi. Cependant, aucun de ces tests ne se suffit à lui-même : ainsi, les modalités de dépistage et de diagnostic requièrent toujours l'utilisation raisonnée de plusieurs tests complémentaires.

D'une manière générale, pour la surveillance d'une maladie grave ou pour l'introduction d'un animal dans un troupeau supposé sain, un moyen efficace d'évaluer une population où la prévalence de la maladie est faible est d'employer des tests multiples en série [47] :

- En premier lieu, un ou plusieurs tests hautement sensibles sont en charge de dépister la population afin d'optimiser l'identification de tous les positifs tout en restant conscient de la possibilité d'erreurs par excès.
- En second lieu, un test très spécifique est réalisé afin de confirmer le statut de l'animal.

**Ainsi il pourrait être suggéré, pour le dépistage de la tuberculose chez l'éléphant, de procéder de la manière suivante :**

- **Réaliser un test rapide et très sensible sur le terrain : l'ElephantTB StatPak®, et le répéter à intervalle régulier.**
- **Confirmer ce test (si nécessaire\*) par un test sérologique de laboratoire : MAPIA ou ELISA.**
- **Lors de résultat positif, établir un diagnostic de certitude par une mise en culture (et/ou P.C.R.) sur un (ou plusieurs) échantillon(s) de lavage de trompe. Ceci permet d'une part de savoir si l'éléphant est excréteur (donc contagieux) et d'autre part d'établir un antibiogramme, indispensable à la mise en place d'un traitement.**

\* Le MAPIA ou l'ELISA de confirmation ne sont pas forcément nécessaires si les résultats du test rapide sont cohérents avec le contexte épidémio-clinique. Ils doivent par contre être réalisés lorsque que l'ElephantTB StatPak® est négatif alors que la suspicion épidémiologique est forte ou lorsque celui est positif et que le vétérinaire estime que la connaissance du profil de séro-réactivité lui sera utile par la suite.

Ces algorithmes décisionnels sont délicats à définir et combineront dans tous les cas un ou plusieurs tests indirects avec un ou plusieurs tests directs. La confrontation des résultats des tests avec le contexte épidémiologique local est primordiale. De même, certains tests ne sont pas incontournables lorsque la décision d'euthanasie s'impose : plusieurs tests rapides positifs dans un contexte épidémiologique suspect peuvent parfois suffire à prendre la décision.

Il est évident que plus ces tests seront performants, plus la cascade décisionnelle sera simplifiée. Ainsi, la poursuite de la recherche en matière de diagnostic de la tuberculose chez l'éléphant demeure capitale.

### iii. Recherche et avenir

Bien que d'immenses avancées aient été réalisées ces dix dernières années en matière d'outils disponibles pour le diagnostic ou le dépistage de la tuberculose chez l'éléphant, des progrès restent à faire. Les recherches s'orientent actuellement vers trois objectifs :

#### **- Poursuivre les recherches fondamentales**

Etant donné que les méthodes indirectes reposent sur la détection des témoins de l'immunité, le perfectionnement de ces techniques est intimement lié à l'avancée des connaissances concernant les mécanismes immunitaires mis en jeu lorsqu'un éléphant est infecté par la tuberculose. Une meilleure connaissance de la nature des anticorps et des cytokines (notamment des interférons  $\gamma$ ) impliqués et de leur cinétique de production aiderait à une meilleure interprétation des tests indirects : la nature exacte des antigènes immuno-dominants, les délais d'apparition des témoins de l'immunité ainsi que leur persistance dans l'organisme sont en fait actuellement inconnus chez l'éléphant.

Par ailleurs, la recherche fondamentale en mycobactériologie moléculaire pourrait aboutir à la mise au point de nouveaux outils (nouvelles sondes, milieu de culture plus performant) permettant de diminuer les délais nécessaires à l'obtention des résultats bactériologiques.

#### **- Perfectionner les techniques déjà utilisées [79]**

De plus amples études sont nécessaires à la validation définitive des tests sérologiques et à la connaissance plus précise de leurs performances quel que soit l'échantillon d'individus testé. Ces tests n'ont notamment pas été suffisamment évalués dans des troupeaux où la probabilité pré-test d'avoir un résultat positif est faible, et donc où les chances d'avoir des faux positifs sont importantes. La valeur limite de détection de ces techniques est également inconnue : il serait intéressant de savoir, par exemple, si une infection latente cantonnée à un unique nœud lymphatique est décelable par un test sérologique.

Par ailleurs, les recherches relatives à l'utilisation de la P.C.R. directement sur les échantillons de lavage de trompe sont primordiales et permettraient de s'affranchir des longs délais associés à la mise en culture.

- **Explorer de nouvelles pistes diagnostiques [86]**

De nombreux tests sont actuellement en cours de validation chez d'autres espèces de parcs zoologiques : il pourrait être intéressant d'estimer leurs performances et leur faisabilité chez l'éléphant. En voici les quatre principaux :

- Le test F.P.A. (*Fluorescent Polarisation Assay*), basé sur le fait qu'un antigène lié à un complexe immun a une valeur de polarisation plus haute qu'un antigène libre. Cette technique est prometteuse chez plusieurs espèces [18].
- Le test de transformation des lymphocytes (L.T.) reposant sur une stimulation des cellules mononucléées par des antigènes spécifiques, suivie d'une estimation du nombre de cellules en prolifération grâce à l'incorporation d'un isotope radioactif. Ce test est décrit chez plusieurs espèces (bisons, lamas, cervidés et primates) mais rencontre encore quelques difficultés logistiques liées à l'utilisation de produits radioactifs.
- Le test B.Tb. (*Blood Test for Tuberculosis*), qui correspond à une combinaison d'un test L.T. et d'un ELISA, permettant de détecter à la fois l'immunité cellulaire et humorale. Cette technique a été utilisée chez les Cervidés aux Etats-Unis [17] et chez les blaireaux en Europe [19] afin de détecter des infections à *M. bovis*. Elle s'annonce prometteuse pour les autres espèces.
- Le test Ag85, basé sur la détection de l'antigène 85, produit par les mycobactéries tuberculeuses durant la phase active de l'infection (test direct) [67, 134]. Le test est prometteur au vu des premières données sur les antilopes mais aboutit à des résultats équivoques chez d'autres espèces (chez l'orang outang, *Pongo pygmaeus*, notamment) [54].

En conclusion, le diagnostic de la tuberculose chez l'éléphant est un sujet complexe et en constant remaniement, qui constitue actuellement un véritable challenge pour les vétérinaires de parcs zoologiques.

Etant données les difficultés inhérentes à l'apparition d'un cas de tuberculose dans une collection d'animaux sauvages, les mesures prophylactiques visant à réduire ce risque ou à en diminuer les conséquences sont un aspect fondamental de la gestion de la tuberculose chez l'éléphant.

### **3.6 Mesures prophylactiques contre la tuberculose de l'éléphant**

La prévention des maladies constitue un aspect fondamental de la médecine zoologique au vu des difficultés d'application de traitements médicaux intensifs à la plupart des animaux sauvages et de leur capacité innée à cacher les symptômes de maladie jusqu'à un stade avancé de celle-ci.

Pour la tuberculose, étant donné que la plupart des espèces sont sensibles à la maladie, la prophylaxie doit se préoccuper de toutes les espèces animales pouvant servir de relai à la contagion.

Par ailleurs, les mesures prophylactiques sont qualifiées de défensives ou d'offensives en fonction du statut sanitaire des animaux : les mesures défensives visent à prévenir l'apparition de la maladie dans un troupeau sain et les mesures offensives visent à limiter l'extension de la maladie et à enrayer l'infection dans un troupeau déjà contaminé.

#### **3.6.1 Mesures de prophylaxie défensive**

Les mesures de prophylaxie défensive sont habituellement subdivisées en mesures sanitaires et en mesures médicales (chimio-prophylaxie consistant le plus souvent en une vaccination). **Or, la vaccination par le BCG** (souche atténuée de *M. bovis*) **est aujourd'hui à proscrire chez les animaux**, bien qu'elle ait été longtemps pratiquée chez les primates non humains. Ce vaccin n'est en effet pas validé chez l'éléphant et il interfère avec les méthodes de dépistage indirect rendant impossible la distinction entre un animal infecté et un animal vacciné. Par ailleurs, l'immunité antituberculeuse n'étant que partielle, il est extrêmement dangereux de prescrire chez l'animal une vaccination contre la tuberculose avec un vaccin vivant atténué (et non inactivé).

De récents progrès en immunologie et en biologie moléculaire concernant les mycobactéries laissent entrevoir la mise au point de nouveaux vaccins, notamment des vaccins inactivés (vaccins à sous-unités protéiques et vaccins à ADN recombinant) [115]. Toutefois, leur application pratique à la faune sauvage captive n'est pas encore d'actualité.

La chimio-prophylaxie étant interdite chez l'éléphant, les mesures défensives sont donc actuellement uniquement sanitaires.

Etant donné qu'il existe quatre principaux facteurs de risque d'infection (cf § 3.3.3.a.), les mesures défensives visent à limiter chacun de ces risques, à savoir :

- limiter le risque d'introduction d'un animal infecté,
- limiter le risque de résurgence d'un précédent foyer,
- limiter le risque d'infection provenant du « voisinage »,
- limiter le risque d'infection provenant de l'homme.

#### **a. Maitrise du risque « introduction »**

Les animaux nouvellement introduits dans un parc zoologique devraient provenir d'institutions « indemnes de tuberculose », réalisant eux-mêmes une prophylaxie sanitaire rigoureuse. Toutefois, comme il l'a déjà été évoqué (cf § 2.4.2.), ces certifications sont très difficiles à mettre en place puisque la qualification d'« indemne » ne peut pas réellement s'appliquer à une maladie concernant toutes les espèces du parc et pouvant resurgir à tout moment à partir d'un précédent foyer.

De plus, des procédures strictes de quarantaine devraient être appliquées à chaque importation, pendant un minimum de 30 jours [118]. Bien que ces mesures soient difficiles à réaliser en pratique pour les grands mammifères, il n'y a cependant aucune raison de ne les réservier qu'aux espèces « faciles » à gérer. La directive « Balai » (directive 92/65/CEE) oblige normalement les institutions agréées à disposer des bâtiments nécessaires à la réalisation de mesures de quarantaine adaptées à chaque espèce. Des examens cliniques réguliers, des prélèvements de sang (pour les analyses hémato-biochimique et pour la sérothèque) et de multiples tests de dépistage de la tuberculose (examens sérologiques +/- cultures sur lavage de trompe) sont requis pendant cette période de quarantaine. Le protocole de quarantaine suggéré par l'AAZA pour les éléphants est décrit en détail dans l'**annexe F**.

Par ailleurs, la réduction au minimum des entrées/sorties d'éléphants serait une mesure efficace pour limiter le risque d'introduction des maladies. Cependant, ceci irait à l'encontre de la tendance actuelle en parcs zoologiques qui est, au contraire, d'intensifier les échanges d'éléphants afin notamment d'augmenter les chances de réussite en termes de reproduction.

Ces remarques sont également applicables à tous les individus, toutes espèces confondues, nouvellement introduits dans un parc. En effet, tous représentent un risque potentiel d'introduction de la maladie, pouvant ensuite s'étendre à l'éléphant.

Eviter qu'un éléphant tuberculeux (excréteur ou porteur latent) ne soit introduit dans un groupe sain constitue dans tous les cas le pilier de la prophylaxie défensive dans la mesure où peu d'autres animaux sont habituellement vecteurs de *M. tuberculosis*. D'autres paramètres sont également à maîtriser dans un parc, notamment le risque de résurgence d'une précédente infection

### **b. Maitrise du risque « résurgence »**

Le risque de persistance du bacille au sein d'un groupe d'éléphants ayant déjà été infecté est élevé, et ceci, quelle que soit l'espèce en cause. Le bacille persiste longtemps dans l'environnement et le portage inapparent semble fréquent chez l'éléphant. Ces collections devraient donc faire l'objet d'une surveillance intensive et prolongée, avec des mesures de désinfection accrues et des tests de dépistage plus fréquents sur les éléphants, comme sur les individus d'autres espèces occupant les enclos adjacents.

Les éléphants traités et considérés comme « guéris » doivent par ailleurs faire l'objet d'une attention particulière (cf §.3.7.1.f.iii.). En effet, un suivi minutieux de l'état de santé de ces animaux est indispensable afin de détecter précocément une éventuelle réactivation de l'infection. Cependant, les moyens de surveillance de l'efficacité du traitement n'étant pas infaillibles, certains suggèrent de ne pas réintroduire ces éléphants dans un troupeau sain et de les laisser « à vie » dans des groupes en cours de traitement ou ayant été traités.

Ainsi, l'assainissement n'est jamais garanti et le risque de résurgence est particulièrement difficile à maîtriser car il concerne certes les éléphants mais également l'ensemble des autres espèces sensibles à la tuberculose.

**c. Maitrise du risque « voisinage »**

Les animaux ne devraient être en contact ni avec la faune sauvage autochtone, ni avec les troupeaux d'animaux domestiques des alentours. Des barrières de protection adéquates devraient entourer les enclos et des distances séparant les terrains appartenant au parc des terrains extérieurs devraient être respectées. De même, le prêt de matériel entre les différentes institutions ou avec le voisinage est fortement déconseillé car il peut être vecteur de la mycobactéries.

Dans le cas particulier où les éléphants sont présentés avec d'autres espèces (enclos mixte), ces animaux doivent également subir régulièrement un dépistage valide de la tuberculose (notamment à l'introduction, cf ci-dessus) afin de limiter le risque de contamination d'un éléphant à partir d'une autre espèce. Le principe est le même pour les animaux occupant les enclos adjacents à l'aire des éléphants.

Considérons à présent le risque que constitue l'homme, réservoir principal de *M. tuberculosis*.

**d. Maitrise du risque « Humain »**

Le risque de contamination d'un éléphant à partir d'un humain présentant une tuberculose active existe. *M. tuberculosis* étant un pathogène dont le réservoir principal est l'homme, il est probable que l'infection ait d'ailleurs été introduite, à l'origine, chez l'éléphant à partir d'un humain infecté. Cependant, la part de responsabilité de l'homme dans ces multiples cas de tuberculose chez l'éléphant est inconnue : aucun cas de transmission de l'homme à l'éléphant n'a été réellement prouvé. Néanmoins, plusieurs rapports font état de souches similaires isolées chez l'homme et chez l'éléphant. Une publication récente (1998) rapporte un cas confirmé de transmission de la tuberculose entre un soigneur animalier et quatre éléphants [74] : lors d'un dépistage mené auprès des employés travaillant dans une institution privée détenant des éléphants dont quatre avaient été diagnostiqués positifs à la tuberculose, l'un des soigneurs s'est avéré présenter une tuberculose active. La souche de *M. tuberculosis* isolée a été comparée par R.F.L.P. avec les mycobactéries isolées chez les quatre éléphants et s'est trouvée être identique. Néanmoins, aucune indication ne permet de conclure sur le sens de la transmission : de l'homme à l'éléphant ou de l'éléphant à l'homme.

Afin de limiter le risque de contamination d'un éléphant à partir d'un humain tuberculeux en parc zoologique, les mesures prises concernent à la fois le public et le personnel zoologique travaillant avec les éléphants :

- Les visiteurs : Il a été montré dans les années 70 que le maintien des primates non humains derrière des vitres avait grandement participé à la diminution de la prévalence de la tuberculose au sein de ce groupe d'espèces [49]. Il est évidemment difficile d'installer des vitres autour des éléphants ; toutefois, les distances séparant les animaux du public devraient interdire tout contact entre les éléphants et les hommes et rendre l'enclos hors de portée des projections des visiteurs (des crachats et des éternuements notamment).
- Le personnel zoologique : Un examen clinique, une vérification du statut vaccinal (BCG) ainsi qu'un dépistage intradermique et/ou radiographique de la tuberculose devraient être imposés à tous lors de l'embauche. Seuls les employés négatifs (ou vaccinés) devraient être autorisés à travailler avec les espèces particulièrement sensibles, tels que les éléphants et les primates. Les soigneurs de ces secteurs, ainsi que les vétérinaires, devraient ensuite subir des tests de dépistage annuels. Ces personnes doivent être informées des grandes lignes de la maladie, du risque de transmission homme-éléphant et éléphant-homme et des conséquences qui en découlent.

Remarque : Ces mesures de protection des éléphants contre les humains excréteurs permettent par ailleurs également de protéger les humains contre les éléphants excréteurs.

Les mesures vis-à-vis du personnel sont de plus en plus appliquées en Amérique du Nord, mais restent très rarement mises en place en Europe. Elles sont, à l'inverse, rigoureusement respectées dans les laboratoires travaillant avec des primates non humains, où le risque de transmission de *M. tuberculosis* à l'homme est pris très au sérieux. Ces protocoles devraient servir de modèles aux mesures appliquées dans les parcs zoologiques.

L'ensemble de ces mesures défensives sont capitales dans la prophylaxie de la tuberculose chez l'éléphant car elles anticipent sur les risques d'apparition d'un foyer tuberculeux, foyer très difficile à enrayer par des mesures offensives, une fois déclaré.

### **3.6.2 Mesures de prophylaxie offensive**

Lorsqu'un foyer de tuberculose se déclare dans une collection zoologique, il est souvent difficile de savoir quelles sont les mesures à prendre immédiatement et quelles sont celles qui peuvent attendre. Ce paragraphe présente les différentes mesures de prophylaxie offensive lors d'apparition d'un cas de tuberculose chez un éléphant et suggère un ordre hiérarchique à adopter dans une telle situation.

#### **a. Mesures de limitation immédiates**

Dès qu'il y a suspicion de tuberculose chez un éléphant, les premières mesures à prendre consistent en :

- l'interdiction stricte de tout mouvement d'animaux du parc, jusqu'à ce que la suspicion soit levée.
- l'isolement immédiat de l'animal suspect et la mise en place de mesures de quarantaine adéquates, concernant notamment les bâtiments, le matériel et le personnel.
- l'inventaire de tous les animaux ayant été en contact avec lui, notamment les autres éléphants et les animaux des enclos adjacents, sans oublier les animaux récemment déplacés dans d'autres parcs zoologiques.
- la réalisation des examens nécessaires à la confirmation de la suspicion, à savoir un prélèvement de sang le plus rapidement possible (pour soumission à des tests sérologiques, notamment le test rapide ElephantTB StatPak®), et éventuellement (en fonction des résultats des premiers tests) la réalisation de lavages de trompe (pour analyse bactériologique).

Après ces mesures d' « urgence », une estimation de la propagation de l'infection au sein du parc doit être réalisée.

## b. Estimation de l'impact du foyer tuberculeux

Si la tuberculose est confirmée (ou que la suspicion est très forte) sur un éléphant, il est nécessaire de tester :

- les autres éléphants du troupeau : des tests sérologiques (ElephantTB StatPak +/- ELISA ou MAPIA) doivent être effectués sur chaque individu du groupe le plus rapidement possible, ainsi qu'éventuellement une « triple » culture sur lavage de trompe.
- tous les mammifères ayant été en contact avec l'éléphant positif (étant donné que tous les mammifères sont sensibles à la tuberculose). Ceux ci regroupent les animaux partageant l'enclos des éléphants (dans le cas d'une présentation mixte), mais aussi ceux occupant les enclos adjacents. On ignore quel périmètre exact il est judicieux de considérer comme étant « à risque » : 20 à 30 mètres semblent être un bon compromis si l'on prend en compte uniquement la dispersion par l'individu infecté. Cependant, la dissémination des bacilles, autrement que par l'éléphant lui-même, existe (matériel, fumier, personnel) et l'ensemble de la collection doit donc bénéficier d'une attention particulière. Par ailleurs, outre les problèmes logistiques liés à la réalisation de tests de dépistage sur les autres espèces (pour les enclos adjacents), se pose le problème du manque de fiabilité de ces tests chez les autres espèces: les résultats doivent ainsi être interprétés en connaissance de cause et en gardant un esprit critique.
- les membres du personnel ayant été en contact avec l'éléphant positif. Des tests intradermiques doivent être réalisés et comparés, dans l'idéal, avec les résultats des examens de référence effectués lors de l'embauche, ou lors de tests antérieurs. Ces résultats sont particulièrement difficiles à interpréter et le recours à d'autres examens permet parfois d'aider au dépistage (radiographies thoraciques et tests interférons gamma notamment). Ces démarches sont sous la responsabilité, en France, de la médecine du travail et ne peuvent être que suggérées (et non imposées) par l'institution zoologique elle-même.

Ces différents tests doivent être lancés le plus rapidement possible car les délais nécessaires à l'obtention des résultats sont souvent longs. Tout résultat positif ou douteux doit par ailleurs être pris très au sérieux étant donné le contexte épidémiologique fortement suspect.

La troisième mesure offensive importante consiste en une désinfection adéquate des locaux et du matériel.

### c. Désinfection de l'environnement

Il est très important de procéder à une désinfection rigoureuse de l'environnement contaminé afin de limiter l'expansion de la maladie. Les bâtiments, l'ensemble du matériel, les réservoirs d'eau et ceux de nourriture doivent être désinfectés avec méthode, en deux temps :

- Un récurage et un nettoyage mécanique complets, sans lesquels toutes les mesures de désinfection sont inutiles.
- Une désinfection chimique au moyen de produits efficaces contre les mycobactéries et appliqués en respectant les temps d'attente. A noter que les bacilles tuberculeux résistent aux acides, aux bases en solution et aux ammoniums quaternaires, mais sont sensibles à l'iode, à l'alcool, aux dérivés phénoliques, aux hypochlorites et au formol (cf §.3.1.2.e.). Des solutions de phénol à 30 g/L (3-5 %) ou d'hypochlorite à 1° chlorométrique peuvent être utilisées.

Ce cycle doit être répété trois fois à 7 jours d'intervalle dans la mesure du possible.

A noter que la désinfection chimique peut être remplacée par une désinfection physique : les bacilles sont tués à 121 °C pendant 15 minutes.

Des procédés mécaniques, tels que le retournement du sol dans l'enclos extérieur par exemple, sont parfois associés aux mesures de désinfection des bâtiments.

Remarque : Il est possible que l'ensemble de ces mesures de désinfection soit dicté, effectué et/ou pris en charge par les autorités sanitaires du pays (DSV en France).

Après la mise en place de ces mesures prophylactiques pratiques (dépistage et désinfection), une enquête épidémiologique doit être lancée pour les raisons évoquées dans le paragraphe suivant.

#### d. Enquête épidémiologique

Lorqu'un cas de tuberculose est confirmé sur un éléphant, la réalisation d'une enquête épidémiologique en amont et en aval du foyer de départ est primordiale. Elle doit permettre idéalement d'identifier :

- la source de l'infection,
- la date approximative de la contamination,
- les établissements susceptibles d'avoir été infectés,
- les animaux et les personnes devant être considérés comme étant « à risque ».

L'examen de sérum antérieurs permet souvent de retracer l'histoire de la maladie et de dater le début de l'infection. **Ceci justifie l'importance de constituer une sérothèque où sont conservés des sérum prélevés à intervalles réguliers.** Des dossiers médicaux individuels à jour et les registres décrivant les mouvements des animaux sont également d'une aide précieuse lors de ces enquêtes.

Par ailleurs, la réalisation d'une enquête épidémiologique nécessite souvent la collaboration d'autres institutions zoologiques, institutions ayant hébergé l'éléphant infecté dans les années précédentes ou ayant reçu récemment un animal en contact avec l'éléphant malade. Il est très important pour faciliter ce type d'enquête que **les parcs coopèrent en faisant preuve d'une totale transparence.**

Ces enquêtes épidémiologiques sont aujourd'hui facilitées par l'utilisation de nouveaux outils permettant notamment de typer les mycobactéries (R.F.L.P., *spoligotyping*). En effet, ces techniques moléculaires permettent de distinguer plusieurs souches au sein d'une même espèce de mycobactérie, en fonction des caractéristiques du génome de l'agent en question (cf §.3.5.2.a.iii.). Ainsi, l'identification de souches semblables sur deux individus est en faveur d'une même origine (transmission interindividuelle ou même source de contamination). Ces techniques ont permis de mettre en relation des foyers de tuberculose étant survenus sur des espèces différentes, comme l'illustrent de récents cas en Suède et en France [87] ou dans des institutions différentes et géographiquement éloignées, comme l'illustrent plusieurs exemples en Amérique du Nord [81].

Savoir d'où vient l'infection (et où elle a pu se disséminer) est essentiel : cela permet d'une part d'identifier les lacunes des mesures prophylactiques défensives en place et, d'autre part,

d'alerter les autres institutions zoologiques concernées (en amont et en aval du foyer) afin qu'elles enrayent également l'infection.

Les mesures décrites jusqu'ici visaient à limiter la dissémination de l'agent infectieux, voyons à présent quelles sont celles qui visent à éliminer cet agent.

#### e. **Mesures d'assainissement**

Les mesures d'assainissement d'un troupeau visent à éliminer l'infection au sein du groupe. Ces mesures concernent non seulement les éléphants mais aussi l'ensemble des espèces sensibles ayant été en contact avec le troupeau. Le fait que les individus excréteurs constituent la source principale d'infection explique l'intérêt d'éliminer les animaux infectés. Imposé pour les troupeaux domestiques, l'abattage total n'est évidemment pas une solution envisageable dans les parcs zoologiques, il s'agit donc d'identifier au préalable le statut infectieux de chaque animal concerné.

Une fois que ces statuts sont définis, trois options sont envisageables :

- Eliminer l'infection en traitant les animaux excréteurs et les animaux porteurs.
- Eliminer l'infection en euthanasiant les animaux excréteurs et les animaux porteurs.
- Combiner les deux options précédentes : par exemple, en euthanasiant les animaux excréteurs et en traitant les animaux porteurs latents.

Le choix de l'une ou l'autre de ces options est toujours un choix délicat et dépend de nombreux facteurs propres à chaque institution. Chacune de ces possibilités présentent par ailleurs des intérêts et de nombreuses limites, dont il sera sujet dans la suite de ce manuscrit.

Le chapitre suivant fait le point sur les connaissances actuelles en matière de thérapeutique anti-tuberculeuse chez l'éléphant et sur les limites inhérentes à la mise en place de ces traitements.

### **3.7 Outils thérapeutiques disponibles pour le traitement d'un éléphant tuberculeux**

Différents traitements antituberculeux ont été tentés chez de nombreuses espèces en captivité, avec plus ou moins de succès. Chez l'éléphant, le premier traitement rapporté date de 1983 [22]. Par la suite, plusieurs articles décrivant les schémas thérapeutiques utilisés, les difficultés rencontrées et, plus récemment, les pharmaco-cinétiques des principales molécules employées chez l'éléphant ont été publiés. Citons notamment l'étude clé de Mikota (2001), qui décrit le traitement de 18 éléphants appartenant à 6 troupeaux différents (infectés par la tuberculose ou exposés à la mycobactéries) [81].

Ainsi, la thérapeutique antituberculeuse chez l'éléphant est un domaine relativement récent en médecine zoologique : les recommandations sont en constant remaniement et les nouvelles avancées sont nombreuses. Le principe général d'un traitement antituberculeux et les différentes données disponibles pour l'éléphant sont présentés dans un premier temps, avant de discuter des difficultés et des risques liés à la mise en place d'une thérapie chez cette espèce dans un second temps.

#### **3.7.1 Principe général et recommandations lors de la mise en place d'un traitement antituberculeux chez l'éléphant**

Après avoir défini les grandes lignes à respecter lors d'une thérapie antituberculeuse, les questions de savoir qui traiter, avec quelles molécules, selon quel protocole et avec quelle efficacité sont abordées.



### a. Principe général d'un traitement antituberculeux

Tout traitement antituberculeux doit répondre à des règles strictes, quelle que soit l'espèce concernée [121]:

- La monothérapie est à proscrire : au moins deux médicaments auxquels le bacille est sensible doivent être combinés. Il a été montré chez l'homme qu'une combinaison d'un grand nombre de drogues augmentait la vitesse d'élimination de la mycobactéries dans les cultures [123, 128].
- La prescription médicamenteuse doit être respectée scrupuleusement : les posologies doivent être suffisantes, l'administration régulière et le traitement mené à son terme (le traitement doit être long, un an en moyenne).
- L'isolement des animaux est primordial : aucun contact avec le public ou avec d'autres animaux (non traités) n'est autorisé pendant toute la durée du traitement.

L'objectif de ces trois règles est d'éliminer l'infection chez l'animal malade, tout en évitant l'apparition de résistance et la dissémination du bacille à d'autres individus.

Les molécules utilisées lors de traitement d'une infection tuberculeuse diffèrent de celles appliquées à d'autres maladies bactériennes en raison de plusieurs propriétés spécifiques des mycobactéries et de leurs hôtes (paroi riche en acides mycoliques, parasite intracellulaire facultatif, maladie chronique et capacité des mycobactéries à persister à l'état de dormance).

Pour être efficace, un antituberculeux doit ainsi satisfaire à trois critères principaux :

- Atteindre la cible, c'est-à-dire pouvoir notamment pénétrer dans les macrophages de l'hôte (efficacité intracellulaire).
- Agir sur l'agent infectieux : la mycobactéries isolée doit donc être sensible à cette molécule, et cette sensibilité doit être vérifiée au préalable par la réalisation d'un antibiogramme.
- Etre peu毒ique, afin de permettre une thérapie nécessairement longue (il est donc utile que le médicament soit actif à faible dose).

Si l'on choisit d'opter pour une chimiothérapie, il est ainsi nécessaire de respecter ces règles générales et d'utiliser des molécules adaptées. Cependant, avant de savoir comment traiter, il faut décider qui traiter. Toutefois, la réponse à cette interrogation est loin d'être simple.

## b. Animaux candidats au traitement

Chez l'homme, il est établi qu'une tuberculose active doit être traitée. Par ailleurs, les patients suspects (c'est-à-dire ceux ayant été en contact avec un individu infecté ou ceux présentant un résultat douteux au test tuberculinique) sont également placés sous traitement selon le « principe de précaution » [123]. Ainsi, l'identification et le traitement des individus excréteurs et porteurs latents (potentiellement réactifs) est un moyen efficace de contrôle chez l'homme [93].

Chez l'éléphant, d'après les recommandations nord-américaines [128] :

- Les individus ayant eu au moins une culture positive sur lavage de trompe doivent être traités. Ils sont considérés comme excréteurs et représentent donc un danger pour l'homme et les autres animaux.
- Les éléphants négatifs à la culture mais ayant été en contact avec un animal positif ou étant positifs à l'un des tests sérologiques peuvent être traités en prophylaxie ou bénéficier d'une surveillance accrue au moyen d'outils diagnostiques variés. Le choix incombe aux vétérinaires et dépend de la stratégie d'éradication mise en place dans le parc. La tendance actuelle aux Etats-Unis est la suivante : lorsqu'un animal est positif à un test sérologique, de nombreux lavages de trompe sont effectués afin de savoir s'il est excréteur ou non. Cependant, au vu des nombreux faux-négatifs à la culture bactériologique sur échantillons de lavage de trompe (cf §.3.5.2.a.ii.), ces individus sont regroupés, isolés des séronégatifs et traités par précaution.
- Les autres éléphants ne sont pas concernés par les recommandations thérapeutiques.

Une fois que la décision de traiter est prise, il faut discuter du protocole thérapeutique à adopter, et notamment de quelles molécules utiliser.

### c. Principaux antituberculeux disponibles

On peut subdiviser les agents tuberculeux en deux classes :

- Les agents de première ligne, qui regroupent les molécules les plus efficaces, c'est-à-dire associant une forte activité et des effets secondaires limités.
- Les agents de seconde ligne, qui ne sont utilisés qu'en cas d'intolérance ou de multi-résistance aux drogues de première ligne.

Toutefois, l'attribution de certains médicaments dans l'une ou l'autre de ces catégories ne fait parfois pas l'unanimité auprès des scientifiques.

#### i. Agents antituberculeux de première ligne

Le mécanisme d'action et l'efficacité présumée des quatre agents de première ligne sont énumérés ci-dessous.

##### Isoniazide (INH)

**Mécanisme d'action :** l'isoniazide est un antibiotique bactéricide, inhibiteur de la synthèse de la paroi cellulaire, métabolisé par le foie et excrété dans l'urine.

**Efficacité :** l'isoniazide est l'antituberculeux le plus efficace chez l'homme contre *M. tuberculosis*.

##### Ethambutol (EMB)

**Mécanisme d'action :** l'éthambutol est un antibiotique bactériostatique, inhibiteur d'un constituant de la paroi cellulaire.

**Efficacité :** l'éthambutol n'est pas recommandé en monothérapie car il ne prévient que faiblement l'apparition de résistance acquise.

### Pyrazinamide (PZA)

**Mécanisme d'action** : le mécanisme d'action précis de la pyrazinamide est inconnu : son activité bactéricide est faible mais son activité stérilisante est très importante, tout particulièrement dans les macrophages et en milieu acide. L'efficacité de la molécule requiert, par ailleurs, la présence d'une pyrazinamidase intacte. Or *Mycobacterium bovis* ne possède pas cette enzyme : *M. bovis* est donc résistant par nature à la pyrazinamide.

**Efficacité** : la pyrazinamide n'est pas recommandée en monothérapie, elle est efficace contre les mycobactéries en combinaison avec d'autres drogues. Elle est inefficace contre *M. bovis*.

### Rifampicine (RIF)

**Mécanisme d'action** : la rifampicine est un antibiotique bactéricide, inhibiteur de la synthèse d'ARN. Elle est métabolisée par le foie et excrétée dans la bile.

**Efficacité** : la rifampicine a une action intracellulaire et extracellulaire, ce qui fait d'elle une molécule très efficace. Elle permet notamment de limiter le risque d'acquisition de résistance à l'isoniazide lorsqu'elle est associée. Cependant, elle accélère le métabolisme de nombreux médicaments, notamment les glucocorticoïdes, et diminue donc leur efficacité.

Ces quatre agents de première ligne sont les antituberculeux les plus couramment utilisés chez l'éléphant. Des agents de seconde ligne viennent parfois s'y ajouter.

## ii. Agents antituberculeux de seconde ligne

Ces agents correspondent plus à des familles d'antibiotiques qu'à des molécules particulières.

### Certains aminoglycosides (streptomycine\*, amikacine)

**Mécanisme d'action** : les aminoglycosides sont des antibiotiques bactéricides, inhibiteurs de la synthèse protéique.

\*La streptomycine est parfois classée parmi les agents de première ligne.

Certaines fluoroquinolones (enrofloxacine, ciprofloxacine, moxifloxacine, gatifloxacine, ofloxacine et lévofloxacine)

**Mécanisme d'action :** les quinolones sont des inhibiteurs de l'ADN-gyrase.

De nombreuses autres molécules sont utilisées très rarement ou ont été découvertes récemment :

- Certains macrolides,
- Certains anti-métabolites (anti-folates),
- Mais aussi l'acide para-aminosalacylique, les oxazolidinones, l'éthionamide, la prothionamide, la capréomycine, la cycloséridine, la thiacétazone.

Ces agents de seconde ligne sont de plus en plus utilisés dans les traitements chez l'homme. Cependant, mise à part la streptomycine, ils ne sont pas encore d'actualité chez l'éléphant, notamment en raison des coûts importants qui leur sont associés. Par ailleurs, seules les drogues de première ligne ont fait l'objet d'études pharmacocinétiques spécifiques chez l'éléphant.

#### **d. Données pharmacologiques sur les principaux antituberculeux**

La réalisation d'études pharmacocinétiques est difficile en pratique : les données sont éparses, les échantillons souvent peu représentatifs et la randomisation impossible. Cependant, plusieurs études concernant l'évaluation pharmacocinétique de l'isoniazide, de l'éthambutol, de la pyrazinamide et de la rifampicine chez l'éléphant ont été publiées en 2005 et 2006 par Maslow.

Ces études sont résumées ci-dessous : elles ont permis de déterminer les doses et les voies d'administration acceptables. Les doses indiquées ci-dessous correspondent aux doses conseillées au démarrage. Ces doses doivent permettre d'atteindre les concentrations sériques cibles (habituellement reconnues efficaces chez l'homme) en médicament et sont à réadapter en fonction des concentrations atteintes lors des contrôles d'efficacité (cf § 3.7.1.f.iii.).

## i. l'isoniazide

Cette étude a été réalisée sur 41 éléphants, entre 1996 et 1999 [71]. Elle permet de conclure que :

- L'exposition par voie rectale est comparable à l'exposition par voie orale.
- Une suspension à base de poudre préparée fraîchement induit une meilleure exposition qu'une solution pré-mélangée.
- L'incorporation de l'isoniazide à la nourriture (à volonté ou donnée à la main) induit une absorption beaucoup plus variable et plus tardive que la voie orale directe (administration directe dans l'oropharynx).
- La concentration maximale sérique est atteinte entre une et trois heures post-administration et est indépendante de la voie d'administration.
- Le temps de demi-vie est compris entre 2 et 5 heures.

Ainsi, les recommandations pour l'isoniazide sont les suivantes :

- Voies d'administration admises : voie orale directe, voie rectale.  
Rq : la voie intramusculaire s'est montrée efficace chez l'antilope (pas de donnée actuellement pour l'éléphant)
- Doses de départ :
  - 7,5 mg/kg/j si la solution est pré-mélangée (voie rectale ou voie orale directe)
  - 4 mg/kg/j si la solution est fraîchement reconstituée (voie orale).
- Prises de sang de contrôle (niveaux sériques) : à 2 et 6 h post-administration.

## ii. l'éthambutol

Cette étude n'a été réalisée que sur 6 animaux appartenant à un unique troupeau : bien qu'insuffisante, elle apporte des informations pratiques intéressantes [72] :

- La voie orale est mieux tolérée que la voie rectale : l'éthambutol cause une irritation significative de la paroi du rectum (non améliorée avec l'ajout de protecteur, tel que la méthylcellulose) provoquant une expulsion rapide (voire immédiate) du contenu rectal. La biodisponibilité par voie rectale est ainsi 2 à 6 fois plus faible que par voie orale.

- La concentration maximale sérique est atteinte entre  $\frac{1}{2}$  heure et 2 heures post-administration et est un peu plus rapide par voie rectale.
- Le temps de demi-vie est compris entre 3 et 4 heures.

Ainsi, les recommandations pour l'éthambutol sont les suivantes :

- Voies d'administration admises : voie orale directe uniquement.  
Rq : la voie sous-cutanée est décrite chez l'antilope (pas de donnée actuellement pour l'éléphant).
- Doses de départ : 30 mg/kg/j (voie orale directe).

### iii. la pyrazinamide

Cette étude a été réalisée sur 23 éléphants, entre 1996 et 1999 [133]. Elle permet de conclure que :

- L'acceptabilité de la pyrazinamide par voie orale est mauvaise.
- L'efficacité est supérieure ( $C_{max}$  plus grand) par voie orale directe que par voie rectale, les biodisponibilités étant comparables.
- L'incorporation de la pyrazinamide à la nourriture (à volonté ou donnée à la main) induit une absorption beaucoup plus variable et plus faible que la voie orale directe *a jeun*.
- La concentration maximale sérique est atteinte en moins de 2 heures post-administration et est indépendante de la voie d'administration.
- Le temps de demi-vie est compris entre 3 et 4 heures.

Ainsi, les recommandations pour la pyrazinamide sont les suivantes :

- Voies d'administration admises : voie orale directe, voie rectale (en cas d'intolérance de la voie orale).  
Rq : la voie sous-cutanée s'est montrée efficace chez l'antilope (pas de données actuellement pour l'éléphant)
- Doses de départ : 30 mg/kg/j (voies orale ou rectale).
- Prises de sang de contrôle (niveaux sériques) : à 1 et 2 h post-administration.

#### iv. la rifampicine

Cette étude a été réalisée sur 25 éléphants, entre 1997 et 1999 [99]. Elle permet de conclure que :

- L'absorption par voie rectale est globalement faible, surtout lors d'utilisation de suppositoires (en moyenne deux à dix fois plus faible que lors d'administration orale directe).
- L'incorporation de l'isoniazide à la nourriture (à volonté ou donnée à la main) induit une absorption beaucoup plus faible que la voie orale directe (administration directe dans l'oropharynx).
- Une suspension à base de poudre fraîchement préparée induit une exposition en moyenne 9 fois supérieure à l'utilisation d'une solution pré-mélangée. Il est cependant possible que ces écarts s'expliquent en partie par des différences dans les conditions de conservation des drogues.
- L'absorption de la rifampicine par voie orale est plus lente et plus variable que chez l'homme : la concentration maximale sérique est atteinte en 4 à 6 heures (contre 2 heures post-administration chez l'homme) et la présence d'une auto-induction (les concentrations atteignent typiquement un plateau en 1 à 2 semaines chez l'homme) n'a pas pu être mise en évidence chez l'éléphant.

Ainsi, les recommandations pour la rifampicine sont les suivantes :

- Voie d'administration admise : voie orale directe uniquement (suspension à base de poudre plutôt que solution pré-mélangée).
- Doses de départ : 10 mg/kg/j (voie orale)
- Prises de sang de contrôle (niveaux sériques) : à 2 et 4 h post-administration.
- Conditions de conservation de la rifampicine : 22°C, à l'abri de la lumière.

Remarque : Toutes ces études ont été réalisées lors d'administration de combinaisons de drogues, il est ainsi impossible de savoir s'il existe des interactions pharmacocinétiques entre les différents antituberculeux, c'est-à-dire si les résultats auraient été différents dans le cas de monothérapies. Cependant, ce type d'étude a été mené chez l'homme et il semblerait que les comportements pharmacocinétiques sont quasiment identiques que la molécule soit administrée seule ou qu'elle soit utilisée en combinaison avec d'autres antituberculeux.

Par ailleurs, aucune étude chez l'éléphant n'a été menée avec les antituberculeux de seconde ligne. Lorsque ces derniers sont utilisés (ce qui reste très rare), les doses et les voies d'administration sont extrapolées des données humaines ou des publications concernant d'autres espèces animales.

A la lumière de ces données pharmacocinétiques, voyons à présent quels sont les schémas thérapeutiques possibles chez l'éléphant.

### e. Schéma thérapeutique recommandé [128]

Pour établir un protocole thérapeutique, il est nécessaire de définir quelles molécules utiliser, à quelles doses, à quelle fréquence et pendant combien de temps, ainsi que les voies d'administration à privilégier.

#### i. Choix des molécules

Le choix des molécules repose avant tout sur le spectre de sensibilité de la mycobactéries isolée vis-à-vis des principaux antituberculeux. **Il est donc indispensable qu'un antibiogramme soit réalisé** le plus rapidement possible, et ceci à partir d'un prélèvement effectué avant toute prise de médicaments. Dans le cas d'un traitement prophylactique (exposition à un animal infecté) ou d'un traitement chez un animal séropositif sans culture positive, l'antibiogramme de référence est celui du cas index, c'est-à-dire celui du premier cas apparu dans la collection.

Les résultats d'un antibiogramme ne sont pas disponibles immédiatement (délai de trois semaines environ après l'identification de la mycobactéries). Il faut donc distinguer deux étapes dans le choix des molécules :

- Avant la réception de l'antibiogramme : le traitement empirique comporte idéalement la combinaison des quatre drogues de première ligne (isoniazide, rifampicine, éthambutol, pyrazinamide).

- Dès réception de l'antibiogramme : le vétérinaire choisit alors deux ou trois antituberculeux auxquels l'animal (ou le cas index) est sensible. Dans la mesure du possible, la combinaison doit comporter l'isoniazide (sauf en cas de résistance) ainsi qu'un ou deux autres antituberculeux de première ligne, afin d'assurer une continuité avec le traitement empirique. D'une manière générale, les cas de chimio-prophylaxie sont traités avec deux molécules et les cas avérés (culture ou sérum positifs) avec trois molécules pendant les 60 premières doses puis avec deux molécules pour le reste du traitement.

Remarque : Initialement, la thérapie incluait uniquement des antituberculeux de première ligne. Etant donnée l'apparition de résistance, il peut être aujourd'hui nécessaire d'inclure des agents de seconde ligne pour le traitement.

## ii. Posologies des médicaments

La détermination des doses thérapeutiques chez l'éléphant est basée sur un objectif précis : **atteindre les niveaux sériques cibles**, reconnus efficaces chez l'homme, pour chacune des molécules utilisées. En effet, il est primordial de ne pas sous-doser les médicaments (pour la plupart concentration-dépendants) afin de ne pas favoriser l'émergence de résistances acquises.

Les niveaux sériques cibles, efficaces chez l'homme, 2 heures post administration, sont indiqués ci-dessous [128] :

- Isoniazide : 3-5 µg/mL
- Rifampicine : 8-24 µg/mL
- Pyrazinamide : 20-60 µg/mL
- Ethambutol : 2-6 µg/mL

La détermination des posologies se déroule donc en deux temps :

- Premier temps : **l'administration des doses « recommandées »** définies par des études pharmacocinétiques [71, 72, 99, 133]. Ces doses permettent théoriquement d'atteindre les niveaux sériques requis de médicaments. Elles sont récapitulées ci-dessous et correspondent globalement aux doses humaines légèrement majorées :

- Isoniazide : 4 ou 7,5 mg/kg (selon la formulation : pré-mélange ou poudre)
  - Rifampicine : 10 mg/kg
  - Pyrazinamide : 30 mg/kg
  - Ethambutol : 30 mg/kg
- **Second temps : l'adaptation de la posologie** en fonction des niveaux sériques réellement atteints. Dès que l'animal prend régulièrement son traitement, des prises de sang sont réalisées pour connaître les concentrations sériques en médicaments. Si les concentrations cibles (cf ci-dessus) ne sont pas atteintes, les doses sont réajustées au mieux. Les niveaux cibles de chacune des molécules doivent être atteints sur deux prélèvements sériques consécutifs réalisés à au moins deux semaines d'intervalle pour que la posologie soit validée. Il est alors possible de compter le nombre de doses efficaces reçues par l'animal, qui servira de base à la détermination de la durée du traitement.

#### D'un point de vue pratique :

Pour la détermination des taux sériques, 2 mL de sérum sont nécessaires pour chaque médicament. Dans l'idéal, deux prises de sang doivent être réalisées afin d'estimer au mieux les concentrations sériques : les moments optimaux pour effectuer ces prélèvements sont en cours de détermination à partir des études pharmacologiques. A l'heure actuelle, des prises de sang à 2 et 6 heures post-administration pour l'isoniazide, à 1 et 2 heures post-administration pour la pyrazinamide et à 2 et 4 h post-administration pour la rifampicine sont recommandées. Ces drogues étant instables à température ambiante, les sérums doivent être envoyés congelés (si possible à - 70°C, sinon à - 20°C immédiatement) dans de la glace. Le prix approximatif d'un dosage aux Etats-Unis est de 50 \$ par drogue. Par ailleurs, afin de respecter au mieux les posologies, il est important que l'éléphant soit pesé précisément avant puis régulièrement tout au long du traitement.

Les recommandations concernant les doses et les niveaux sériques cibles sont en constante discussion, notamment à cause des nombreux effets secondaires observés (cf ci-après). Les doses sont également à adapter à la fréquence d'administration des médicaments.

### iii. Fréquence d'administration

**Il est recommandé d'administrer chacune des molécules quotidiennement** (comme chez l'homme) pendant toute la durée du traitement.

Cependant, à partir du moment où l'animal a reçu ses 60 premières doses efficaces, il est possible d'opter pour une thérapie à jours alternés (ou *pulse therapy*). Ce protocole consiste en l'administration de doses doubles une journée sur deux. Cette solution est réservée aux cas où une administration quotidienne est rendue impossible par des difficultés techniques (contention difficile) ou par l'existence d'effets secondaires graves (et qui seraient moins prononcés à cette fréquence d'administration).

Que les molécules soient administrées quotidiennement ou une journée sur deux, la durée du traitement est la même.

### iv. Durée du traitement

Etant donné le manque de recul sur son efficacité à long terme, le traitement chez l'éléphant est poursuivi un peu plus longtemps que chez l'homme (où il dure 6 mois en moyenne).

En théorie, la durée du traitement chez l'éléphant est de **9 mois pour un traitement prophylactique** et de **12 mois pour le traitement d'un cas avéré**. Cependant, cette durée se comptabilise davantage en nombre de doses efficaces qu'en nombre de jours.

Ainsi en pratique, un traitement « d'un an » équivaut à l'administration effective de 365 doses efficaces et dure donc en moyenne plus d'un an (12 à 15 mois) si l'on compte les jours où l'animal refuse les médicaments, ceux où il a reçu des doses non optimales et ceux où le traitement a du être arrêté à cause des effets secondaires. Il est par exemple accepté que les 60 premières doses soient administrées sur 90 jours compte tenu des difficultés techniques ; difficultés notamment liées à l'administration orale ou rectale des médicaments.

### v. Voies d'administration possibles

Les traitements chez l'éléphant peuvent être administrés par voies orale et / ou rectale selon la molécule (cf §.3.7.1.d.) :

- Isoniazide et pyrazinamide : voies orale ou rectale
- Rifampicine et éthambutol : voie orale seulement

En fonction de l'acceptabilité par l'animal et de la faisabilité technique, le vétérinaire peut choisir d'opter pour l'une ou l'autre des possibilités. Toutefois, lors d'administration par voie orale, l'administration doit obligatoirement être directe (au moyen d'une « sonde » oropharyngienne) et non associée à la nourriture [71, 99, 133].

Les difficultés techniques liées à ces modes d'administration sont discutées dans la suite du document (cf §.3.7.2.a.ii.).

Ainsi il existe une certaine souplesse dans la détermination du schéma thérapeutique de base. En effet, le choix des doses ainsi que des fréquences et des voies d'administration est empirique : ces paramètres sont à réadapter selon l'individu, et plus précisément selon ses niveaux sériques en médicaments, selon les effets secondaires observés et selon sa tolérance aux contentions quotidiennes. Cependant, il n'est pas possible de modifier constamment le protocole, sous peine de nuire à l'efficacité du traitement et/ou de voir apparaître des pharmacorésistances. Ainsi, pour tout changement au cours du traitement, la consultation préalable des autorités et des groupes de spécialistes est plus que recommandée.

Il apparaît évident que le schéma thérapeutique « parfait » n'existe pas et qu'aucun protocole ne peut être respecté à la lettre, en raison notamment des nombreuses difficultés techniques. Qu'en est-il donc de l'efficacité des traitements mis en place chez l'éléphant ?

## **f. Efficacité des traitements chez l'éléphant**

Après avoir analysé les données rétrospectives disponibles sur l'efficacité réelle des traitements antituberculeux chez l'éléphant, les indicateurs permettant d'évaluer cette efficacité et les recommandations concernant son suivi sont présentés.

### **i. Efficacité réelle**

Habituellement, la détermination de l'efficacité d'un traitement repose sur **l'évaluation de sa capacité à éliminer l'agent infectieux**. Dans le cas de la tuberculose chez l'éléphant, les moyens diagnostiques actuels ne permettent pas de savoir avec certitude si la mycobactéries est présente ou non dans l'organisme, sauf lors d'examen *post-mortem*.

Or, en mai 2005, sur les 22 éléphants à culture positive ayant été traités, seuls cinq de ces éléphants étaient morts ou avaient été euthanasiés [64, 79]. Ainsi, on ne connaît l'efficacité réelle des traitements que dans cinq cas, ce qui explique le peu de recul qui existe sur les thérapeutiques antituberculeuses chez l'éléphant :

- Chez 3 de ces 5 éléphants, aucune mycobactérie n'a été isolée suite à l'autopsie et il est donc possible de considérer que les traitements ont éliminé l'infection.
- Chez les deux autres, l'autopsie puis les cultures ont révélé la persistance de mycobactéries. Les traitements n'ont donc pas permis l'élimination de l'infection. Cependant, ces deux cas étaient « particuliers » :
  - Le traitement n'avait pas été respecté scrupuleusement pour l'un d'eux à cause de difficultés techniques.
  - Le traitement n'avait pas été mené à son terme pour l'autre : la tuberculose était devenue multi-résistante (isoniazide et streptomycine) et l'euthanasie avait été préférée avant la fin du traitement.

Ainsi les moyens d'évaluer l'efficacité stricte des schémas thérapeutiques employés sont limités et le recul sur les performances des traitements est minime. Il existe toutefois des indicateurs *ante-mortem* de l'efficacité du traitement, qu'il faut cependant interpréter avec précaution.

## ii. **Indicateurs *ante-mortem* de l'efficacité du traitement**

Le principe et les limites de ces différents indicateurs sont présentés ci-dessous, afin notamment de comprendre quelles sont les difficultés que rencontrent les vétérinaires lorsqu'ils doivent se prononcer sur le statut d'un éléphant en fin de traitement.

### Test tuberculinique

**Principe :** Les premières évaluations *ante-mortem* de l'efficacité des traitements reposaient sur le virage tuberculinique observé (passage d'un test tuberculinique positif avant la mise en place du traitement à un test négatif à la suite de ce traitement) [108].

**Limites :** Outre la faible fiabilité du test tuberculinique chez l'éléphant (cf §.3.5.2.b.i), il est évident que l'utilisation d'antituberculeux provoque une immunodépression chez l'animal traité, et explique le manque de sensibilité d'un test à la tuberculine réalisé chez cet animal. Ce test n'est plus utilisé actuellement.

### Culture sur lavage de trompe

**Principe** : Lorsque la culture sur lavage de trompe est positive au départ, le fait qu'elle redevienne négative au cours du traitement est un indicateur de l'arrêt de l'excrétion de la mycobactéries par l'animal.

**Limites** : Outre les limites relatives au manque de sensibilité du test (cf §.3.5.2.a.ii.), cet indicateur d'efficacité du traitement comporte deux inconvénients majeurs :

- Il indique que l'animal n'est plus excréteur mais en aucun cas qu'il est guéri (c'est-à-dire que la mycobactéries a été éliminée de l'organisme)
- Il n'a pas une grande valeur chez les animaux traités en prophylaxie (exposition à un animal infecté) ou uniquement séropositifs pour lesquels aucune mycobactéries n'a été isolée au départ.

**Cas rapportés** : De récentes données semblent montrer que le traitement permet rapidement un arrêt de l'excrétion : les cultures sur lavage de trompe de trois éléphants sont devenues négatives après quelques semaines de traitement [79].

### Concentrations sériques des médicaments

**Principe** : Un moyen indirect d'évaluer l'efficacité d'un traitement est de considérer que lorsque les niveaux sériques cibles des antituberculeux sont atteints, le traitement est supposé efficace.

**Limites** : Les concentrations cibles visées chez l'éléphant n'ont pas été déterminées spécifiquement pour cette espèce : elles sont extrapolées à partir des valeurs humaines. On ignore ainsi si elles sont réellement le reflet de l'efficacité du traitement chez l'éléphant.

**Cas rapportés** : Une publication souligne que les lavages de trompe étaient redevenus négatifs chez deux éléphants traités à l'isoniazide et la rifampicine alors que le niveau sérique cible de la rifampicine n'était pas atteint [24]. Cela peut s'expliquer de trois façons :

- L'isoniazide seul suffisait à la guérison.
- Le niveau sérique efficace de rifampicine chez l'éléphant est en réalité plus faible que celui requis chez l'homme.
- Les lavages de trompe étaient faussement négatifs.

Dans tous les cas, cela illustre qu'il existe des failles dans l'évaluation de l'efficacité du traitement par l'une ou l'autre des méthodes (lavage de trompe ou détermination des concentrations sériques en médicaments).

### Tests sérologiques

**Principe :** Il a été montré que l'administration d'un traitement antituberculeux chez l'éléphant entraînait des changements de caractéristiques de la réponse humorale [128]. Les profils sérologiques du MAPIA et de l'ELISA sont différents avant et pendant le traitement [64].

**Limites :** Ces modifications sérologiques ne sont pas encore codifiées. Des études sont en cours d'investigation afin de savoir si tel ou tel changement dans le profil sérologique peut être considéré comme une « preuve » de guérison.

**Cas rapportés :** Dans une étude récente, il a été montré que la réponse immunitaire vis-à-vis de l'antigène ESAT-6 (antigène immunodominant lors d'infection tuberculeuse chez l'éléphant) diminuait chez les animaux traités et apparemment en voie de guérison (cultures négatives, bonne observance du traitement) alors que cette réponse restait prépondérante chez deux individus pour lesquels le traitement avait échoué (cultures positives *post-mortem*). Une augmentation brutale du taux d'anticorps anti-ESAT-6 avait été notée peu de temps avant que ces deux animaux soient à nouveaux excréteurs [64]. Ces résultats ouvrent de belles perspectives quant à la capacité des tests sérologiques (MAPIA notamment) à être de bons indicateurs pour le suivi thérapeutique.

Il existe ainsi plusieurs moyens d'évaluer l'efficacité d'un traitement autres que les données *post-mortem*. Les nouvelles méthodes de diagnostic sérologique devraient notamment être d'un grand recours. Bien qu'elles ne soient pas fiables à 100%, ces indications sur l'efficacité thérapeutique sont primordiales afin d'assurer un suivi de l'animal tout au long du traitement.

### iii. **Recommandations pour le suivi de l'efficacité d'un traitement**

Chacun des indicateurs de l'efficacité du traitement décrits ci-dessus comporte des limites. Afin de minimiser les risques d'erreur, il est judicieux de combiner les différents tests. Ainsi, afin de suivre l'efficacité du traitement, il est recommandé [128]:

- de contrôler régulièrement les niveaux sériques des différentes drogues utilisées (les coordonnées des laboratoires réalisant les dosages sont indiquées en **annexe B**).
- d'effectuer des lavages de trompes tous les deux mois jusqu'à 6 mois post-traitement, ainsi que des tests de sensibilité lorsque ces lavages permettent d'isoler une mycobactéries.
- D'effectuer des tests sérologiques (ELISA, MAPIA, Immunoblot et Elephant TB StatPak®) régulièrement. La fréquence de ces contrôles n'a pas encore été déterminée mais réaliser des contrôles sérologiques à chaque lavage de trompe semble raisonnable.
- **De poursuivre la surveillance des animaux au long terme : un éléphant ayant été sous chimiothérapie antituberculeuse doit toujours être considéré comme un animal à risque.**

A ce jour, en Amérique du Nord [128], pour qu'un éléphant infecté soit à nouveau considéré négatif (donc plus soumis aux restrictions de transport et de contact avec le public ou avec les autres animaux), il suffit que deux conditions soient remplies :

- Avoir reçu 6 mois de traitement avec la preuve que les niveaux sériques cibles de médicaments ont été atteints pour 180 doses (6x30 jours). Les dosages requis sont réalisés sur deux tests à deux dates distantes d'au moins deux semaines.
- Avoir des cultures bactériologiques sur lavage de trompe négatives. Les échantillons requis doivent être prélevés selon la *triple sample method*, deux fois à deux mois d'intervalle.

Ces deux conditions sont cependant très arbitraires. En effet, au vu des connaissances actuelles, l'éléphant (comme l'homme) semble cesser d'excréter la mycobactéries dès quelques semaines après le début du traitement [79]. Il est cependant difficile de déterminer si le traitement a éliminé la mycobactéries ou s'il a juste supprimé l'excrétion. Ainsi il existe un risque non négligeable de considérer comme guéris des éléphants en réalité encore porteurs de

la mycobactéries. Ces éléphants constituerait alors des réservoirs épidémiologiques de la maladie, avec un risque de réurgence très important.

Le problème de savoir si un éléphant peut réellement « guérir » de la tuberculose, c'est-à-dire éliminer l'infection, est actuellement une question clé pour la gestion des éléphants en post-traitement. Devant ces nombreuses interrogations sans réponse, l'une des options possibles, qui se dessine d'ailleurs aux Etats-Unis à l'heure actuelle, est de constituer des groupes « indemnes » et des groupes « suspects ». Ainsi, un éléphant en post-traitement, ne réintègrera pas n'importe quel troupeau, par peur qu'un jour, il se remette à être excréteur... Cela illustre une fois de plus la nécessité de poursuivre les recherches en matière de pathophysiologie, de techniques diagnostiques et de thérapeutique, et illustre par ailleurs l'une des nombreuses difficultés rencontrées lors de la mise en place d'un traitement antituberculeux chez un éléphant.

### **3.7.2 Difficultés et risques liés à la mise en place d'une thérapie**

Aux indéniables difficultés pratiques rencontrées tout au long du traitement s'ajoutent différents risques pour l'animal traité mais aussi pour l'homme et les autres espèces du parc : l'apparition d'effets secondaires pouvant compromettre la réussite du traitement, l'émergence d'une souche de mycobactéries pharmacorésistante et la possibilité de transmission du bacille à l'homme ou aux autres animaux en sont les principaux exemples.

#### **a. Difficultés pratiques rencontrées lors d'un traitement**

Les contraintes relatives à la mise en place d'une thérapie antituberculeuse ont été évoquées précédemment : elles sont particulièrement lourdes à gérer dans le cas d'un traitement sur un éléphant. En effet, l'isolement des animaux est difficile, l'administration des drogues nécessite du personnel qualifié et beaucoup de temps et les médicaments doivent être disponibles en quantité très importante.

### i. **Difficultés liées à l'isolement des animaux**

La nécessité d'isoler les animaux sous traitement a déjà été soulignée. Cette « quarantaine » est difficile à réaliser pour les éléphants pour deux raisons :

- Des raisons d'ordre matériel : le parc doit disposer de bâtiments et d'accès à l'extérieur permettant la séparation des animaux traités de ceux qui ne le sont pas. Par ailleurs, les outils de travail (tracteur, pelles, seaux...) doivent être réservés au secteur « infecté », ce qui signifie qu'il faut tout disposer en double.
- Des raisons relatives au bien-être animal : l'éléphant étant un animal social, il n'est pas éthique de le maintenir isolé tout seul pendant de longues périodes (plus d'un an), surtout s'il est présent dans le groupe depuis longtemps. Il est donc « presque nécessaire » que le traitement s'applique à plusieurs animaux (voire à tout le groupe) en même temps.

### ii. **Difficultés liées à l'administration des médicaments**

#### Administration par voie orale

L'éléphant possède un goût développé et une bonne mémoire : il est donc difficile de lui administrer des médicaments par voie orale quotidiennement sur de longues périodes. Plusieurs cas publiés [24] décrivent des éléphants refusant de prendre leur traitement par voie orale, d'où la nécessité de développer d'autres voies d'administration. Par ailleurs, la dissolution des médicaments dans l'eau de boisson n'est pas une option envisageable étant donnée la tendance des animaux à disperser leur eau partout. De plus, il a été montré que l'administration d'antituberculeux en combinaison avec la nourriture (que l'aliment soit donné à la main, mélangé à des « friandises » ou laissé à volonté) ne permettait pas d'atteindre les niveaux sériques requis [71, 99, 133]. Il est donc nécessaire que l'administration par voie orale soit directe. Ainsi les éléphants doivent être entraînés à accepter un pas d'âne afin de leur administrer les médicaments directement dans l'oropharynx via une seringue drogueuse d'équine ou un tube souple en caoutchouc.

### Administration par voie rectale

L'administration des médicaments par voie rectale peut être une solution à envisager en cas d'échec par prise orale, notamment avec la pyrazinamide. Cependant, certaines drogues (éthambutol) sont très irritantes pour la muqueuse rectale et d'autres (rifampicine) sont très mal absorbées par cette voie et ne doivent donc pas être administrées ainsi.

Le rectum doit être vidangé manuellement puis lavé à l'eau tiède avant chaque administration. Des suppositoires semi-solides sont alors introduits dans le rectum ou la solution est déposée directement sur la muqueuse à l'aide d'un tuyau en caoutchouc.

Par ailleurs, cette technique nécessite la coopération quotidienne d'un animal, préalablement entraîné, et constitue une manipulation risquée pour le personnel.

### Administration par voie parentérale

L'administration de médicaments par voie parentérale pose d'autres difficultés. D'une part, l'éléphant est une espèce chez laquelle il est fréquent d'observer des abcès au point d'injection. Ces abcès cicatrisent lentement et sont difficiles à soigner. Les formulations doivent donc être peu irritantes. D'autre part, il est nécessaire de disposer de formulations très concentrées (donc de reconditionner les médicaments) afin de réduire les volumes d'injection. Néanmoins, étant donné que les voies orale et rectale posent des difficultés en termes d'observance, la voie parentérale reste une option intéressante, d'autant plus que certaines drogues (amikacine notamment) ne sont disponibles que sous forme injectable. Elle demeure cependant peu utilisée à l'heure actuelle chez l'éléphant.

#### **iii. Coût des molécules**

Pour un éléphant asiatique adulte, administré aux posologies recommandées, l'isoniazide coûte en moyenne chaque jour 5 \$, la rifampicine 65 \$, l'éthambutol 155 \$ et la pyrazinamide 190 \$ [79] !

Ainsi, le traitement d'un éléphant revient à 50 000-60 000 US \$ uniquement en frais de médicaments, auxquels il faut ajouter les frais d'analyses indispensables pour le suivi médical (dosages sériques des concentrations d'antituberculeux et analyses hémato-biochimiques régulières) ainsi que le coût « humain » en termes de temps et de personnel impliqué.

De telles dépenses sont obligatoirement un obstacle à la mise en place d'un traitement chez cette espèce non seulement dans les parcs zoologiques mais aussi et surtout chez les éléphants domestiqués dans les pays asiatiques.

#### iv. Disponibilité des molécules

Traiter un éléphant de 5 tonnes équivaut à traiter environ 80 personnes, traiter un troupeau de 6 éléphants équivaut à en traiter 500 ! Des quantités énormes de médicaments sont nécessaires compte tenu du poids de l'animal et de la durée du traitement. Il est parfois impossible de se procurer les antituberculeux dans des délais adéquats. Les retards de livraison ainsi que les ruptures de stocks ont quelquefois mené à des discontinuités de traitement. Il est, par ailleurs, nécessaires d'obtenir toutes les autorisations requises pour l'utilisation d'une telle quantité d'antituberculeux, médicaments souvent soumis à des contraintes de délivrance et de circulation particulières.

#### v. Investissement humain

Traiter un animal quotidiennement pendant plus d'un an requiert un investissement humain énorme :

- D'une part, les animaux traités ont besoin d'une attention accrue et d'une surveillance quotidienne scrupuleuse de leur état général (appétit, forme, comportement anormal).
- D'autre part, l'administration des médicaments suppose une bonne connaissance des réactions de l'animal et des techniques médicales employées et requiert beaucoup de temps.
- Enfin, un entraînement médical intensif avant et pendant la thérapie est indispensable à la réussite de celle-ci.

Pour s'assurer que ces trois points seront respectés, il est important de **constituer une équipe soudée**, composée de soigneurs et de vétérinaire(s). Une formation spécifique doit ainsi être dispensée à toute l'équipe : elle doit notamment aborder les enjeux de l'observance du traitement et les risques liés à la tuberculose en tant que zoonose. La nécessité de communiquer (cahier de notes, réunions) constamment au sein de cette équipe est primordiale afin d'harmoniser les pratiques et d'effectuer un suivi précis des animaux.

Il peut arriver qu'une lassitude se crée, notamment à cause du caractère répétitif des actes par exemple : la réalisation d'un tel traitement est un défi pour l'équipe autant que pour l'animal et requiert de l'endurance. Ces exigences au niveau du personnel font que ce challenge n'est pas accessible à toutes les institutions zoologiques actuellement.

Les difficultés techniques liées à la mise en place d'un traitement chez l'éléphant sont donc nombreuses. Cependant, il est possible de les surmonter si l'on dispose de personnel expérimenté, d'animaux coopératifs et de moyens matériels et financiers adéquats. A ces problèmes techniques s'ajoute un risque majeur pour l'animal : l'apparition d'effets secondaires ; risque malheureusement indépendant de l'homme et difficilement contrôlable.

## **b. Risques pour l'animal : l'existence d'effets secondaires**

Les effets secondaires des principaux antituberculeux sont à ce jour bien connus chez l'homme. La liste de ces effets chez l'éléphant est moins exhaustive et correspond aux réalités de terrain décrites jusqu'à présent.

### **i. Effets secondaires décrits chez l'homme**

Les effets secondaires énumérés ci-dessous n'ont pas tous été décrits à ce jour chez l'éléphant. Toutefois, il est important de les connaître car ils peuvent tous survenir au cours d'un traitement antituberculeux, quelle que soit l'espèce [79, 128]. Il est donc primordial d'être attentif à ces signes afin de les détecter précocément.

#### **Isoniazide :**

- Principalement : hépatite et neuropathie périphérique.
- Plus rarement : anémie, céphalées, troubles gastro-intestinaux, anorexie, psychose, convulsions, encéphalopathie, éruption cutanée.

Lors de traitement à l'INH, la consommation de produits contenant de la tyramine (vin rouge, fromage) peut provoquer une réaction histaminique.

**Rifampicine :**

- Principalement : hépatite.
- Plus rarement : insuffisance rénale, anémie hémolytique, thrombocytopénie, céphalées, troubles gastro-intestinaux, anorexie, faiblesse, ataxie.
- Possiblement tératogène (déconseillé lors du premier trimestre de la grossesse).

**Pyrazinamide :**

- Principalement : arthrite et arthralgie (causées par une hyperuricémie).
- Plus rarement : hépatite, photosensibilité, troubles gastro-intestinaux, anorexie.

**Ethambutol :**

- Principalement : névrite optique.
- Plus rarement : insuffisance rénale, céphalées, arthralgie, anaphylaxie, neuropathie périphérique.

**Aminoglycosides (streptomycine, amikacine) :**

- Principalement : néphrotoxicité et ototoxicité (vertige, ataxie), réversibles lors de l'arrêt immédiat du traitement.

**Quinolones (ciprofloxacine, lévofloxacine) :**

- Rarement : diarrhée, photosensibilité, convulsions, agitation, anxiété.

**ii. Effets secondaires décrits chez l'éléphant**

De nombreux effets secondaires ont été rapportés chez l'éléphant comparativement au nombre de cas traités. Les cliniciens attribuent fréquemment ces effets à l'utilisation d'isoniazide. Cependant, il est difficile de déterminer si l'effet adverse est dû à un médicament plutôt qu'à un autre étant donné l'emploi (quasi systématique) de combinaison de drogues [128].

- Lors de traitement à l'isoniazide seul, ont été rapportés [79] :
  - o Des épisodes d'anorexie, de léthargie et de pica.
  - o Des changements d'humeur avec comportement agressif.

- De nombreuses modifications des paramètres biochimiques (augmentation des ASAT, de la bilirubine totale, des GGT, des acides biliaires et des LDH), parfois associées à des signes cliniques de souffrance hépatique (urine brune, troubles digestifs).
- Un cas de leucopénie grave (WBC passant de 13000 à 1900 / $\mu$ L).

Par ailleurs, il a été établi que l'isoniazide provoquait des effets secondaires lors d'administration rectale dès 5 mg/kg/j [71]. Or la dose recommandée d'isoniazide (au départ) par voie rectale est de 7,5 mg/kg/j (cf §.3.7.1.e.ii).

- Lors de traitement utilisant une association d'antituberculeux (ces combinaisons sont variables et sont indiquées entre parenthèses), ont été rapportés [79]:
  - Des épisodes d'anorexie et de léthargie (INH+RIF+PZA) (INH+PZA) (INH+RIF) (enrofloxacine + PZA) (PZA+EMB+amikacine+enrofloxacine).
  - Du pica : consommation de sable (INH+RIF).
  - Des signes oculaires : épiphora, blépharite et œdème cornéen (enrofloxacine + PZA).
  - Un cas d'ataxie, associée à une parésie/paralysie de la trompe (PZA+EMB+amikacine+enrofloxacine).
  - Un cas de raideur des membres (enrofloxacine + PZA).
  - Un cas d'anémie (INH+PZA) : les pharmacologistes indiquaient que les deux molécules affectaient les lignées érythrocytaires de la moelle osseuse mais par des mécanismes différents.

L'ensemble de ces effets se sont résolus en quelques jours à quelques semaines après la diminution des doses ou l'arrêt du traitement [79]. Une reprise progressive du traitement (demi-dose, puis augmentation sur plusieurs semaines) semble être mieux tolérée [81]. La thérapie à jours alternés, consistant à ne traiter qu'un jour sur deux mais à des doses doubles semble une option également envisageable.

D'une manière générale, il est très difficile d'atteindre les niveaux sériques cibles de médicaments sans induire aucun effet secondaire, ce qui explique la nécessité d'effectuer un suivi attentif de l'état général de chaque individu traité.

### iii. **Conséquences sur le suivi médical d'un éléphant sous traitement**

Compte tenu des nombreux effets secondaires rapportés, il est primordial d'assurer un suivi médical scrupuleux tout au long du traitement. Par ailleurs, de fortes variations existent entre les individus : il est donc important de surveiller chaque animal et non pas le troupeau dans son ensemble. Ainsi sont recommandés :

- Une surveillance étroite et quotidienne de l'état général (appétit, forme, comportement). Ces données doivent être notées dans un cahier ou sous forme informatique.
- Un suivi du poids mensuel (dans la mesure du possible).
- Un contrôle mensuel de la formule sanguine, des paramètres biochimiques (notamment hépatiques et rénaux) et des électrolytes.

Par ailleurs, certains effets secondaires peuvent être prévenus par des mesures prophylactiques simples. Ainsi, lorsqu'un éléphant est sous traitement antituberculeux, il est conseillé :

- D'éviter l'administration concomitante d'autres médicaments hépatotoxiques.
- D'éliminer de sa ration les produits fermentés afin de limiter les risques de réactions histaminiques (décris chez l'homme lors de traitement à l'isoniazide).
- D'administrer de la vitamine B6 (1 mg/kg/j) afin de prévenir une éventuelle neuropathie périphérique (traitement prophylactique systématique mis en place chez l'homme lors d'administration d'isoniazide).

Ces effets secondaires sont lourds et difficiles à gérer. Le fait que le traitement repose sur une combinaison de drogues augmente par ailleurs la probabilité d'apparition de ces effets toxiques. Ces derniers peuvent altérer le succès thérapeutique, notamment par une non observance du traitement qui constitue elle-même un risque d'émergence de pharmacorésistance, pouvant par ailleurs se propager à l'homme ou à d'autres animaux.

## c. Risques pour les autres animaux et pour l'homme

Il est évident que les difficultés évoquées ci dessus rendent très difficile la réalisation d'un traitement antituberculeux chez l'éléphant. Par ailleurs, à sa longueur, son coût et son caractère astreignant s'ajoutent les risques de sélection de souches résistantes et de transmission à l'homme.

### i. Sélection de souches résistantes aux antituberculeux

#### *Prévalence des souches pharmacorésistantes chez l'éléphant*

Une étude sur la résistance aux antituberculeux a été réalisée à partir de 33 souches de *M. tuberculosis* et d'une souche de *M. bovis* isolées chez 19 éléphants infectés provenant de 10 institutions différentes (Harris and Osorio, NVSL).

Cette étude a montré qu'une résistance à au moins un antituberculeux (pharmacorésistance simple) était présente chez 26,5 % des souches (9 cas sur 34) et une multi résistance chez 5,9 % des souches (2 cas sur 34) ; une multi résistance chez l'éléphant étant définie comme la résistance à au moins deux agents de première ligne.

Les résultats détaillés de cette étude sont reportés dans le tableau ci-dessous.

Antituberculeux	Nombre d'échantillons résistants	Prévalence dans cette population
Streptomycine	0/34	0 %
Isoniazide	8/34	23,5 %
Rifampicine	2/34	5,9 %
Ethambutol	0/34	0 %
Pyrazinamide	2/34 (dont un à <i>M. bovis</i> *)	5,9 %
<b>Pharmacorésistance simple</b>	<b>9/34</b>	<b>26,5 %</b>
<b>Multirésistance</b>	<b>2/34</b>	<b>5,9 %</b>

\* *M. bovis* est résistant, de manière naturelle, à la pyrazinamide.

**Figure 15 : Sensibilités de 34 souches de *M. tuberculosis* (33) et *M. bovis* (1) isolées chez l'éléphant vis-à-vis des principaux antituberculeux (J. Payer, NVSL, [79])**

Pour l'un de ces cas, l'acquisition de la résistance a été réellement prouvée : la souche initiale isolée était sensible à tous les antituberculeux de première ligne et est devenue multirésistante après 20 mois de traitement, fréquemment interrompu à cause d'effets secondaires sévères [64].

Chez l'homme, la proportion de tuberculose résistante à au moins un antituberculeux est estimée à 10-20 % et la proportion de multi résistance à 5-10 % (très variable selon les régions du monde). Ces formes de tuberculose constituent une préoccupation majeure de santé publique étant donné les difficultés et les coûts accrus alors associés au traitement (cf §2.1.2.) [79]. Chez l'éléphant, comme chez l'homme, les résistances les plus fréquemment observées sont les résistances à l'isoniazide ou à la rifampicine.

#### Causes probables de l'existence de souches pharmacorésistantes

L'émergence de ces antibiorésistances s'explique principalement par :

- L'utilisation d'une molécule unique (isoniazide souvent) lors des premiers essais thérapeutiques [22].
- La méconnaissance des posologies optimales, nécessaires à l'atteinte des concentrations sériques cibles, elles-mêmes extrapolées de la médecine humaine.
- Une non observance stricte du traitement. En effet, les effets secondaires, les difficultés techniques d'administration et les problèmes de disponibilité des médicaments sont à l'origine d'arrêt puis de reprises successives du traitement ou de diminution des posologies, qui sont autant de facteurs de risques de voir apparaître une souche résistante voire multirésistante.

#### Conséquences de l'émergence de souches pharmacorésistantes

Lorsqu'une tuberculose résistante ou multi-résistante est diagnostiquée chez un éléphant :

- Le traitement de la maladie est alors très difficile à gérer : les chances de succès sont moindres et le coût bien plus élevé comparativement à une tuberculose « ordinaire ».
- Les risques de transmission à l'homme et aux autres espèces doivent être réévalués et pris encore plus au sérieux. En effet, **il n'est pas admissible que le personnel soit exposé à de tels animaux sans précaution drastique** étant donnée la gravité de la maladie chez l'homme lorsque la mycobactérie impliquée est résistante.

## Mesures préventives visant à limiter le risque d'apparition de résistances

Les recommandations thérapeutiques actuelles chez l'éléphant visent à réduire le risque d'apparition de souches mycobactériennes résistantes voire multirésistantes [128]. Ainsi :

- Les monothérapies sont à proscrire. Tout traitement antituberculeux doit obligatoirement reposer sur la combinaison de plusieurs médicaments.
- Un antibiogramme doit être effectué le plus rapidement possible afin d'adapter les molécules et les posologies au spectre de sensibilité de la mycobactérie isolée.
- En attendant les résultats de cet antibiogramme, le traitement empirique doit reposer idéalement sur la combinaison des quatre agents de première ligne (isoniazide, rifampicine, éthambutol, pyrazinamide).
- Les niveaux sériques de médicaments doivent être évalués régulièrement afin de s'assurer que les doses administrées sont suffisantes. Cette mesure a été ajoutée aux recommandations du *guideline* entre 2000 et 2003, elle constitue aujourd'hui l'un des piliers de la détermination du schéma thérapeutique.
- Des tests de sensibilité doivent être répétés régulièrement tout au long du traitement afin de s'assurer qu'une souche de mycobactérie résistante ne soit pas sélectionnée.

L'émergence de souches mycobactériennes pharmacorésistantes chez l'éléphant est d'autant plus grave que ces souches peuvent se transmettre à l'homme.

### **ii. Risque de transmission à l'homme**

Entreprendre un traitement chez un éléphant infecté par la tuberculose est un challenge long et dont le succès n'est pas garanti. La thérapie dure en moyenne plus d'un an, un an pendant lequel des personnes sont exposées quotidiennement à un animal infecté voire excréteur. Certaines manipulations sont considérées comme étant à haut risque, notamment les lavages de trompe et l'administration des traitements par voies orale et rectale (l'excration dans les fèces étant décrite chez de nombreuses espèces).

Or, la tuberculose est une zoonose et rappelons que le risque de transmission de la mycobactéries de l'homme à l'éléphant est réel :

- Plusieurs contaminations humaines ont été suspectées en raison de changements d'intensité de la réaction tuberculinique observés entre le test à l'embauche et le test après contact avec un éléphant infecté [74].
- Un cas de transmission éléphant / homme a été rigoureusement établi et le lien épidémiologique entre les deux a été prouvé : les mycobactéries isolées chez l'homme et chez les 4 éléphants en question appartenaient à la même souche (empreintes génétiques comparées par R.F.L.P.) [74]. L'origine de l'infection (homme ou animal) n'a cependant pas pu être établie.

Le risque pour la santé humaine est d'autant plus important que l'existence de mycobactéries résistantes voire multi-résistantes aux antituberculeux a été prouvée. Ainsi, les responsabilités encourues par l'institution zoologique et les autorités sanitaires qui décident de traiter ses éléphants sont énormes d'un point de vue sécurité sanitaire pour ses employés. De nombreux pays (via leurs autorités sanitaires) ne sont pas prêts à prendre ce risque et optent alors pour l'euthanasie.

Par ailleurs, l'efficacité de ce traitement est inconnue à long terme (cf § 3.7.1.f.), des éléphants « guéris » peuvent donc être en réalité des réservoirs latents de la maladie. Ces éléphants constituent des menaces potentielles non seulement pour les autres animaux mais aussi pour le personnel. Or l'ensemble des mesures de précaution mises en place pour les éléphants en traitement disparaît peu à peu, la vigilance baisse et le risque de transmission en est d'autant plus important.

Ainsi, le fait que la tuberculose soit une zoonose grave, que le risque de dissémination existe et que celui de créer des pharmacorésistances est bien réel représente les trois points clés nécessaires à la compréhension des désaccords entre partisans et opposants à la mise en place d'un traitement antituberculeux chez l'éléphant. Ces facteurs expliquent la réticence de nombreux vétérinaires quant à la réalisation d'une thérapie et justifient la possibilité d'avoir recours à l'euthanasie, même s'il s'agit d'espèces protégées.

La thérapeutique de la tuberculose chez l'éléphant est ainsi loin d'être codifiée, de nombreuses limites à ce traitement existent encore et les preuves de son efficacité réelle restent à faire. Plusieurs études en médecine humaine sont suivies attentivement par les vétérinaires et des projets de recherche chez l'éléphant se poursuivent sur le terrain, afin qu'à l'avenir le traitement soit une solution efficace et peu risquée.

#### d. **Recherche et avenir dans le domaine thérapeutique**

Afin de progresser en matière de thérapeutique antituberculeuse chez l'éléphant, les efforts des spécialistes doivent se concentrer sur trois axes principaux :

- La création d'une base de données unique combinant pour chaque éléphant traité les dates de traitement, les doses administrées, les difficultés pratiques rencontrées, les effets secondaires observés, les résultats des examens complémentaires réalisés, les niveaux sériques atteints ainsi que les éventuelles résistances acquises. L'analyse statistique de ces données pourrait permettre de souligner certaines tendances et d'identifier précisément l'origine des problèmes rencontrés.
- La poursuite des études pharmacocinétiques afin qu'à chaque schéma thérapeutique correspondent des données expérimentales. De nombreuses inconnues demeurent, par exemple, sur [79]:
  - o les profils pharmacocinétiques de chacune des drogues (utiles notamment pour déterminer le pic d'absorption),
  - o la tolérance des différentes formulations d'éthambutol lors d'administration rectale (comparativement à la formulation commerciale utilisée jusqu'ici),
  - o la pharmacocinétique des agents de seconde ligne, notamment de l'amikacine par voie parentérale (prometteuse),
  - o la toxicité de la pyrazinamide,
  - o les causes de la faible biodisponibilité des drogues lorsqu'elles sont données en association avec la nourriture (inactivation par les aliments, mauvaise prise alimentaire).

- L'investigation d'autres pistes thérapeutiques, telles que [79]:
  - de nouvelles voies d'administration : l'inhalation et les voies parentérales (intra-musculaire et intra-dermique surtout) pourraient être utiles.
  - de nouvelles formulations : les microsphères notamment devraient offrir une approche plus réalisable en médecine zoologiques (efficacité comparable, doses moindres et moins fréquentes que les formulations actuelles).
  - de nouvelles molécules : les récentes avancées en médecine humaine laissent entrevoir des perspectives intéressantes pour l'éléphant (drogues plus efficaces et moins toxiques). Les fluoroquinolones agiraient notamment en synergie avec l'isoniazide et l'éthionamide et entraîneraient moins d'effets secondaires que les traitements usuels. D'autres composés naturels et synthétiques sont en cours d'investigation et sont également prometteurs.

Pour que ces recherches soient le plus constructives possibles, il est indispensable que les différentes institutions coopèrent entre elles et coordonnent leurs actions. Se pose alors parfois le problème de savoir comment financer ces études à large échelle.

En conclusion générale sur l'étude de la tuberculose chez l'éléphant, les données sur l'épidémiologie et la symptomatologie de la maladie progressent à mesure que de nouveaux cas se déclarent dans le monde, de réelles avancées en matière de diagnostic et de traitement ont été réalisées ces dernières années et des perspectives intéressantes restent à explorer dans les prochaines années. Afin d'illustrer la gestion de la maladie en parcs zoologiques, la description d'un cas pratique survenu sur un éléphant d'Afrique au *Safari Parc de Peaugres* en décembre 2004 fait l'objet de la dernière partie.

## **4. DESCRIPTION D'UN CAS PRATIQUE AU SAFARI DE PEAUGRES**

L'objectif de cette partie n'est en aucun cas d'analyser les points positifs et négatifs de la gestion du cas de tuberculose sur un éléphant, ni de discuter des performances des tests ou des recommandations prophylactiques. Ceci a été déjà détaillé dans les paragraphes précédents. Le but est de décrire la gestion pratique d'une crise sanitaire à partir du moment où elle survient jusqu'au moment où elle prend fin pour mieux saisir les difficultés qu'une telle situation peut engendrer sur le terrain.

### **4.1 D'un groupe d'éléphants en bonne santé à un groupe suspect de tuberculose**

Le groupe d'éléphants présent à Peaugres en 2004, ainsi que leurs conditions de vie et leurs antécédents médicaux sont présentés dans un premier temps. Puis la survenue soudaine de la suspicion de tuberculose au sein du troupeau est décrite chronologiquement dans un deuxième paragraphe.

#### **4.1.1 Description du troupeau**

Situé au pied du Mont Pilat en Ardèche (France), le Safari de Peaugres fut créé en 1974 et accueille environ 300 000 visiteurs chaque année. Les 900 animaux du parc, appartenant à plus de 120 espèces différentes, bénéficient d'une superficie de 80 hectares, dans un environnement privilégié permettant à certaines espèces d'évoluer en semi-liberté (partie « Safari » accessible en voiture). Le parc est largement impliqué dans la sauvegarde des espèces menacées et participe notamment à 24 programmes européens d'élevage (EEP), parmi lesquels figure celui de l'éléphant d'Afrique (*Loxodonta africana*).

En décembre 2004, date à laquelle la tuberculose est suspectée à Peaugres, le groupe d'éléphants d'Afrique est alors composé d'un mâle et de trois femelles :

- **Johnty**, né en 1987 (18 ans) en captivité.
- **Ettie**, née en 1969 (36 ans) dans la nature, arrivée à Peaugres en 1992 en provenance du Zoo de Tel Aviv (Israël).
- **Josepha**, née en 1989 (16 ans) en captivité, arrivée à Peaugres en 1992 en provenance du Zoo de Tel Aviv (Israël).
- **Myntrick**, née en 1984 (21 ans) dans la nature (Zimbabwe), arrivée au Zoo de Kolmarden (Suède) en 1987, transférée au Zoo de Boras (Suède) en 1998 puis à Peaugres en juillet 2002.

Les quatre éléphants vivent seuls (pas de présentation mixte d'espèces) dans un enclos extérieur d'environ 7000 m<sup>2</sup>, situé à l'entrée de la partie « Safari » du parc, accessible en voiture. Les visiteurs peuvent toutefois stationner et observer les animaux à pied à partir d'une passerelle, une clôture électrique et un fossé permettant au public de rester hors de portée des animaux.

Une piscine, une mare de boue, des troncs d'arbres, des pneus et une boule percée remplie de nourriture constituent les principales composantes de l'enclos, auxquels s'ajoutent d'autres enrichissements variés effectués quotidiennement par les soigneurs-animaliers.

Le bâtiment de nuit comprend trois box individuels et un box double (pour le mâle), séparés les uns des autres par des barreaux et donc autorisant des contacts visuels, olfactifs, auditifs et tactiles (trompe contre trompe) entre les individus.

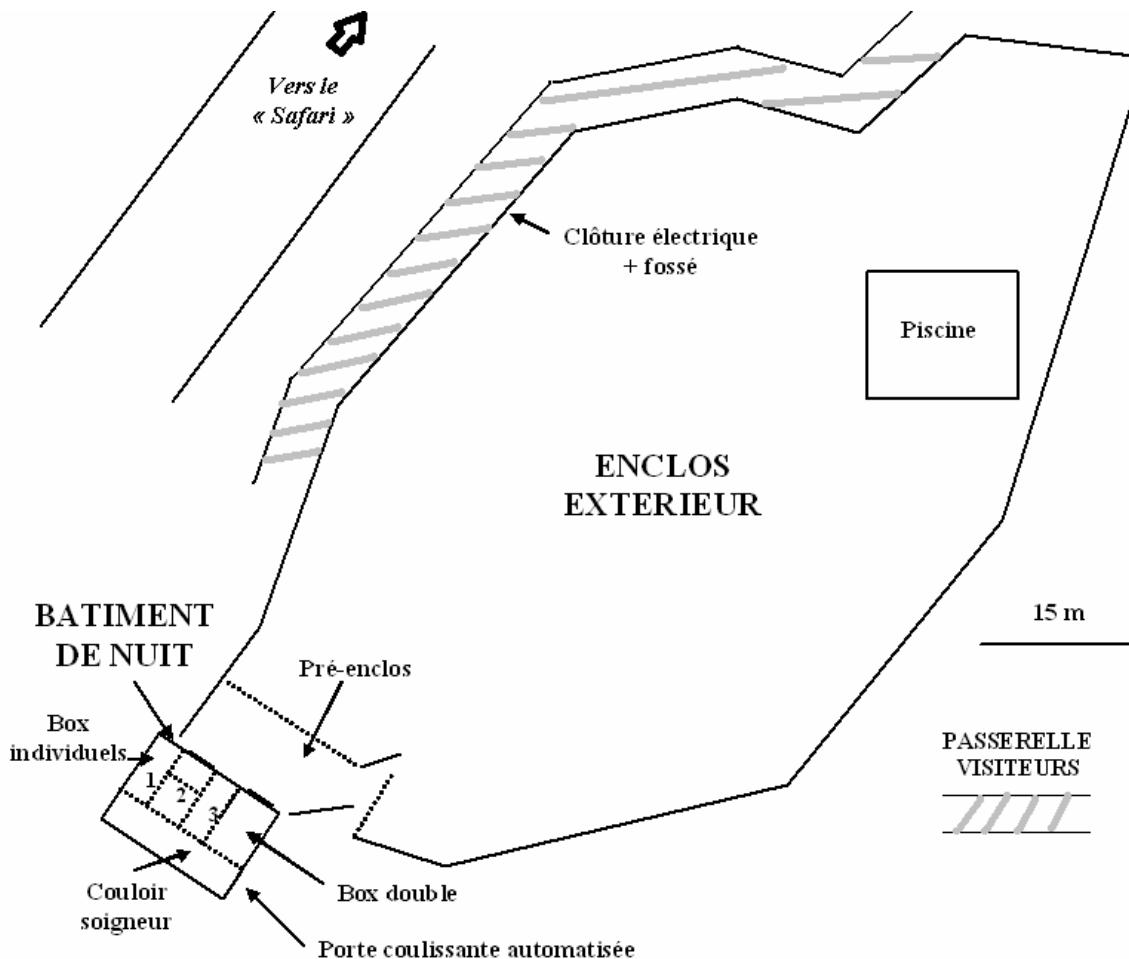


Figure 16 : Plan des enclos extérieur et intérieur des éléphants (Peaugres, déc 2004)

Un entraînement médical (« *Medical training* ») est réalisé en moyenne une fois par jour afin de familiariser les animaux aux procédures techniques de base (prise de sang, parage de pieds, inspection des dents). Tous les exercices s'effectuent à travers des barrières de protection et aucun contact libre n'est autorisé.

D'un point de vue médical :

- **Le mâle** (Johnty) a présenté plusieurs épisodes de colique les mois précédents (d'août à novembre 2004) : un appétit inconstant, des difficultés à se déplacer et à uriner ainsi qu'un œdème ventral s'étendant progressivement aux membres antérieurs sont les principaux symptômes observés.

- **Les trois femelles** (dont Myntrick) sont, quant à elles, en parfaite condition physique, aucun antécédent médical majeur n'est à noter.

Cependant, l'une d'entre elles cache son jeu...

Voyons à présent comment une crise sanitaire d'une telle ampleur survient du jour au lendemain au sein d'un groupe apparemment en pleine santé.

#### **4.1.2 Survenue de l'infection**

Fin 2004, les vétérinaires du Zoo de Boras (Suède) suspectent une tuberculose sur une femelle éléphant d'Afrique (Shona), ayant mis bas 20 mois auparavant. Les signes cliniques fortement évocateurs (toux et amaigrissement chroniques) sont corroborés par un résultat positif à l'ElephantTB StatPak® (17/11/04), alors que les multiples tests réalisés jusque là (ELISA Lelystadt et lavages de trompe) s'étaient toujours avérés négatifs. Cette séroposivité est confirmée trois semaines plus tard (08/12/04) par des lésions pulmonaires caséuses extensives à l'autopsie, suite à l'euthanasie réalisée en accord avec les autorités sanitaires suédoises.

Dès le premier résultat sérologique positif, une enquête épidémiologique est entreprise : l'objectif premier consiste à évaluer le statut des individus ayant été en contact avec Shona. Le troupeau de Boras est alors composé de trois autres éléphants d'Afrique : tous sont rapidement soumis à un test rapide et s'avèrent négatifs. Reste à tester Myntrick, transférée deux ans auparavant à Peaugres, mais ayant partagé l'enclos de Shona pendant quatre années en Suède. Le sérum prélevé juste avant son départ (juillet 2002) est décongelé et soumis à l'ElephantTB StatPak® : il ressort positif...

Le 1<sup>er</sup> décembre 2004, la vétérinaire du Safari de Peaugres est avertie des résultats de ce test sérologique : Myntrick étant en excellente santé, rien ne laissait présager une telle nouvelle. Par ailleurs, la question de la fiabilité du test (ElephantTB StatPak®, Chembio) se pose alors : bien que les résultats préliminaires semblent très convaincants, rien n'est encore validé chez l'éléphant à ce moment là et la technique diagnostique reste mal connue. La situation est cependant sérieuse et urgente et des mesures immédiates sont mises en place.

## **4.2 De la suspicion de l'infection à la décision d'euthanasie**

Dès l'alerte donnée par le parc zoologique de Boras, une série de mesures est immédiatement mise en place. Puis vient le temps de la réflexion et des discussions avec l'ensemble des acteurs : une décision doit être prise.

### **4.2.1 Description des mesures immédiates mises en place**

A la nécessité de confirmer la suspicion pesant sur Myntrick, se juxtaposent des mesures urgentes visant à limiter le risque de transmission du bacille vis-à-vis du personnel, des autres éléphants et de l'ensemble des animaux du parc.

#### **a. Confirmation du statut infectieux de Myntrick**

La première mesure consiste à confirmer au plus vite la séropositivité de Myntrick vis-à-vis de la tuberculose. Les éléphants de Peaugres pratiquant un entraînement médical régulier, des prélèvements sanguins sont rapidement obtenus sur Myntrick et Johnty (dont le mauvais état général fait craindre une infection tuberculeuse au vu du contexte épidémiologique). Après soumission à l'ElephantTB StatPak® (en Suède) : le sérum de Myntrick ressort « fortement » positif pour la tuberculose et celui de Johnty négatif (12/12/04). Ces résultats sont confirmés par le laboratoire néerlandais de Lelystadt : leur test ELISA détecte la présence de deux antigènes issus de *M. bovis* (ELIB et MB70) dans le sérum de Myntrick.

*Remarque* : Johnty est euthanasié une semaine plus tard lors d'un épisode sévère de colique (20/12/04). L'autopsie conclut en faveur d'une glomérulonéphrite sévère avec colite néphrétique et présence d'urolithiases. Aucune lésion macroscopique ni microscopique n'est évocatrice de tuberculose et la mise en culture des ganglions trachéobronchiques ne met en évidence aucune mycobactéries.

Par ailleurs, d'autres examens complémentaires sont réalisés sur Myntrick :

- Le test tuberculinique (bovin) est négatif.
- L'analyse des paramètres hématologiques ne révèle aucune anomalie, excepté une légère hypoalbuminémie (31,1 g/L [37-39]) et un rapport A/G (Albumine/Globuline) de 0,64 (plus faible que la moyenne [~1] ; modifications en faveur d'une infection chronique.

L'étape diagnostique suivante consiste alors à réaliser des lavages de trompe et à envoyer les échantillons récoltés à l'AFSSA Alfort (PCR et culture bactériologique) afin de préciser le statut infectieux de Myntrick (excrétrice ou non). Cependant, la technique est difficile à maîtriser : après trois semaines d'entraînement intensif et spécifique de l'animal, des prélèvements utilisables sont obtenus, ils seront alors répétés tous les deux jours du 7 au 29 janvier 2005.

Bien avant l'obtention de ces échantillons, la décision est prise d'isoler Myntrick des deux autres femelles et de tout mettre en œuvre afin de limiter le risque de dissémination de la mycobactéries aux autres animaux et au personnel.

### **b. Mesures visant à limiter la dissémination du bacille**

La deuxième mesure d'urgence consiste à isoler Myntrick des autres éléphants, afin de limiter le risque de transmission du bacille dans l'hypothèse où elle serait excrétrice. Cependant, le parc ne disposant pas de bâtiments adaptés à la quarantaine de tels animaux, une séparation physique totale est impossible. Dans le bâtiment de nuit, Myntrick occupe alors le box double, un box vide la séparant des deux autres femelles. A l'extérieur, elle n'a alors plus accès à l'ensemble de l'enclos et reste cantonnée au pré-enclos (cf plan ci-dessus). Rapidement, des changements de comportement sont visibles : Myntrick devient agressive envers les autres éléphants et envers le personnel, ses nouvelles « conditions de vie » étant inadaptées.

Ces mesures d'« isolement » sont d'une part insuffisantes puisque les éléphantes peuvent encore établir des contacts tactiles à travers les barrières, et d'autre part contraires au bien-être animal puisque Myntrick est confinée dans un espace restreint avec des interactions sociales limitées. Cependant, il semble utopique d'imposer aux parcs zoologiques de disposer des infrastructures nécessaires à un tel isolement, isolement qui, par ailleurs, va à l'encontre de la nature résolument sociale de l'éléphant.

A cela s'ajoutent toutes les mesures mises en place afin de ne pas disséminer la mycobactéries au sein des autres espèces du parc :

- L'utilisation de pédiluves à l'entrée des bâtiments et de l'enclos est rendue obligatoire.
- Des restrictions d'usage concernant l'emploi du matériel (tracteur, brouettes, fourches, pelles, tuyaux) sont imposées, les outils étant confinés au « secteur éléphants ».
- Une collecte séparée du fumier des éléphants est réalisée.
- Aucune sortie d'animaux appartenant à la partie « Safari » n'est autorisée (ni vers d'autres institutions, ni pour des transferts au sein même du zoo) ; et ceci jusqu'à ce que soit précisé l'impact du foyer tuberculeux sur les espèces géographiquement voisines des éléphants.

Enfin et surtout, étant donnée la possibilité de transmission de la mycobactéries à l'homme, des mesures de protection sont imposées vis-à-vis du personnel en contact avec Myntrick :

- Un contrôle des carnets de vaccination est réalisé afin de vérifier les dates de BCG et les résultats des tests tuberculiniques des employés.
- Le port d'un masque facial, protégeant le nez et la bouche, est rendu obligatoire à chaque contact avec Myntrick et tout particulièrement lors de la réalisation des lavages de trompe.

L'ensemble de ces mesures est pris rapidement par l'équipe dirigeante du parc, sous les conseils des vétérinaires ayant été confrontés à la même situation et influencée par les nombreuses données bibliographiques alors rassemblées et synthétisées. Cependant, la question de savoir quand et comment prévenir les autorités sanitaires se pose très rapidement.

### c. Alerte de la Direction des Services Vétérinaires

Lors de suspicion de tuberculose sur un éléphant, aucune déclaration auprès des autorités sanitaires (DSV) n'est obligatoire (cf §.2.4.1.). Cependant, malgré la peur des restrictions que peuvent imposer ces autorités, il est difficile, d'un point de vue diplomatique, de ne pas faire appel à leur aide, notamment quant à la prise de décision vis-à-vis de Myntrick. De plus, il est impossible de réaliser des analyses mycobactériologiques dans les laboratoires de référence (AFSSA Alfort) sans inévitablement éveiller les soupçons. Enfin, en cas de confirmation de la tuberculose (culture bactériologique positive), c'est à la DSV que revient la décision du

devenir de l'animal. Il n'est donc d'aucune utilité de vouloir cacher aux autorités la suspicion de tuberculose qui pèse sur Myntrick : la DSV de Privas (Ardèche) est informée du cas, elle contacte à son tour la DDASS et la Médecine du travail.

Commencent alors des discussions entre les différents partis. Il est primordial de pouvoir exposer le plus clairement possible quel est le problème, quels sont les outils diagnostiques disponibles et leurs limites, quelles sont les différentes options possibles et enfin quel risque existe pour l'Homme. Beaucoup de réponses à ces questions ne sont que partielles et restent très imprécises pour le vétérinaire du parc, qui, pourtant est alors le plus apte à expliquer à chacun l'ensemble des données. Une décision quant au devenir de Myntrick doit être rapidement prise en concertation avec l'ensemble des protagonistes.

#### **4.2.2 La décision d'euthanasier**

Le 5 janvier 2005, la décision est prise d'euthanasier Myntrick au plus vite. Les raisons qui motivent ce choix puis la gestion pratique de l'euthanasie et de l'autopsie sont abordées ci-dessous.

##### **a. Les raisons de ce choix**

Les premières questions à se poser sont les suivantes : existe-t-il une autre option que l'euthanasie pour Myntrick ? Un traitement est-il envisageable dans ce cas précis ?

La question de savoir s'il faut traiter ou euthanasier un animal tuberculeux ne se pose plus aujourd'hui lorsqu'il s'agit de troupeaux domestiques. Les législations sanitaires de la plupart des pays européens et nord-américains interdisent le traitement chez ces animaux, à quelques exceptions près. Cependant, la chimiothérapie constitue une alternative à l'euthanasie envisageable pour des animaux appartenant à une lignée de haute valeur génétique ou à une espèce menacée de disparition, comme l'éléphant. Elle est par ailleurs l'option devenue quasi-systématique aux Etats-Unis lorsqu'un cas de tuberculose se déclare chez cette espèce... mais avec quels résultats ? Rappelons qu'aucune publication n'est alors disponible ni sur la pharmaco-cinétique des médicaments ni sur la validité des tests sérologiques (contrairement à ce qui est détaillé dans la troisième partie de ce document, la majorité des publications étant très récentes).

Par ailleurs, le risque de transmission du bacille à l'Homme (personnel et public) est mal connu et celui vis-à-vis des autres animaux (les deux femelles éléphants et les autres espèces du « Safari ») est également incertain. De plus, d'un point de vue purement technique, les infrastructures ne sont pas adaptées pour maintenir décemment Myntrick isolée pendant les longs mois nécessaires au traitement.

Ainsi, bien que la décision soit difficile à prendre et à annoncer, l'euthanasie s'impose rapidement comme la seule option envisageable pour Myntrick et se justifie parfaitement par le « principe de précaution » visant à protéger l'Homme face à un risque non mesuré de zoonose grave : l'autopsie est prévue le 31 janvier 2005.

A la peur de ne pas prendre la bonne décision (risque que les tests sérologiques aient été faussement positifs), vient s'ajouter toutes les difficultés logistiques qui s'annoncent pour la réalisation d'une autopsie sur un animal de trois tonnes...

#### **b. Difficultés logistiques rencontrées lors de l'autopsie**

Conformément aux recommandations britanniques [118], Myntrick est euthanasiée le 30 janvier par injection intra-veineuse de pentobarbital (4 x 50 mL). Elle est ensuite transportée par un camion spécial (société *ECODECHET*) dans une benne adéquate vers une salle spéciale de l'usine d'équarrissage, située à deux heures de route de Peaugres. La salle a été spécialement louée, sous couvert de la DSV, et dispose d'une balance adéquate (Myntrick pèse 3140 kg !) et du matériel de traction et de découpe nécessaires à l'autopsie (palan, tractopelle, treuil, tronçonneuse, scie). L'institut de pathologie animale de la faculté de Berne apporte par ailleurs une aide logistique (matériel de découpe, de ponction, de prélèvements et de protection) et humaine. Leur expérience en matière d'autopsie d'animaux exotiques est alors plus que bienvenue. L'équipe, présente lors de l'autopsie, est composée des deux vétérinaires en charge des DSV de l'Ain et de l'Ardèche (dont dépendent respectivement la salle d'équarrissage et le zoo), de trois représentants du Safari de Peaugres (vétérinaire, responsable zoologique et directeur), de deux vétérinaires de l'institut de physiologie de Munich et de six personnes travaillant pour l'institut de pathologie animale de Bern.

L'autopsie révèle alors d'importantes lésions macroscopiques caséo-calcaires dans les deux poumons et permet la « quasi » confirmation de l'infection tuberculeuse ; confirmation obtenue définitivement deux mois plus tard lorsque les résultats de la culture bactériologique concluent à l'isolement de *M. tuberculosis* à partir des lésions pulmonaires (aucune colonie de mycobactéries n'est isolée des ganglions trachéo-bronchiques).

Les découvertes *post-mortem* entraînent la mise en place de nouvelles mesures pour le parc zoologique à moyen et long termes : de nouveaux défis attendent les dirigeants de Peaugres.

### **4.3 De l'autopsie aux levées des dernières restrictions**

La confirmation de la tuberculose chez Myntrick sème un vent de panique au sein de la DSV, de la DDASS et de la Médecine du travail. L'hypothèse d'une fermeture provisoire du parc voiture est même envisagée. Une série de mesures en découle : certaines prennent effet immédiatement, d'autres auront des conséquences à plus long terme.

#### **4.3.1 Conséquences suite à la confirmation de tuberculose**

La DSV impose :

- Le maintien de l'isolement des deux éléphantes vis-à-vis des autres espèces.
- Le maintien des précautions prises à l'égard des soigneurs (port de masques).
- La poursuite des mesures concernant le confinement du matériel et la séparation du fumier.
- La réalisation d'une désinfection minutieuse et adéquate du bâtiment de nuit, effectuée par le GDS (coût d'environ 300 €).
- Le retournement régulier du sol de l'enclos extérieur sur 20 cm de profondeur afin de permettre l'action stérilisante des UV sur les bacilles.
- L'euthanasie de la femelle dromadaire la plus proche (en mauvais état général) et l'envoi de ses ganglions trachéo-bronchiques pour analyse bactériologique (aucune colonie mycobactérienne) ne sera isolée.

- L'obtention des résultats d'un test rapide ElephantTB StatPak® pour les deux femelles éléphants restantes dans un délai d'un mois.
- La réalisation d'un dépistage par test tuberculinaire (bovin) de l'ensemble des herbivores des secteurs voisins (cf plan ci dessous), à savoir les élands du Cap, les watusis, les dromadaires, les addax, les girafes et les yacks.

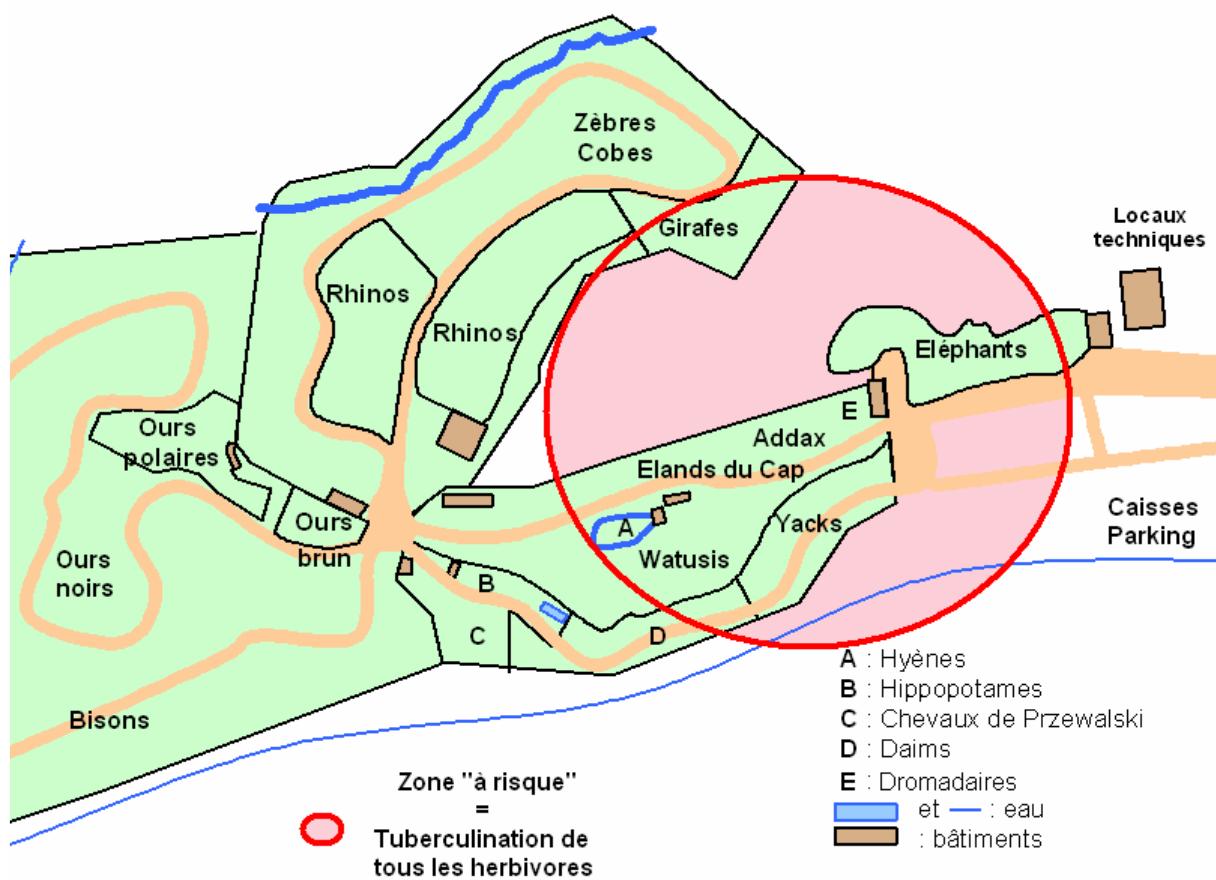


Figure 17 : Plan des enclos avoisinant le parc des éléphants (Peaugres, 2004)

Les deux dernières mesures citées sont difficiles à mettre en place en pratique. D'une part, les deux femelles restantes ne sont pas préparées aux prises de sang, un entraînement spécifique intensif débute donc afin d'obtenir les prélèvements dans les délais imposés. D'autre part, le dépistage des herbivores sauvages n'est pas réalisable de la même manière qu'au sein des troupeaux domestiques : aux difficultés évidentes de contention s'ajoutent les faibles valeurs prédictives des tests employés.

Par ailleurs, la Médecine du travail impose :

- La réalisation d'un test tuberculinique par un médecin délégué par la Médecine du travail sur chacun des employés travaillant avec les éléphants. Les résultats étant aberrants, la décision d'y associer des clichés radiographiques thoraciques a été prise. Les résultats de l'ensemble du personnel testé s'avèrent négatifs.
- La réalisation d'un suivi annuel du personnel vis-à-vis de la tuberculose, ce qui n'a jamais été effectué en réalité.

A ces conséquences prenant effet immédiatement s'ajoutent des restrictions à moyen et long termes quant à la surveillance des animaux.

#### **4.3.2 Conséquences à moyen et long termes**

Les restrictions quant à l'utilisation du matériel, le confinement du tracteur et l'épandage du fumier étant levées une à une, les seules mesures réellement imposées à long terme visent les animaux eux-mêmes, et plus précisément les éléphants :

- Les ganglions trachéo-bronchiques de tous les animaux du parc voiture retrouvés morts ou euthanasiés doivent être soumis à une culture bactériologique (AFSSA Alfort) jusqu'en mars 2006.
- Des tests ElephantTB StatPak réguliers doivent être réalisés sur les deux femelles (si possible tous les 2 mois). Chacun des tests effectués est ressorti négatif jusqu'à présent.
- Aucune introduction d'éléphant n'est autorisée avant mars 2006. Shorty, un mâle de 21 ans arrive à Peaugres le 27 septembre 2006, en provenance du zoo d'Amnéville, où un test ElephantTB StatPak® a été réalisé avant son départ et s'est avéré négatif. Ce test a été répété en avril 2008 et confirme sa séronégativité.

L'arrivée de Shorty marque réellement la fin de cet épisode, sans pour autant faire oublier qu'une nouvelle crise sanitaire, tuberculose ou non, peut survenir à tout moment.

## CONCLUSION

La tuberculose de l'éléphant est une maladie de captivité complexe, sous diagnostiquée et encore « tabou », notamment en raison de son potentiel zoonotique. La gravité de la maladie chez l'Homme, l'existence de pharmaco-résistances chez l'éléphant et les nombreuses inconnues persistant quant au risque réel de dissémination du bacille sont autant de facteurs invitant le vétérinaire à mettre l'aspect zoonotique et sanitaire au cœur du problème à résoudre. Ainsi, cet exemple illustre parfaitement les défis actuels que peuvent être amenés à relever les vétérinaires de parcs zoologiques. Bien qu'ils ne disposent que très rarement du « pouvoir décisionnel », ils jouent un rôle de médiateur auprès des autorités sanitaires et du personnel du parc, auquel s'ajoute un réel rôle d'expertise scientifique. Ainsi leur implication, leurs connaissances et surtout leurs capacités à synthétiser les informations et à les exposer clairement conditionnent la prise de décision : à eux de faire en sorte qu'elle soit le fruit d'une concertation éclairée entre les différents protagonistes.

Par ailleurs, les immenses avancées en matière de diagnostic démontrent une fois de plus l'intérêt d'une transparence totale entre les différentes institutions zoologiques, coopération sans laquelle il est impossible de collecter des informations précises et nombreuses afin d'établir des banques de données indispensables à la recherche en médecine de zoo. L'actualité est riche en matière de tuberculose sur les espèces sauvages dans les parcs zoologiques européens à l'heure actuelle, elle contribue notamment à la construction de réseaux de collaboration entre les parcs, faisant du métier de vétérinaire de zoo, un travail passionnant et résolument humain.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

**Melle Pauline, Geneviève, Andréa DELNATTE**

a été admis(e) sur concours en : 2002

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 12 Juillet 2007

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, Jacques DUCOS de LAHITTE, Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, autorise la soutenance de la thèse de :

**Melle Pauline, Geneviève, Andréa DELNATTE**

intitulée :

« *Etude de la tuberculose chez l'éléphant : Importance en parc zoologique* »

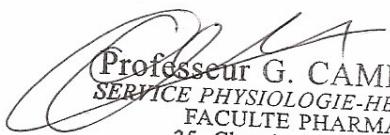
Le Professeur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Professeur Jacques DUCOS de LAHITTE

Vu :  
Le Directeur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Professeur Alain MILON



Vu :  
Le Président de la thèse :  
Professeur Gérard CAMPISTRON

Vu le : 14 DEC. 2007  
Le Président  
de l'Université Paul Sabatier  
Professeur Jean-François SAUTEREAU



Professeur G. CAMPISTRON  
SERVICE PHYSIOLOGIE-HEMATOLOGIE  
FACULTE PHARMACIE  
35, Chemin des Maréchaux  
31062 TOULOUSE CEDEX 4  
Tél. : 05.62.25.68.20  
Fax : 05.62.25.98.15



# **REFERENCES**

# **BIBLIOGRAPHIQUES**



- [1] AZAA : Elephant Species Survival Plan, "Quarantine guidelines for elephants," consulté le 18/12/2007, [[http://www.elephantcare.org/protodoc\\_files/new03/Quarantine%20Guidelines%20For%20Elephants%202003.pdf](http://www.elephantcare.org/protodoc_files/new03/Quarantine%20Guidelines%20For%20Elephants%202003.pdf)], 2003>.
- [2] F. S. H. Baldrey, "Tuberculosis in an elephant," J. R. Army Vet. Corps, 1 (1930), 252.
- [3] R. L. Ball, G. Dumonceaux, J. H. Olsen, M. S. Burton, and K. Lyashchenko, "Comparison of trunk wash results matched to Multi-Antigen Print ImmunoAssay in a group of captive asian elephants (*Elephas maximus*)," Proc. AAZV annual conference (Tampa, FL, 2006), pp. 303-304.
- [4] P. Barua and S. Bist, "Cruelty to elephants - a legal and practical view. ,," Zoos Print J., 11:6 (1996), 47-51.
- [5] J. J. Bénet, "La tuberculose," Polycopié d'enseignement de maladies contagieuses. Ecoles Nationales Vétérinaires Françaises, 2004.
- [6] M. Binkley, "Tuberculosis in captive elephants," Proc. AAZV annual conference (Houston, TX, 1997), pp. 116-119.
- [7] J. J. Blanc, C. R. Thouless, J. A. Hart, H. T. Dublin, I. Douglas-Hamilton, C. G. Craig, R. F. W. Barnes, and al, "African Elephant Status Report 2007 : An update from the African Elephant Database," vol. 33, Occasional Paper of the IUCN Species Survival Commission, 2007.
- [8] A. B. Bopayya, "Tuberculosis in an elephant," Indian Vet. J., 5 (1948), 142-145.
- [9] D. Botstein, R. L. White, M. Skolnick, and R. W. Davis, "Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism," Am. J. of Human Genet., 32 (1980), 314-331.
- [10] CDC : Centers for Disease Control and Prevention, "Division of Tuberculosis Elimination," Consulté le 15/04/2008, [<http://www.cdc.gov/tb/>], 2007>.
- [11] A. Chakraborty, "Diseases of elephants (*Elephas maximus*) in India : Review," Indian Wildlife Year Book, 2 (2003), 74-82.
- [12] K. Chandrasekharan, "Prevalence of infectious diseases in elephants in Kerala and their treatment. In : The Asian Elephant : Ecology, Biology, Diseases, Conservation and Management," Proc. National Symposium on the Asian Elephant (Kerala Agricultural University, India, 1989), pp. 148-155.
- [13] K. Chandrasekharan, K. Radhakrishnan, J. V. Cheeran, K. N. M. Nair, and T. Prabhakaran, "Review of the incidence, etiology and control of common diseases of asian elephants with special reference to Kerala," Proc. A Week with Elephants : International Seminar on Asian Elephants (Bombay, India, 1995), pp. 439-449.

- [14] Chembio Diagnostic Systems, "Veterinary Products for Animals : Elephant TB STAT-PAK," consulté le 14/12/2007, [www.chembio.com/animaltest4.html], mis à jour le 31/05/07>.
- [15] CITES, "Convention de Washington," consulté le 16/04/2008, [http://www.cites.org/fra/index.shtml], 2008>.
- [16] F. D. Cohen, Eléphant d'Afrique et Elephant d'Asie : Biologie, Relations avec l'Homme au cours de l'Histoire, Menaces et Conservation, Th. : Med.vet. : Alfort : 2007; 258p.
- [17] R. A. Cook, "*Mycobacterium bovis* infection of cervids : diagnosis, treatment and control," In : Zoo and Wild Animal Medicine, Current Therapy, 4th edition (M. E. Fowler and R. E. Miller, eds.), WB Saunders Company, Philadelphia, PA, 1999, pp. 650-657.
- [18] D. V. Cousins and N. Florisson, "A review of tests available for use in the diagnosis of tuberculosis in non-bovine species," Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics), 24:3 (2005), 1039-1059.
- [19] D. Dalley, M. A. Chambers, P. Cockle, W. Pressling, D. Gavier-Widen, and R. G. Hewinson, "A lymphocyte transformation assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in the Eurasian badger (*Meles meles*)," Vet. Immunol. Immunopathol., 70:1-2 (1999), 85-94.
- [20] D. Damman and H. Stedefeder, "Tuberkulöse Erkrankung eines Elefanten, hervorgerufen durch Bazillen des sogenannten typus humanus," Deutsche Tierarztliche Wochenschrift, 17 (1909), 345-346.
- [21] G. W. De Lisle, C. G. Mackintosh, and R. G. Bengis, "*Mycobacterium bovis* in free-living and captive wildlife, including farmed deer.," Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 20:1 (2001), 86-111.
- [22] J. E. Devine, W. J. Boever, and E. Miller, "Isoniazid therapy in an Asiatic elephant (*Elephas maximus*)," Journal of Zoo and Animal Medicine, 14 (1983), 130-133.
- [23] I. Douglas-Hamilton, "The African Elephant Action Plan. Unpublished report : IUCN / WWF / NYZS," 1979.
- [24] F. Dunker and M. Rudovsky, "Management and treatment of a *Mycobacterium tuberculosis* positive elephant at the San Francisco zoo," Proc. AAZV and AAWV joint conference (Omaha, NE, 1998), pp. 122-123.
- [25] J. S. Dylewski, H. M. Zackon, A. H. Latour, and G. R. Berry, "Mycobacterium szulgai: an unusual pathogen," Reviews of infectious diseases, 9:3 (1987), 578-580.
- [26] J. Endres, "Personal communication," European Elephant Group, Germany, 2005.
- [27] Eur-Lex, "Eur-Lex, l'accès au droit de l'union européenne.," consulté le 20/04/2008, [http://www.eur-lex.europa.eu/], 2008>.

- [28] J. P. Euzéby, "Dictionnaire de bactériologie vétérinaire," consulté le 14/12/2007, [<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/garde.html>], mis à jour le 10/12/2007>.
- [29] M. Fabre, F. Augu, and S. Lecaudey, "Tuberculose, techniques de diagnostic en mycobactériologie," consulté le 14/12/2007, <http://www.mycobacterie.fr/>], mis à jour le 05/12/2007>.
- [30] D. Frankel, "Elephants pack their trunks and leave the circus," Lancet, 349 (1977), 1675.
- [31] C. W. Furley, "Tuberculosis in elephants," Lancet, 350:9072 (1997), 224.
- [32] A. H. Garrod, "Report on the Indian elephant, which died in the society's gardens on July 7, 1875," Proceedings Zoological Society of London (1875), 542.
- [33] D. Gavier-Widen, A. Hard, C. Segerstad, and Al, "Mycobacterium tuberculosis infection in Asian elephants (*Elephas maximus*) in Sweden," Proc. Eur. Assoc. Zoo Wildl. Vet., 4th Sci. Meet (Heidelberg, Germany, 2002).
- [34] D. Gomis, "Tuberculosis outbreak in Mulhouse Zoo : diagnostic perspectives," Eur. Assoc. Zoo Wildl. Vet., 7th Congress, Leipzig, Germany, 2008.
- [35] C. Gorovitz, "Tuberculosis in an african elephant," Nord. Vet. Med., 14:Supl. 1 (1962), 351-352.
- [36] H. B. Greenberg, R. C. Jung, and A. E. Gutter, "Hazel elephant is dead (of tuberculosis)," Am. Rev. Respir. Dis., 124:3 (1981), 341.
- [37] D. G. Grobler, A. L. Michel, L. M. De Klerk, and R. G. Bengis, "The gamma-interferon test : its usefulness in a bovine tuberculosis survey in African buffaloes (*Syncerus caffer*) in the Kruger National Park," Onderstepoort J. Vet. Res., 69:3 (2002), 221-227.
- [38] A. Gutter, "Mycobacterium tuberculosis in an asian elephant," Proc. AAZV annual conference (Seattle, WA, 1981), pp. 105-106.
- [39] K. Hamilton, S. K. Mikota, M. Miller, G. Dumonceaux, K. Giri, K. Gairhe, S. Paudel, and G. Kaufman, "Evaluation of blood chemistry values for possible relationship to tuberculosis infection status in captive asian elephants (*Elephas maximus*) in Nepal," Proc. AAZV, AAWV, AZA/NAG joint conference (Knoxville, TN, 2007), pp. 229-230.
- [40] H. Hammatt, "Elephant Care International : Elephant TB initiative," consulté le 14/12/2007, [<http://www.elephantcare.org/tbshort.htm>], 2007>.
- [41] H. Hammatt, "Elephant Care International : TB Initiative (Zoos and Aquariums Committed to Conservation meeting in Houston)," consulté le 14/12/2007, [[http://www.elephantcare.org/protodoc\\_files/2007/Elephant%20Care%20International%20TB%20Initiative.pdf](http://www.elephantcare.org/protodoc_files/2007/Elephant%20Care%20International%20TB%20Initiative.pdf)], 2007>.



- [42] K. Harr, R. Isaza, and J. Harvey, "Clinicopathologic findings in *Mycobacterium tuberculosis* culture-positive elephants (*Elephas maximus*) in comparison to clinically normal elephants.,," Proc. AAZV, AAWV, ARAV, NAZWV joint conference (Orlando, FL, 2001), pp. 209-213.
- [43] J. Hars, M. L. Boschirol, P. Belli, J. Vardon, E. Coquatrix, B. Garin-Bastuji, and M. F. Thorel, "Découverte du premier foyer de tuberculose sur les ongulés sauvages en France," Faune Sauvage:261 (Avril 2004), p29.
- [44] J. Hars and S. Rossi, "Surveillance des maladies transmissibles en France : Actualités 2005," Proc. GEEFSM Annual Conference (Roquetes, 2006).
- [45] J. Hecht, "Telltale bones," New Scientist 2312:14 (2001).
- [46] S. Hedges and Al, "Why inter-country loans will not help Sumatra's elephants ?," Zoo Biol., 25:3 (2006), 235-246.
- [47] S. K. Hietala and I. A. Gardner, "Validity of using diagnostic tests that are approved for use in domestic animals for nondomestic species," In : Zoo and Wild Animal Medicine, Current Therapy, 4th edition (M. E. Fowler and R. E. Miller, eds.), WB Saunders Company, Philadelphia, PA, 1999, pp. 55-58.
- [48] M. Hutchins and M. Keele, "Elephant importation from range countries : ethical and practical considerations for accredited zoos," Zoo Biol., 25:3 (2006), 219-233.
- [49] R. Isaza, "Tuberculosis in all taxa," In : Zoo and Wild Animal Medicine, 5th edition (M. E. Fowler and R. E. Miller, eds.), WB Saunders Company St. Louis, MO, 2003, pp. 689-699.
- [50] R. Isaza and C. Ketz, "A trunk wash technique for the diagnosis of tuberculosis in elephants," Proc. EAZWV annual conference (Vienna, Austria, 1999), pp. 121-124.
- [51] IUCN, "The IUCN Species Survival Commission : 2007 IUCN Red List of Threatened Species," consulté le 16/04/2008, [<http://www.iucnredlist.org/>], 2007>.
- [52] A. K. Iyer, "Veterinary science in India, ancient and modern, with special reference to tuberculosis," Agriculture and Live-stock in India, 7:6 (1937), 718-724.
- [53] V. M. Katoch, "Newer diagnostic techniques for tuberculosis," Indian J. Med. Res., 120:4 (2004), 418-428.
- [54] A. M. Kilbourn, H. P. Godfrey, R. A. Cook, P. P. Calle, E. J. Bosi, S. I. Bentley-Hibbert, K. Huygen, M. Andau, M. Ziccardi, and W. B. Karesh, "Serum antigen 85 levels in adjunct testing for active mycobacterial infections in orangutans," Journal of wildlife diseases, 37:1 (2001), 65-71.
- [55] C. Lacasse, K. Terio, M. J. Kinsel, L. L. Farina, D. A. Travis, R. Greenwald, K. P. Lyashchenko, M. Miller, and K. C. Gamble, "Two cases of atypical mycobacteriosis caused by *Mycobacterium szulgai* associated with mortality in captive African elephants (*Loxodonta africana*)," J. Zoo Wildl. Med., 38:1 (2007), 101-107.

- [56] R. S. Larsen, "Personal communication," Davis, CA, 2005.
- [57] R. S. Larsen, M. Kay, J. Triantis, and M. D. Salman, "Update on serologic detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in asian elephants," Proc. AAZV, AAWV, AZA/NAG joint conference (Omaha, NE, 2005), pp. 62-63.
- [58] R. S. Larsen, M. D. Salman, S. K. Mikota, R. Isaza, R. J. Montali, and J. Triantis, "Evaluation of a Multiple-Antigen Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in captive elephants," J. Zoo Wildl. Med., 31:3 (2000), 291-302.
- [59] Légifrance, "Service public de diffusion du droit français," consulté le 20/04/2008, [<http://www.legifrance.gouv.fr/>], 2008>.
- [60] S. S. Lewerin, S. L. Olsson, K. Eld, B. Roken, S. Ghebremichael, T. Koivula, G. Kallenius, and G. Bolske, "Outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* infection among captive Asian elephants in a Swedish zoo," Vet. Rec., 156:6 (2005), 171-175.
- [61] J. Livet and J. Torsten, "Wild living Asian Elephants in India and South East Asia," consulté le 15/04/08, [<http://asianelephant.net/wildlife.htm>], 2004>.
- [62] K. Lyashchenko, "Personnal communication," Medford, NY, 2005.
- [63] K. P. Lyashchenko, J. Esfandiari, and R. Greenwald, "Multi-Species TB Test based on the innovative DPP Technology," Chembio Diagnostic Systems, Inc., Medford, NY, USA, 2007.
- [64] K. P. Lyashchenko, R. Greenwald, J. Esfandiari, J. H. Olsen, R. Ball, G. Dumonceaux, F. Dunker, C. Buckley, M. Richard, S. Murray, J. B. Payeur, P. Andersen, J. M. Pollock, S. K. Mikota, M. Miller, D. Sofranko, and W. R. Waters, "Tuberculosis in elephants : antibody responses to defined antigens of *Mycobacterium tuberculosis*, potential for early diagnosis, and monitoring of treatment," Clin. Vaccine Immunol., 13:7 (2006), 722-732.
- [65] K. P. Lyashchenko, M. Miller, and W. R. Waters, "Application of MAPIA (Multiple Antigen Print ImmunoAssay) and rapid lateral flow technology for tuberculosis testing of elephants," Proc. AAZV, AAWV, AZA/NAG joint conference (Omaha, NE, 2005), pp. 64-65.
- [66] K. P. Lyashchenko, M. Singh, R. Colangeli, and M. L. Gennaro, "A Multi-Antigen Print ImmunoAssay for the development of serological diagnosis of infectious diseases," J. Immunol. Methods, 242:1-2 (2000), 91-100.
- [67] B. J. Mangold, R. A. Cook, M. R. Cranfield, K. Huygen, and H. P. Godfrey, "Detection of elevated levels of circulating antigen 85 by dot immunobinding assay in captive wild animals with tuberculosis," J. Zoo Wildl. Med., 30:4 (1999), 477-483.
- [68] P. C. Mann, M. Bush, D. L. Janssen, E. S. Frank, and R. J. Montali, "Clinicopathologic correlations of tuberculosis in large zoo mammals," J. Am. Vet. Med. Assoc., 179:11 (1981), 1123-1129.

- [69] J. Marks, P. A. Jenkins, and M. Tsukamura, "Mycobacterium szulgai--a new pathogen," *Tubercle*, 53:3 (1972), 210-214.
- [70] V. Martinez and B. Gicquel, "Laboratory diagnosis of mycobacterial infections," *Arch. Pediatr.*, 12:2 (2005), S96-S101.
- [71] J. N. Maslow, S. K. Mikota, M. Zhu, R. Isaza, L. R. Peddie, F. Dunker, J. Peddie, H. Riddle, and C. A. Peloquin, "Population pharmacokinetics of isoniazid in the treatment of *Mycobacterium tuberculosis* among Asian and African elephants (*Elephas maximus* and *Loxodonta africana*)," *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 28:1 (2005), 21-27.
- [72] J. N. Maslow, S. K. Mikota, M. Zhu, H. Riddle, and C. A. Peloquin, "Pharmacokinetics of ethambutol (EMB) in elephants," *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 28:3 (2005), 321-323.
- [73] C. A. McGaughey, "Diseases of elephants : part III," *Ceylon Veterinary Journal*:9 (1961), 94-98.
- [74] K. Michalak, C. Austin, S. Diesel, M. J. Bacon, P. Zimmerman, and J. N. Maslow, "*Mycobacterium tuberculosis* infection as a zoonotic disease: transmission between humans and elephants," *Emerg. Infect. Dis.*, 4:2 (1998), 283-287.
- [75] S. K. Mikota, "Tuberculosis in elephants," In : *Zoo and Wild Animal Medicine, Current Therapy*, 6th edition (M. E. Fowler and R. E. Miller, eds.), WB Saunders Company St. Louis, MO, 2008, pp. 355-364.
- [76] S. K. Mikota, K. Giri, K. Gairhe, K. Hamilton, S. Paudel, G. Dumonceaux, M. Miller, B. Vincent, and G. Kaufman, "TB : Implications for Elephant Management in Asia," consulté le 14/12/2007, [[http://www.elephantcare.org/protodoc\\_files/2007/TB%20and%20Implications%20for%20Elephant%20Management%20in%20Asia.pdf](http://www.elephantcare.org/protodoc_files/2007/TB%20and%20Implications%20for%20Elephant%20Management%20in%20Asia.pdf)], 2007>.
- [77] S. K. Mikota, R. S. Larsen, and R. J. Montali, "Tuberculosis in elephants in North America," *Zoo Biology*, 19 (2000), 393-403.
- [78] S. K. Mikota and J. Maslow, "Epidemiology and treatment of tuberculosis in elephants," *Proc. AAZV annual conference* (Milwaukee, WI, 2002), pp. 384-387.
- [79] S. K. Mikota and M. Miller, "Elephant Tuberculosis Research Workshop Orlando, FL May 21-22, 2005 : Summary," consulté le 14/12/07, [[http://www.elephantcare.org/protodoc\\_files/2005/Elephant%20Tuberculosis%20Research%20Workshop%20May%202005.pdf](http://www.elephantcare.org/protodoc_files/2005/Elephant%20Tuberculosis%20Research%20Workshop%20May%202005.pdf)], 2005>.
- [80] S. K. Mikota, M. Miller, G. Dumonceaux, K. Giri, K. Gairhe, K. Hamilton, S. Paudel, K. P. Lyashchenko, R. S. Larsen, J. Payeur, W. R. Waters, M. D. Salman, and G. Kaufman, "Comparison of four serologic assays and culture to determine tuberculosis infection in captive elephants in Nepal," *Proc. AAZV, AAWV, AZA/NAG joint conference* (Knoxville, TN, 2007), pp. 71-72.

- [81] S. K. Mikota, L. Peddie, J. Peddie, R. Isaza, F. Dunker, G. West, W. Lindsay, R. S. Larsen, M. D. Salman, D. Chatterjee, J. Payeur, D. Whipple, C. Thoen, D. S. Davis, C. Sedgwick, R. J. Montali, M. Zicardi, and J. Maslow, "Epidemiology and diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in captive Asian elephants (*Elephas maximus*)," *J. Zoo Wildl. Med.*, 32:1 (2001), 1-16.
- [82] S. K. Mikota, E. L. Sargent, and G. S. Ranglack, "Medical management of the elephant," Indira Publishing House, West Bloomfield, MI, 1994, pp. 123-128.
- [83] J. Miller, A. Jenny, J. Rhyan, D. Saari, and D. Suarez, "Detection of *Mycobacterium bovis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cattle and elk by PCR amplification of an IS6110 sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms," *J. Vet. Diagn. Invest.*, 9:3 (1997), 244-249.
- [84] J. M. Miller, A. L. Jenny, and J. B. Payeur, "Polymerase Chain Reaction detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium avium* organisms in formalin-fixed tissues from culture-negative ruminants," *Vet. Microbiol.*, 87:1 (2002), 15-23.
- [85] M. Miller, "Elephant TB Diagnostics and Guidelines. In : Report of the Committee on Tuberculosis," consulté le 14/12/2007, [www.usaha.org/committees/reports/2006/report-tb-2006.pdf], 2006>.
- [86] M. A. Miller, "Current diagnostic methods for tuberculosis in zoo animals," In : *Zoo and Wild Animal Medicine, Current Therapy*, 6th edition (M. E. Fowler and R. E. Miller, eds.), WB Saunders Company St. Louis, MO, 2008, pp. 10-19.
- [87] T. Moller, B. Roken, L. Petersson, C. Vitaud, and K. P. Lyashchenko, "Preliminary results of a new serological test for detection of TB-infection (*Mycobacterium tuberculosis*) in elephants (*Elephas maximus* and *Loxodonta africana*) - Swedish Case studies.," *Verh.ber.Erkrg.Zootiere* (2005), 173-181.
- [88] R. J. Montali, S. K. Mikota, and L. I. Cheng, "*Mycobacterium tuberculosis* in zoo and wildlife species," *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 20:1 (2001), 291-303.
- [89] D. Morar, The development of an interferon-gamma (IFNg) assay for the diagnosis of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in African elephants (*Loxodonta Africana*) and black rhinoceros (*Diceros bicornis*), MSc (Veterinary Science), University of Pretoria, South Africa, 2005.
- [90] D. Morar, E. Tijhaar, A. Negrea, H. Klos, J. Hendriks, I. Van Rijhn, J. Godfroid, A. Michel, and V. Rutten, "Development of an ELISA for the detection of Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) as a diagnostic tool for tuberculosis in elephants," Proc. 7th conference of the European Wildlife Diseases Association (Aosta Valley, Italy, 2006).
- [91] R. S. Narayanan, "A case of tuberculosis in an elephant," *J. comp. patho.*, 38 (1925), 96-97.
- [92] L. Naughton, R. Rose, and A. Treves, "The social dimensions of human-elephant conflict in Africa : A literature review and case studies from Uganda and Cameroon.,"

An IUCN Report to the African Elephant Specialist, Human-Elephant Task Conflict Task Force, Glands, 1999.

- [93] E. Nuermberger, W. R. Bishai, and J. H. Grosset, "Latent tuberculosis infection," *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, 25:3 (2004), 317-336.
- [94] P. Oh, R. Granich, J. Scott, B. Sun, M. Joseph, C. Stringfield, S. Thisdell, J. Staley, D. Workman-Malcolm, L. Borenstein, E. Lehnkering, P. Ryan, J. Soukup, A. Nitta, and J. Flood, "Human exposure following *Mycobacterium tuberculosis* infection of multiple animal species in a Metropolitan Zoo," *Emerg. Infect. Dis.*, 8:11 (2002), 1290-1293.
- [95] D. Olson, "Elephant Husbandry resource guide," International Elephant Foundation, FortWorth, TX, 2004.
- [96] Organisation Mondiale de la Santé, "The Global Plan to Stop TB 2006-2015," consulté le 14/12/2007, [<http://www.stoptb.org/globalplan/>], 2005>.
- [97] K. C. Panicker, A. K. Ponnappan, E. V. Radhakrishnan, and M. N. Pad, "Practical elephant management. A handbook for mahouts.," consulté le 16/04/2008, [<http://www.elephantcare.org/mancover.htm>], 1997>.
- [98] J. B. Payeur, J. L. Jarnagin, J. G. Marquardt, and D. L. Whipple, "Mycobacterial isolations in captive elephants in the United States," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 969 (2002), 256-258.
- [99] C. A. Peloquin, J. N. Maslow, S. K. Mikota, A. Forrest, F. Dunker, R. Isaza, L. R. Peddie, J. Peddie, and M. Zhu, "Dose selection and pharmacokinetics of rifampin in elephants for the treatment of tuberculosis," *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 29:6 (2006), 581-585.
- [100] M. R. Pinto, M. R. Jainudeen, and R. G. Panabokke, "Tuberculosis in a domesticated Asiatic elephant (*Elephas maximus*)," *Vet. Rec.*, 93:26 (1973), 662-664.
- [101] N. Pollock, J. Westerling, and A. Sloutsky, "Specimen dilution increases the diagnostic utility of the Gen-Probe Mycobacterium Tuberculosis Direct Test," *Am. J. Clin. Pathol.*, 126:1 (2006), 142-147.
- [102] T. Rahman, "Infectious and non-infectious disease of elephants," In : Healthcare, Breeding and Management of Asian Elephants (D. Das, ed., New Delhi. Project Elephant. Govt. of India), 2003, pp. 108-118.
- [103] P. Ratanakorn, "Elephant Health Problems and Management in Cambodia, Lao and Thailand. A Research Update on Elephants and Rhinos," *Proc. International Elephant and Rhino Research Symposium* (Vienna, 2001), pp. 111-114.
- [104] L. Riquelme, La tuberculose chez les espèces sauvages de zoo : utilisation du dosage de l'interféron gamma pour le diagnostic., Th. : Med.vet. : Alfort, 2008.
- [105] A. L. Roca, N. Georgiadis, J. Pecon-Slattery, and S. J. O'Brien, "Genetic evidence for two species of elephant in Africa," *Science*, 293 (2001), 1473-1477.

- [106] C. P. Ryan, "Tuberculosis in Circus Elephants," Pulse Southern California Veterinary Medical Association, vol. 8, 1997, pp. 15-18.
- [107] G. Saunders, "Pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection in a circus elephant," J. Am. Vet. Med. Assoc., 183:11 (1983), 1311-1312.
- [108] D. L. Schmitt, "Proboscidea (Elephants)," In : Zoo and Wild Animal Medicine, 5th edition (M. E. Fowler and R. E. Miller, eds.), WB Saunders Company, St. Louis, MO, 2003, pp. 541-550.
- [109] N. W. Schulger and W. N. Rom, "The Host Immune Response to Tuberculosis," Am. J. Respir. Crit. Care Med., 157 (1998), 679-691.
- [110] P. Seneviratna, S. G. Wettimuny, and D. Seneviratna, "Fatal tuberculosis pneumonia in an elephant," Veterinary Medicine Small Animal Clinician, 60 (1966), 129-132.
- [111] H. Shojaei, J. G. Magee, R. Freeman, M. Yates, N. U. Horadagoda, and M. Goodfellow, "Mycobacterium elephantis sp. nov., a rapidly growing non-chromogenic Mycobacterium isolated from an elephant," International journal of systematic and evolutionary microbiology, 50 Pt 5 (2000), 1817-1820.
- [112] J. Shoshani, "Evolution des Proboscidea," In : Les Eléphants, 2nd ed., Bordas, Paris, 1993, pp. 18-33.
- [113] J. Shoshani, "Pourquoi sauver les éléphants," In : Les Eléphants, 2nd ed., Bordas, Paris, 1993, pp. 226-229.
- [114] J. Shoshani and P. Tassy, "Advances in proboscidean taxonomy and classification, anatomy and physiology, and ecology and behavior," Quat. Internat., 126-128 (2005), 5-20.
- [115] M. A. Skinner, D. N. Wedlock, and B. M. Buddle, "Vaccination of animals against *Mycobacterium bovis*," Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics), 20:1 (2001), 112-132.
- [116] D. E. Snyder and Al, "Historical aspects of tuberculosis in the Philadelphia Zoo," in : Mycobacterial infections of zoo animals (R. J. Montali, ed., Smithsonian Institution Press, Washington, DC), 1978, pp. 33-44.
- [117] P. J. Stephenson, "WWF Species Action Plan : African elephant 2007-2011," (2006).
- [118] M. F. Stevenson and O. Walter, "Management guideline for the welfare of zoo animals : Elephants (*Loxodonta africana*, *Elephas maximus*), 2nd edition," British & Irish Association of Zoos & Aquariums, London, UK, 2006.
- [119] A. Terkel, "European regional EEP African Elephant Studbook," 2006.
- [120] H. Thieringer, "About tuberculosis in an elephant," Berl. Tierarztl. Wschr., 27 (1911), 234-235.

- [121] C. O. Thoen, "Tuberculosis and other mycobacterial diseases in captive wild animals," In : Zoo and Wild Animal Medicine, Current Therapy, 3rd edition (M. E. Fowler, ed., WB Saunders Company, Philadelphia, PA), 1993, pp. 45-49.
- [122] C. O. Thoen and E. M. Himes, "Tuberculosis," In : Infectious Diseases of Wild Mammals (J. W. Davis, L. H. Karstad and D. O. Trainer, eds.), Iowa State University Press, Ames, IO, 1981, pp. 263-274.
- [123] G. Thornton, "Treatment of tuberculosis and tuberculosis infection in adults and children," Am. J. Respir. Crit. Care Med., 149 (1994), 1359-1374.
- [124] E. Tortoli, G. Besozzi, C. Lacchini, V. Penati, M. T. Simonetti, and S. Emler, "Pulmonary infection due to *Mycobacterium szulgai*, case report and review of the literature," Eur Respir J, 11:4 (1998), 975-977.
- [125] C. Turenne, P. Chedore, J. Wolfe, F. Jamieson, K. May, and A. Kabanui, "Phenotypic and molecular characterization of clinical isolates of *Mycobacterium elephantis* from human specimens," J. Clin. Microbiol., 40 (2002), 1230-1236.
- [126] C. D. Tuttle, "Les éléphants en captivité," Les Eléphants. 2nd ed. (J. Shoshani, ed., Bordas, Paris), 1993, pp. 184-193.
- [127] US Department of Agriculture, "Elephant necropsy protocol (*Elephas maximus*, *Loxodonta africana*)," consulté le 14/12/2007, [[http://www.aphis.usda.gov/animal\\_welfare/downloads/elephant/eleph\\_nec2003.pdf](http://www.aphis.usda.gov/animal_welfare/downloads/elephant/eleph_nec2003.pdf)], 2003>.
- [128] US Department of Agriculture, "Guidelines for the control of tuberculosis in elephants 2003," consulté le 14/12/2007, [[http://www.aphis.usda.gov/animal\\_welfare/downloads/elephant/tb2003.pdf](http://www.aphis.usda.gov/animal_welfare/downloads/elephant/tb2003.pdf)], 2003>.
- [129] H. M. Vordermeier, M. A. Chambers, P. J. Cockle, A. O. Whelan, J. Simmons, and R. G. Hewinson, "Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis.," Infect. Immun. J., 70 (2002), 3026-3032.
- [130] R. Waters, "Personal communication," Orlando, FL, 2005.
- [131] W. R. Waters, M. V. Palmer, J. P. Bannantine, and Al, "Antibody responses in reindeer (*Rangifer tarandus*) infected with *Mycobacterium bovis*," Clin. Diagn. Lab. Immunol., 12:6 (2005), 727-735.
- [132] D. L. Whipple and M. V. Palmer, "Reemergence of tuberculosis in animals in the United States," In : Emerging diseases of animals (C. Brown and C. Bolin, eds.), ASM Press, Washington, DC, 2000, pp. 281-299.
- [133] M. Zhu, J. N. Maslow, S. K. Mikota, R. Isaza, F. Dunker, H. Riddle, and C. A. Peloquin, "Population pharmacokinetics of pyrazinamide in elephants," J. Vet. Pharmacol. Ther., 28:5 (2005), 403-409.

- [134] M. Ziccardi, H. N. Wong, L. A. Tell, D. Fritchler, J. Blanchard, A. Kilbourn, and H. P. Godfrey, "Further optimization and validation of the antigen 85 immunoassay for diagnosing mycobacteriosis in wildlife," Proc. AAZV annual conference (Minneapolis, MN, 2003), pp. 219-220.
- [135] Zootest, "Dépistages sérologiques de la tuberculose," Consulté le 01/05/08, [<http://www.vetosphere.com/zootest/index.html>], 2007 >.



## ANNEXES



## Annexe A : Protocole d'autopsie chez l'éléphant [127]

### ***ELEPHANT NECROPSY PROTOCOL***

This protocol is an effort of the Elephant Species Survival Plan (SSP) Propagation Group of the American Zoo and Aquarium Association (AZA). Its purpose is to provide a format for the systematic collection of information and samples that will add to our knowledge of elephants.

#### **ELEPHANT TUBERCULOSIS ALERT**

An intense search for lesions of tuberculosis (TB) is encouraged in all elephant necropsies. This should include all elephants that die or are euthanized for other reasons even though TB is not suspected. Ideally, elephants should be bled for serology (ELISA), and trunk wash(es) collected just prior to euthanasia. Elephants that die naturally should have a *post-mortem* trunk wash performed and serum should be harvested from *post-mortem* blood for serological assays.

All elephants undergoing necropsies should have a careful examination of the tonsillar regions and submandibular lymph nodes for tuberculous appearing lesions. All lymph nodes should be carefully evaluated for lesions since other sites may also be infected (ex. reproductive or gastrointestinal tract). Take any nodes that appear caseous or granulomatous for culture (freeze or ultrafreeze), and fixation (in buffered 10% formalin). In addition, search thoracic organs carefully for early stages of TB as follows: after removal of the lungs and trachea, locate the bronchial nodes at the junction of the bronchi from the trachea. Use clean or sterile instruments to section the nodes. Freeze half of the lymph node and submit for TB culture to NVSL or a laboratory experienced in mycobacterial culture and identification (**even if no lesions are evident**). Submit sections in formalin for histopathology. Carefully palpate the lobes of both lungs from the apices to the caudal borders to detect any firm B-B shot to nodular size lesions. Take sections of any suspicious lesions. Open the trachea and look for nodules or plaques and process as above. Regional thoracic and tracheal lymph nodes should also be examined and processed accordingly. Split the trunk from the tip to its insertion and take samples of any plaques, nodules or suspicious areas for TB diagnosis as above. Look for and collect possible extra-thoracic TB lesions, particularly if there is evidence of advanced pulmonary TB.

#### **EQUIPMENT CHECKLIST**

1. Standard large animal necropsy instruments. Multiple scalpel handles, duplicates or triplicates of other instruments. Extra box of scalpel blades, knife sharpener, and a continual supply of sharp knives.
2. Retractors of various sizes and shapes. Self-retaining retractors with one or two movable arms mounted on a slide bar are most useful if available.
3. Sterile instruments for culture collection.
4. 10% neutral buffered formalin.
5. 4% buffered glutaraldehyde).
6. Containers for sample collection.
7. Culture swabs, sterile urine cups, glass slides.
8. Serum tubes for blood and urine collection.

9. Aluminum foil and plastic bags for freezing tissues.
10. Labels and waterproof marking pens.
11. Scale for obtaining organ weights.
12. Tape measure (metric), at least 2 meters long.
13. Chain saw, axe, or reciprocating saw to cut through the cranium. Hammers, chisels and handsaws.
14. Hoist/crane.
15. Carts on rollers to move heavy parts.
16. Coveralls, boots, gloves, caps, masks, protective eye and head gear.
17. Accessible water supply with hose.
18. Camera (conventional and/or digital) and film, extra batteries.
19. First aid kit.
20. Surgical masks approved for TB exposure.

## **LOGISTICS AND NECROPSY TIPS**

Heavy equipment may be necessary to move a dead elephant. For an on site necropsy, chains and a tow truck may be sufficient to reposition the animal or to move it a short distance. If the animal must be transported to a remote site, a truck with a hoist will be needed. It may be easier to manipulate the animal onto a flatbed trailer. Trucks can generally be rented or may be available from a telephone company. If a flatbed carrier is used, the animal will need to be strapped to the bed and covered with a tarp (a baseball diamond infield tarp works well). If transportation will be delayed, the carcass can be covered with ice.

If death is imminent or euthanasia is planned, completion of the measurement checklist *ante-mortem* will save time at necropsy. Otherwise, measurements should be done as soon after death as possible.

Assigning specific tasks to team members will help the necropsy to proceed in an orderly manner. For example, a team may be assigned to each of these areas: head, forelegs, hindlegs, abdominal region. One person should oversee the collection, labeling, and processing of research materials and any communication concerning research requests. It may be helpful to designate a media spokesperson. Dissection of the head is best completed after separating it from the body. A good portion of the cranium must be damaged to remove the brain intact; a chain saw, large axe, and chisels are needed to penetrate the thick cranium. A battery operated reciprocating saw with a replaceable metal cutting blade may be safer and easier to handle. A posterior approach to brain removal can be made by 3 connecting deep cuts with a chain saw in the margins of the flattened triangle formed at the base of the elephant skull. Then remove the bony plate in chunks with a curved crow-bar. Use of a chain saw on bone can be hazardous and cause shrapnel-like fragments to be launched. Protective eye, head and face gear should be worn by the chain saw operator and personnel in the immediate area. In case an elephant may be unknowingly tuberculous, dissection of the thoracic cavity should always be performed last, and preferably by two people with face masks (hepa-filter preferred) and other protection against Mycobacteria. All other personnel should be dismissed from the area before the thoracic cavity is entered. After the initial incision at the ventral midline is made, one person holds the retractor and the other cuts the tensed skin. Once the sternum is exposed, the ribs are separated at the cartilaginous attachment and adjustable retractors are applied to hold the cavity open. Alternatively, after the abdominal viscera are removed, the diaphragm can be cut from its costosternal attachments and the lungs palpated from a caudal approach for tuberculous nodules, as the lobes are being separated from the closely adhered visceral and parietal pleura. The heart, lungs, and associated structures may then be removed “en bloc”.

## **ELEPHANT NECROPSY PROTOCOL GROSS EXAMINATION**

### **WORKSHEET**

Institution/Owner/ Address : \_\_\_\_\_

Species : \_\_\_\_\_ ISIS# : \_\_\_\_\_ Studbook# : \_\_\_\_\_ Name : \_\_\_\_\_

Birth date/Age : \_\_\_\_\_ Sex : \_\_\_\_\_ Weight (Kg) : \_\_\_\_\_ (Actual ? Estimate ?)

Death date : \_\_\_\_\_ Death location : \_\_\_\_\_

Necropsy date : \_\_\_\_\_ Necropsy location : \_\_\_\_\_

*Post-mortem* interval : \_\_\_\_\_ Captive Born ? Wild Caught ? : \_\_\_\_\_

History (clinical signs, circumstances of death, clinical lab work, diet & housing) : \_\_\_\_\_

### **GROSS EXAMINATION**

General Exam (physical/nutritional condition, skin, body orifices, superficial lymph nodes) : \_\_\_\_\_

Musculoskeletal System (bones, marrow, joints, muscles) : \_\_\_\_\_

Body Cavities (fat stores, pleura, thymus, lymph nodes) : \_\_\_\_\_

Spleen : \_\_\_\_\_

Respiratory System (trunk passages, pharynx, larynx, trachea, bronchi, lungs, regional lymph nodes; submit lung lesions for TB culture; **bronchial lymph nodes should be cultured for TB even if normal in appearance**) : \_\_\_\_\_

Cardiovascular System (heart, pericardial sac, vessels, myocardium, valves, chambers) : \_\_\_\_\_

Digestive System (mouth, teeth, tongue, esophagus, stomach, small intestine, cecum, large intestine, rectum, liver, pancreas, mesenteric lymph nodes) : \_\_\_\_\_

Urinary System (kidneys, ureters, bladder, urethra) : \_\_\_\_\_

Reproductive System (testes/ovaries, uterus & cervix, penis/vagina, urogenital canal, prostate, seminal vesicles, bulbo-urethral gland, mammary gland, placenta) : \_\_\_\_\_

Endocrine System (thyroids, parathyroids, adrenals, pituitary) : \_\_\_\_\_

Central Nervous System (brain, meninges, spinal cord) : \_\_\_\_\_

Sensory Organs (eyes, ears) : \_\_\_\_\_

Additional Comments or Observations : \_\_\_\_\_

Summarize Preliminary Diagnoses : \_\_\_\_\_

### **TISSUE CHECK LIST**

Freeze 3-5 cm blocks of tissue from lesions and major organs (e.g., lung, liver, kidney, spleen) in small plastic bags. Freezing at -70°C in an ultra-low freezer is preferred. If this is unavailable, freezing at conventional temperatures is acceptable (use a freezer without an automatic defrost cycle if possible).

**Any lesions noted in the lungs should be submitted to NVSL or other qualified mycobacterial laboratory for mycobacterial culture. Bronchial lymph nodes should be cultured for TB even if normal in appearance.**

Preserve as many of the tissues listed below as possible in 10% buffered formalin at a ratio of approximately 1 part tissue to 10 parts solution. Tissues should be no thicker than 0.5 to 1.0 cm. Fix diced (1x1 mm) pieces of kidney, liver, spleen and lung in a suitable EM fixative if possible - glutaraldehyde base e.g., Trump-McDowell fixative.

Tissue check list : Adrenal / Kidney / Penis / Thymus/ Blood / Large intestine / Pituitary / Tongue / Bone with marrow / Liver / Prostate / Trachea / Bulbo-urethral gland / Lung / Salivary gland / Trunk cross section / Brain / Lymph nodes / Seminal vesicles / Uterus/cervix / Cecum / Mammary gland / Skin / Ureter / Diaphragm / Muscle / Small intestine / Urinary bladder / Esophagus Nerve (sciatic) / Spinal cord / Vaginal/urogenital canal / Eye / Ovary/testis / Spleen / Heart/aorta / Pancreas / Stomach / Hemal node / Parathyroid / Temporal gland.

## Annexe B : Laboratoires de référence

### **Histopathologie** (Spécialistes américains)

Dr. Richard Montali  
National Zoo - Department of Pathology (Washington, DC 20008, USA)  
Tel : (202) 673-4869 Fax : (202) 673-4660 E-mail : [rmontali@njp.si.edu](mailto:rmontali@njp.si.edu)

Dr. Arthur.J.Davis (Chief of Pathology)  
Dr. Mark Hall (Head Pathological Investigations)  
USDA APHIS NVSL - Pathobiology Laboratory (Ames, IA 50010, USA)  
Tel : (515) 663-7521 Fax : 515-663-7527  
E-mail : [Arthur.J.Davis@aphis.usda.gov](mailto:Arthur.J.Davis@aphis.usda.gov) ou [Mark.Hall@aphis.usda.gov](mailto:Mark.Hall@aphis.usda.gov)

### **Bactériologie**

***En Europe (culture, spoligotyping, antibiogramme)***  
Mme María Laura Boschiroli-Cara  
AFSSA Alfort, Unité Zoonoses Bactériennes,  
Laboratoire d'études et de recherches en pathologie animale et zoonoses  
23 avenue du Général de Gaulle,  
94706 Maisons-Alfort Cedex, France  
Tel : 00 33 149 771 300 Fax : 00 33 149 771 344  
E-mail: [ml.boschiroli@afssa.fr](mailto:ml.boschiroli@afssa.fr)

***Aux Etats-Unis (culture, antibiogramme, R.F.L.P., M.T.D.)***  
Dr. Janet Payeur, Head,  
Mycobacteria and Brucella Section, USDA APHIS VS  
National Veterinary Services Laboratories (NVSL)  
1800 Dayton Avenue / PO Box 844  
Ames, IA 50010, USA  
Tel : (515) 663-7676 Fax: (515) 663-7315  
E-mail : [Janet.B.Payeur@aphis.usda.gov](mailto:Janet.B.Payeur@aphis.usda.gov)

### **Test interféron gamma**

Diana Whipple, Research Leader  
Bacterial Diseases of Livestock Research Unit, USDA, ARS  
National Animal Disease Center  
2300 Dayton Avenue, PO Box 70  
Ames, IA 50010, USA  
Tel : (515) 663-7325 Fax : (515) 663-7458  
E-mail : [dwhipple@nadc.ars.usda.gov](mailto:dwhipple@nadc.ars.usda.gov)

## **Test ELISA**

### ***En Europe : ELISA Lelystadt***

Department of Bacteriology and TSEs  
Central Institute for Animal Disease Control  
P.O. box 2004  
8203 AA Lelystad, The Netherlands  
Tel : 00 31 320 238 800 Fax : 00 31 320 238 668  
E-mail : [info@cidc-lelystad.nl](mailto:info@cidc-lelystad.nl)

### ***Aux Etats-Unis***

Mycobacterium bovis Testing Laboratory  
Animal Population Health Institute  
College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences  
Environmental Health Building, Room 107  
Colorado State University  
Ft. Collins, CO 80523-1676, USA  
Tel : (970) 491-7950 Fax: (970) 491-1889

### **Pour toute question sur la méthode :**

Dr. R. Scott Larsen (UC Davis, CA, USA)  
Tel: (530) 752-1393 Fax: (530) 752-0414  
E-mail: [slarsen@ucdavis.edu](mailto:slarsen@ucdavis.edu)

## **Test MAPIA et ElephantTB StatPak®**

Chembio Diagnostic Systems, Inc.  
3661 Horseblock Road  
Medford, NY 11763, USA  
Tel : (631) 924-1135 Fax : (631) 924-6033  
E-mail : [info@chembio.com](mailto:info@chembio.com) Web Site : [www.chembio.com](http://www.chembio.com)

## **Dosages sériques des antituberculeux**

Dr. Charles Peloquin  
National Jewish Medical and Research Center  
1400 Jackson Street  
Denver, CO 80206, USA  
Tel : (303) 398-1925, 398-1448, 398-1427 Fax : (303) 270-2229  
E-mail : [Peloquin@NJC.org](mailto:Peloquin@NJC.org) Web site : [www.njc.org](http://www.njc.org)

## Annexe C : Technique de lavage de trompe [50, 128]

### ***A TRUNK WASH TECHNIQUE FOR THE DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS IN ELEPHANTS***

#### **MATERIALS AND METHODS**

The trunk wash technique requires that the elephant allows the handlers to restrain and manipulate the tip of trunk. This is difficult in an untrained elephant in that most elephants resent this manipulation, and the trunk is many times stronger than the combined force of several handlers. It is therefore important that the animals be trained to present the trunk, allow gentle manual restraint, and manipulation of the trunk tip during the collection of the sample. The training period varies with the individual elephant, the prior behavioral conditioning of the animal, and the skill of the handlers. In our experience, most animals can be adequately trained for the procedure in 2-4 weeks.

The materials needed for a trunk wash include : Sterile 0.9% saline solution, sterile 60 ml syringe, 1 gallon plastic zip lock type bags (heavy duty), and sterile, 50 ml, screw top, plastic jar or centrifuge tube. As long as attention is given to collecting a clean sample from the distal nasal passages, the materials and techniques for the sample collection can be modified. For example, some clinicians prefer to use a 14-gauge red rubber tube feeding tube inserted into the trunk tip instead of simply flushing the sterile saline into the trunk tip. Another common variation is to use a sterile plastic container to catch the trunk wash fluid instead of a plastic bag.

#### **PROCEDURE**

A routine screening of an elephant should consist of a series of three trunk wash samples collected on separate days within a one-week period. Trunk washings should be collected in the morning and prior to water being offered to the animal. These recommendations are made in an attempt to obtain a representative sample of the nasal flora from the previous night, and to avoid the dilution effect caused by elephants drinking water with their trunks.

The elephant's trunk is manually restrained by the handlers so that the tip is held up. The 60 ml syringe filled with sterile saline is then inserted into one of the nostrils and the saline quickly flushed into the trunk. The handler then lifts the trunk tip as high as possible to help the fluid flow as far into the trunk as possible. The 1 gallon plastic bag is then slipped over the trunk tip and the tip of the trunk is lowered to allow the fluid to drain. If possible, the elephant is allowed to exhale into the bag during this collection phase of the procedure. A good sample should retrieve a significant portion of the saline that was placed into the trunk (about 40 ml). The sample should contain visible mucus from the inside of the trunk and often contains dirt and food particles that are normally found inside the trunk. The collection of moderate amounts of foreign material does not invalidate the sample. If, however, the collector feels the contamination is excessive, a second flush may be attempted.

Once the sample is collected in the plastic bag, it is carefully transferred into a labeled container. Ideally, the sample is refrigerated and sent directly to a laboratory for processing and mycobacterial culture. If the sample cannot be sent directly for culturing, it may be frozen in a regular freezer (-20 to -10 °C) until it can be sent to the laboratory. Often the recommended three daily cultures samples are collected and frozen until all samples are collected and the batch of samples can be sent to the laboratory together.

## Annexe D : Mode d'emploi du test ElephantTB StatPak® [14]



CATALOG # 60-9680-0  
5 Test Kit

3661 Horseblock Road  
Medford, New York 11763 U.S.  
Veterinary License No. 645

### Mycobacterium bovis - Mycobacterium tuberculosis Antibody Test Kit ElephantTB STAT-PAK® Assay

A Rapid Immunochromatographic Test for the Detection of Antibodies to Mycobacterium tuberculosis and  
Mycobacterium bovis in Elephant Serum, Plasma or Whole Blood

FOR IN VITRO VETERINARY DIAGNOSTIC USE  
READ INSTRUCTIONS FOR USE CAREFULLY BEFORE PERFORMING TEST

#### INTENDED USE

The ElephantTB STAT-PAK Assay is a qualitative, single use, two-step, immunochromatographic screening test for the detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* in serum, plasma or whole blood from African elephants (*Loxodonta africana*) and Asian elephants (*Elephas maximus*). The test is used as an aid in the diagnosis of active tuberculosis (TB) in conjunction with other diagnostic methods.

If specific antibodies are present in the sample, the expected test result is reactive. A reactive result is suggestive of active TB. In the absence of antibodies, the expected test result is nonreactive.

#### SUMMARY AND EXPLANATION

Tuberculosis (TB) in elephants is a re-emerging zoonotic disease caused primarily by *Mycobacterium tuberculosis* and, in some cases, by *Mycobacterium bovis*. The only USDA-recommended diagnostic test for TB in elephants is mycobacterial culture of trunk wash samples. However, there is a growing body of evidence indicating that this method has poor sensitivity, as it can only identify animals with extensive shedding of the organism that typically occurs late in the course of disease. Rapid detection of infected elephants is a crucial prerequisite for more effective control of TB, as early diagnosis allows timely initiation of chemotherapy [1-3].

Serological methods constitute an attractive alternative as they are simple, inexpensive, relatively non-invasive, and they do not depend on detection of mycobacteria [4-5]. None of the existing TB tests alone is sufficient to diagnose disease. Therefore, new TB diagnostic algorithms are being developed, in which serological assays may play an important role (see PERFORMANCE CHARACTERISTICS below).

The Chembio ElephantTB STAT-PAK Assay is a rapid immunochromatographic test for antibody detection that is safe, simple, and easy to perform.

#### PRINCIPLE OF TEST

The Chembio ElephantTB STAT-PAK Assay is based on immunochromatographic (lateral-flow) technology. The test employs a unique cocktail of recombinant *M. tuberculosis* proteins that are bound to the membrane solid phase. Blue latex particles conjugated with protein are used as the detection system. The ElephantTB STAT-PAK Assay can be used with serum, plasma or whole blood. Once a test sample is applied to the SAMPLE (S) well followed by the addition of a diluent, it flows laterally through the membrane strip. When it reaches the conjugate pad, antibodies, if present, bind to protein-latex conjugate and then the migrating immune complex binds to the antigens on the solid phase in the TEST (T) area producing a blue line. In the absence of antibodies there is no line in the TEST (T) area. The sample continues to migrate along the membrane and produces a blue line in the CONTROL (C) area demonstrating that the reagents are functioning properly.

#### MATERIALS PROVIDED

Each kit contains the following items:

- 5 ElephantTB STAT-PAK test devices
- 5 Disposable pipettes
- 1 Diluent vial (5mL)
- 1 Product insert

#### Additional Material Required But Not Provided

- Clock, watch or other timing device
- Disposable gloves
- Biohazard disposal container
- Collection devices for specimens

## STORAGE AND STABILITY

The ElephantTB STAT-PAK Assay should be stored at 8 to 30°C in the original sealed pouch. The diluent should be stored in the original vial at 8 to 30°C. The kit is stable until the date printed on the box label and/or pouch.

**NOTE:** Do not use expired test kits.

**CAUTION:** Do not freeze test kits.

## PRECAUTIONS

1. The test is designed FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE only. Use the test only in accordance with instructions supplied with the kit.
2. Handle all specimens as recommended for any potentially infectious serum or blood specimen in the CDC-NIH manual, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 4<sup>th</sup> ed., 1999.
3. Use suitable protective clothing(gloves, lab coat, safety glasses) when handling samples or test devices after samples have been applied. Avoid any contact between hands, eyes, nose or mouth during specimen collection and testing.
4. Do not pipette any material by mouth. Do not smoke, eat or drink in areas where specimens or kit material are kept.
5. All testing should be performed at a temperature of 18 to 30°C.
6. After the completion of the assay, carefully dispose of materials treating them as biohazardous waste.
7. Do not use expired test kits. Do not freeze test kits.
8. Do not mix reagents from different kit lots.

## SPECIMEN COLLECTION

The ElephantTB STAT-PAK Assay can be performed on whole blood, serum or plasma.

**Whole Blood:** Collect whole blood into tubes containing heparin or EDTA. Be sure to thoroughly mix whole blood by inverting capped tube several times just prior to testing. Follow test procedure instructions.

**Serum:** Serum is used from whole blood collected aseptically by venipuncture into a clean tube without anticoagulant. Allow the blood to clot at room temperature, centrifuge at 2000 rpm for 10 minutes at room temperature, 18 to 30°C, and separate the serum from the clot. **Plasma:** Collect whole blood with anticoagulant (heparin, EDTA or sodium citrate), centrifuge at 2000 rpm for 10 minutes at room temperature, 18 to 30°C, and isolate the plasma supernatant.

Samples perform best when tested immediately after collection. Specimens should be immediately refrigerated at 2 to 8°C following collection and can be used up to 3 days. If testing within 3 days is not possible, the specimens should be frozen at -20°C or colder until use. Avoid repeated freezing and thawing. DO NOT FREEZE WHOLE BLOOD.

**NOTE:** If specimens are to be shipped, they should be packed in compliance with regulations covering the transportation of etiologic agents. Venous whole blood, serum and plasma specimens should be shipped refrigerated with cold packs or wet ice.

## TEST PROCEDURE

1. If test samples are refrigerated, remove them from the refrigerator and allow them to come to a temperature of 18 to 30°C before testing.
2. Remove the required number of ElephantTB STAT-PAK Assay devices from their pouches and place the devices on a flat surface area. It is not necessary to remove the desiccant from the package. **NOTE:** If desiccant packet is missing, DO NOT USE, discard the test device and a new test device should be used.
3. Label test units with sample names and/or identification numbers. (see Figure 1 below)



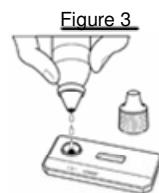
**Figure 1**

4. Using a disposable pipette, draw the specimen to be tested (whole blood, serum or plasma), into the pipette being careful not to draw up any air and add one full drop of specimen onto the center of the SAMPLE (S) well. (See Figure 2 below)



**Figure 2**

5. Once the specimen has been applied to the SAMPLE (S) well, remove the cap, invert the diluent bottle and hold it vertically (not at an angle) over the SAMPLE well. Add the diluent slowly dropwise; add 3 drops (~100 µl) into SAMPLE (S) well. (See Figure 3)



**Figure 3**

6. Read results at 20 minutes after the addition of diluent. Do not read any results after 30 minutes. Refer to INTERPRETATION OF RESULTS section below.
7. Discard the used disposable pipette, test device and any other test materials into a biohazard waste container.

## QUALITY CONTROL

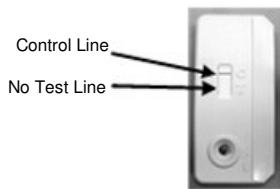
A blue colored line should always appear in CONTROL (C) area if the test has been performed correctly and the device is working properly. It serves as an internal test procedural control.

Good Laboratory Practice (GLP) recommends the use of control materials along with the test samples to ensure proper performance of the test kit. Positive and Negative serum or plasma based commercial controls should be used for this purpose. Use controls as per the TEST PROCEDURE instructions of this insert.

## INTERPRETATION OF RESULTS

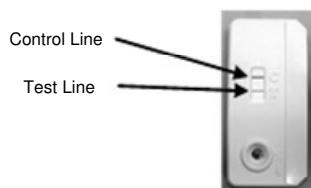
### Nonreactive Result

One blue colored line in the CONTROL (C) area, with no visible colored line in the TEST (T) area indicates a nonreactive result. A nonreactive result at 20 minutes means that neither *Mycobacterium tuberculosis* nor *Mycobacterium bovis* antibodies were detected in the specimen. A nonreactive result does not preclude the possibility of TB infection.



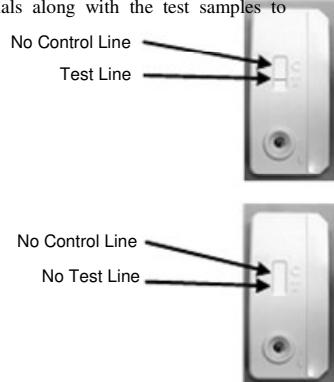
### Reactive Result

Two blue lines - one in the TEST (T) area and one in the CONTROL (C) area - indicate a reactive result. Intensities of the TEST and CONTROL lines may vary. Even a very faint line in the TEST (T) area of the device within 20 minutes is indicative of a reactive result. A reactive result means that *Mycobacterium tuberculosis* and/or *Mycobacterium bovis* antibodies were detected in the specimen



## INVALID RESULTS

A blue line should always appear in the CONTROL (C) area, whether or not a line appears in the TEST (T) area. If there is no distinct blue line in the CONTROL (C) area, the test is invalid and should be repeated using a new device.



## LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. The assay is designed for detecting antibodies against *M. tuberculosis* and *M. bovis* only from elephant plasma, serum or whole blood. Any other body fluids or pooled samples or specimens from other than elephant species should not be used.
2. A reactive result suggests the presence of antibodies to *M. tuberculosis* and/or *M. bovis*.
3. For a reactive result, the intensity of the test line does not necessarily correlate with the titer of antibody in the specimen.
4. Reading nonreactive results earlier than 20 minutes or any results later than 30 minutes may yield erroneous results.
5. Do not use hemolyzed blood samples.
6. Blood specimens must be thoroughly mixed just prior to testing.
7. Be careful to add only 30  $\mu$ L of specimen and 3 drops of diluent after applying the specimen to the SAMPLE (S) well.
8. Do not open the sealed test pouch until just prior to use.
9. Do not use kit contents beyond labeled expiration date.
10. Read results in a well-lit area.



## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Highly specific and sensitive antibody binding proteins are used in the ElephantTB STAT-PAK Assay. The diagnostic performance was compared to the standard USDA-recommended method, trunk wash culture, and the ElephantTB STAT-PAK Assay was found to be superior.

Further, it was shown that both Asian and African elephants infected with either *M. tuberculosis* or *M. bovis* could be detected by ElephantTB STAT-PAK Assay up to several years prior to finding positive culture in trunk washes [3].

### Sensitivity and Specificity

Sensitivity of the ElephantTB STAT-PAK Assay was determined by testing 23 culture positive elephants. Of these samples, 23/23 were reactive by the Chembio ElephantTB STAT-PAK antibody test kit (Table 1). The specificity of the ElephantTB STAT-PAK Assay was determined by testing 131 serum, plasma, and/or whole blood samples. Of these samples 127/131 were non-reactive by the Chembio ElephantTB STAT-PAK antibody test kit (Table 2).

Table 1.  
Diagnostic sensitivity of ElephantTB STAT-PAK Assay

Elephant	Mycobacterial species	ElephantTB STAT-PAK reactive
African	<i>M. tuberculosis</i>	3/3
African	<i>M. bovis</i>	1/1
Asian	<i>M. tuberculosis</i>	19/19

Table 2.  
Specificity studies of ElephantTB STAT-PAK Assay

Elephant	ElephantTB STAT-PAK non-reactive	Trunk Lavage Culture negative
African	58/58	58/58
Asian	50/54	54/54
Unknown	19/19	19/19

### REPRODUCIBILITY STUDIES

Reproducibility was tested at three independent laboratories using three serials of ElephantTB STAT-PAK Assay. A reference panel of 30 blinded samples representing negative, weakly reactive and reactive were tested 3 different times on 3 different days. The compiled results from 3 laboratories demonstrated 98.5% accuracy.

## REFERENCES

1. Lewerin, S.S., Olsson, S-L., Eld, K., Röken, B., Ghebremichael, S., Koivula, T., Källenius, G., and Bölske, G. (2005) Outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* infection among captive Asian elephants in a Swedish zoo. *Vet. Rec.* 156: 171-175.
2. Montali, R.J., Mikota, S.K., and Chemg, L.I. (2001) *Mycobacterium tuberculosis* in in zoo and wildlife species. *Rev. sci. tech. Off. int.Epiz.* 20: 291-303.
3. Mikota, S.K., Peddie, L., Peddie, J., Isaza, R., Dunker, F., West, G., Lindsay, W., Larsen, R.S., Salman, M.D., Chatterjee, D., Payeur, J., Whipple, D., Thoen, C., Davis, D. S., Sedgwick, C., Montali, R.J., Ziccardi, M., and Maslow, J. (2001) Epidemiology and diagnosis *Mycobacterium tuberculosis* in captive Asian elephants (*Elephas maximus*). *J. Zoo Wildl. Med.* 32: 1-16.
4. Lyashchenko, K.P., et al., (2006) Tuberculosis in Elephants: Antibody Responses to Defined Antigens of *Mycobacterium tuberculosis*, Potential for Early Diagnosis, and Monitoring of Treatment. *Clinical And Vaccine Immunology* 13: 722-732.
5. Larsen, R.S., Salman, M.D., Mikota, S.K., Isaza, R., Montali, R.J., and Triantis, J. (2000) Evaluation of a Multiple-Antigen Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* Infection in Captive Elephants. *J. Zoo Wildl. Med.* 31: 291-302.
6. Lyashchenko K.P., Singh M., Colangeli R., and Gennaro M.L. (2000) A multi-antigen print immunoassay for the serological diagnosis of infectious diseases. *J. Immunol. Methods* 242: 91-100.

## FOR MORE INFORMATION, CONTACT:

### CHEMBIO DIAGNOSTIC SYSTEMS, INC.

3661 HORSEBLOCK ROAD  
MEDFORD, NY 11763 USA  
U.S. Veterinary License No. 645  
Tel: (631) 924-1135  
Fax: (631) 924-6033  
Email: [info@chembio.com](mailto:info@chembio.com)  
Web Site: [www.chembio.com](http://www.chembio.com)

### ORDERING INFORMATION

Cat #	Product
60-9680-0	ElephantTB STAT-PAK® 5 Test Kit
60-9682-0	ElephantTB STAT-PAK® 20 Test Kit
60-9683-0	ElephantTB STAT-PAK® 50 Test Kit

**Annexe E : Bon de commande européen ElephantTB StatPak® [135]**

**Bon de commande / zootest.com**



Date : \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

	Ref	Prix net H.T <i>Hors livraison</i>	Quantité	Total
Commande Normale	<b>PrimaTB STAT-PAK® 5</b>	400 \$		
	<b>PrimaTB STAT-PAK® 20</b>	1200 \$		
	<b>PrimaTB STAT-PAK® 50</b>	2500 \$		
	<b>ElephantTB STAT-PAK® 5</b>	500 \$		
	<b>ElephantTB STAT-PAK®</b>	1500 \$		
	<b>ElephantTB STAT-PAK®</b>	2500 \$		
Commande Express	<b>PrimaTB STAT-PAK® 5</b>	380 €		
	<b>ElephantTB STAT-PAK® 5</b>	315 €		
Test Unique	<b>1 primate</b>	80 €		
	<b>1 Mammifère non primate</b>	90 €		

Nom : \_\_\_\_\_

Vétérinaire      Si non vétérinaire, nom du vétérinaire référent : \_\_\_\_\_

Institution : \_\_\_\_\_

Parc zoologique

Animalerie

Laboratoire

DDSV/DGAL

Adresse : \_\_\_\_\_

Ville : \_\_\_\_\_ Code postal : \_\_\_\_\_

Tel : \_\_\_\_\_ Fax : \_\_\_\_\_

E-mail : \_\_\_\_\_

Espèces cibles pour les tests recommandés : \_\_\_\_\_

Signature : \_\_\_\_\_ Cachet : \_\_\_\_\_

**► FAX : 01 48 83 08 55**

## Annexe F : Protocole de quarantaine chez l'éléphant [1]

### ***QUARANTINE GUIDELINES FOR ELEPHANTS***

Due to the size, strength, and social nature of elephants, it may be logistically difficult to maintain isolation from other animals during arrival and quarantine. The Recommended Preshipment Protocol for Elephants lists a comprehensive battery of tests to detect disease prior to shipment. Since most zoological institutions will not have facilities available to safely house and manage a newly arriving elephant, it is important that the receiving institution work closely with the sending institution to ensure that all (or as many as possible) of the listed tests are conducted and results reviewed. Following the preshipment protocol may help compensate for some of the quarantine compromises that may be required. Regardless of preshipment test results, every attempt should be made to maintain some degree of physical separation from the resident elephants after arrival.

Current quarantine practices recommend a minimum 30-90 day quarantine period for most species found in zoos and aquaria. Social concerns, physical facility design, and availability of trained elephant staff may dictate a modified quarantine protocol. The final decision for specific quarantine protocols at each institution should be made by the veterinary staff in consultation with the elephant management staff.

- Whenever possible, the newly arrived elephant should be maintained with physical separation from all other resident elephants. This should include provisions to prevent contact with feed, bedding, or feces/urine between animals. One option to allow social interaction is to provide a “companion” and treat both animals as “quarantined”.
- Initial visual assessment of the elephant, along with review of the medical records, to determine health status should be used to develop an individual quarantine plan.
  - ❖ Ideally, the recommended length of quarantine is a minimum of 30 days. However, this may be changed in light of social concerns or detection of abnormal health status.
  - ❖ Risk of disease transmission between animals should be balanced with the concern for well-being (physical, psychological, and social) of the elephant.
- Quarantine procedures should be planned as soon as the elephant can be safely managed and appears to be settling in the facility.
  - ❖ Thorough physical examination including a review of all systems.
  - ❖ Blood collection for CBC, serum chemistry panel, fibrinogen, serum protein electrophoresis, and serum bank.
  - ❖ Fecal collection for parasite screening should be done weekly for the first 3 weeks.
  - ❖ Fecal cultures for *Salmonella* should be conducted at least weekly for the first 3 weeks.
  - ❖ Any procedures that were not completed prior to transport or may have come due; such as vaccination, serologic screening, or TB testing.
- Release from quarantine should be the decision of the veterinary staff (after completion and review of results from any quarantine procedures), in conjunction with the assessment of the elephant management staff.

It should be emphasized that the quarantine test requirements should be conducted regardless of the preshipment testing. The stress of transport and quarantine may result in changes (for example, *Salmonella* shedding) that were inapparent during testing at the sending institution.

NOM : DELNATTE

Prénom : Pauline

**TITRE : Etude de la tuberculose chez l'éléphant : importance en parc zoologique**

RESUME : Les éléphants d'Afrique (*Loxodonta africana*, *Loxodonta cyclotis*) et d'Asie (*Elephas maximus*) sont des espèces menacées dans leur milieu naturel. Leur élevage en parc zoologique est difficile et les populations captives diminuent peu à peu. La tuberculose chez l'éléphant n'est pas rapportée chez les individus sauvages, alors que de nombreux cas ont été déclarés chez des spécimens captifs. Depuis 10 ans, des études sont menées afin de mettre au point des techniques diagnostiques fiables et des thérapies efficaces. Chez l'éléphant, l'infection est souvent inapparente et est principalement causée par *Mycobacterium tuberculosis*, agent de la maladie chez l'homme. L'apparition d'un cas dans une collection zoologique constitue donc un risque de zoonose grave pour les employés et les visiteurs. La gestion pratique du cas et le devenir d'un éléphant tuberculeux dépend ainsi grandement des autorités sanitaires du pays, comme l'illustre l'exemple du Safari de Peaugres (Ardèche, France) en 2004.

MOTS-CLES : Eléphant, tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, zoonose, parc zoologique, captivité, tests diagnostiques, traitement.

---

**ENGLISH TITLE : Tuberculosis in elephants : its importance in zoo animal medicine**

ABSTRACT : African elephants (*Loxodonta africana*, *Loxodonta cyclotis*) and asian elephants (*Elephas maximus*) are endangered species in free-ranging wildlife. Elephant husbandry in zoo is difficult and the captive population gradually decreases. Elephant tuberculosis is a zoo disease: many cases of this mycobacteriosis have been reported in zoo elephants but not in wild elephants. For ten years several diagnostic tests and treatments have been developed and tested in order to improve their performance. Elephants often show no clinical signs and tuberculosis is mainly due to *Mycobacterium tuberculosis* as in the human disease. Therefore, an outbreak of tuberculosis in a zoological collection represents an important zoonotic risk for staff and visitors. The management of these cases mainly depends on Health Authorities' policy as seen in the example at the Safari de Peaugres (Ardèche, France) in 2004.

KEYWORDS : Elephant, tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, zoonosis, zoo, captivity, diagnostic tests, treatment.