



# UNIVERSITÉ FRANÇOIS - RABELAIS DE TOURS



**ÉCOLE DOCTORALE « Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant »**

**Unité : Infectiologie et Santé Publique**

**THÈSE** présentée par :

**Louise LEFRANÇOIS**

Soutenue le : 26 Octobre 2012

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais de Tours**

Discipline : Sciences de la vie

**Etude des adhésines HBHA et LBP impliquées  
dans l'interaction de *Mycobacterium avium* ssp.  
*paratuberculosis* avec les cellules épithéliales  
intestinales, cibles privilégiées de la bactérie *in vivo***

**THÈSE dirigée par :**

**M. BIET Franck**

Directeur de Recherche, INRA, Tours

**RAPPORTEURS :**

**M. BAULARD Alain**

Directeur de Recherche, Institut Pasteur, Lille

**M. HERRMANN Jean-Louis**

Professeur, Université de Versailles-St Quentin en Yvelines

**JURY :**

**M. BAULARD Alain**

Directeur de Recherche, Institut Pasteur, Lille

**M<sup>me</sup> BIERNE Hélène**

Directeur de Recherche, Institut Pasteur, Paris

**M. BIET Franck**

Directeur de Recherche, INRA, Tours

**M. HERRMANN Jean-Louis**

Professeur, Université de Versailles-St Quentin en Yvelines

**M. GOUDEAU Alain**

Professeur, Université François Rabelais, Tours

## REMERCIEMENTS

Je remercie les différents supports financiers qui ont participé à la réalisation de ces travaux, l'INRA, la région Centre, le département MICA et l'école doctorale SSBCV.

Je tiens à remercier les rapporteurs de cette thèse **Alain Baulard** et **Jean-Louis Herrmann** mais également **Hélène Bierne** et **Alain Goudeau** d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à **Franck Biet** pour m'avoir donné la chance de réaliser l'apprentissage du métier de chercheur dans ces conditions. Je n'aurai pas pu espérer mieux : toutes ces opportunités de congrès et de stages...Quelle chance ! Merci pour toutes ces discussions personnelles et professionnelles, tes encouragements, ton soutien et ta confiance qui sans le savoir m'ont fait avancer! Je te remercie également pour ta disponibilité et ton implication dans mon encadrement durant ces 3 ans malgré un planning souvent chargé.

Merci à toi **Thierry Cochard** pour ton aide précieuse autant au niveau des manips que moralement...Tous ces moments de rigolade étaient un vrai bonheur...Tellement de souvenirs durant ces 2 ans et demi passés dans nos 1,5 m<sup>2</sup> de bureau chacun, avec tout ton bordel partout...Mais que dire de plus ! J'espère ne pas confirmer ce proverbe « loin des yeux, loin du cœur » et retrouver des collègues comme toi dans le futur.

Merci à **Isabelle Jacques** pour toutes les discussions diverses et variées que nous avons eu ensemble, pour tes précieux conseils et ton implication dans la relecture de ce manuscrit.

Ce travail n'aurait pu aboutir sans l'aide de nombreux collaborateurs : **Florence Gilbert**, **Olivier Grépinet**, **Patricia Berthon**, **Christelle Bodier**, **Sylvie Canepa**, **Ana Paula Gomez Teixeira**, **Eve Haguenoer**, **Céline Pujol** et **Philippe Lanotte** pour votre aide dans la mise au point de certaines manips et votre implication dans ce projet.

Je remercie **Camille Loch** de m'avoir accueillie dans son laboratoire, **Sophie Lecher** pour avoir pris le temps de nous apprendre la méthode de purification et **Dominique Raze** pour ses conseils et son avis aux différentes étapes de mon projet de thèse.

**Maria Cristina Vidal Pessolani** pour m'avoir donné cette fabuleuse opportunité de venir travailler dans son laboratoire, d'avoir pu découvrir cette superbe ville de Rio et surtout d'avoir pu rencontrer des gens géniaux. Merci à vous !

Un grand merci à **Franck Biet**, **Florence Carreras**, **Sébastien Holbert**, **Thierry Cochard**, **Benoit Allain** et **Benjamin Buffet** pour leur participation à la correction et l'élaboration de ce manuscrit.

Je remercie le reste de l'équipe Infections Mycobactériennes Animales et transmets tout mon courage à **Robin Lombard** pour la suite de sa thèse. Je tiens à remercier également **Nathalie Winter** pour son aide dans ma recherche de post-doc.

Toutes les personnes qui ont croisé mon chemin durant ces trois ans dans les couloirs de l'INRA ou ailleurs.

Je remercie mes amis du master ICMV, mes copines de Chartres, mes amis de Tours, l'ADOCT pour toutes ces soirées qui permettent d'oublier momentanément que le chemin est encore long !

Je tiens à remercier avec tout mon amour ma famille, **mon père** pour ses encouragements et **ma mère**, qui est un peu dépassée par toutes mes aventures mais qui malgré cela me soutient et me réconforte chaque jour. Sans elle je n'en serais pas là aujourd'hui! J'espère qu'un jour la vie lui rendra tout ce qu'elle mérite...

Une pensée pour **ma sœur** dont je suis fière et qui a toujours crû en moi. Merci à sa jolie famille pour la joie qu'elle m'apporte, **ma nièce**, j'espère ne pas rater trop de moments avec toi ces prochaines années !

Je finis par remercier l'homme qui partage ma vie, je souhaite que la vie construite ensemble continue comme elle a commencé dans le soutien, la confiance, l'amour, la joie et la simplicité peut importe où elle nous emmènera, mais aucun doute, la route a l'air moins difficile quand tu es à mes côtés.

## RESUME FRANÇAIS

**Introduction :** *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (Map) est l'agent étiologique de la paratuberculose ou maladie de Johne, entérite chronique fatale chez les ruminants. Peu de données sont disponibles pour ce pathogène dont l'évolution bi-phasique a fait émerger deux familles appelées : type C pour « Cattle » et type S pour « Sheep ». S'il est clairement établi que l'intestin grêle est le site primaire d'infection pour Map, les mécanismes moléculaires d'interaction, d'entrée et de dissémination du bacille restent largement méconnus.

**Objectif :** Dans ce contexte, l'objectif de mon projet de thèse visait à identifier et caractériser les adhésines exprimées par Map par des approches génétiques et biochimiques.

**Résultats :** Des résultats de cytoadhérence ont montré que l'héparine et la laminine pouvaient moduler l'adhésion de Map aux cellules épithéliales suggérant l'implication d'adhésines capables d'interagir avec ces matrices. Sur la base de ces observations, j'ai isolé l'adhésine LBP par chromatographie sur héparine-Sépharose. La caractérisation de la LBP de Map a montré qu'elle est identique à 80% à celles décrites chez différentes espèces de mycobactéries. C'est une adhésine exprimée constitutivement et capable de fixer différentes matrices extracellulaires. La LBP peut être utilisée comme antigène de diagnostic et sa réactivité avec du sérum de patients de Crohn soulève de nouvelles questions.

Dans une deuxième partie de ma thèse, j'ai isolé une autre adhésine également capable d'interagir avec l'héparine mais avec une faible affinité. Pour cette adhésine, HBHA, la stratégie de purification a été entièrement modifiée. J'ai ainsi pu isoler la HBHA sous sa forme native à partir d'une culture de Map réalisée en fermenteur. Cette HBHA isolée de la souche de référence présente une séquence protéique plus courte que celle de *M. tuberculosis* (TB), qui fait référence. Cette différence porte sur le domaine C-terminal responsable de l'interaction avec les glycosaminoglycanes et explique ainsi une affinité réduite pour l'héparine. Disposant d'une vaste collection de souches de Map, nous avons recherché si au sein de cette sous-espèce la HBHA présentait du polymorphisme. Grâce à cette exploration, j'ai montré que, selon le type C ou S, Map exprimait une HBHA différente. Cette observation est d'autant plus étonnante que chez les mycobactéries cette adhésine est strictement conservée par espèce. Chez Map, la HBHA de type C est courte 190 aa contre 205 aa pour celle de type S. Cette observation a été vérifiée, par GeneMapper®, sur l'ensemble des souches génotypiquement définie dans la collection. La différence portant sur la partie C-terminale des HBHA, j'ai cherché à mesurer leur affinité pour l'héparine. La HBHA de type C est éluée à 200 mM NaCl par chromatographie d'affinité sur héparine-Sépharose, contre 410 mM NaCl pour la HBHA de type S. Des analyses en Biacore® ont confirmé et précisé ces données qui démontrent bien que la HBHA de type S, plus longue a plus d'affinité pour l'héparine. Ces résultats sont étonnants à double titre, d'une part les deux types C et S de la sous-espèce *paratuberculosis* peuvent être distingués par la taille de leur HBHA, et d'autre part par leur capacité d'interaction à l'héparine. Le schéma évolutif de la sous-espèce *paratuberculosis* montre que le type S serait plus proche de la sous-espèce *avium* que le type C. Ces résultats sont également en corrélation avec la HBHA de type S qui est similaire à 98,6 % à celle du MAC alors que celle de type C diffère de celle du MAC.

Une dernière analyse récente m'a permis de montrer que par contre la LBP de type C a une séquence plus longue que celle des S également au niveau du domaine C-terminal.

**Conclusion - perspectives :** Ce travail de thèse a permis de caractériser pour la première fois les adhésines HBHA et LBP produites par Map. Le polymorphisme de ces adhésines, relié à l'évolution de l'espèce *avium*, ouvre de nombreuses perspectives sur leurs rôles dans la pathogénèse de Map, sur le tropisme cellulaire, la préférence d'hôte et sur l'intérêt de ces antigènes pour améliorer le diagnostic de Map.

## RÉSUMÉ ANGLAIS

**Background :** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) is the etiologic agent of paratuberculosis (or Johne's disease), a chronic enteric fatal disease in ruminants. Only little data are available for this pathogen that has evolved into two lineages called: type C "Cattle" and type S "Sheep". While it is clear that the small intestine is the primary site of Map infection, the molecular mechanisms of interaction, entry and dissemination of bacillus remain unknown.

**Aim of thesis :** In this context, my thesis project was to identify and characterize Map adhesins involved in bacillus interaction with host cell by genetic and biochemical approaches.

**Results :** Cytoadherence assays have shown that heparin and laminin can modulate Map adhesion to epithelial cell suggesting involvement of adhesins able to interact with matrix. Based on these observations, I isolated LBP adhesin by heparin-Sepharose chromatography. The LBP characterization shown 80% identity with other adhesins described on mycobacterial species. This adhesin, constitutively expressed is able to interact with different components of extracellular matrix. In addition LBP can be used as antigen to diagnosis paratuberculosis and its reactivity with Crohn patient sera raises more questions.

On the second part of my PhD, I isolated another adhesin also able to interact with heparin but with low affinity. For this adhesin, the purification method has been completely modified. I succeeded to purify the native HBHA from Map culture performed in bioreactor. This HBHA isolated from ATCC reference strain present an amino acid sequence shorter to that of *M. tuberculosis* (TB), the reference. The difference was located in the C-terminal domain of the protein responsible to the glycosaminoglycans interactions explaining a reduced affinity of the Map HBHA to heparin compare to that of TB. Using our comprehensive collection of a Map strains, I examined the polymorphism of the HBHA within this subspecies. Interestingly I discovered that Map express distinct HBHA according to type C and S. This observation is surprising because this adhesin is strictly conserved by species. In Map, HBHA from type C is shorter (190 aa) to that of type S (205 aa). This observation was strengthened by GeneMapper® technology, on genotyped strains from our collection.

Since these differences affect the C-terminal domain of HBHA responsible of the heparin binding site, I examined their affinities to heparin. The type C HBHA chromatographed onto heparin-Sepharose was eluted at 200 mM NaCl whereas the type S HBHA was eluted at 410 mM NaCl. Biacore® analyses have confirmed more precisely that affinity binding of the HBHA type S with heparin is higher than that calculated for the HBHA of type C. These unexpected results are surprising because Map type C and S can be distinguished according to their structure but also by their heparin affinities. The evolutionary scenario of the subspecies *paratuberculosis* indicates that Map type S is closer to the subspecies *avium* than Map type C. These results are in correlation with HBHA produced by type S which is similar at 98.6 % to that of MAC whereas that of type C diverge to MAC HBHA.

Last recent analysis has allowed me to show that type C LBP has a sequence longer than the LBP of type S also on the C-terminal domain.

**Conclusion - outlooks :** In this project we have characterized for the first time adhesins HBHA and LBP expressed by Map. Specific polymorphism highlighted related to the evolution of the species *avium*, opens large number questions on their role on the pathogenesis of Map including the cellular tropism, host preference or interest of these antigens to improve diagnostic.

# TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS .....	2
RESUME FRANÇAIS .....	4
RESUME ANGLAIS .....	5
TABLE DES MATIERES .....	6
LISTE DES TABLEAUX.....	8
LISTE DES FIGURES.....	9
LISTE DES ANNEXES.....	11
LISTE DES ABREVIATIONS.....	12
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....	14
Chapitre 1 : La maladie de Johne ou paratuberculose.....	15
I. La paratuberculose – une histoire ancienne.....	15
II. Pathologie .....	16
II-1 Physiopathologie caractéristique de la paratuberculose.....	16
II-2 Contamination et transmission dans un cheptel .....	18
II-3 Facteurs de risque.....	19
II-4 Hôtes de <i>M. a. paratuberculosis</i> .....	20
II-5 Développement de l’infection .....	20
III. Réponse de l’hôte .....	22
IV. Impact en santé animale – Quelle est la prévalence actuelle ? .....	24
V. Conséquences économiques .....	25
VI. Prophylaxie – Comment lutter contre la paratuberculose ? .....	26
VI-1 Diagnostic .....	26
VI-2 Plans de maîtrise .....	28
VI-3 Vaccination .....	29
VII. Traitement.....	29
VIII. La maladie de Crohn – <i>M. a. paratuberculosis</i> transmissible à l’homme ?.....	30
Chapitre 2 : <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> .....	32
I. Taxonomie des mycobactéries .....	32
II. Caractères morphologiques – physiologiques .....	33
II-1 L’enveloppe des mycobactéries .....	33
II-2 La croissance .....	35
III. Quelques caractères génomiques .....	36

III-1	Le complexe <i>Mycobacterium avium-intracellulare</i> .....	36
III-2	Polymorphisme et évolution de la sous-espèce <i>paratuberculosis</i> .....	37
III-3	Génotypage de la sous-espèce <i>paratuberculosis</i> .....	40
IV.	Caractères phénotypiques distinctifs.....	43
Chapitre 3 : Interactions hôte - mycobactéries.....		45
I.	Du côté de la cellule.....	45
I-1	Interactions avec les cellules phagocytaires .....	45
I-2	Interactions avec les cellules épithéliales .....	47
II.	Du côté de la bactérie – Adhésines mycobactériennes majeures .....	53
II-1	« <i>Major Membrane Protein</i> ».....	53
II-2	« <i>Fibronectin Binding Protein</i> » .....	55
II-3	« <i>Laminin Binding Proteins</i> » .....	64
II-4	« <i>Heparin Binding HemAgglutinin</i> » .....	70
OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE .....		77
RESULTATS .....		80
CONCLUSION – PERSPECTIVES .....		174
BIBLIOGRAPHIE .....		181
ANNEXES .....		201
Annexe 1 : Clonages réalisés pour cette étude.....		202
Annexe 2 : Les 5 adhésines de <i>M. a. paratuberculosis</i> .....		203
Annexe 3 : Communications scientifiques.....		204
Annexe 4 : Liste des publications .....		205
Résumé.....		206

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Les différentes méthodes de diagnostic de la paratuberculose .....	27
Tableau 3 : Liste des amorces utilisées dans l'étude des adhésines de <i>M. intracellulare</i> .....	164
Tableau 2 : Caractéristiques des isolats cliniques de <i>M. intracellulare</i> utilisés dans l'étude des adhésines .....	164



## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Dr Heinrich Albert Johne.....	15
Figure 2 : Dr Frederick William Twort.....	16
Figure 3 : Structure et principaux composants cellulaires du granulome tuberculeux .....	17
Figure 4 : Aspect encéphaloïde de la muqueuse intestinale.....	18
Figure 5 : Modalités de contamination d'un cheptel.....	19
Figure 6 : Distribution des animaux infectés en fonction des différents stades de l'infection	21
Figure 7 : Evolution de l'excrétion bacillaire et de la cinétique des réponses immunitaires Th1 et Th2.....	23
Figure 8 : Prévalence apparente de la paratuberculose bovine au niveau des troupeaux européens.....	24
Figure 9 : Plans d'action contre la paratuberculose clinique en France métropolitaine .....	29
Figure 10 : Arbre phylogénétique de 119 espèces mycobactériennes .....	32
Figure 11 : <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> .....	33
Figure 12 : Représentation schématique de l'architecture de la paroi mycobactérienne .....	35
Figure 13 : Arbre phylogénétique de l'espèce <i>avium</i> .....	38
Figure 14 : Représentation schématique des hypothèses d'évolution de l'espèce <i>avium</i> .....	39
Figure 15 : Génotypage de <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> .....	43
Figure 16 : Récepteurs des cellules phagocytaires impliqués dans l'adhésion des mycobactéries.....	47
Figure 17 : Représentation schématique de la fibronectine .....	49
Figure 18 : Structure moléculaire de la laminine .....	49
Figure 19 : Récepteurs des cellules épithéliales impliqués dans l'adhésion des mycobactéries .....	52
Figure 20 : Caractérisation moléculaire de la MMP de <i>M. leprae</i> .....	53
Figure 21 : Caractérisation moléculaire du composant B du complexe antigénique 85 de <i>M.</i> <i>kansasii</i> .....	57
Figure 22 : Caractérisation moléculaire de la FAP de <i>M. avium</i> .....	61
Figure 23 : Caractérisation moléculaire de la LBP de <i>M. leprae</i> .....	68
Figure 24 : Caractérisation moléculaire de la HBHA de <i>M. tuberculosis</i> .....	71
Figure 25 : Mise en évidence de l'adhésion de <i>M. intracellulare</i> aux cellules épithéliales pulmonaires A-549.....	168

Figure 26 : Expression et purification des adhésines de <i>M. intracellulare</i> en conditions natives .....	169
Figure 27 : Absence de polymorphisme entre les gènes <i>hbha</i> et <i>lbp</i> des différents isolats cliniques de <i>M. intracellulare</i> .....	170
Figure 28 : Les isolats cliniques de <i>M. intracellulare</i> expriment une HBHA et une LBP homologues à celles du MAC .....	170

## **LISTE DES ANNEXES**

Annexe 1 : Clonages réalisés pour cette étude .....	202
Annexe 2 : Les 5 adhésines de <i>M. a. paratuberculosis</i> .....	203
Annexe 3 : Communications scientifiques .....	204
Annexe 4 : Liste des publications .....	205

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>aa</b> – acide aminé	<b>HBD</b> – <i>Heparin Binding Domain</i>
<b>ACERSA</b> – Association de Certification en Santé Animale	<b>HBHA</b> – <i>Heparin Binding HemAgglutinin</i>
<b>ADN</b> – Acide DesoxyriboNucléique	<b>Hlp</b> – <i>Histone like protein</i>
<b>AFM</b> – <i>Atomic Force Microscopy</i>	<b>HS</b> – Héparane Sulfate
<b>AH</b> – Acide hyaluronique	<b>HSPG</b> – Héparane Sulfate ProteoGlycane
<b>ARN</b> – Acide RiboNucléique	<b>IBD</b> – <i>Inflammatory Bowel Disease</i>
<b>ATCC</b> – <i>American Type Culture Collection</i>	<b>IGRAs</b> – <i>Interferon Gamma Release Assay</i>
<b>BAAR</b> – Bacille Acido-Alcool-Résistant	<b>IL</b> – Interleukine
<b>BCG</b> – Bacille de Calmette et Guérin	<b>INF<math>\gamma</math></b> – Interferon gamma
<b>CBD</b> – <i>Cell Binding Domain</i>	<b>IS</b> – <i>Insertion Sequence</i>
<b>CFP-10</b> – <i>Culture Filtrate Protein</i>	<b>kDa</b> – Kilo Daltons
<b>CMH</b> – Complexe Majeur d'Histocompatibilité	<b>KS</b> – Kératane Sulfate
<b>CPAg</b> – Cellules présentatrices d'antigènes	<b>L5P</b> – LipopentaPeptide
<b>CS</b> – Chondroïtine Sulfate	<b>Lm</b> – Laminine
<b>DC-SIGN</b> – <i>Dendritic Cell Specific Intracellular adhesion molecule 3 Grabbing non Integrin</i>	<b>LAM</b> – LipoArabinoMannane
<b>DS</b> – Dermatan Sulfate	<b>Lb</b> – Lame basale
<b>ELISA</b> – <i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>	<b>LB</b> – Lymphocyte B
<b>ESAT-6</b> – <i>Early Secreted Antigenic Target</i>	<b>LBP</b> – <i>Laminin Binding Protein</i>
<b>FAP</b> – <i>Fibronectin Attachment Protein</i>	<b>LDL</b> – <i>Low Density Lipoprotein</i>
<b>FN</b> – Fibronectine	<b>LM</b> – LipoMannane
<b>GAGs</b> – GlycosAminoGlycanes	<b>LOS</b> – LipoOligoSaccharide
<b>GBD</b> – <i>Gelatine Binding Domain</i>	<b>LSP</b> – <i>Large Sequence Polymorphism</i>
<b>GDS</b> – Groupements de Défense Sanitaire	<b>LT</b> – Lymphocyte T
<b>GPL</b> – GlycoPeptidoLipide	<b>MAC</b> – <i>Mycobacterium avium-intracellulare Complex</i>
	<b>ManLAM</b> – LAM Mannosylé
	<b>MBL</b> – <i>Mannose Binding Lectin</i>
	<b>MBP</b> – <i>Maltose Binding Protein</i>
	<b>MDP1</b> – <i>Mycobacterial DNA Binding Protein</i>

<b>ME</b> – Matrice Extracellulaire	<b>RDA</b> – <i>Representational Difference Analysis</i>
<b>MICI</b> – Maladies Inflammatoires Chroniques de l’Intestin	<b>RFLP</b> – <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
<b>Mincle</b> – <i>Marophage Inducible C-type Lectin</i>	<b>RGD</b> – Arginine Glycine Acide Aspartique
<b>MIRU-VNTR</b> – <i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number Tandem Repeat</i>	<b>RIMC</b> – Réponse Immunitaire à Médiation Cellulaire
<b>MLSA</b> – <i>MultiLocus Sequencing Analysis</i>	<b>RIMH</b> – Réponse Immunitaire à Médiation Humorale
<b>MMP</b> – <i>Major Membrane Protein</i>	<b>SIDA</b> – Syndrome d’ImmunoDéficience Acquise
<b>MNT</b> – Mycobactérie Non Tuberculeuse	<b>SNGTV</b> – Société Nationale Groupements Techniques Vétérinaires
<b>MOTT</b> – <i>Mycobacteria Other Than Tuberculosis</i>	<b>SNP</b> – <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
<b>MR</b> – <i>Mannose Receptor</i>	<b>Sp</b> – <i>Surfactant proteins</i>
<b>NMR</b> – <i>Nuclear magnetic resonance</i>	<b>SPR</b> – <i>Surface Plasmon Resonance</i>
<b>PAMPs</b> – <i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>	<b>SSR</b> – <i>Simple Sequence Repeats</i>
<b>PCR</b> – <i>Polymerase Chain Reaction</i>	<b>TLRs</b> – <i>Toll Like Receptors</i>
<b>PGs</b> – Proteoglycanes	<b>TNF <math>\alpha</math></b> – <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
<b>PGL</b> – Phénolique GlycoLipide	<b>UFC</b> – Unité Formant Colonie
<b>pH</b> – potentiel Hydrogène	<b>UV</b> – Ultra Violet
<b>PIM</b> – Phosphatidyl-Inositol Mannosylé	<b>WB</b> – <i>Western-Blot</i>
<b>PFGE</b> – <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>	
<b>PPDj</b> – <i>Purified Protein Derivative Johnin</i>	

# REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

---

## Chapitre 1 : La maladie de Johne ou paratuberculose

### I. La paratuberculose – une histoire ancienne

Les premiers récits d'éleveurs mentionnant la paratuberculose remontent au XIX<sup>ème</sup> siècle. Ils rapportent la présence de diarrhées sévères et fatales décimant leurs troupeaux de bovins. En 1881, les Docteurs Hansen et Nielsen, lors de l'autopsie de bovins morts dans les mêmes conditions, sont les premiers à observer un épaissement anormal de la muqueuse intestinale se caractérisant par un aspect granulomateux.

Ce n'est qu'en 1895 que la première description « officielle » de la paratuberculose a été réalisée. En 1894, un éleveur allemand décida d'envoyer des tissus d'une de ses vaches, morte d'une diarrhée cachectisante, aux Docteurs Heinrich Albert Johne (Figure1) et Langdon Frothingham. Ils observèrent eux aussi cet aspect granulomateux de l'intestin accompagné de gonflements des ganglions lymphatiques (<sup>115</sup>Johne & Frothingham, 1895). Grâce à la coloration de Ziehl-Neelsen, ils remarquèrent la présence de nombreux Bacilles Acido-Alcoolo Résistants (BAAR) suspectant l'implication du bacille de la tuberculose aviaire, *Mycobacterium avium*. Ils donnèrent à cette pathologie le nom d'« entérite pseudotuberculeuse ».



Figure 1: Dr Heinrich Albert Johne  
(1839-1910)

En 1905, le Dr Bernhard Bang écarta l'implication de *Mycobacterium avium* et distingua les deux pathologies. Il essaya vainement de reproduire l'infection chez des oiseaux en leur inoculant des bacilles provenant de matières fécales de bovins infectés et proposa de nommer la maladie « *enteritis chronica bovis pseudotuberculosa* ». L'agent étiologique fut isolé pour

la première fois par le docteur Frederick William Twort (Figure 2) en 1912 qui avait observé la présence de petites colonies satellites présentes sur une culture de *Mycobacterium phlei*. Il suggéra alors le nom de « *mycobacterium enteritis chronicae pseudotuberculose, bovis, Johne* » (<sup>266</sup>Twort & Ingram, 1912).



Figure 2 : Dr Frederick William Twort  
(1877-1950)

Lors de la publication du « *Manual of Systematic Bacteriology* » de Bergey en 1923, l'agent causal de la maladie de Johne a été officiellement nommé, *Mycobacterium paratuberculosis*. Puis, en 1990, Thorel *et al.*, ont sélectionné 22 tests discriminants basés sur l'aspect des colonies, les conditions de croissance, les activités enzymatiques... ce qui permit d'identifier le bacille comme étant une sous-espèce de l'espèce *avium*. Ils ont alors proposé de renommer l'agent : *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* (*M. a. paratuberculosis*) (<sup>256</sup>Thorel, 1990).

## II. Pathologie

### II-1 Physiopathologie caractéristique de la paratuberculose

La paratuberculose est une entérite chronique granulomateuse contagieuse et infectieuse caractérisée, au stade clinique avancé, par des diarrhées sévères, une anémie, un amaigrissement prononcé suivi d'un affaiblissement général de l'organisme entraînant la mort de l'animal. La physiopathologie de la paratuberculose bovine, ovine et caprine est très similaire. Cependant pour la paratuberculose ovine et caprine, on note quelques différences notamment l'absence de troubles digestifs et une évolution plus rapide de la maladie.

Après ingestion par voie orale, le bacille arrive dans l'intestin grêle au niveau des plaques de Peyer du jéjunum et de l'iléon. Le bacille va traverser la barrière intestinale par transcytose



principalement via les cellules M des dômes sub-épithéliaux mais également par l'intermédiaire des entérocytes (<sup>163</sup>Momotani, 1988 ; <sup>209</sup>Sangari, 2001 ; <sup>213</sup>Schleig, 2005 ; <sup>234</sup>Siguoardottir, 2004 ; <sup>32</sup>Bermudez, 2010). Les cellules M sont dépourvues de villosités, d'enzymes digestives et présentent à leur surface du mucus qui facilite l'attachement et l'internalisation du bacille. Le bacille va ensuite être pris en charge par les macrophages sous-épithéliaux pour être présenté dans les follicules lymphoïdes, particulièrement nombreux dans l'iléon, aux Lymphocytes T (LT). Les macrophages contenant les bacilles vont s'agréger puis évoluer en cellules épithéloïdes qui vont fusionner et donner naissance aux cellules géantes multinucléées appelées cellules de Langhans. Les lymphocytes vont venir entourer les macrophages infectés pour former la structure caractéristique des infections mycobactériennes : le granulome (Figure 3).

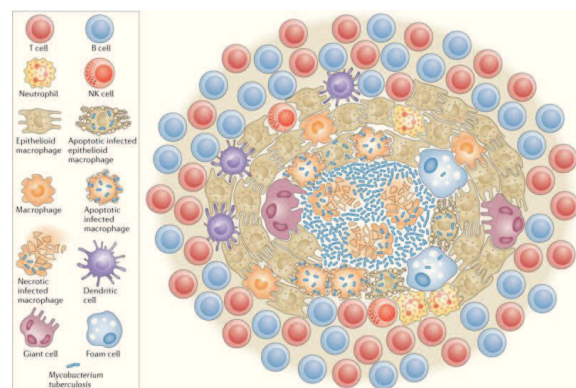


Figure 3 : Structure et principaux composants cellulaires du granulome tuberculeux (D'après <sup>195</sup>Ramkrishnan, 2012)

L'apparition de ces granulomes, au niveau des plaques de Peyer, correspond à la forme paucibacillaire dite tuberculoïde de l'infection. À cette étape, l'infection peut être contenue par le système immunitaire pendant plusieurs années. Les bacilles capables de se multiplier à l'intérieur des cellules phagocytaires et de résister au processus de phagocytose vont être de plus en plus nombreux et entraîner la progression de l'infection. Les granulomes se propagent dans la lamina propria, la sous-muqueuse et les nœuds lymphatiques mésentériques. Ce stade correspond à la forme multibacillaire dite lépromateuse de la maladie où l'organisme ne maîtrise plus l'infection, ce qui se traduit par l'effondrement de la réponse cellulaire et l'apparition de la réponse humorale.

La muqueuse intestinale va s'épaissir progressivement, donnant un aspect granulomateux appelé encéphaloïde (Figure 4). L'intestin grêle ne va plus pouvoir absorber les nutriments, ce qui va conduire, malgré un appétit constant, à l'amaigrissement de l'animal, à des diarrhées cachexiques, à la formation d'œdèmes entraînant la mort (<sup>48</sup>Clarke, 1997 ; <sup>279</sup>Vialard, 2002 ; <sup>44</sup>Chacon, 2004).



Figure 4 : Aspect encéphaloïde de la muqueuse intestinale  
Comparaison d'une muqueuse intestinale granulomateuse caractéristique de la maladie de Johne (au - dessus)  
avec une muqueuse intestinale saine (au - dessous).

## II-2 Contamination et transmission dans un cheptel

Un cheptel est majoritairement contaminé suite à l'introduction d'un animal infecté par *M. a. paratuberculosis*. Les animaux infectés excrètent dans le milieu extérieur, selon le stade évolutif de la maladie, entre 4 millions et 4 milliards de germes par jour (<sup>278</sup>Vialard, 2002), ce qui crée une pollution environnementale importante favorable à la contamination des veaux (<sup>30</sup>Berghaus, 2006 ; <sup>189</sup>Pillars, 2009). En effet, *M. a. paratuberculosis* persiste et survit dans l'environnement plus d'une année sans s'y multiplier. L'agent pathogène est retrouvé jusqu'à 39 semaines dans l'eau stagnante, plus de 20 semaines dans le fumier et l'herbe voire plus d'une année dans les matières fécales (<sup>278</sup>Vialard, 2002 ; <sup>285</sup>Whittington, 2004 ; <sup>208</sup>Salgado, 2011).

Dans la littérature, 3 voies de contamination ont été mises en évidence : la voie oro-fécale, la voie pseudo-verticale et la voie verticale *in utero*. La voie oro-fécale, principal mode de transmission de la paratuberculose, est une méthode de transmission indirecte. Les jeunes bovins se contaminent par l'intermédiaire de l'environnement, de l'alimentation et/ou des structures agricoles souillées par des matières fécales contaminées (box de vêlage, plancher de lactation, distribution de l'eau ou de la nourriture, hygiène des locaux...). La deuxième voie de transmission décrite est une voie pseudo-verticale, c'est-à-dire via les sécrétions

mammaires. En effet, la présence de *M. a. paratuberculosis* est détectée dans le lait et le colostrum dans 10 à 35% des échantillons selon le statut de l'animal, excréteur asymptomatique ou clinique. Enfin, la voie de contamination verticale dite *in utero* est la troisième voie possible. Durant l'infection, des phases de bactériémie peuvent apparaître, infectant le fœtus dans 10 à 40% des cas selon le stade infectieux. De plus, il a été montré que *M. a. paratuberculosis* est présent dans les fluides utérins et placentaires mais également dans la semence pouvant poser problème lors d'inséminations artificielles et à la surface des embryons issus de mères infectées (<sup>278</sup>Vialard, 2002 ; <sup>286</sup>Whittington, 2009) (Figure 5).

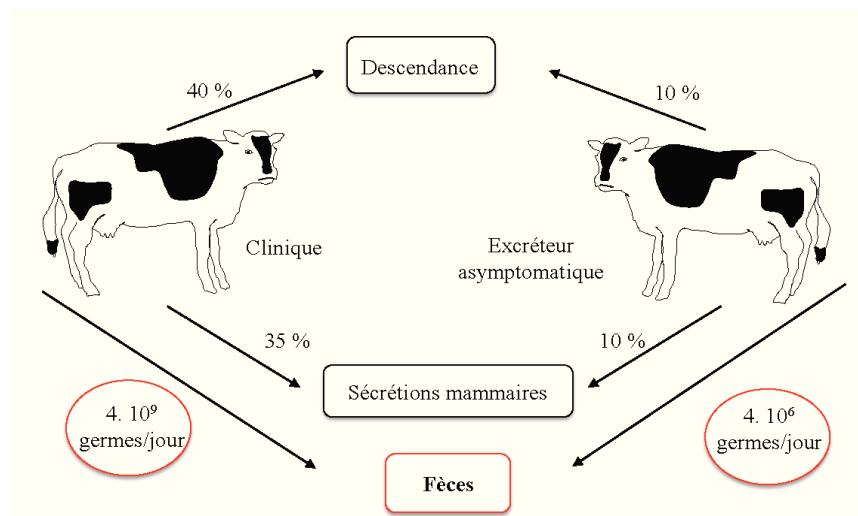


Figure 5 : Modalités de contamination d'un cheptel

### II-3 Facteurs de risque

Une récente méta-analyse a mis en évidence une corrélation entre l'âge des animaux et la sensibilité à l'infection. Les jeunes bovins sont les plus touchés par la paratuberculose avec 75% de cas d'infection chez les animaux âgés de moins de 6 mois, suivi des veaux âgés de 6 à 12 mois avec 50% et des animaux âgés de plus de 12 mois avec un peu moins de 20% (<sup>292</sup>Windsor, 2010). Les conditions immunitaire et physiologique des nouveaux-nés (et ce jusqu'à l'âge de 18 mois) sont en partie responsables de leur contamination. En effet, ils ont au niveau du tube digestif un système immunitaire immature (présence d'une plaque de Peyer unique favorisant l'infection) et les conditions physico-chimiques (pH acide, présence de lactoferrine) sont favorables à l'implantation du bacille.

La génétique de l'animal est également un élément important dans la sensibilité à la paratuberculose mais les études sur ce sujet sont peu nombreuses. Il a néanmoins été remarqué sur le terrain que certains génotypes de bovins sont plus ou moins résistants à l'infection. Les vaches laitières (Holstein et Normande) ou allaitantes (Limousine, Blonde d'Aquitaine) semblent être les races les plus sensibles.

D'autres facteurs de risque liés plutôt à la conduite d'élevage ou à l'état physiologique de l'animal sont à prendre en compte. Dans les troupeaux laitiers, la conduite d'élevage permet d'éviter la contamination des veaux dans la période la plus critique car ils sont séparés de leur mère dès la naissance, contrairement aux élevages allaitants où la marge de manœuvre est plus réduite. De plus, la lactation, la gestation, une carence alimentaire, le stress dû au changement d'exploitation ou encore une co-infection avec un autre pathogène peuvent influencer le passage de l'animal en phase clinique (<sup>278</sup>Vialard, 2002).

## II-4 Hôtes de *M. a. paratuberculosis*

*M. a. paratuberculosis* est capable d'infecter de nombreuses espèces animales aussi bien domestiques que sauvages. Les animaux les plus communément infectés sont les ruminants domestiques tels que les bovins, les ovins et les caprins. Cependant, la paratuberculose a non seulement été décrite chez des ruminants sauvages (cerf, élan, antilope et bison) mais également chez des espèces non-ruminantes de la faune sauvage (lapin, renard, blaireau, belette). On la retrouve également chez des espèces plus exotiques (rhinocéros, girafe, primate, gnou, kangourou et gazelle) (<sup>165</sup>Motiwala, 2004 ; <sup>49</sup>Cleland, 2010 ; <sup>7</sup>Alharbik, 2012 ; <sup>41</sup>Bryant, 2012) et chez l'homme (<sup>46</sup>Chiodini, 1984).

## II-5 Développement de l'infection

### II-5-1 Modèle « iceberg »

Les étapes de l'infection de la maladie de Johne sont souvent illustrées par l'image d'un iceberg représenté par 4 stades relativement bien définis (Figure 6).

Le stade I de l'infection est le stade le plus inquiétant car l'animal infecté ne présente aucun signe clinique apparent et les méthodes de diagnostic ne permettent pas de mettre en évidence l'infection. Par conséquent, cette période asymptomatique est comparable à la partie immergée de l'iceberg et représente un grand danger qui passe inaperçu aux yeux des éleveurs. On y trouve 50 à 70% des animaux infectés, qui après une longue période d'incubation (2-3 ans minimum) vont ou non, développer la forme clinique de la maladie. Les stades II et III sont représentés par des animaux adultes qui excrètent des quantités de bactéries plus ou moins fortes ayant plutôt un impact sur la transmission de la maladie via la contamination environnementale. De plus, au stade III, les signes cliniques deviennent progressivement visibles et on observe une diminution de la production de lait, une perte de poids et l'apparition de diarrhées intermittentes qui s'intensifient et deviennent progressivement continues. Puis, les animaux entrent en phase clinique avancée (stade IV) représentée par la partie émergée de l'iceberg qui correspond à l'infime partie des animaux infectés détectables par les méthodes de diagnostic (3-5%). L'état général de l'animal se dégrade rapidement et est traduit par une malabsorption intestinale et des diarrhées omniprésentes engendrant la mort de l'animal (<sup>133</sup>Leboeuf, 2001).

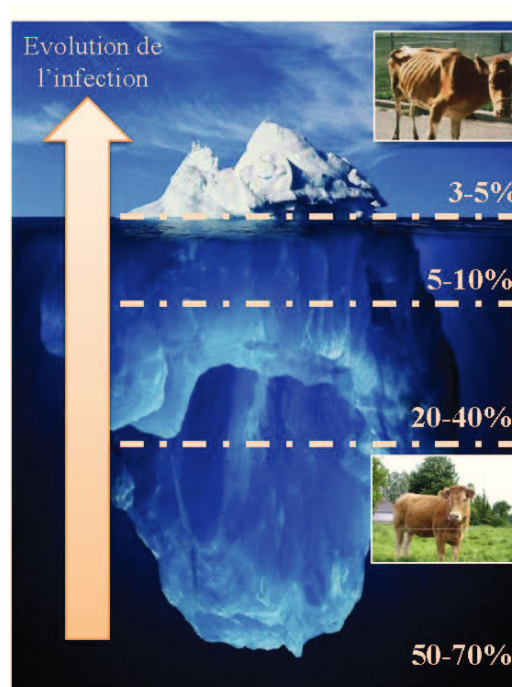


Figure 6 : Distribution des animaux infectés en fonction des différents stades de l'infection

## II-5-2 Notion de « super excréteurs »

Il est important de noter avec ce pathogène que l'on peut retrouver des animaux qualifiés de « super excréteurs » en fonction de la quantité de *M. a. paratuberculosis* détectée dans 1 gramme de fèces. On distingue quatre statuts majeurs dans la paratuberculose: les faibles excréteurs (< 20 UFC), les moyens excréteurs (20 < UFC < 100) et les forts excréteurs (UFC > 100) et les « super excréteurs » caractérisés par la présence de plus de 10 000 germes par gramme de fèces (<sup>283</sup>Whitlock, 2000 ; <sup>57</sup>Crossley, 2005). Dans le cas des animaux « super excréteurs » l'excrétion bacillaire est constante dans le temps et indépendante du stade de l'infection. En effet, ce statut a été démontré chez les veaux âgés de moins de 18 mois dans des élevages où la prévalence apparente est supérieure à 20% (<sup>10</sup>Antognoli, 2007 ; <sup>281</sup>Weber, 2012) mais également chez des animaux asymptomatiques représentant 10% des animaux dits « forts excréteurs » (<sup>81</sup>Fecteau, 2010). De plus, la dose minimale infectante, chez les jeunes bovins, est estimée à 10<sup>3</sup> bactéries (10<sup>9</sup> à 10<sup>12</sup> expérimentalement), ce qui est vraiment faible comparée à la quantité de bactéries excrétées par les animaux « super excréteurs ». C'est pourquoi ces animaux constituent une menace importante quant à l'infection des troupeaux (<sup>26</sup>Begg, 2008).

***La paratuberculose est une inflammation chronique intestinale qui se transmet aux jeunes bovins principalement par voie oro-fécale. M. a. paratuberculosis présente un large spectre d'hôte qui comprend les ruminants domestiques mais également la faune sauvage ce qui rend difficile les études épidémiologiques et le contrôle de cette pathologie. Certains facteurs de susceptibilité ont été mis en évidence tels que l'âge, la race ou l'état physiologique des animaux. Le problème majeur aujourd'hui est le manque d'une méthode de diagnostic fiable pour la détection de la phase précoce de l'infection.***

## III. Réponse de l'hôte

Dans le dogme de la réponse immunitaire à *M. a. paratuberculosis*, on observe une réponse Th1 (RIMC) dans la phase précoce de l'infection jusqu'au déséquilibre de la réponse qui se traduit par la mise en place d'une réponse Th2 (RIMH) (Figure 7). Les cellules présentatrices d'antigènes (CPAg) activées vont d'une part présenter l'antigène aux LT naïfs via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMHI / CD8+ et CMHII / CD4+) et d'autre part produire un panel de cytokines qui va conduire, dans le ganglion, à l'éducation et la

différenciation des LT naïfs CD4+ et CD8+. Les LT CD8+ naïfs vont exercer une activité cytotoxique (enzymes protéolytiques, radicaux libres oxygénés et oxyde nitrique) sur les cellules infectées afin de les éliminer. Les LT CD4+ Th0 sont activés et synthétisent l'IL2 qui va leur permettre une prolifération accrue afin de maintenir l'inflammation (<sup>244</sup>Stabel, 2000).

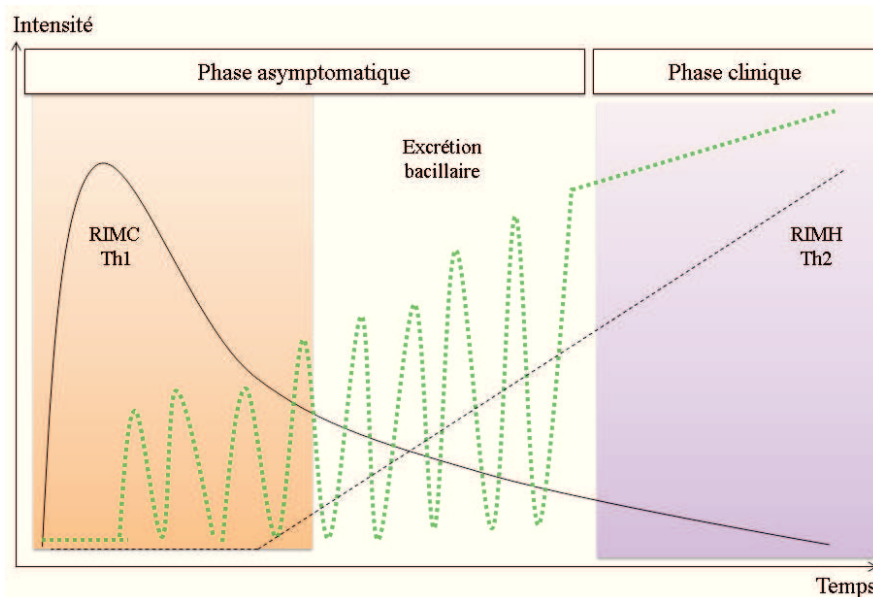


Figure 7 : Evolution de l'excrétion bacillaire et de la cinétique des réponses immunitaires Th1 et Th2 au cours du temps

Lors du stade paucibacillaire, phase précoce, on observe majoritairement la sécrétion de l'IFN $\gamma$  alors que dans le stade multibacillaire l'IL10 est retrouvée en abondance. Ces deux cytokines, IFN $\gamma$  et l'IL10, sont capables d'inhiber respectivement la réponse Th2 et Th1 (<sup>242</sup>Stabel, 2000 ; <sup>55</sup>Coussens, 2001). Récemment, il a été décrit dans le modèle ovin que la production d'IL10 (marqueur de la réponse Th2) ainsi que l'augmentation des Lymphocytes B (LB) dans le sang et les ganglions lymphatiques sont observées rapidement après inoculation des animaux par *M. a. paratuberculosis*. Ces résultats suggèrent qu'il n'y aurait pas de « switch » entre la réponse Th1 et Th2 mais une dérégulation de la réponse immunitaire au court du temps. La réponse IFN $\gamma$ , marqueur de la réponse Th1, s'affaiblirait au court du temps alors que la production d'IL10 et de LB serait continue (<sup>25</sup>Begg, 2005 ; <sup>64</sup>De silva, 2010 ; <sup>23</sup>Begg, 2011).

#### IV. Impact en santé animale – Quelle est la prévalence actuelle ?

De nombreuses études de prévalence sont conduites aujourd'hui afin d'estimer au mieux l'ampleur de la paratuberculose qui ne cesse de progresser. Les données disponibles actuellement sont sous-estimées en raison des problèmes de diagnostic de la phase asymptomatique de l'infection, de la non-standardisation des méthodes de contrôle utilisées mais également du fait que la paratuberculose, contrairement à la tuberculose bovine, ne soit pas une maladie à déclaration obligatoire. Depuis sa première description au début du XIX<sup>ème</sup> siècle en Europe, la paratuberculose n'a cessé de se propager, touchant aujourd'hui les 5 continents et plus particulièrement l'Amérique du Nord, l'Europe et l'Australie qui pratiquent l'élevage intensif. L'association ACERSA a défini un troupeau comme positif lorsqu'il contient un animal ayant une sérologie positive plus une culture ou une PCR positive pour *M. a. paratuberculosis* (<sup>5</sup>ACERSA, 2005). À ce jour, les informations disponibles nous indiquent que la prévalence aux États-Unis est passée dans les troupeaux bovins laitiers de 40% à 68% en 20 ans. En Europe, elle est estimée dans les troupeaux bovins laitiers entre 0 et 80% avec une grande variation selon les pays. Les plus touchés sont la France, l'Italie et le Danemark suivis de près par l'Allemagne et les Pays-Bas. (Figure 8) (<sup>171</sup>Nacy, 2008). Certains pays européens n'ont pas de résultats de prévalence car ils n'ont pas de plan de contrôle permettant le dépistage de la paratuberculose dans les troupeaux bovins (<sup>176</sup>Nielsen, 2009).

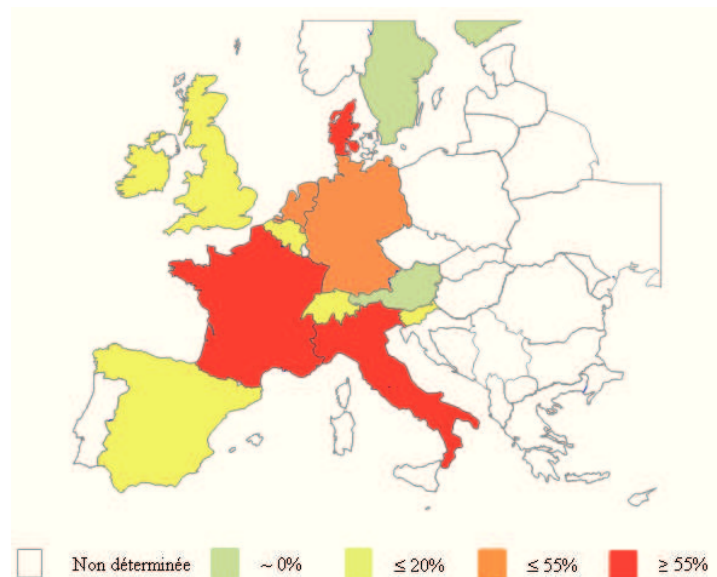


Figure 8 : Prévalence apparente de la paratuberculose bovine au niveau des troupeaux européens



En France, la distribution de la paratuberculose varie selon les départements avec une prévalence plus élevée dans les bassins laitiers tels que la Bretagne, la Normandie mais aussi dans les bassins allaitants comme le Limousin (<sup>4</sup>ACERSA, 2002).

Concernant l'impact de la paratuberculose dans les troupeaux de petits ruminants très peu de données ont été publiées. En Suisse et en Espagne, la prévalence est supérieure à 20% (<sup>176</sup>Nielsen, 2009) et en France proche de 63% (<sup>154</sup>Mercier, 2011). En Australie, la prévalence est en moyenne de 12% et localisée à l'Est du pays (<sup>122</sup>Kennedy, 2005). Dans les régions infectées, la répartition de la paratuberculose est irrégulière et préférentiellement liée aux conditions environnementales (des terrains pauvres et humides carencés en calcium et riches en fer) qui favorisent la survie du germe et augmentent la réceptivité des animaux. Si la paratuberculose est à l'évidence la maladie des ruminants domestiques (bovins, ovins et caprins), elle est également retrouvée dans la faune sauvage jouant un rôle important dans l'épidémiologie et la dissémination de la maladie. (<sup>257</sup>Thorel, 2002). De nombreux cas chez les cerfs sauvages et d'élevage ont été rapportés notamment en Europe (<sup>181</sup>Pavlik, 2000 ; <sup>37</sup>Boalerd, 2000 ; <sup>188</sup>Pieterse, 2010) mais également en Nouvelle-Zélande (<sup>177</sup>Nugent, 2011) et aux États-Unis (<sup>233</sup>Shulaw, 1986).

***La paratuberculose est classée dans l'importance des maladies des ruminants en 1<sup>ère</sup> place en Amérique du Nord et au 8<sup>ème</sup> rang en Europe. La paratuberculose est une pathologie dont la prévalence ne cesse de progresser malgré les programmes de maîtrise et de contrôle mis en place par de nombreux pays. Cette pathologie reste aujourd'hui une préoccupation majeure en santé animale.***

## V. Conséquences économiques

Depuis 2001, la paratuberculose est considérée par l'organisation mondiale de la santé animale comme «importante du point de vue socio-économique et/ou sanitaire au niveau national et dont les effets sur le commerce international des animaux et des produits d'origine animale n'est pas négligeable ». L'estimation des pertes économiques tient compte des effets directs de la paratuberculose sur la productivité d'élevage tels que la diminution de la production laitière et de la fertilité, le retard de croissance, la fonte de la masse musculaire et la réforme précoce des animaux mais également de façon indirecte via la perte du potentiel génétique ou des entraves commerciales se traduisant par des restrictions de vente d'animaux

reproducteurs, de semence ou d'embryons (<sup>133</sup>Leboeuf, 2001). Il faut également prendre en compte le coût des programmes de maîtrise et de contrôle de la paratuberculose mis en place par les pays, concernant le diagnostic, la vaccination et l'abattage précoce des animaux infectés mais également les programmes de recherche qui s'élèvent à des centaines de millions de dollars par an aux États Unis. Malgré cela, les pertes économiques engendrées par la paratuberculose aux États Unis sont estimées à 250 millions de dollars/an pour l'industrie laitière et à 1,5 milliard de dollars/an pour la filière viande (<sup>243</sup>Stabel 1998 ; <sup>179</sup>Ott, 1999).

*Les pays industriels n'hésitent pas à investir dans des programmes de recherche et de contrôle pour lutter contre la paratuberculose mais l'incapacité à maîtriser cette pathologie engendre des pertes économiques considérables pour l'industrie bovine.*

## VI. Prophylaxie – Comment lutter contre la paratuberculose ?

### VI-1 Diagnostic

Les méthodes de diagnostic sont complémentaires et généralement utilisées en parallèle des plans de lutte contre la paratuberculose. Le diagnostic se fait soit par des méthodes directes (coloration Ziehl-Neelsen, culture ou PCR) qui permettent de détecter l'agent *M. a. paratuberculosis* soit par méthode indirecte (ELISA) qui met en évidence les acteurs de la réponse immunitaire (Table 1).

Tableau 1 : Les différentes méthodes de diagnostic de la paratuberculose

Méthodes	Sensibilité	Spécificité	Méthode qualitative/quantitative	Durée du test	Contexte d'emploi
<u>DIRECTE</u> (détecte <i>M. a. paratuberculosis</i> ) :  <b>ZIEHL NEELSEN</b> (Bactérioscopie)	Faible  dû à l'excrétion bacillaire intermittente	Moyenne  détecte autres BAAR	Qualitative	< 24h	<u>Phase clinique</u>
<b>COPROCULTURE</b>  (Méthode de référence)	Moyenne  ne détecte qu'une fèces contaminée sur 2	Bonne  croît en cours d'évolution	Semi quantitative  classement des animaux selon l'apparition des colonies	Très long  jusqu'à 18 semaines	<u>Phase clinique et non clinique</u>  détection des excréteurs asymptomatiques
<b>PCR</b>  (Polymerase Chain Reaction)	Moyenne  Présence d'inhibiteurs dans les fèces et détection des bactéries mortes	Excellente ~ 100%  Utilisation du marqueur IS900 spécifique de <i>M. a. paratuberculosis</i>	Qualitative  Possibilité d'utiliser la PCR quantitative	24-48h	<u>Phase clinique et non clinique</u>  détection rapide et précoce des excréteurs asymptomatiques
<u>INDIRECTE</u> (détecte la réponse humorale)  <b>Sérologie ELISA</b>	Bonne, croît en cours d'évolution  50 à 90%	Spécificité > 90	Quantitative	48-72h	<u>Phase clinique et non clinique</u>

Lors de la phase précoce de l'infection, seules les méthodes de diagnostic direct peuvent être utilisées car les anticorps n'apparaissent que lorsque la réponse Th1 s'effondre, laissant place à la réponse Th2, c'est-à-dire entre 10 à 17 mois après l'infection. En laboratoire, la coloration de Ziehl-Neelsen et la PCR représentent les tests les plus rapides et les plus spécifiques pour mettre en évidence l'infection précoce. Contrairement à la coloration de Ziehl-Neelsen, qui détecte tous les BAAR, la PCR permet une identification spécifique de *M. a. paratuberculosis* via la séquence d'insertion 900 (IS900) mais ne distingue pas si l'ADN bactérien détecté provient d'une bactérie morte ou vivante.

Généralement, la mise en culture des prélèvements se fait en parallèle mais la croissance de *M. a. paratuberculosis* est extrêmement lente (entre 6 et 18 semaines). Elle est majoritairement réalisée à partir de fèces (coproculture) mais peut également se faire à partir de tissus d'animaux infectés comme l'intestin, le foie ou encore les ganglions lymphatiques. Lors de la phase clinique de la paratuberculose, les anticorps présents peuvent être détectés par la méthode ELISA qui est une méthode fiable, rapide, quantitative et plus ou moins

---

spécifique qui utilise comme antigène le « *Purified Protein Derivative of Johnin* » (PPDj) (<sup>277</sup>Vialard, 2002 ; <sup>259</sup>Timms, 2011).

Les tests « *Interféron Gamma Release Assays* » (IGRAs) permettent de détecter la production d'IFN $\gamma$ , marqueur de la réponse Th1, durant la phase précoce de l'infection. Le principe repose sur une stimulation *in vitro* des LT provenant d'un animal infecté, par le PPDj utilisé comme antigène. La quantité d'IFN $\gamma$  sécrété est dosée par la méthode ELISA (<sup>117</sup>Jungerson, 2002). L'inconvénient de ce test est que le PPDj utilisé pour la stimulation est composé d'un ensemble d'antigènes peu spécifique provenant de *M. a. paratuberculosis*. Ce test n'est pas encore utilisé en routine pour le diagnostic de la paratuberculose car il manque de spécificité mais suscite un grand intérêt pour l'amélioration des méthodes de diagnostic.

Récemment, une méthode de PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) a été développée pour permettre le dépistage précoce des animaux excréteurs (bovins, ovins). Cette technologie repose sur l'amplification du gène de l'IS900 spécifique de *M. a. paratuberculosis* qui permet d'une part de différencier les animaux négatifs des animaux positifs et d'autre part de pouvoir définir et identifier les animaux dits « super-excréteurs » (Adiagene). C'est une méthode très sensible, quantitative, rapide mais chère qui, comme la PCR, ne permet pas de distinguer si l'ADN de *M. a. paratuberculosis* détecté provient d'une bactérie morte ou vivante. (<sup>121</sup>Kawaji, 2011 ; <sup>272</sup>Veillon-Vasallo, 2011).

## VI-2 Plans de maîtrise

Les plans de maîtrise mis en place ces 20 dernières années visent à essayer de contrôler la paratuberculose clinique dans les élevages infectés. Ces programmes nécessitent l'implication des éleveurs et des vétérinaires qui s'engagent dans un processus de longue haleine, pouvant aller jusqu'à 5 ans, en raison des caractéristiques épidémiologiques de la maladie. En France, deux actions nationales ont été mises en œuvre depuis 1999 par les Groupements de Défense Sanitaire (GDS) et la Société Nationale Groupements Techniques Vétérinaires (SNGTV) (Figure 9). En revanche, il n'existe que des actions locales pour les petits ruminants. Les plans de maîtrise de la paratuberculose bovine clinique ont trois pôles d'action : la détection/réforme des animaux excréteurs, la maîtrise sanitaire des risques de contamination et la vaccination des veaux qui s'est arrêtée en 2001 en France (<sup>116</sup>Jubert, 2002 ; <sup>154</sup>Mercier, 2011 ; <sup>40</sup>Brugère-Picoux, 2012).

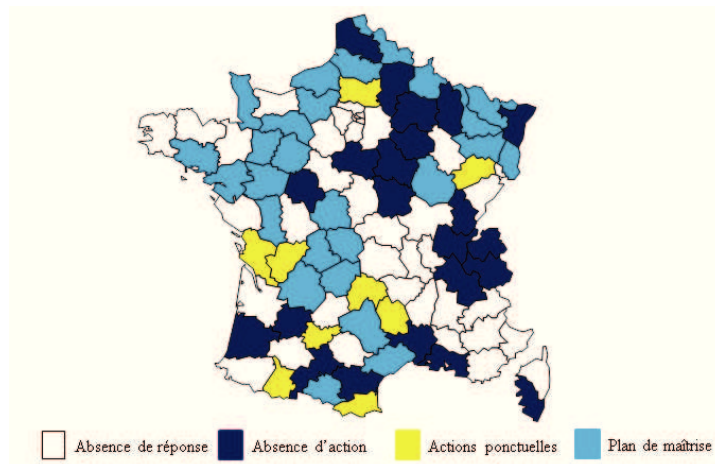


Figure 9 : Plans d'action contre la paratuberculose clinique en France métropolitaine

### VI-3 Vaccination

Actuellement, quatre vaccins sont disponibles et couramment employés dans le monde pour la vaccination de bovins, ovins, caprins et cervidés: Gudair®, Weybridge®, Mycopar® et Néo Parasec®. De nombreux pays d'Europe, d'Amérique et d'Océanie utilisent la vaccination pour contrôler la maladie. La vaccination ne prévient pas l'infection mais diminue le taux d'atteintes cliniques et diminue l'excrétion bacillaire. En effet, la grande majorité des études menées sur la vaccination rapportent des effets bénéfiques sur les productions laitières, l'épidémiologie et la pathogénèse observés sur des bovins, des ovins et des caprins (<sup>22</sup>Bastida, 2011). Deux inconvénients majeurs à la vaccination ont été mis en évidence : les animaux vaccinés répondent positivement aux tests de diagnostic sérologique de la paratuberculose et interfèrent également dans les tests de diagnostic de la tuberculose bovine (maladie à déclaration obligatoire) (<sup>258</sup>Thorel, 2002). Par conséquent, en France, la fabrication du vaccin Néo Parasec® a été arrêtée en 2001, ce qui prive les éleveurs et les vétérinaires d'un outil précieux dans la lutte contre la paratuberculose, notamment chez les petits ruminants (<sup>24</sup>Begg, 2005).

## VII. Traitement

Les traitements de la paratuberculose sont rarement prescrits et peu compris. En effet, *M. a. paratuberculosis* est un organisme à croissance lente possédant une paroi riche en lipides qui rend difficile l'action des antibiotiques. Les contraintes engendrées par les traitements sont nombreuses. Ces traitements sont journaliers, coûteux, longs, peu efficaces et ne permettent

pas d'éliminer complètement la présence de *M. a. paratuberculosis* pouvant provoquer des résistances et des rechutes à long terme. Les animaux contaminés et traités doivent être mis à l'écart pendant la durée du traitement pour éviter de contaminer le cheptel, ce qui entraîne en plus des inconvénients logistiques. Par conséquent, il est économiquement plus intéressant pour les éleveurs de réformer leurs animaux plutôt que de leur donner un traitement antibiotique. Néanmoins, certains antibiotiques tels que l'isoniazide, la clofazimine, et la rifampicine peuvent être appliqués pour des animaux de haute valeur génétique ou des animaux domestiqués (<sup>241</sup>St-Jean, 1991 ; <sup>50</sup>Cocito, 1994 ; <sup>88</sup>Greenstein, 2008 ; <sup>80</sup>Fecteau, 2011).

*Les outils actuellement disponibles ne permettent pas de lutter efficacement contre la paratuberculose. C'est pourquoi la plupart des programmes de recherche sont focalisés sur la prévention de l'infection à *M. a. paratuberculosis* par le développement de nouveaux vaccins et de tests diagnostiques efficaces. C'est le cas du projet européen « mycobactdiagnosis », auquel nous participons, qui vise à identifier de nouveaux antigènes spécifiques de *M. a. paratuberculosis* pour la détection de la phase précoce de l'infection.*

## VIII. La maladie de Crohn – *M. a. paratuberculosis* transmissible à l'homme ?

Les premières descriptions de la maladie de Crohn ont été réalisées par Dalziel en 1913 (<sup>60</sup>Dalziel, 1913) puis par Crohn en 1932 (<sup>56</sup>Crohn, 1984). La maladie de Crohn est une pathologie qui touche essentiellement les jeunes personnes (~ 30 ans) mais également les enfants. C'est une maladie chronique évolutive très invalidante avec des phases d'activité et de remission plus ou moins longues. C'est une pathologie d'origine multifactorielle qui met en jeu des événements génétiques, immunitaires, infectieux et environnementaux. Elle fait partie des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) et est localisée essentiellement dans l'iléon, le jéjunum et le colon mais peut s'étendre de la bouche à l'anus. Les symptômes les plus fréquents sont de fortes diarrhées, des douleurs abdominales, de la fièvre et dans 15% des cas des manifestations extra-intestinales. La maladie de Crohn est une pathologie retrouvée à travers le monde mais avec une incidence plus élevée ces 15 dernières années au Canada (16,5 cas/10<sup>5</sup> personnes (Alberta)), en France (6,4 cas/10<sup>5</sup> personnes), en

Scandinavie (8,9 cas/10<sup>5</sup> personnes (Suède)), en Écosse (11,7 cas/10<sup>5</sup> personnes) et au Pays-Bas (6,9 cas/10<sup>5</sup> personnes) (<sup>74</sup>Economou, 2008).

Même si *M. a. paratuberculosis* n'est pas l'agent étiologique de la maladie de Crohn, sa présence reste à expliquer lorsqu'il est présent chez certain patients (<sup>44</sup>Chacon, 2004 ; <sup>171</sup>Nacy, 2008). Certains symptômes et lésions gastro-intestinales causés chez les animaux par *Map* sont similaires de celles observées chez les patients de Crohn. La présence de *M. a. paratuberculosis* a été démontrée via la détection de l'ADN ou d'anticorps. En revanche, il est difficile de l'identifier *in situ* et peu d'études décrivent l'isolement de la bactérie à partir de lésions de patients atteints de la maladie de Crohn (<sup>46</sup>Chiodini, 1984 ; <sup>27</sup>Behr, 2008 ; <sup>118</sup>Juste, 2008 ; <sup>3</sup>Abubakar, 2008 ; <sup>149</sup>Mendoza, 2009 ; <sup>36</sup>Biet, 2011 ; <sup>162</sup>Momotani, 2012).

***Selon le rapport de l'Académie Américaine de Microbiologie, il est clairement démontré que *M. a. paratuberculosis* peut être présent dans certaines formes de la maladie de Crohn (<sup>171</sup>Nacy, 2008). La question aujourd'hui est de déterminer le rôle exact que joue *M. a. paratuberculosis* dans cette pathologie, s'il est présent de façon silencieuse ou en tant qu'opportuniste.***

## Chapitre 2 : *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*

### I. Taxonomie des mycobactéries

Le genre *Mycobacterium* est l'unique genre de la famille des *Mycobacteriaceae* qui appartient à l'ordre des Actinomycetales et à la classe des Schizomycetes. Il existe plus d'une centaine d'espèces dont la plupart sont des saprophytes ou des opportunistes à croissance rapide et d'autres sont des pathogènes importants pour l'homme et l'animal avec une croissance lente comme *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. ulcerans*, *M. abscessus* et *M. a. paratuberculosis* (<sup>94</sup>Gutteriez, 2009) (Figure 10).

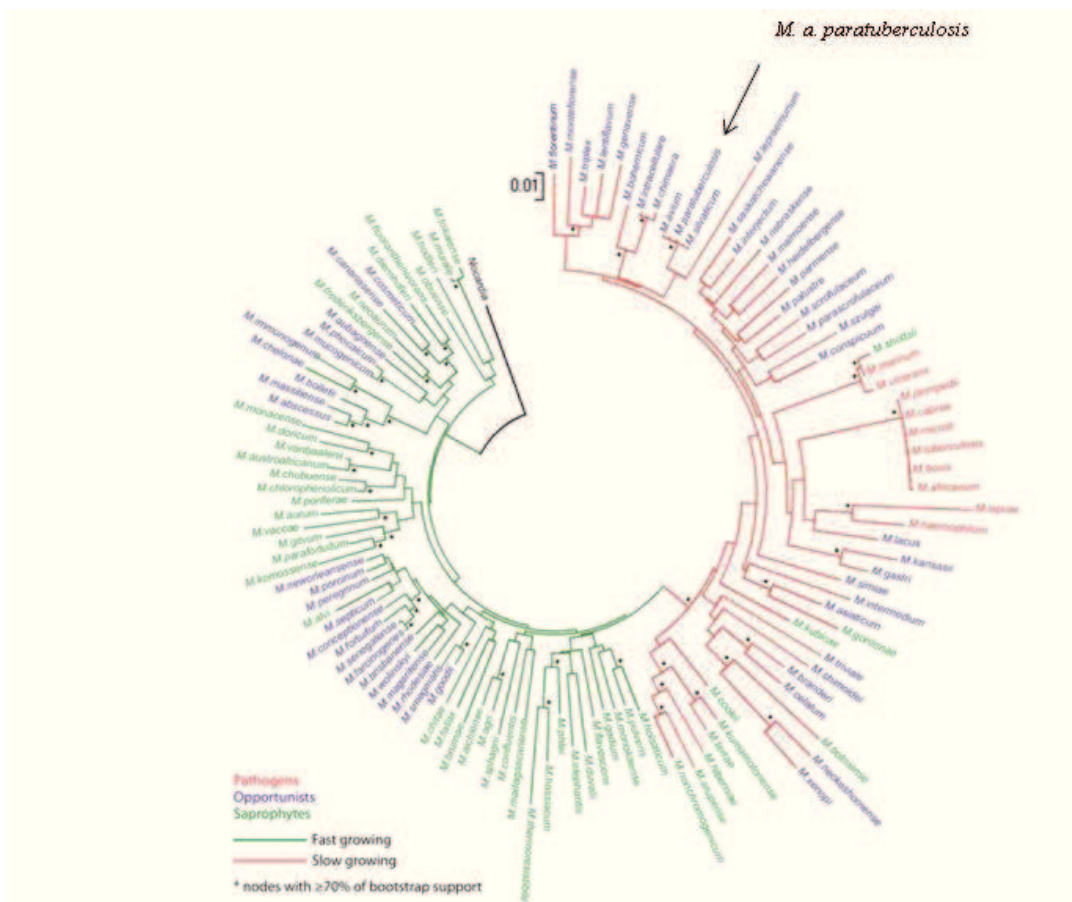


Figure 10 : Arbre phylogénétique de 119 espèces mycobactériennes  
Étude basée sur les gènes de l'ARN 16S, *hsp65* et *rpoB* (D'après <sup>94</sup>Gutteriez, 2009)



Le séquençage des génomes a permis l'évolution des méthodes d'identifications moléculaires définissant les mycobactéries en trois grands groupes génétiquement distincts: i) Le complexe *tuberculosis* qui comprend les mycobactéries responsables de tuberculose chez l'homme et l'animal avec *M. tuberculosis* (ou bacille de Koch), *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis BCG* (souche vaccinale), *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* et *M. microti* ; ii) *M. leprae* (ou bacille de Hansen), responsable de la lèpre chez l'homme ; iii) Les Mycobactéries Non-Tuberculeuses (MNT) ou « *Mycobacteria Other Than Tuberculosis* » (MOTT) qui comprend le complexe *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC) responsable d'infections animales et humaines auquel appartient la sous-espèce *paratuberculosis*.

## II. Caractères morphologiques – physiologiques

La sous-espèce *paratuberculosis* est caractérisée par des petits bâtonnets plus épais et plus trapus que les autres mycobactéries (Figure 11). Ce sont des organismes aérobies/micro-aérophiles, intracellulaires et immobiles. Les mycobactéries sont décrites comme non sporulantes bien que de récents rapports mettent en évidence la présence d'un morphotype semblable à une spore dans une culture de *M. a. paratuberculosis* de plus d'un an (<sup>131</sup>Lamont, 2012) et de BCG (<sup>85</sup>Ghosh, 2009).



Figure 11 : *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*  
 Observation par microscopie électronique de l'agent étiologique de la maladie de Johne:  
 (D'après [Johne's Information Center, University of Wisconsin](#))

### II-1L'enveloppe des mycobactéries

Caractéristique des mycobactéries, l'enveloppe est très épaisse et riche en lipides protégeant les mycobactéries contre l'effet des antibiotiques, des acides et joue un rôle dans la résistance à la phagocytose et dans l'environnement. La coloration de Gram n'est pas utilisable mais les mycobactéries sont considérées comme des bactéries gram + riches en Guanine Cytosine (GC). Ce sont des BAAR et peuvent être visualisés par microscopie grâce à la coloration de

Ziehl-Neelsen qui colore les bacilles en rouge sur un fond bleu car la paroi absorbe la fushine mais ne se décolore ni sous l'action des acides forts, ni sous l'action de l'alcool.

L'enveloppe mycobactérienne est constituée schématiquement de l'intérieur vers l'extérieur, d'une membrane plasmique (4 nm), d'une paroi (8 nm) et d'une capsule (11 nm). La membrane plasmique des mycobactéries est similaire à celle des autres bactéries. Elle est principalement constituée d'une bicouche phospholipidique avec comme l'un des principaux composants le PhosphatidylInositol Mannosylé (PIM). La paroi est constituée de trois parties : le peptidoglycane, l'arabinogalactane estérifié par les acides mycoliques et les « lipides extractibles ». Ces deux dernières molécules peuvent être regroupées sous le nom de membrane externe ou mycomembrane. Le LipoArabinoMannane (LAM) est une molécule de la paroi ancrée dans le peptidoglycane portant à son extrémité une coiffe de mannose chez les mycobactéries pathogènes telles que *M. tuberculosis* ou *M. leprae*, jouant un rôle très important dans la virulence (<sup>124</sup>Kremer, 1999). Les glycolipides représentent 70% des lipides exposés à la surface. Ce sont des molécules spécifiques d'espèces et définies en trois grandes familles: i) Les LipoOligoSaccharides (LOS) présents chez *M. kansasii* et *M. goodii* ; ii) Les GlycoPeptidoLipides (GPL) exprimés à la surface des espèces du MAC, de *M. abscessus* et de *M. chelonae* ; iii) Les Phénoliques GlycoLipides (PGL) retrouvés chez les espèces du complexe *tuberculosis* et de *M. leprae*. La couche la plus externe de l'enveloppe est appelée capsule chez les mycobactéries pathogènes. Chez *M. tuberculosis*, elle est composée de polysaccharides (majoritairement l' $\alpha$ -glucane), de protéines et de peu de lipides (3-8%). La capsule serait impliquée dans la pathogénie des mycobactéries et dans leur résistance aux antibiotiques jouant ainsi le rôle de barrière (<sup>59</sup>Daffé, 1999 ; <sup>210</sup>Sani, 2010) (Figure 12).

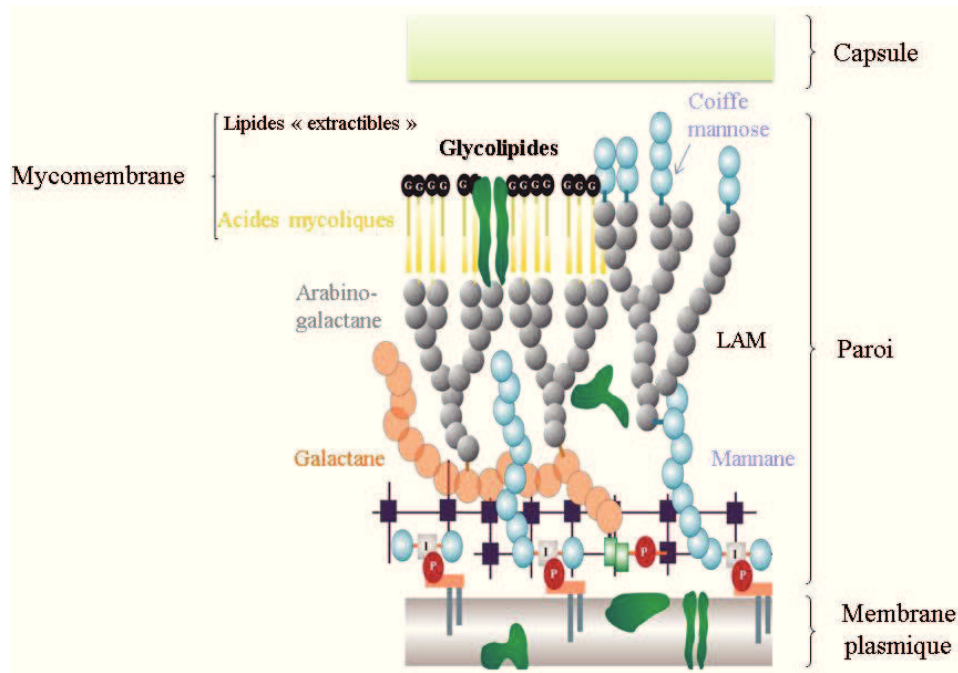


Figure 12 : Représentation schématique de l'architecture de la paroi mycobactérienne (D'après<sup>124</sup>Kremer, 1999).

Ce qui est surprenant chez la sous-espèce *paratuberculosis* c'est qu'elle est la seule sous-espèce du MAC à ne pas exprimer de GPL à sa surface. En effet, il a été démontré par des analyses biochimiques, sur un large panel de souches, que *M. a. paratuberculosis* produit un LipopentaPeptide (L5P). Cette molécule, spécifique de cette sous-espèce, est composée d'une chaîne d'acide gras de 12 à 22 carbones associée à 5 acides aminés. Cette antigène permet de distinguer *M. a. paratuberculosis* des autres espèces du MAC (<sup>73</sup>Eckstein, 2006 ; <sup>35</sup>Biet, 2008).

## II-2 La croissance

Les mycobactéries peuvent être réparties selon leur vitesse de croissance. Il y a celles dites à croissance rapide qui ont un temps de génération allant de 2 à 6 heures laissant apparaître des colonies après 3 à 7 jours d'incubation, c'est le cas de *M. smegmatis*, alors que les mycobactéries à croissance lente ont un temps de génération allant de 20h pour *M. tuberculosis* à ~ 1,5 jour (36 h) pour *M. a. paratuberculosis*, donnant des colonies visibles à l'œil nu à partir de 3 semaines jusqu'à plusieurs mois (<sup>130</sup>Lambrech, 1988). La durée de croissance est plus longue lorsqu'il s'agit d'un isolement à partir de prélèvements. Les colonies de *M. a. paratuberculosis* peuvent apparaître lisses ou rugueuses, de taille variable et parfois pigmentées en jaune-orangé (<sup>245</sup>Stevenson, 2002).

La croissance *in vitro* de *M. a. paratuberculosis* est dépendant d'un sidérophore : la mycobactine J. La plupart des mycobactéries sont capables de produire ce sidérophore par elles-mêmes pour puiser et transporter le fer nécessaire à leur croissance. L'analyse génomique de *M. a. paratuberculosis* a mis en évidence la présence d'un opéron de 10 gènes, homologue à celui de *M. tuberculosis*, impliqué dans la synthèse de la mycobactine. L'un des gènes de l'opéron nommé *mbtA* est plus court que son homologue chez *M. tuberculosis*. Ce gène code pour une protéine tronquée, dans sa partie C-terminale, qui interfère avec la cascade aboutissant à la production du sidérophore (<sup>138</sup>Li, 2005). Cette spécificité a longtemps été utilisée comme un caractère taxonomique pour l'identification de *M. a. paratuberculosis* (<sup>255</sup>Thorel, 1984 ; <sup>256</sup>Thorel 1990).

### III. Quelques caractères génomiques

#### III-1 Le complexe *Mycobacterium avium-intracellulare*

Le complexe *Mycobacterium avium-intracellulare* est un groupe hétérogène qui, comme son nom l'indique, regroupe deux espèces génétiquement distinctes *Mycobacterium avium* et *Mycobacterium intracellulare* (Figure 13). Les membres du MAC sont des pathogènes pour l'homme et l'animal, très présents dans l'environnement et dont le nombre d'infection n'a cessé d'augmenter depuis les années 1980 avec l'émergence du SIDA. L'espèce *M. avium* est divisée en 4 sous-espèces en fonction de leurs caractéristiques génétiques et phénotypiques (<sup>256</sup>Thorel, 1990) : i) *M. a. avium* est responsable de tuberculose aviaire. Cette sous-espèce est un pathogène opportuniste chez l'homme provoquant des infections disséminées, pulmonaires ou des adénopathies chez l'enfant (<sup>265</sup>Turenne, 2007) ; ii) *M. a. silvaticum* est un pathogène animal obligatoire qui partage de nombreuses caractéristiques avec les isolats de *M. a. avium* mais il est responsable d'infections aviaires uniquement chez le pigeon sauvage d'où le nom de « bacille wood-pigeon » ; iii) *M. a. hominissuis* a été proposée afin de différencier les isolats de *M. a. avium* isolés d'oiseaux, de ceux isolés d'homme ou de porc (<sup>159</sup>Mijs, 2002) ; iv) *M. a. paratuberculosis* est responsable d'inflammations intestinales chez les ruminants. La sous-espèce *M. a. paratuberculosis* est la seule sous-espèce à être différenciée en deux types: *M. a. paratuberculosis* de type S (pour « Sheep » ou type I/III) et de type C (pour « Cattle » ou type II) (<sup>264</sup>Turenne, 2008). Plus récemment, 6 nouvelles sous-espèces ont été associées au MAC : *M. chimaera* (<sup>260</sup>Tortoli, 2004), *M. colombiense* (<sup>170</sup>Murcia, 2006), *M. bouchedurhonense*, *M.*

*marseillense*, *M. timonense* (<sup>29</sup>Ben Salah, 2009) et *M. vulneris* (<sup>270</sup>Van Ingen, 2009) qui sont principalement des souches isolées de cas cliniques humains.

### III-2 Polymorphisme et évolution de la sous-espèce *paratuberculosis*

Les premières études qui mettent en évidence du polymorphisme génomique au sein de la sous-espèce *paratuberculosis* sont basées sur la « *Restriction Fragment Length Polymorphism-IS900* » (IS900 RFLP) (<sup>53</sup>Collins, 1990 ; <sup>62</sup>De Lisle, 1992) puis plus récemment sur l'analyse des « *Large Sequence Polymorphism* » (LSP) présents chez *M. a. paratuberculosis* de type C ou S mais ces études ne permettent pas de proposer un schéma sur l'évolution de l'espèce *avium* (<sup>225</sup>Semret, 2006). Une analyse des SNP de *M. avium* et *M. a. paratuberculosis* a montré que la divergence entre ces deux sous-espèces est plus ancienne que celle observée entre *M. a. paratuberculosis* de type S et C mais ne donne aucune indication sur l'évolution de la sous-espèce *M. a. paratuberculosis* (<sup>145</sup>Marsh, 2007).

Le schéma d'évolution proposé pour l'espèce *avium*, basé sur une analyse « *Representational difference analysis* » (RDA), laisse supposer une évolution linéaire de *M. a. hominissuis* vers *M. a. paratuberculosis* de type S évoluant ensuite vers *M. a. paratuberculosis* de type C (<sup>71</sup>Dohmann, 2003). En effet, Dohmann *et al.*, ont mis en évidence la présence de 3 *loci* spécifiques présents chez les souches de *M. a. paratuberculosis* de type S et chez *M. a. avium* 25291 avec 98-99% d'homologie mais absents des souches de *M. a. paratuberculosis* de type C. Les études suivantes sont en contradiction avec cette première hypothèse d'évolution. Une délétion de la région *mmpL* a été mise en évidence par PCR chez les souches de type S alors qu'elle est présente chez les *M. a. paratuberculosis* de type C (<sup>144</sup>Marsh, 2005). Inversement, une analyse génomique par micropuce à ADN a permis d'identifier 3 régions délétées chez les souches de type S et présentes chez les souches de type C suggérant une évolution indépendante et distincte des deux types de *M. a. paratuberculosis* (<sup>142</sup>Marsh, 2005 ; <sup>143</sup>, <sup>144</sup>2006).

Plus récemment deux études ont démontré une évolution distincte entre les souches de *M. a. paratuberculosis* de type C et S. Une étude de 6 gènes de référence (*recF*, *sodA*, *aspB*, *gndI*, *pepB*, and *hsp65*) basée sur du « *MutliLocus Sequencing Analysis* » (MLSA), réalisée sur 56 isolats de *M. avium*, a montré que la sous-espèce *hominissuis* présente beaucoup de

variabilités, dues à des phénomènes de recombinaison, comparée aux groupes de sous-espèces *M. a. avium*/*M. a. sylvaticum* et *M. a. paratuberculosis* qui ont évolués de façon indépendante et clonale (<sup>264</sup>Turenne, 2008). L'analyse phylogénétique sur ces mêmes gènes indique que la sous-espèce *paratuberculosis* est représentée par une branche distincte donnant le type C et le type S. (Figure 13).

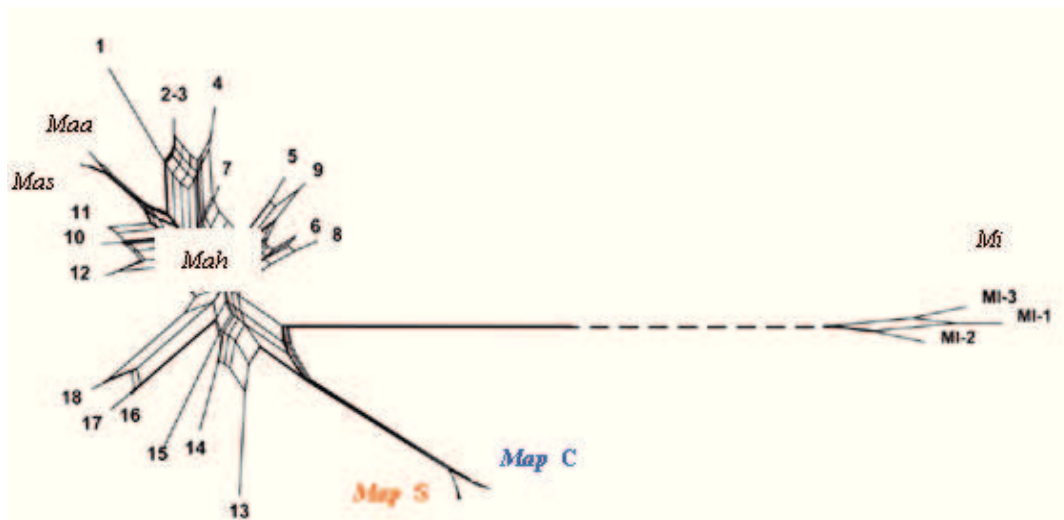


Figure 13 : Arbre phylogénétique de l'espèce *avium*

Etude basée sur 6 gènes de référence en utilisant *M. intracellulare* comme groupe externe. Les chiffres représentent les différentes souches de *Mah* (D'après <sup>264</sup>Turenne, 2008).

Pour mieux comprendre l'évolution de l'espèce *avium*, la présence ou l'absence de 25 LSP a été réalisée sur un large panel de souches. Cette analyse a révélé que certaines séquences sont spécifiques à la sous-espèce *paratuberculosis* et confirme l'existence de deux génovars C et S majeurs émergents de l'ancêtre commun *M. a. hominissuis*. De plus, le génovar *M. a. paratuberculosis* type S semble se différencier en deux souches nommées 85/14 et LN20 (<sup>6</sup>Alexander, 2009) (Figure 14A). Ces deux génovars de *M. a. paratuberculosis* ont une spécificité d'hôte qui n'est pas exclusive mais très préférentielle, à savoir les souches de type C (type II) sont majoritairement isolées de bovins et les souches de type S (type I/III) isolées d'ovins.

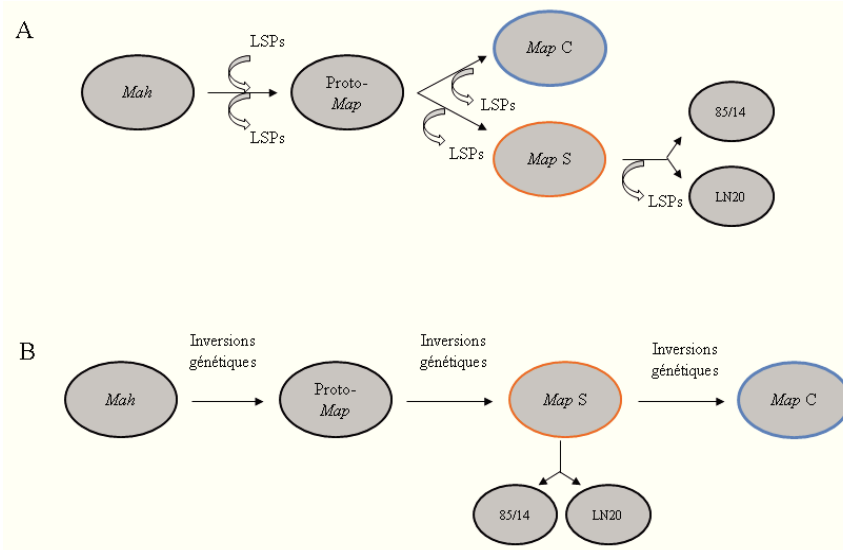


Figure 14 : Représentation schématique des hypothèses d'évolution de l'espèce *avium*  
 A) Evolution biphasique ou B) linéaire de la sous-espèce *paratuberculosis*.

Récemment, l'évolution de l'espèce *avium* a été étudiée par comparaison génomique grâce aux génomes séquencés disponibles : *M. a. paratuberculosis* K-10 (<sup>138</sup>Li, 2005), *M. a. hominissuis* 104 (<sup>293</sup>Wu, 2006) et plus récemment *M. a. paratuberculosis* 397 de type S (<sup>19</sup>Bannantine, 2012). L'étude de Bannantine *et al.*, basée sur la méthode d'étude de la synténie (groupe de gènes dont le voisinage et l'organisation est conservée sur plusieurs génomes) suggère que *M. a. paratuberculosis* est la dernière sous-espèce à avoir divergé. Les données montrent un élément d'inversion entre *M. a. hominissuis* et *M. a. paratuberculosis* type S puis un deuxième événement entre *M. a. paratuberculosis* de type S et C suggèrent une évolution linéaire. (Figure 14B) (<sup>19</sup>Bannantine, 2012). Lorsque le génome de *M. intracellulare* est ajouté dans l'étude de synténie, les données montrent une forte conservation génomique avec *M. a. hominissuis*, ce qui questionne sur l'ancêtre commun de l'espèce *avium*. Cependant, les études phylogénétiques et polymorphiques réalisées sur un grand nombre de souches et sur des gènes de référence conservés montrent bien que l'espèce *intracellulare* est très éloignée de l'espèce *avium*. C'est pourquoi l'hypothèse que dans l'évolution de l'espèce *avium* *M. intracellulare* est l'ancêtre reste discutable et a été abordée uniquement par cette méthodologie.

**Les nombreuses études menées pour comprendre l'évolution de l'espèce *avium* montrent que *M. a. paratuberculosis* de type C est la dernière sous-espèce à avoir divergé. L'ancêtre commun semble être le groupe hétérogène de *M. a. hominissuis*. Cependant, nous ne**

---

*connaissons pas le schéma d'évolution précis. La sous-espèce paratuberculosis de type C émerge-t-elle de M. a. paratuberculosis de type S ou a-t-elle évolué de façon indépendante ?*

### III-3 Génotypage de la sous-espèce *paratuberculosis*

Comme pour *M. tuberculosis*, l'identification et le typage des souches de *M. a. paratuberculosis* par les techniques de bactériologie conventionnelle ne sont pas adaptées compte tenu de la croissance très lente de ces bactéries. Les techniques de typage moléculaire, outils indispensables pour l'épidémiologie et le contrôle de la paratuberculose, se sont rapidement développés grâce au séquençage du génome la souche K-10 (<sup>138</sup>Li, 2005).

Depuis les années 90, la technique de référence pour le typage des souches de *M. a. paratuberculosis* était l'IS900 RFLP. Cette technique utilise la séquence d'insertion IS900 spécifique de *M. a. paratuberculosis* comme sonde, pour hybrider avec les fragments d'ADN issus de la RFLP. Cette technique bien que très utilisée est peu discriminante, peu sensible et nécessite une grande quantité d'ADN très difficile à obtenir avec *M. a. paratuberculosis*. Une autre technique également très gourmande en ADN mais qui peut être assez discriminante est la « *Pulsed Field Gel Electrophoresis* » (PFGE) (<sup>51</sup>Coffin, 1992 ; <sup>235</sup>Singh, 1999 ; <sup>227</sup>Sevilla, 2007).

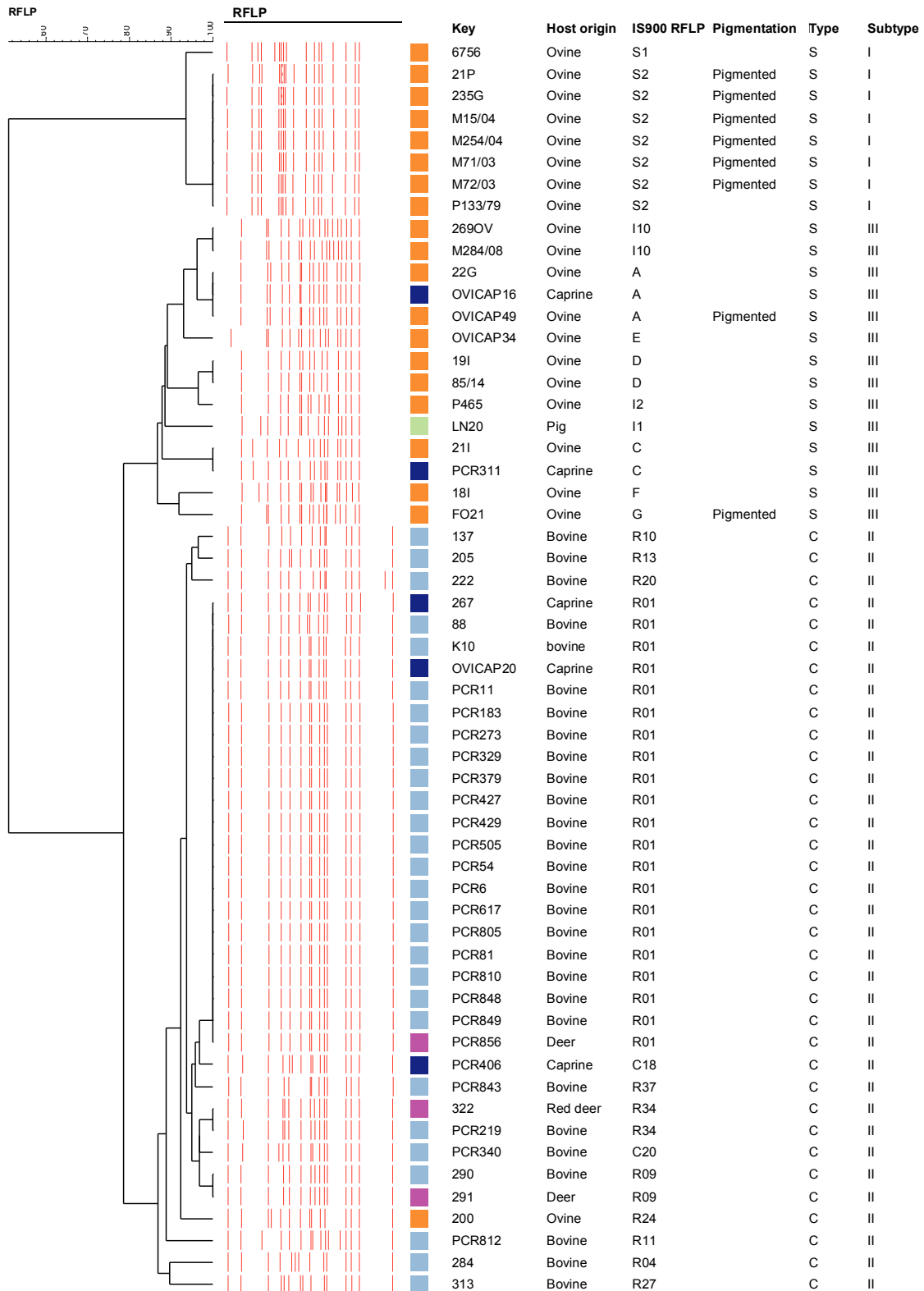
Les techniques de typage basées sur la PCR, beaucoup plus sensible et pratique pour *M. a. paratuberculosis*, s'imposent aujourd'hui pour le génotypage des souches. Parmi ces techniques certaines comme le typage MIRU-VNTR (<sup>253</sup>Thibault, 2007) utilise les minisatellites, séquences de 14 à 500 pb répétées en tandem variant d'une souche à l'autre, comprenant les « *Variable Number Tandem Repeat* » (VNTR) mais aussi les « *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units* » (MIRU). D'autres techniques utilisent la variation des microsatellites, di ou tri nucléotide, typage « *Simple Sequence Repeats* » (SSR) (<sup>8</sup>Amonsin, 2004) ou bien encore l'analyse des « *Single Nucleotide Polymorphism* » (SNP), variations d'un nucléotide à une position spécifique.

Bien que la plupart des techniques peuvent discriminer les souches selon les types S et C (Biet *et al.*, BMC révision) certaines se sont spécialisées pour ce typage comme la technique basée



sur l'amplification de séquence LSP (<sup>225</sup>Semret, 2006). Pour connaître le type (S versus C) et sous type (I, II ou III) Castellanos *et al.* ont développé une PCR suivi d'un séquençage ciblant des SNP chez deux gènes utilisés comme marqueurs phylogénétiques chez les mycobactéries : *gyrA* et *gyrB* (<sup>43</sup>Castelanos, 2007).

A



B

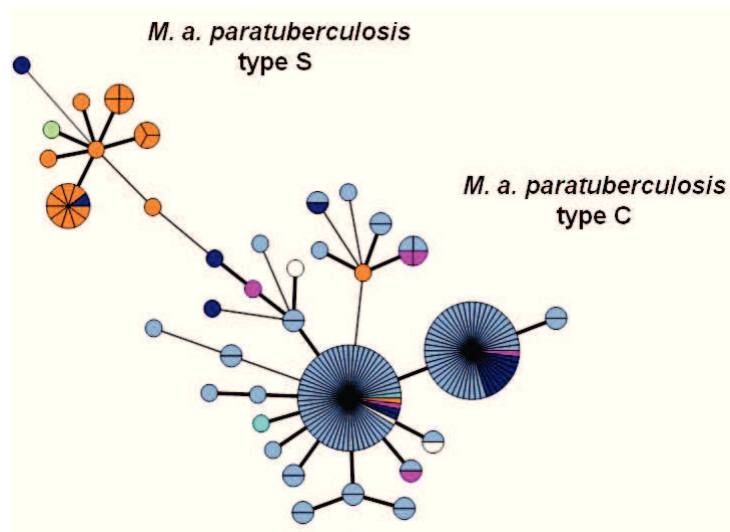


Figure 15 : Génotypage de *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*  
 A) Dendrogramme réalisé par la méthode IS 900-RFLP et B) Représentation de l'analyse des MIRU-VNTR analysé par Bionumerics® (D'après Biet *et al.*, données en cours de publication dans BMC Microbiology).

#### IV. Caractères phénotypiques distinctifs

En dehors des différences génotypiques observées entre les souches de *M. a. paratuberculosis* de type C et de type S, quelques différences phénotypiques ont été démontrées. La différence majeure entre les souches ovines et bovines concerne leur culture. La croissance des souches de type S est plus fastidieuse, plus lente et plus exigeante que celle des souches de type C (<sup>284</sup>Whittington, 2011). Stevenson *et al.*, ont étudié la diversité de souches pigmentées et non pigmentées par différentes méthodes de génotypage. Il s'avère que les colonies pigmentées avec une couleur jaune-orangée sont des souches ovines de type I (<sup>245</sup>Stevenson, 2002). Récemment, deux souches pigmentées de *M. a. paratuberculosis* ont été génotypées, indiquant que ce sont des souches ovines de type III. Le phénotype de pigmentation n'est donc pas restreint au type I mais peut être étendu au type III tandis que les colonies de souches bovines (type II) sont plutôt blanchâtres (Biet *et al.*, soumis à BMC Microbiol, 2012).

Des études de protéomique réalisées à partir de souches de type C et de type S ont montré que le manque de nutriments est létal, après 12 semaines, pour les souches de type S alors qu'un effet bactériostatique est observé pour les souches de type C (<sup>92</sup>Gumber, 2009). Une

résistance plus accrue à des variations de chaleur a été mise en évidence pour des souches de type C (<sup>93</sup>Gumber, 2009). De plus, une analyse transcriptomique et protéomique a démontré qu'en présence de fortes concentrations de fer dans le milieu de culture, les souches de type C sont capables d'augmenter la régulation des gènes de stockage et de régulation du fer contrairement aux souches de type S qui semblent avoir un mécanisme de stockage du fer défaillant (<sup>114</sup>Janagama, 2010). Enfin, la production de cytokines induites par les souches de type C et S après stimulation des macrophages humains et bovins montrent une réponse plutôt anti-inflammatoire pour les souches de type C alors que les souches de type S induisent une réponse pro-inflammatoire semblable à celle générée par des isolats de *M. a. avium* (<sup>113</sup>Janagama, 2006 ; <sup>166</sup>Motiwala, 2006 ; <sup>38</sup>Borrmann, 2011).

***En plus des éléments génotypiques, des différences phénotypiques entre les souches de M. a. paratuberculosis de type C ou de type S sont observées au niveau de la croissance, du métabolisme du fer ou lors de l'induction de cytokines.***

---

## Chapitre 3 : Interactions hôte - mycobactéries

### I. Du côté de la cellule

#### I-1 Interactions avec les cellules phagocytaires

Les mycobactéries sont des organismes intracellulaires. Après pénétration dans l'organisme, les bacilles vont traverser la première barrière de défense de l'hôte, les muqueuses (pulmonaire ou intestinale), puis ils vont être pris en charge par les cellules de l'immunité innée : les macrophages. Chez *M. tuberculosis*, les macrophages alvéolaires jouent d'une part le rôle de niche pour les bacilles et d'autre part le rôle de CPAg. En effet, les peptides mycobactériens digérés par les cellules phagocytaires vont être présentés aux LT afin d'orienter leur différenciation. Les cellules dendritiques sont également des CPAg mais leur rôle dans la capture directe des mycobactéries n'a pas été démontré. La majorité des études répertoriées sont réalisées sur des macrophages et montrent qu'une multitude de mécanismes sont disponibles pour favoriser l'entrée du bacille dans la cellule phagocytaire. Les récepteurs impliqués dans la reconnaissance des mycobactéries appartiennent à différentes familles qui reconnaissent différents ligands mycobactériens.

La famille des « *Toll Like Receptors* » (TLRs) reconnaît des motifs moléculaires spécifiques appelés « *Pathogen-Associated Molecular Pattern* » (PAMPs) présents à la surface des bactéries induisant des signaux cellulaires inflammatoires (<sup>192</sup>Quesniaux, 2004). Les TLRs les plus décrits chez *M. tuberculosis* sont les TLR2 et TLR9 (<sup>201</sup>Reiling, 2002 ; <sup>246</sup>Sugawara, 2003 ; <sup>15</sup>Bafica, 2005). Les TLR1, TLR6 et TLR4 sont décrits chez *M. a. paratuberculosis* comme impliqués dans la susceptibilité des animaux à la paratuberculose via la présence de mutations ou de surexpressions de ces TLRs dans l'intestin (<sup>251</sup>Taylor, 2008 ; <sup>167</sup>Mucha, 2009 ; <sup>190</sup>Plain, 2010). Le récepteur CD14 est décrit comme le cofacteur du TLR4. Il peut être retrouvé sous forme soluble dans le milieu extérieur ou sous forme membranaire associé au TLR4. Après interaction avec ces ligands tels que les PIMs et le LAM des mycobactéries, il va se lier au TLR4 qui est le seul à pouvoir induire des signaux cellulaires par l'intermédiaire de son domaine transmembranaire (<sup>9</sup>Anas, 2010 ; <sup>54</sup>Court, 2011).

Les récepteurs « *Scavenger* » sont une grande famille capable de reconnaître, entre autres, des lipoprotéines modifiées (acétylées ou oxydées) de faible densité (LDL) (<sup>169</sup> Mukhopadhyay, 2004). Chez les mycobactéries le(s) ligand(s) des récepteurs « *Scavenger* » n'ont pas été mis en évidence de façon précise mais le rôle de ces récepteurs dans l'adhésion de *M. tuberculosis* a été clairement établi *in vitro* et *in vivo* (<sup>298</sup>Zimmerli, 1996 ; <sup>226</sup>Sever-Chronoes, 2011).

Le système du complément est un des processus majeurs dans la capture des mycobactéries par un phénomène d'opsonisation, mené par plusieurs mécanismes indépendants, il va favoriser la phagocytose de l'agent pathogène. L'activation de la voie classique du complément se fait par la reconnaissance d'un complexe mycobactérie/anticorps. Ce complexe peut également être reconnu directement par les récepteurs Fc présents sur les cellules qui reconnaissent la partie Fc des immunoglobulines. Des molécules mycobactériennes telles que les ManLAM ou la « *Heparin Binding HemAgglutinin* » (HBHA) sont capables de se lier au C3, composant clef de la cascade, pour induire la phagocytose par la voie alterne du complément (<sup>215</sup>Schlesinger, 1990 ; <sup>99</sup>Hirsch, 1994 ; <sup>216</sup>Schorey, 1997 ; <sup>168</sup>Mueller-Ortiz 2001). De plus, la « *Mannose Binding Lectin* » (MBL) qui joue le rôle d'opsonine va se lier au ManLAM des mycobactéries pour ensuite activer la voie du complément par la voie des lectines (<sup>84</sup>Garred, 1997).

La famille des C-lectines reconnaît les sucres portés par les mycobactéries tels que le ManLAM, le LipoMannane (LM), les glycolipides ou encore la « *Fibronectin Attachment Protein* » (FAP). Parmi ces récepteurs on retrouve les Récepteurs au Mannose (MR) (<sup>214</sup>Schlesinger, 1993 ; <sup>239</sup>Souza, 2007), les « *Dendritic Cell Specific Intercellular adhesion molecule 3 Grabbing non integrin* » (DC-SIGN) (<sup>250</sup>Tanne, 2010), les « *Macrophage inducible C-type lectin* » (Mincle) (<sup>111</sup>Ishikawa, 2009) ou encore les « *Surfactant Proteins* » (Sp) présentes au niveau pulmonaire (<sup>194</sup>Ragas, 2007).

Les mycobactéries ont développé plusieurs stratégies pour faciliter leur internalisation par les cellules phagocytaires en particulier les macrophages, dans lesquels elles sont capables de survivre et de se multiplier. Les molécules impliquées sont présentes au niveau de l'enveloppe, on y trouve les lipoglycanes (PIMs, LAM, LM et ManLAM) et les lipides complexes (GPL, LOS et PGL) qui sont des ligands pour les récepteurs cellulaires (Figure 16).

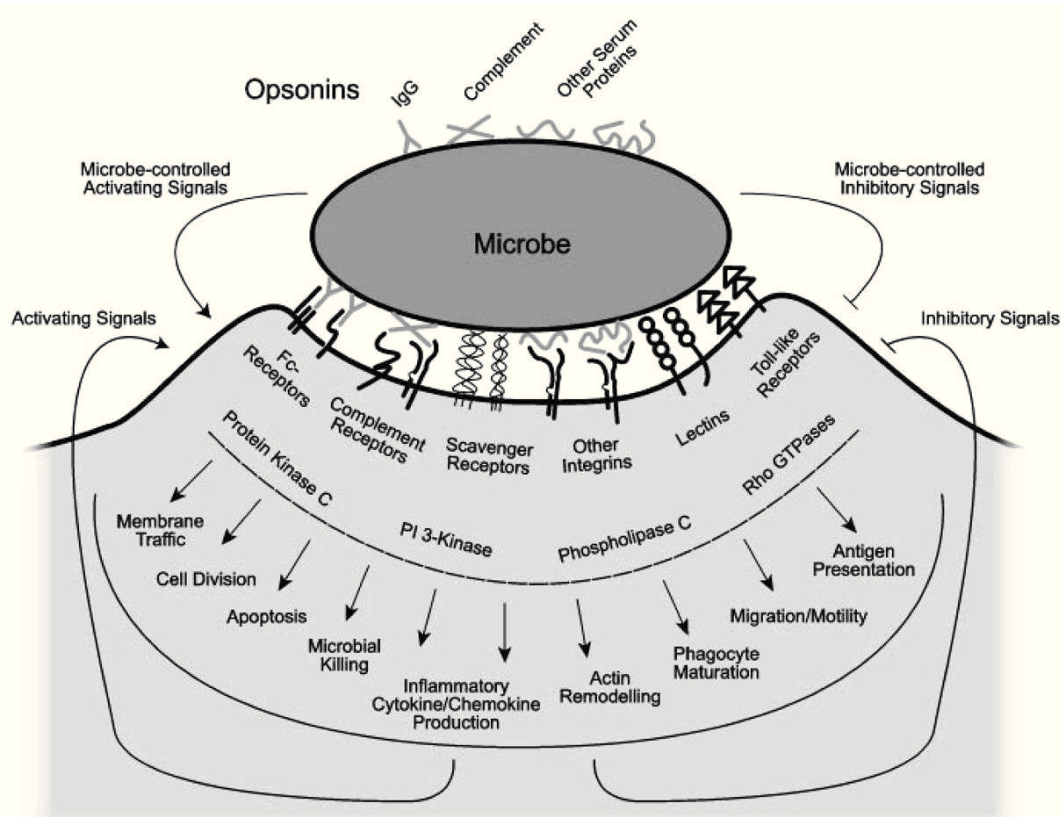


Figure 16 : Récepteurs des cellules phagocytaires impliqués dans l'adhésion des mycobactéries (D'après <sup>268</sup>Underhill, 1999)

## I-2 Interactions avec les cellules épithéliales

En dehors de l'interaction avec les macrophages, les mycobactéries ont développé un arsenal de molécules pour pouvoir interagir également avec les cellules épithéliales.

La matrice extracellulaire (ME) des eucaryotes est un réseau très complexe de macromolécules dans lequel peuvent migrer et adhérer les cellules pour interagir entre elles. Plusieurs rôles importants dans la physiologie cellulaire lui sont attribués comme l'embryogénèse, le contrôle de la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire et la consolidation des tissus (<sup>110</sup>Isberg, 1994). Les éléments qui constituent cet environnement extracellulaire sont des protéines, des glycoprotéines et des polysaccharides. L'ensemble des protéines est représenté par des fibres élastiques et des fibres de collagène qui jouent un rôle dans le maintien et l'intégrité du réseau mais aussi par l'intermédiaire des molécules d'adhérence telles que la fibronectine (FN) et la laminine (Lm) qui assurent la cohésion intercellulaire ou cellules-ME. Les polysaccharides sont essentiellement représentés par des

GlycosAminoGlycanes (GAGs) ou des ProteoGlycanes (PGs) (<sup>33</sup>Bernfield, 1999). Les intégrines font partie d'une grande famille de récepteurs présents à la surface de tous les types cellulaires avec deux rôles majeurs, l'attachement de la cellule à la ME et la transduction de signaux de la ME vers la cellule.

La composition de la matrice extracellulaire est impliquée dans le tropisme cellulaire des mycobactéries par la présence de récepteurs spécifiques exprimés à la surface des cellules (<sup>141</sup>Maridonneau-Parini, 2001) qui varient d'un organe à un autre mais également d'une espèce animale à une autre (<sup>140</sup>Maccarana, 1996 ; <sup>211</sup>Sasisekharan, 2002). En effet, les mycobactéries pathogènes pour l'homme et l'animal telles que *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. ulcerans* et *M. a. paratuberculosis* présentent toutes des sites d'infections spécifiques. *M. tuberculosis* induit une infection pulmonaire, *M. leprae* a une préférence pour le système nerveux périphérique, *M. ulcerans* est localisée au niveau de la peau et *M. a. paratuberculosis* cible les cellules intestinales. Chaque cellule possède une lame basale (Lb) ou membrane basale qui se situe à la base des épithéliums ou autour de certaines cellules spécifiques (cellules endothéliales, adipocytes, cellules musculaires et cellules de Schwann). Les molécules constitutives de la Lb telles que la Lm, les GAGs, les PGs, le collagène de type IV et d'autres glycoprotéines sont sécrétées par les cellules épithéliales. La Lb permet l'adhérence de la cellule épithéliale au tissu conjonctif sous-jacent et constitue une interface qui sert de filtre pour la diffusion des nutriments, la polarité et la différenciation cellulaire.

## I-2-1 Les molécules d'adhérence

### I-2-1-1 La fibronectine

La FN est un dimère constitué de deux sous-unités identiques réunies par des ponts disulfures à leur extrémité C-terminale, composées de trois types de modules qui se répètent (Type I, II et III). La liaison aux cellules via les intégrines permet de linéariser la molécule de FN qui peut ainsi s'associer avec ses homologues ou d'autres composés comme les PGs (héparane et chondroïtine sulfate), tous les types de collagène ainsi qu'à la fibrine. La séquence d'aa arginine-glycine-acide aspartique (RGD) permet à la FN de se lier aux intégrines pour interagir avec la cellule (<sup>173</sup>Naito, 2000 ; <sup>79</sup>Faralli, 2009).



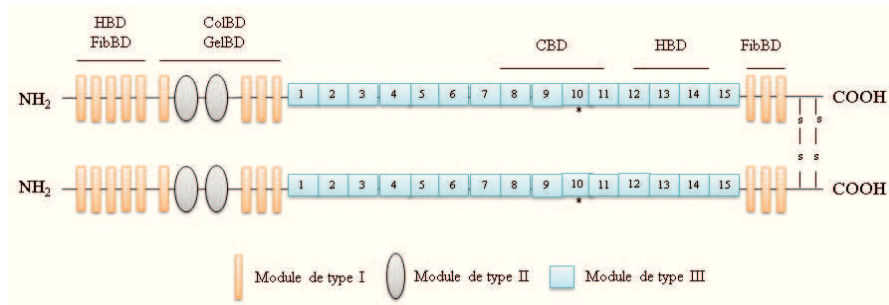


Figure 17 : Représentation schématique de la fibronectine  
 FibBD – Fibrin Binding Domain ; HBD – Heparin Binding Domain; CBD – Cell Binding Domain; ColBD – Collagen Binding Domain; GBD – Gelatin Binding Domain; \* RGD sequence

### I-2-1-2 La laminine

La Lm est une molécule hétérotrimérique, en forme de croix, composée de chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  reliées entre elles par des ponts disulfures. Chez l'homme et la souris, 16 isoformes ont été identifiées grâce aux différentes combinaisons et à l'assemblage de 5 chaînes  $\alpha$ , 4 chaînes  $\beta$  et 3 chaînes  $\gamma$ . La partie C-terminale de la chaîne  $\alpha$  contient un domaine globulaire appelé domaine G divisé en 5 domaines impliqués dans le maintien de la structure de cette molécule. La Lm présente des motifs de liaison au collagène IV, aux PGs (Héparane Sulfate) et à la cellule via les intégrines (séquence RGD). Les chaînes les plus répandues au niveau de l'épithélium sont les chaînes  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$  et  $\gamma 1$ . La distribution de certaines isoformes est spécifique au tissu. Par exemple, les chaînes  $\alpha 2$  et  $\beta 2$  sont majoritairement exposées à la surface des cellules de Schwann alors que la chaîne  $\alpha 4$  est présente dans la Lb des vaisseaux sanguins (<sup>263</sup>Tunggal, 2000 ; <sup>267</sup>Tzu, 2008 ; <sup>96</sup>Hamill, 2009). (Figure 18)

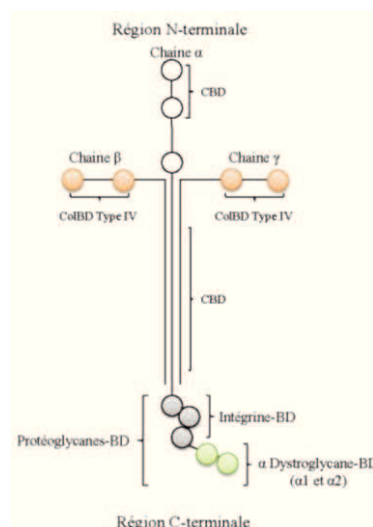


Figure 18 : Structure moléculaire de la laminine  
 CBD – Cell Binding Domain; ColBD – Collagen Binding Domain; BD – Binding Domain.

### I-2-1-3 Le collagène

Le collagène est défini comme une molécule de structure qui renforce la peau, les tendons et les organes internes. A ce jour, 15 isotypes ont été identifiés et on les retrouve sous forme de fibrille avec, pour chacun, une combinaison unique de 3 chaînes  $\alpha$  enroulées les unes aux autres. C'est la protéine la plus abondante dans l'organisme qui se répartit de façon spécifique selon les types cellulaires. L'interaction cellule-ME se fait via l'intégrine  $\alpha 2 \beta 1$  présente sur les cellules qui reconnaissent la séquence GXXGER présente sur la chaîne  $\alpha 2$  du collagène (<sup>76</sup>Emsley, 2000).

### I-2-2 Les intégrines

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires présents en abondance à la surface des cellules. Ce sont des hétérodimères composés d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$ . A ce jour, 24 intégrines différentes ont été décrites formées par 18 chaînes  $\alpha$  et 8 chaînes  $\beta$  différentes. La sous-unité  $\alpha$  détermine la spécificité de liaison avec les ligands alors que la sous-unité  $\beta$  est impliquée dans de multiples voies de signalisation. La famille des intégrines peut être représentée en 4 grands groupes en fonction des ligands reconnus : les « *collagen receptors* », les « *laminin receptors* », les « *leukocyte-specific receptors* » et les « *RGD receptors* » capables donc de médier l'interaction cellule-cellule et cellule-ME. L'expression des intégrines est ubiquitaire mais leur distribution est variable selon le type cellulaire. Par exemple l'intégrine  $\alpha V \beta 3$  est présente sur l'endothélium et les chaînes  $\alpha 6$  et  $\alpha 3$  sont exprimées à la surface des cellules épithéliales (<sup>108</sup>Hynes, 2002 ; <sup>247</sup>Takada, 2007 ; <sup>20</sup>Barczyk, 2010) (Figure 19).

### I-2-3 Les glycosaminoglycanes

Les GAGs sont des polymères, non ramifiés, composés de répétitions de 70 à 200 motifs disaccharidiques sulfatés. Durant leur biosynthèse dans l'appareil de Golgi, les sucres aminés (glucosamine ou galactosamine) sont N-sulfatés, O-sulfatés ou N-acétylés et les acides hyaluroniques (acide glucuronique ou acide iduronique) ou le galactose subissent l'épimérisation, donnant de nombreuses variétés de séquence. Selon leurs modifications de structure, on peut classer les GAGs en 6 membres : l'héparine, les Héparanes Sulfates (HS), les Chondroitines Sulfates (CS), les Kératanes Sulfates (KS), les Dermatanes Sulfates (DS) et l'acide hyaluronique.

L'héparine est retrouvée dans les granules des mastocytes alors que les HS sont exprimées par la majorité des cellules. L'héparine est la plus sulfatée des GAGs (environ  $\geq 2,4$  groupes sulfates par unité de disaccharide alors que les HS seulement 0,8 à 1,4 groupe sulfate par unité de disaccharide) apportant donc à la molécule une densité de charge négative importante. De plus, les modifications présentes sur l'héparine sont plus importantes que celles des HS : 80% des résidus glycosamine sont N-sulphatés contre 60% sur les HS ce qui apporte une charge négative plus importante pour l'héparine. Le degré d'acide iduronique et de O-sulfatation est plus varié dans les molécules d'héparine (<sup>33</sup>Bernfield, 1999 ; <sup>211</sup>Sasisekharan, 2000 ; <sup>193</sup>Rabenstein, 2002). Pour toutes ces raisons, l'héparine est utilisée dans les études *in vitro* pour représenter la famille des GAGs.

L'acide hyaluronique est le seul GAG à être ni sulfaté ni lié de façon covalente à un core protéique.

#### I-2-4 Les protéoglycanes

Un ou plusieurs GAGs peuvent être rattachés de façon covalente à un core protéique devenant des protéoglycanes (PGs) regroupés sous le terme d'Héparane Sulfate ProteoGlycane (HSPG) et formant trois familles majeures exprimées sur les cellules épithéliales (<sup>205</sup>Rostand, 1997 ; <sup>280</sup>Wadstrom, 1999 ; <sup>151</sup>Menozzi, 2002 ; <sup>77</sup>Esko, 2009) (Figure 19).

i) La famille des syndecanes est composée de 4 membres exprimés de manière spécifique à un tissu. Ce sont des récepteurs transmembranaires capables de transmettre un signal du milieu extracellulaire vers le cytosquelette. Les GAGs accrochés de façon covalente au core protéique sont représentés par des HS et des CS ; ii) La famille des glypicanes, avec 6 membres, sont composées d'une molécule de glycosylphosphatidylinositol (GIP) qui sert à l'ancrage de la glycoprotéine dans la membrane. Contrairement aux syndecanes, les glypicanes n'ont pas de domaine transmembranaire et sont incapables de transmettre un signal intracellulaire. De plus, ils portent sur leur core protéique uniquement des HS comme GAGs (<sup>276</sup>Veugelers, 1999) ; iii) Le CD44 est un récepteur transmembranaire qui est exprimé sur les leucocytes et autres types cellulaires. Il peut avoir deux fonctions différentes selon la forme d'épissage qu'il subit : certaines formes de CD44 peuvent porter des GAGs telles que des HS ou des CS alors que d'autres formes sont des récepteurs à l'acide hyaluronique (<sup>125</sup>Kugelman, 1992 ; <sup>160</sup>Milstone, 1994) (Figure 19).

## I-2-5 Le dystroglycane

Le récepteur dystroglycane est transcrit par un ARN polycistronique donnant deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  liées de façon non covalente sous sa forme mature. La sous-unité  $\beta$  est transmembranaire, raccrochée d'une part au cytosquelette d'actine et d'autre part à la sous-unité  $\alpha$  qui est uniquement extracellulaire et impliquée dans l'interaction avec la ME. C'est un récepteur très fortement exprimé au niveau de la Lb de la plupart des cellules épithéliales, des muscles et du système nerveux (<sup>21</sup>Barresi, 2006 ; <sup>109</sup>Ibraghimov-Beskrovnaya, 1993). La protéine mature possède une partie centrale très glycosylée (<sup>39</sup>Brancassio, 1995) indispensable à l'interaction avec les ligands (<sup>155</sup>Michele, 2002) (Figure 19).

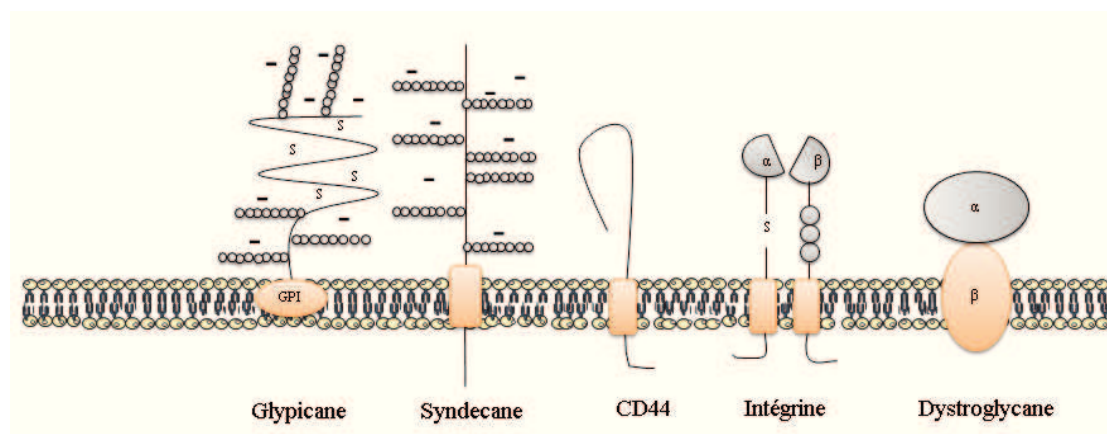


Figure 19 : Récepteurs des cellules épithéliales impliqués dans l'adhésion des mycobactéries

Les molécules d'adhérence, les intégrines et les PGs sont des récepteurs exprimés de façon spécifique à la surface des cellules ou présents dans la ME. Ils ont des rôles importants dans le développement cellulaire, la tumorigénèse, la fixation de facteurs de croissance ou encore dans le métabolisme (<sup>33</sup>Bernfield, 1999 ; <sup>247</sup>Takada, 2007 ; <sup>267</sup>Tzu, 2008 ; <sup>79</sup>Faralli, 2009).

***Les microorganismes (bactéries, virus ou parasites) utilisent toutes les molécules décrites précédemment comme récepteurs pour envahir et coloniser leur hôte.***

## II. Du côté de la bactérie – Adhésines mycobactériennes majeures

Chez les mycobactéries, peu de facteurs de virulence ont été décrits. Parmi eux, les adhésines, molécules sécrétées ou exprimées à la surface de la bactérie sont capables de médier l'interaction entre un pathogène et son hôte par la fixation des composants de la ME ou via les récepteurs cellulaires.

### II-1 « Major Membrane Protein »

#### II-1-1 Découverte et localisation

L'isolement des antigènes de surface de *M. leprae* a permis d'identifier deux protéines majeures de surface. Parmi elles, la MMP I (Major Membrane Protein) avec un poids moléculaire de 35 kDa qui est retrouvée sous forme de multimères (<sup>106</sup>Hunter, 1990). La caractérisation moléculaire de la protéine de 35 kDa a mis en évidence un cadre ouvert de lecture codant pour une protéine de 307 aa qui ne présente pas de signal d'exportation dans sa partie N-terminale et possède un domaine hydrophobe entre les résidus 284 et 300 aa de la partie C-terminale (Figure 20).

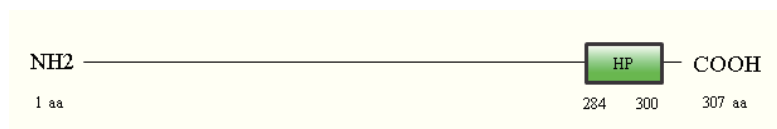


Figure 20 : Caractérisation moléculaire de la MMP de *M. leprae*  
HP – Hydrophobic segment.

La présence de cette protéine a été recherchée chez d'autres espèces mycobactériennes par PCR, hybridation de l'ADN génomique et immunoblot. Les résultats indiquent que la MMP de 35 kDa est présente chez *M. smegmatis* et *M. a. paratuberculosis* mais absente de *M. intracellulare*, *M. tuberculosis*, *M. bovis* et d'autres espèces (<sup>262</sup>Triccas, 1998 ; <sup>16</sup>Banasure, 2001). Grâce à la production d'anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine de 35 kDa de *M. a. paratuberculosis*, la MMP de *M. intracellulare* a été mise en évidence. De plus, ces anticorps monoclonaux sont capables de détecter les bacilles de *M. a. paratuberculosis*, par fluorescence, après infection *in vitro* de macrophages (BoMac) (<sup>18</sup>Bannantime, 2007). Il

semble que la protéine de 35 kDa soit majoritairement présente dans la fraction membranaire malgré la présence minime de bandes observées dans les fractions cytosoliques de *M. a. paratuberculosis* par immunoblot et microscopie électronique (<sup>17</sup>Bannantine, 2003 ; <sup>18</sup>Bannantine, 2007).

#### II-1-2 Invasion cellulaire

*M. a. paratuberculosis* a un tropisme intestinal. La transcription et l'expression de la MMP ont été analysées dans des conditions mimant l'intestin. Les résultats montrent que dans des conditions d'oxygène faible ou de forte osmolarité, la transcription du gène *mmp* ainsi que la production de la MMP sont augmentées. En revanche, la transcription du gène *mmp* est nulle dans des conditions de pH acide. De plus, Bannantine *et al.*, ont montré que *M. a. paratuberculosis* est capable d'envahir les cellules épithéliales (MDBK). Cette invasion est réduite, de manière dose dépendante, après pré-incubation des bactéries avec des anticorps spécifiques de la MMP (test d'inhibition) ou en présence de protéines MMP purifiées (test de compétition). Ces résultats révèlent que la MMP intervient dans l'adhésion et l'invasion de *M. a. paratuberculosis* mais aucun récepteur cellulaire n'a été mis en évidence jusqu'à présent.

La capacité d'invasion de *M. a. paratuberculosis* a été testée après incubation de la bactérie en présence ou à faible concentration d'oxygène. Puis, les mêmes tests d'inhibition et de compétition ont été répétés. La préincubation avec de l'oxygène engendre une diminution de l'invasion de 30% alors qu'avec une concentration en oxygène faible, la réduction de l'invasion est de 60%. Ces résultats s'expliquent par la surexpression de la MMP en présence de faible concentration d'oxygène. (<sup>17</sup>Bannantine, 2003). Les résultats obtenus dans cette étude sont similaires à ceux publiés par Bermudez *et al.*, sur l'effet des conditions environnementales sur l'entrée de *M. avium* dans les cellules épithéliales intestinales (HT-29) (<sup>31</sup>Bermudez, 1997).

***La MMP est une protéine exprimée à la surface de nombreuses mycobactéries mais absente des espèces du complexe tuberculosis. L'implication de la MMP dans l'invasion des cellules épithéliales, dans des conditions mimant l'intestin, montre que cette protéine est importante dans la pathogénèse de M. a. paratuberculosis.***

### II-1-3 Propriété antigénique

L'antigène MMP de *M. leprae* (MMP-L) est reconnu dans 90% des cas de lèpre (<sup>146</sup>Martin, 2001). Les anticorps de patients avec une lèpre déclarée reconnaissent la MMP-L, contrairement aux patients sains ou atteints de la tuberculose, (<sup>202</sup>Roche, 1990). La capacité de la MMP-L à induire une réponse cellulaire a été testée *in vitro*. Les résultats montrent que la réponse IFN $\gamma$  induite est forte dans les formes paucibacillaires alors que dans les formes multibacillaires la réponse est faible voire absente. Cette capacité à stimuler la réponse immunitaire a été testée *in vivo* par immunisation de cochons d'Inde avec la MMP-L suivie de l'infection par *M. leprae*, *M. tuberculosis* et BCG. Les données montrent une hypersensibilité uniquement dans le cas de la lèpre (<sup>261</sup>Triccas, 1996). Un homologue de la MMP-L caractérisé chez *M. avium*, au niveau moléculaire et immunologique, montre des résultats similaires à ceux obtenus avec la MMP-L (<sup>262</sup>Triccas, 1998). Les propriétés de l'antigène MMP-L ont été utilisées pour la conception d'un vaccin à ADN. L'analyse *in vivo* dans le modèle murin a montré une forte réponse cellulaire induisant une protection comparable à celle induite par le BCG (<sup>146</sup>Martin, 2001). Une autre étude a utilisé la MMP de *M. a. paratuberculosis* comme antigène pour le diagnostic de la paratuberculose par méthode ELISA. La sensibilité proche de 93% et la spécificité proche de 86% sont suffisantes pour détecter la paratuberculose (<sup>231</sup>Shin, 2004).

### II-2 « *Fibronectin Binding Proteins* »

Les adhésines qui fixent la fibronectine sont parmi les plus répandues. On les retrouve chez *Staphylococcus aureus* (<sup>164</sup>Mongodin, 2002), *Leptospira biflexa* (<sup>82</sup>Figueira, 2011), *Pseudomonas aeruginosa* (<sup>203</sup>Roger, 1999) ou encore *Acinetobacter baumannii* (<sup>237</sup>Smani, 2012). Toutes ces bactéries expriment à leur surface des molécules capables de lier la FN pour former un pont faisant le lien avec la cellule hôte. Les premières études réalisées chez les mycobactéries montrent que BCG est capable d'adhérer à des surfaces recouvertes de FN (<sup>200</sup>Ratliff, 1988). Cette adhérence est saturable, spécifique et inhibée par des composants du surnageant de culture de BCG, ce qui suggère que la protéine est sécrétée. L'adhésion de BCG *in vitro* aux cellules T24 est augmentée par l'ajout de FN exogène et inhibée par des anticorps anti-FN ou des billes recouvertes de FN (<sup>200</sup>Ratliff, 1988 ; <sup>14</sup>Aslanzadeh, 1989 ; <sup>128</sup>Kuroda, 1993) suggérant que la molécule fixant la FN est également exposée à la surface de la bactérie.

Ces éléments décrits chez *M. tuberculosis* et BCG ont permis de mettre en évidence deux protéines avec un poids moléculaire de 30/31 kDa et de 55 kDa capables d'interagir avec la FN (<sup>1</sup>Abou-zeid, 1991). Ces adhésines seront par la suite identifiées, respectivement, comme les composants du complexe antigénique 85 et la FAP (*Fibronectin Attachment Protein*).

## II-2-1 « Antigen 85 complex »

### II-2-1-1 Dénomination et localisation

Le complexe antigénique 85 est composé de 3 protéines codées par 3 gènes séparés (<sup>291</sup>Wiker, 1990). L'antigène 85A est également appelé MPT44 ou P32 ; l'antigène 85B est aussi nommé MPT59, Antigène 6 ou  $\alpha$  antigène et l'antigène 85C, MPT45. Après purification, l'identification a révélé que ces protéines ont une séquence d'environ 300 à 350 aa et un poids moléculaire variant de 30 à 32 kDa. (<sup>289</sup>Wiker, 1986 ; <sup>2</sup>Abou-zeid 1988 ; <sup>172</sup>Nagai, 1991). La partie N-terminale de ces protéines contient un peptide signal qui permet l'exportation des protéines 85A, 85B et 85C jusqu'à la surface. Cette séquence, composée de 40 aa dans la plupart des espèces et possède un motif AXA nécessaire pour la reconnaissance de la peptidase (<sup>98</sup>Harboe, 1998).

Les protéines du complexe antigénique 85 sont activement sécrétées chez *M. tuberculosis* (<sup>2</sup>Abou-zeid, 1988 ; <sup>288</sup>Wiker, 1992) et *M. leprae* (<sup>183</sup>Pessolani, 1992). On les retrouve également exposées à la surface des bactéries (<sup>2</sup>Abou-zeid, 1988 ; <sup>196</sup>Rambukkana, 1992). La production d'anticorps polyclonaux exprimant un épitope commun aux trois protéines a été décrit et nommé HYT27 ce qui a permis d'identifier ces protéines chez d'autres espèces mycobactériennes. La production d'anticorps monoclonaux anti-Ag 85B a permis de mettre en évidence la localisation membranaire de l'antigène 85B de *M. leprae* par hybridation *in situ* sur une biopsie de peau (<sup>196</sup>Rambukkana, 1992).

### II-2-1-2 Relation structure – fonction

En 1992, une des premières études réalisées sur la capacité des antigènes 85A, B et C de BCG et de *M. leprae* à adhérer à la FN a été menée par Pessolani *et al.*. Les différentes méthodologies utilisées ont remis en question la capacité des composants du complexe antigénique 85 à interagir avec la FN (<sup>183</sup>Pessolani, 1992). Depuis, des études précises chez *M. kansasii*, *M. bovis*, *M. leprae* et *M. a. paratuberculosis* ont permis d'identifier les motifs clés impliqués dans l'interaction (<sup>254</sup>Thole, 1992 ; <sup>182</sup>Peake, 1993 ; <sup>175</sup>Naito, 1998 ; <sup>127</sup>Kuo,



2012). Peake *et al.*, ont démontré par ELISA, immunoradioactivité et Western Blot (WB), que l'Ag 85B produit par BCG est capable de se fixer à la FN. En synthétisant des séquences peptidiques qui se chevauchent, ils ont identifié par ELISA trois domaines de liaison à la FN en position: 61-90 aa, 121-140 aa et 201-220 aa (<sup>182</sup>Peake, 1993). Chez *M. leprae*, deux sites de liaison à la FN ont été identifiés par WB localisés en 55-266 aa et 265-327 aa, ce qui recouvre la quasi-totalité de la protéine (<sup>254</sup>Thole, 1992). L'étude la plus précise dans la définition des sites de liaison à la FN a été réalisée sur l'Ag 85B de *M. kansasii*. En effet, deux peptides capables de lier la FN ont été identifiés par ELISA en position 84-110 aa et 216-219 aa mais seulement le peptide 84-110 aa permet d'inhiber à lui seul l'adhésion des Ag 85A et C à la FN. Le motif <sup>98</sup>FEWYYQSGLSV<sup>108</sup> de 11 résidus est nécessaire à l'interaction avec la FN et plus particulièrement les résidus <sup>98</sup>FEWYYQ<sup>103</sup> identifiés par mutagenèse dirigée (<sup>175</sup>Naito, 1998) (Figure 21). Ce motif, unique aux mycobactéries, est conservé parmi de nombreuses espèces (<sup>69</sup>Dheenadhayalan, 2002 ; <sup>127</sup>Kuo, 2012).

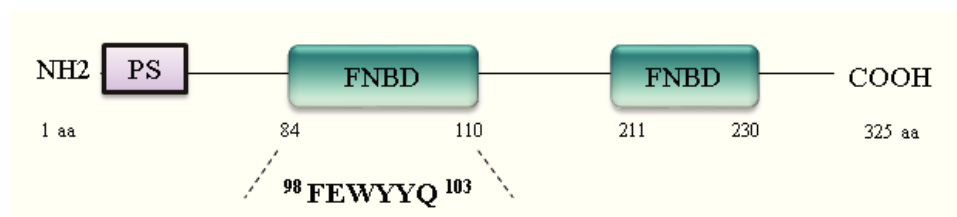


Figure 21 : Caractérisation moléculaire du composant B du complexe antigénique 85 de *M. kansasii*  
PS – Peptide signal ; FNBD – *Fibronectin Binding Domain*. En gras – motif minimum impliqué dans l'adhésion.

***Les molécules du complexe antigénique 85 se lient à la FN pour interagir avec la cellule hôte de façon indirecte. Le motif de liaison FEWYYQ, indispensable à la liaison avec la FN, est unique aux mycobactéries et est très conservé.***

### II-2-1-3 Motifs de liaison de la FN

Deux études suggèrent que l'interaction de la FN avec les composants antigéniques du complexe 85 se fait par l'intermédiaire de plusieurs sites de liaison. L'implication du GBD (*Gelatin Binding Domain*) a été mise en évidence par un test d'inhibition cellulaire en présence de gélatine et d'héparine montrant une inhibition de liaison entre l'Ag 85B de *M. bovis* proche de 60% uniquement avec la gélatine (<sup>182</sup>Peake, 1993). De plus, Naito *et al.*, ont identifié, par ELISA, deux autres sites de liaison : le CBD (*Cell Binding Domain*) et le Hep-2

(*Heparin Binding Domain*) capables d'interagir avec l'Ag 85B de *M. kansasii* (<sup>175</sup>Naito, 1998). Récemment, une étude décrit de façon très précise les motifs d'interactions présents sur la molécule de FN. Kuo *et al.*, ont démontré par « *Surface Plasmon Resonance* » (SPR) que tous les antigènes 85A, B et C de *M. a. paratuberculosis* sont capables d'interagir avec la FN. Puis, ils ont analysé par ELISA les quatre domaines de la FN, à savoir le NTD (N-terminal domain), GBD, CBD et le domaine de 40 kDa. Les résultats montrent que seul le domaine de 40 kDa de la FN est impliqué dans l'interaction avec une affinité similaire à la molécule de FN entière. Ce domaine de 40 kDa est constitué de 4 sous-unités Fn 12, 13, 14 formant le Hep-2 domaine et du module Fn 15. Les méthodes de SPR et WB ont mis en évidence l'implication de la sous-unité Fn 14 dans l'interaction qui est capable, après incubation avec l'Ag 85B de *M. a. paratuberculosis*, d'inhiber la liaison avec la FN. Les peptides synthétisés à partir de la sous-unité Fn 14 ont montré, par ELISA et mutagenèse dirigée, que les résidus impliqués dans la liaison sont localisés entre les acides aminés 17-26 aa et plus particulièrement <sup>19</sup>L, <sup>20</sup>V, <sup>21</sup>S, <sup>23</sup>Q, <sup>24</sup>P, <sup>25</sup>P et <sup>26</sup>R (<sup>127</sup>Kuo, 2012).

***Le mécanisme d'interaction entre les protéines du complexe antigénique 85 et la FN est relativement bien connu et met en évidence l'implication de plusieurs domaines présents sur la FN.***

#### II-2-1-4 Autres rôles associés aux composants Ag85

En dehors de leur capacité d'adhérence, les composants du complexe antigénique 85 sont connus pour leur capacité à induire une forte réponse immunitaire à médiation cellulaire (<sup>230</sup>Shin, I&I, 2005). Leur potentiel dans le diagnostic de la lèpre (<sup>147</sup>Martinez, 2006 ; <sup>119</sup>Kashyap, 2007 ; <sup>58</sup>Da Silva, 2011) ou encore dans la mise en place de vaccin a été étudié (<sup>249</sup>Tanghe, 2001 ; <sup>68</sup>Dhar, 2004 ; <sup>70</sup>Dietrich, 2006). En effet, il a été montré que ce sont des antigènes qui induisent une immunité protectrice contre *M. leprae* à travers la production d'IFN $\gamma$  dans le modèle murin (<sup>174</sup>Naito, 1999).

Une activité de transférase des mycolates, impliquée dans l'assemblage de la paroi, a été mise en évidence *in vitro* pour les trois composants du complexe antigénique 85 (<sup>28</sup>Belisle, 1997). L'utilisation d'une souche de *M. tuberculosis* mutante pour l'Ag 85C a permis de mettre en évidence une diminution de 40% des acides mycoliques présents dans la paroi, ayant pour conséquence une absorption plus rapide des composés hydrophobes et hydrophiles sauf pour l'isoniazide. Malgré de profondes modifications de la composition de la paroi, la souche

mutante est capable de se répliquer et de survivre *in vitro* dans des macrophages murins dérivés de la moëlle (BMDM) (<sup>112</sup>Jackson, 1999). En revanche, l'impact des protéines Ag 85A et B de *M. tuberculosis* testé grâce à des mutants montre que le mutant pour l'Ag 85A a des difficultés à croître sur un milieu pauvre en nutriments mais également dans les deux lignées de macrophages humains et murins testées (THP-1 et J774.1A) alors que le mutant pour l'Ag 85B a un phénotype similaire à la souche sauvage de *M. tuberculosis* (<sup>13</sup>Armitige, 2000). Ces résultats indiquent que l'Ag 85A aurait un impact plus important que l'Ag 85B sur la résistance de *M. tuberculosis*.

***Ces résultats montrent que les protéines du complexe antigénique 85 ont un rôle clef dans la composition, l'intégrité et la perméabilité de la paroi mycobactérienne.***

## II-2-2 « Fibronectin Attachment Protein »

La première molécule mycobactérienne liant la FN a été identifiée et purifiée par chromatographie échangeuse d'ions à partir d'un lysat de *M. vaccae* et nommée p55 en raison de son poids moléculaire de 55 kDa. L'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre la p55 de *M. vaccae* a permis de détecter dans la paroi de BCG une protéine homologue de 55 kDa. L'inhibition de l'adhésion de BCG à des surfaces recouvertes de FN a été mise en évidence par des tests de compétition avec les anticorps monoclonaux anti-p55 de *M. vaccae*. Ces résultats confirment l'implication de cette protéine orthologue de p55 chez BCG dans l'interaction du bacille avec la FN (<sup>199</sup>Ratliff, 1993).

La protéine p55 de *M. vaccae* a été définie comme étant la FAP (FAP-V) et identifiée pour la première fois chez *M. leprae* (FAP-L) (<sup>287</sup>Wieles, 1994 ; <sup>218</sup>Shorey, 1995) puis le gène a été séquencé chez *M. tuberculosis* (FAP-T). La présence de la FAP a été mise en évidence chez *M. avium*, *M. kansasii*, *M. smegmatis* et *M. xenopi* par des anticorps monoclonaux anti-FAP de BCG, ce qui indique que cette protéine est très conservée chez les mycobactéries (<sup>102</sup>Horn, 1996).

### II-2-2-1 Dénomination et localisation

Chez *M. tuberculosis*, le cadre ouvert de lecture code pour une protéine de 325 aa qui possède un peptide signal de 39 aa dans sa partie N-terminale (<sup>132</sup>Laqueyrie, 1995). Il s'avère que, par analyse SDS-PAGE, la molécule a un poids moléculaire apparent de 45/47 kDa d'où l'appellation 45/47 kDa antigène. *M. a. paratuberculosis* produit une FAP avec une séquence

protéique de 368 aa et un poids moléculaire prédit à 32 kDa alors que son poids apparent est proche de 50/60 kDa (<sup>223</sup>Secott, 2001 ; <sup>86</sup>Gioffré, 2009). On peut également retrouver la FAP sous le nom de « *Alanine and Proline rich Antigen* » (Apa), caractérisée par un fort pourcentage de résidus de proline (22%) et d'alanine (19%) ou encore MPT32.

Le traitement des bactéries par des enzymes, des antibiotiques, des détergents ou encore par la chaleur réduit fortement la capacité d'adhésion de la bactérie à la FN, suggérant une localisation de la FAP à la surface de la bactérie (<sup>200</sup>Ratliff, 1988 ; <sup>269</sup>Valentin-Weigand, 1992 ; <sup>273</sup>Verbelen, 2009). La répartition de la FAP a été analysée par microscopie électronique et WB, montrant une distribution de la FAP à la surface mais également dans la partie cytosolique de la bactérie (<sup>223</sup>Secott, 2001).

#### II-2-2-2 Relation structure – fonction

Le rôle de la FAP dans l'interaction avec la FN a été démontré chez BCG (FAP-B) (<sup>273</sup>Verbelen, 2009), *M. leprae* (FAP-L) (<sup>42</sup>Byrd, 1993 ; <sup>218</sup>Schorey, 1995), *M. a. paratuberculosis* (<sup>220,221</sup>Secott, 2001 ; 2002) et la caractérisation moléculaire plus précise de la FAP a été réalisée chez *M. avium* (FAP-A) (<sup>217</sup>Shorey, 1996 ; <sup>297</sup>Zhao, 1999 ; <sup>158</sup>Middelton, 2000 ; <sup>157</sup>2002 ; <sup>156</sup>2004) et *M. a. paratuberculosis* (FAP-P) (<sup>269</sup>Valentin-Weigand, 1992 ; <sup>223</sup>Secott, 2001 ; <sup>224</sup>2002 ; <sup>222</sup>2004).

Deux sites de liaison à la FN en position 177-201 aa et 269-292 aa sur la FAP-A ont été identifiés par l'utilisation de peptides synthétiques. Ces deux motifs sont conservés chez *M. leprae* et *M. tuberculosis* avec plus de 80% d'identité, alors que la FAP de *M. smegmatis* présente uniquement le motif 269-292 aa qui est capable d'inhiber à lui seul la liaison de la FAP-L et de la FAP-A avec la FN. L'adhésion de *M. avium* et BCG à la FN est également inhibée par le peptide 269-292 aa suggérant que la FAP-L et FAP-A interagissent avec la FN par un mécanisme similaire (<sup>217</sup>Shorey, 1996). Le motif minimum présent dans le peptide 269-292 aa de FAP-A nécessaire à l'interaction avec la FN a été défini par mutagenèse dirigée. Il s'agit du motif <sup>273</sup>RWFV <sup>276</sup> qui est indispensable à l'interaction de la FAP-A avec la FN. Les mutations successives d'un acide aminé à l'autre ne sont pas suffisantes pour complètement abolir la liaison de la FAP-A avec la FN. Par contre, si les 4 acides aminés sont délétés simultanément, l'activité de liaison à la FN est complètement perdue. Ce motif de 4 acides aminés est conservé chez toutes les FAP produites par les mycobactéries (<sup>297</sup>Zhao, 1999) (Figure 22).

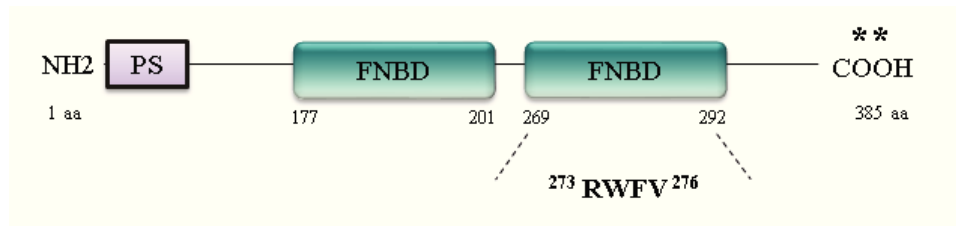


Figure 22 : Caractérisation moléculaire de la FAP de *M. avium*  
 PS – Peptide signal ; FNBD – Fibronectin Binding Domain. En gras – motif minimum impliqué dans l'adhésion. \*\*  
 Présence de modifications post-traductionnelles (glycosylations).

La caractérisation *in vitro* du rôle de la FAP-L sur des cellules épithéliales T24 et sur des cellules de Schwann JS1 a montré que l'ajout de FN augmente fortement l'adhésion et l'internalisation de *M. leprae* sur ces deux types cellulaires. Plusieurs méthodes ont permis de mettre en évidence l'importance de la FAP-L dans l'interaction avec la cellule cible ; i) Les méthodes d'inhibition : la pré-incubation de *M. leprae* avec des anticorps polyclonaux anti-FAP-V, anti-FAP-L ou anti-FN induit une diminution de l'adhésion en bloquant de façon directe l'adhésine FAP ou indirecte via la FN qui sert de médiateur pour l'adhésion cellulaire ; ii) L'addition de FAP-L purifiée ou recombinante en présence de *M. leprae* engendre un phénomène de compétition entre ces molécules pour les sites de liaison à la FN (<sup>218</sup>Shorey, 1995). De plus, l'adhésion de *M. avium* et *M. tuberculosis* est inhibée par des tests de compétition lorsque la bactérie ou le tissu sont pré-incubés avec la FN ou la FAP-A, respectivement (<sup>158</sup>Middleton, 2000 ; <sup>157</sup>2002 ; <sup>156</sup>2004).

*M. avium* et *M. tuberculosis* sont capables d'adhérer à la muqueuse respiratoire provenant de tissu humain en culture par l'intermédiaire du mucus fibreux et de la ME mais pas avec le mucus globulaire (<sup>158</sup>Middleton, 2000 ; <sup>157</sup>2002 ; <sup>156</sup>2004).

La construction d'un mutant de *M. smegmatis* pour le gène *fap* a montré une diminution d'adhérence à la ME qui est restaurée par complémentation avec un vecteur exprimant la FAP-A (<sup>158</sup>Middleton, 2000 ; <sup>157</sup>2002 ; <sup>156</sup>2004). De plus, un mutant de *M. a. paratuberculosis* pour le gène *fap* a été caractérisé sur cellules T24 et Caco2 et montrent une réduction de l'adhésion de plus de 50% sur ces deux types cellulaires, ce qui renforce l'importance de la FAP dans l'adhésion mycobactérienne (<sup>224</sup>Secott, 2002).

La FAP-P présente deux sites de liaison à la fibronectine en position 173-197 aa et 265-288 aa. L'étude de la FAP-P sur modèle de « gut loop » murin a montré que *M. a. paratuberculosis* traverse l'intestin via les cellules M et que le nombre de cellules M envahies est multiplié par 2,5 lorsque la bactérie est opsonisée par de la FN montrant ainsi l'implication

d'une FAP. L'invasion des cellules M est diminuée de 77 à 90% avec la souche mutante de *M. a. paratuberculosis* pour le gène *fap*, confirmant le rôle essentiel de la FAP-P dans la dissémination du bacille (<sup>222</sup>Secott, 2004).

***La FAP joue un rôle important dans l'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales. Plusieurs sites de liaison à la FN ont été mis en évidence sur la FAP exprimée par des mycobactéries.***

#### II-2-2-3 Récepteurs cellulaires

Les intégrines font partie des récepteurs cellulaires utilisés par les microorganismes pour se lier à la cellule hôte via les molécules d'adhérence comme la FN.

Les cellules M sont les seules cellules de l'épithélium intestinal à exprimer une forte densité de  $\beta 1$  intégrine dans la lumière (<sup>47</sup>Clark, 1998). La chaîne  $\beta 1$  et l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  ont été identifiées *in vitro* sur cellules RPMI-2650, T24 et par immunoblot comme le récepteur des mycobactéries opsonisées par la FN (<sup>42</sup>Byrd, 1993 ; <sup>128</sup>Kuroda, 1993). L'utilisation d'anticorps spécifiques anti-intégrine a mis en évidence l'importance des chaînes  $\alpha 5$ ,  $\alpha V$ ,  $\beta 1$  et  $\beta 3$  sur l'invasion des cellules M par *M. a. paratuberculosis*. En effet, une co-localisation de la FAP-P et de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  sur cellules Hep-2 par microscopie a confirmé ce résultat. (<sup>222</sup>Secott, 2004).

***Les mycobactéries interagissent avec la cellule hôte via la FAP exprimée à la surface qui est capable de se lier à la FN. L'un des récepteurs cellulaires majeurs de la FN impliqué dans l'adhésion des mycobactéries est l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ .***

#### II-2-2-4 Modifications post-traductionnelles

La différence entre le poids moléculaire théorique et apparent de la FAP visualisé sur SDS-PAGE est due à la présence de modifications posttraductionnelles subies par la protéine. L'analyse par spectrométrie de masse a permis de mettre en évidence le profil des modifications présentes sur la FAP de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, BCG et sur la souche de *M. smegmatis* recombinant pour la FAP de *M. tuberculosis*. Le mannose et l'arabinose sont les deux sucres détectés et présents de 1 à 9 résidus par molécule, ce qui montre que la FAP est glycosylée. En comparaison avec la FAP native, la FAP recombinante dans *M. smegmatis*

présente des glycosylations alors qu'une FAP exprimée dans *E. coli* ne montre pas de modifications. L'abondance et le degré de glycosylation est plus faible chez les FAP recombinantes dans *M. smegmatis* que chez les protéines natives (<sup>101</sup>Horn, 1999).

Le modèle du cochon d'Inde, préalablement immunisé par le BCG, a été utilisé pour mettre en évidence l'impact des glycosylations de la FAP sur la capacité à provoquer une réaction d'hypersensibilité retardée et à stimuler des LT. Les antigènes natifs glycosylés induisent une réponse immunitaire forte. Cette capacité est réduite de 4 fois avec une FAP produite chez *M. smegmatis* et sa capacité à stimuler les LT de 10 fois. De même, les traitements chimiques ou enzymatiques diminuent jusqu'à 30 fois la réponse immunitaire induite par rapport à la FAP native (<sup>101</sup>Horn, 1999 ; <sup>204</sup>Romain, 1999). Par conséquent, l'antigénicité de la FAP est dépendante des glycosylations portées par la protéine native. L'épitope de la FAP-A reconnu par les LT dans deux modèles murins a été identifié en position 288-302 aa et 249-262 aa ce qui correspond à la région la plus conservée de la FAP (<sup>100</sup>Holsti, 1998).

***La FAP sous sa forme native subit des modifications post-traductionnelles identifiées comme des glycosylations indispensables pour son immunogénicité.***

#### II-2-2-5 Autres rôles associés à la FAP

Cet antigène FAP a été utilisé pour la mise en place de méthodes de diagnostic spécifique de la paratuberculose ou de la tuberculose bovine. La FAP-P n'est pas reconnue par le sérum des animaux infectés par *M. bovis* mais est reconnue par ceux d'animaux atteints de paratuberculose (<sup>86</sup>Gioffre, 2009). Des anticorps monoclonaux anti FAP-P sont capables de reconnaître spécifiquement *M. a. paratuberculosis* lors d'une infection *in vitro* de macrophages (Raw 264.7) mais aussi sur des tissus d'animaux infectés (<sup>240</sup>Souza, 2011). En revanche, la FAP-B a été testée pour le diagnostic de la tuberculose bovine par méthode ELISA avec une spécificité de 96% mais la sensibilité déterminée n'est que de 40%, trop faible pour la mise en place en routine du test (<sup>45</sup>Chanteau, 2000).

Il a été montré *in vivo* dans le modèle murin du cancer de la vessie, que les souris prétraitées avec de la FAP-B ont une croissance de la tumeur diminuée et une activité anti-tumorale dose dépendante (<sup>296</sup>Zhao, 2000 ; <sup>236</sup>Sinn, 2008).

La FAP induit *in vitro* une activation des cellules dendritiques qui expriment plus fortement les CMH de classe I et II, l'IL12 et l'IFN $\gamma$  montrant une polarisation vers une réponse Th1 (<sup>135</sup>Lee, 2009).

La FAP a un impact sur la paroi mycobactérienne. Une souche de *M. smegmatis* mutée pour la FAP présente une perméabilité et un phénomène d'agrégation plus important que la souche sauvage (<sup>161</sup>Miyamoto, 2004).

## II-3 « *Laminin Binding Protein* »

### II-3-1 Interaction de *M. leprae* avec la laminine

*M. leprae* envahit les cellules de Schwann du système nerveux périphérique dans la phase précoce de l'infection. Ce tropisme est dû à la présence prédominante d'un variant de la Lm présent dans la lamina propria des cellules de Schwann. L'isoforme identifiée est la Lm 2, constituée d'une chaîne  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  et  $\gamma 1$ . La chaîne  $\alpha 2$ , également appelée mérosine, est spécifique des cellules nerveuses, des cellules musculaires striées et des cellules trophoblastiques alors que les chaînes  $\beta 1$  et  $\gamma 1$  sont exprimées par de nombreux types cellulaires (<sup>137</sup>Leivo, 1988). En effet, cette préférence d'adhésion à la Lm 2 a été mise en évidence sur une matrice isolée montrant une affinité plus forte de *M. leprae* pour la Lm 2 que pour la Lm 1, le FN, les HSPG ou encore le collagène IV (<sup>197</sup>Rambukkana, 1997).

Des souris déficientes pour l'expression de la chaîne  $\alpha 2$  avec une expression normale des chaînes  $\beta 1$  et  $\gamma 1$  ont été utilisées pour une expérience *in situ*. On observe que l'adhésion de *M. leprae* aux nerfs périphériques de souris déficientes en chaîne  $\alpha 2$  de la Lm 2 est réduite de 85% comparé à celle observée sur les souris contrôle, suggérant un rôle important de cette chaîne dans l'adhésion de *M. leprae* (<sup>197</sup>Rambukkana, 1997).

Le domaine d'interaction de la chaîne  $\alpha 2$  de la Lm 2 avec *M. leprae* a pu être identifié grâce à l'expression de formes recombinantes testées sur matrice isolée et *in vitro* sur cellules de Schwann ST88-14. Les résultats montrent que le domaine G, contenu dans la partie C-terminale, est directement impliqué dans l'adhésion de *M. leprae* aux cellules nerveuses (<sup>197</sup>Rambukkana, 1997). En comparaison à *M. leprae*, les propriétés d'adhésion à la chaîne  $\alpha 2$  de la Lm 2 ont été évaluées chez *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* et *M. chelonae*. Les résultats montrent une adhésion similaire pour toutes les espèces mycobactériennes testées. Le pré-traitement de *M. leprae* avec de la chaîne  $\alpha 2$  augmente son adhésion aux cellules de Schwann ST88-14 de plus de 6,5 fois comparé aux bactéries non traitées visualisées par microscopie à fluorescence. Ces résultats, également confirmés pour BCG, démontrent que les mycobactéries pathogènes mais aussi non-pathogènes sont capables de se lier à la chaîne



$\alpha 2$  de la Lm 2 et d'adhérer aux cellules de Schwann ST88-14. Cette étude prouve que le tropisme de *M. leprae* pour les cellules de Schwann n'est pas uniquement dû à la présence d'une adhésine mais qu'il est médié par de multiples facteurs cellulaires et bactériens (<sup>142</sup>Marques, 2001).

***Le tropisme de M. leprae pour les cellules de Schwann est, entre autres, dû à la présence de la Lm 2 et plus précisément à la chaîne  $\alpha 2$  qui facilite l'adhésion de la bactérie par la formation d'un pont entre une molécule de surface de M. leprae et les cellules de Schwann.***

### II-3-2 Caractérisation de la *Laminin Binding Protein* (LBP)

La molécule de surface présente chez *M. leprae* impliquée dans l'interaction avec la Lm a été identifiée par Shimoji *et al.*, en utilisant l'affinité de *M. leprae* pour la Lm 2. Une protéine avec un poids moléculaire apparent de 28 kDa a été purifiée avec un poids moléculaire théorique de ~21 kDa. Cette protéine a donc été appelée ML-LBP21. Elle présente une séquence protéique de 200 aa, riche en alanine (22%) et lysine (~19%) répartis dans son domaine C-terminal sous forme de répétition XKKX donnant à la protéine une charge positive élevée (<sup>229</sup>Shimoji, 1999). On peut également retrouver la ML-LBP21 sous le nom de HupB, « *Histone like protein* » (Hlp) ou « *Mycobacterial DNA binding protein 1* » (MDP1). Ces noms proviennent de la forte homologie de séquence avec la HU de *E. coli* et de sa capacité à fixer l'ADN démontrée par la LBP de BCG (<sup>63</sup>Marques, 2000 ; <sup>12</sup>Aoki, 2004).

La LBP est conservée chez de nombreuses espèces mycobactériennes (<sup>229</sup>Shimoji, 1999 ; <sup>12</sup>Aoki, 2004). Malgré l'absence de peptide signal dans la partie N-terminale, la LBP de *M. leprae* et de BCG a été visualisée à la surface de la bactérie et dans la partie membranaire par microscopie électronique et immunoblot, respectivement (<sup>229</sup>Shimoji, 1999 ; <sup>12</sup>Aoki, 2004). La capacité de la ML-LBP21 à se lier seule à la Lm 2 a été étudiée par différentes méthodes indépendantes. L'adhérence de la ML-LBP21 au domaine G de la Lm 2 a été mise en évidence par WB et ELISA et son rôle dans l'adhésion et l'invasion des cellules de Schwann a également été démontré par cytométrie en flux et microscopie à fluorescence (<sup>229</sup>Shimoji, 1999).

La pré-incubation de *M. leprae* avec la ML-LBP21 recombinante augmente de manière dose dépendante l'attachement du bacille aux cellules de Schwann ST88-14.

Cependant, la construction d'un mutant de *M. smegmatis* pour le gène *lbp* ne montre aucune différence par rapport à la souche sauvage dans sa capacité d'adhésion aux cellules de Schwann ST88-14 (<sup>63</sup>Marques, 2000). Ce résultat montre que la LBP n'est pas la seule molécule à jouer un rôle dans l'adhésion du bacille aux cellules épithéliales ou que la LBP exprimée par *M. smegmatis* n'a pas le même rôle que celle exprimée par *M. leprae*.

***Une des molécules impliquées dans l'adhésion de M. leprae est la LBP exprimée à la surface des mycobactéries, elle se lie à la lamine 2 pour pouvoir adhérer aux cellules de Schwann.***

### II-3-3 Récepteurs cellulaires de la laminine

L'intégrine  $\alpha 6 \beta 4$  a été définie comme l'un des plus importants récepteurs à la Lm 2 présents sur les cellules de Schwann (<sup>75</sup>Einheber, 1993). Afin de déterminer quelles sont les chaînes d'intégrines impliquées dans la liaison de la Lm, une étude *in vitro* a été réalisée à partir de différents types cellulaires (HBL-100, Cos-7 et K562). Les cellules HBL-100 et Cos-7 expriment fortement l'intégrine  $\alpha 6 \beta 4$  et peu la  $\alpha 6 \beta 1$  alors que les cellules K562 sont utilisées comme contrôle et expriment uniquement le récepteur à la FN, l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$ .

En présence de Lm 2, *M. leprae* adhère de façon dose dépendante aux cellules exprimant la chaîne  $\alpha 6$  (HBL-100 et Cos-7) alors qu'il adhère très peu au type cellulaire contrôle (K526). Le rôle de la chaîne  $\beta 4$  dans l'adhésion de *M. leprae* a été montré par un test d'inhibition grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-intégrine. Les résultats montrent une diminution de l'adhérence en présence d'anticorps anti-chaîne  $\beta 4$  (<sup>197</sup>Rambukkana, 1997).

Le domaine  $\alpha$ -dystroglycane du complexe  $\alpha/\beta$  dystroglycane est capable de se lier à la Lm 2. Cette propriété a été démontrée par chromatographie d'affinité et WB montrant une affinité dépendante du calcium et inhibée en présence d'héparine et de NaCl (<sup>294</sup>Yamada, 1994). L'adhérence de *M. leprae* au domaine  $\alpha$ -dystroglycane est médiée par le domaine G de la Lm 2 et augmentée de façon dose dépendante avec la concentration du domaine  $\alpha$ -dystroglycane sur matrice isolée, alors que sur cellules de Schwann l'adhésion de *M. leprae* est inhibée par un phénomène de compétition avec le domaine  $\alpha$ -dystroglycane natif (<sup>198</sup>Rambukkana, 1998). Le dystroglycane est impliqué dans l'interaction de *M. leprae* avec la ME médiée par le domaine G de la Lm 2 qui agit comme un cofacteur de la liaison (<sup>141</sup>Maridonneau-Parini, 2001 ; <sup>197</sup>Rambukkana, 1997 ; <sup>198</sup>1998).

---

***Ces études montrent que l'intégrine  $\alpha\beta4$  et le domaine extracellulaire  $\alpha$ -dystroglycane sont les deux récepteurs capables de médier l'adhésion de *M. leprae* aux cellules de Schwann par l'intermédiaire de la Lm 2.***

#### II-3-4 Autres ligands et motifs d'interactions de la LBP

Bien que la LBP soit une molécule chargée très positivement dans sa partie C-terminale, par la présence de nombreux résidus lysines, son interaction avec les ligands est de deux natures :

i) Les interactions électrostatiques, dépendantes des charges positives, qui permettent d'interagir avec les molécules chargées négativement telles que l'ADN ou les GAGs ; ii) Les interactions médiées par la reconnaissance de motifs comme c'est le cas pour la Lm 2, le collagène I ou encore l'acide hyaluronique. (<sup>12</sup>Aoki, 2004 ; <sup>191</sup>Portugal, 2008 ; <sup>238</sup>Soares de Lima, 2005). L'interaction entre l'héparine, les HS, les CS et la LBP de BCG a été mesurée par « *Surface Plasmon Resonance* » (SPR) avec comme contrôle un composant du complexe antigénique 85 incapable d'interagir avec les GAGs. La LBP de BCG est capable d'interagir avec tous les GAGs testés mais ne se lie pas aux sucres non sulfatés (dextrose, mannose ou encore galactose). De plus, l'adhésion de la LBP aux cellules A-549 est inhibée par l'acide hyaluronique, l'héparine et l'ADN, ce qui confirme l'importance de cette adhésion. Une étude *in vivo* montre que des souris infectées avec une souche de BCG plus de l'acide hyaluronique induit une réduction de colonisation du poumon comparée aux souris infectées avec BCG seul, ce qui indique que l'acide hyaluronique pourrait prévenir l'attachement et/ou l'invasion de BCG (<sup>12</sup>Aoki, 2004).

Le site de liaison à l'héparine a été identifié dans la partie N-terminale de la LBP en position 31-50 aa, par ELISA grâce à des peptides synthétiques (<sup>12</sup>Aoki, 2004). Cette étude est en contradiction avec l'étude de Soares de Lima *et al.*, qui a mis en évidence de façon précise l'implication du domaine C-terminal de la LBP de *M. leprae* dans l'interaction avec la Lm, l'héparine et les cellules de Schwann ST88-14 par immunofluorescence (<sup>238</sup>Soares de Lima, 2005). Par la suite, l'étude menée par Portugal *et al.*, montre par ELISA, « *Nuclear Magnetic Resonance* » (NMR) et chromatographie d'affinité la présence de deux sites de liaison aux HS : un défini dans le domaine N-terminal de la LBP en position 31-60 aa et l'autre correspond au domaine C-terminal de la protéine 103-200 aa, ce qui conforte les deux études précédemment décrites (<sup>191</sup>Portugal, 2008) (Figure 23).

**Plusieurs ligands ont été mis en évidence pour la LBP, à savoir : la Lm, l'héparine, le collagène I, les GAGs et l'acide hyaluronique, autant de facteurs qui favorisent l'adhésion des mycobactéries à la cellule via la matrice extracellulaire.**

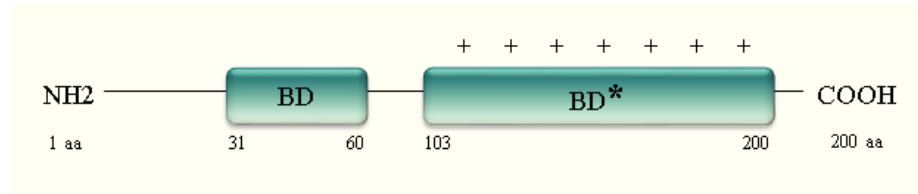


Figure 23 : Caractérisation moléculaire de la LBP de *M. leprae*  
BD – Binding Domain; + Présence de modifications post-traductionnelles (méthylations).

### II-3-5 Modifications post-traductionnelles

La mise en évidence des modifications post-traductionnelles de la LBP a été décrite chez *M. smegmatis* (<sup>187</sup>Pethe, 2001). Les premières analyses par spectrométrie de masse des modifications post-traductionnelles ont révélé la présence d'une molécule de glucose suggérant que la LBP de *M. smegmatis* était glycosylée (<sup>187</sup>Pethe, 2001). Ensuite, le séquençage protéique de la partie C-terminale (150-199 aa) a montré que les modifications portées par la LBP de *M. smegmatis* sont des méthylations mises en évidence par des groupements méthyles (mono- ou di-) présents sur les résidus lysines (<sup>186</sup>Pethe, 2002). La HBHA et la LBP ont un épitope commun reconnu par l'anticorps monoclonal 4057D2 qui reconnaît uniquement les protéines sous forme méthylée de façon naturelle, chimique ou recombinante dans *M. smegmatis* (<sup>153</sup>Menozzi, 1996 ; <sup>187</sup>Pethe, 2001 ; <sup>186</sup>Pethe 2002).

L'impact de ces méthylations sur la capacité d'adhérence de la LBP de *M. leprae* a été testé par ELISA et *in vitro* sur cellules Schwann ST88-14. La comparaison entre la LBP recombinante de *M. leprae* non-méthylée et chimiquement méthylée après expression chez *E. coli* ne montre aucune différence sur leur capacité à interagir avec l'héparine, la Lm ou avec les cellules de Schwann (<sup>238</sup>Soares de Lima, 2005).

***L'adhésine LBP produite par les mycobactéries subit des modifications post-traductionnelles qui sont des méthylations mais celles-ci n'ont aucun impact sur la capacité d'adhésion aux matrices isolées ou aux cellules épithéliales.***

## II-3-6 Autres rôles associés à la LBP

Le second rôle associé à la LBP est sa capacité à lier l'ADN. Il a été démontré par gel retard que les LBP de *M. tuberculosis* et de *M. smegmatis* ont une forte affinité pour l'ADN. Les études montrent que les deux domaines de la LBP de BCG sont impliqués dans l'interaction avec l'ADN (<sup>228</sup>Sharadamma, 2011), aussi bien le domaine C-terminal par l'intermédiaire des répétitions de lysine et d'alanine (PAKK et PAAK) (<sup>126</sup>Kumar, 2010) que le domaine N-terminal via le peptide 31-50 aa. La mutagenèse dirigée n'a pas permis de mettre en évidence un seul acide aminé responsable de cette interaction. Le motif 31-50 aa est parfaitement conservé parmi les mycobactéries et absent des protéines décrites comme liant l'ADN (<sup>83</sup>Furugen, 2001).

Une souche de *M. smegmatis* mutante pour le gène *lbp* a mis en évidence une sensibilité plus forte aux UV et une perméabilité plus forte à quelques antibiotiques par rapport à la souche sauvage, ce qui suggère un rôle dans l'intégrité de la paroi (<sup>232</sup>Shires, 2001 ; <sup>11</sup>Anuchin 2010 ; <sup>282</sup>Whiteford, 2011). De plus, l'expression de la LBP pendant la phase de dormance est surexprimée de 5 à 7 fois plus que pendant la croissance. On retrouve cette surexpression lorsque la bactérie est soumise à un choc thermique de 10 °C, ce qui montre que la LBP semble jouer un rôle dans la réponse à un stress environnemental ou encore pendant la phase de dormance.

Il semblerait que la LBP de BCG soit capable de contrôler par une régulation négative l'assemblage de la paroi. La LBP est capable de se lier directement aux protéines du complexe antigénique 85 ainsi qu'aux substrats comme le tréhalose nécessaire pour faire le lien entre l'acide mycolate et les sucres. La fonction de régulateur a été mise en évidence par l'étude de la croissance d'une souche de *M. smegmatis* mutante pour la LBP en comparaison avec une souche sauvage et une souche mutée complémentée. Les trois souches ont une croissance similaire mais la synthèse des acides mycoliques est fortement réduite pour les souches sauvage et complémentée alors qu'ils continuent à être synthétisés dans la souche mutante *M. smegmatis* LBP. L'addition de LBP à forte dose diminue la croissance de BCG alors que les protéines du complexe antigénique 85 induit la croissance. Tous ces résultats montrent que la LBP présente dans et à la surface de la bactérie est impliquée dans le contrôle de l'assemblage de la paroi (<sup>120</sup>Katsube, 2007).

Récemment, il a été démontré que les LBP de BCG, *M. tuberculosis* et *M. leprae* sont capables d'interagir avec le fer mais uniquement sous sa forme Fe<sup>3+</sup>. L'activité ferroxidase,

qui consiste à convertir du  $\text{Fe}^{2+}$  sous forme  $\text{Fe}^{3+}$ , a été démontrée pour les trois LBP analysées. Enfin, le rôle dans la détoxification du fer a été mis en évidence grâce à une souche de *M. smegmatis* délétée pour la LBP montrant un taux de survie 100 fois inférieur à la souche sauvage en présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nécessaire à la transformation du  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\text{Fe}^{3+}$  (<sup>248</sup>Takatsuka, 2011). Ces résultats suggèrent que la LBP serait impliquée dans le processus de détoxification et de stockage du fer nécessaire à la croissance de la bactérie.

***Toutes ces études montrent qu'en dehors de son rôle d'adhésine, la LBP a d'autres fonctions indispensables à la viabilité de la bactérie.***

## II-4 « Heparin Binding HemAgglutinin »

### II-4-1 Identification et localisation

C'est dans les années 90 que pour la première fois Menozzi *et al.*, ont montré *in vitro*, sur cellules épithéliales CHO et macrophages J774A.1, que l'adhérence de BCG est spécifiquement inhibée par des sucres sulfatés et cela uniquement sur les cellules épithéliales. Les sucres simples comme le dextran, le mannose ou le galatose ne sont pas capables d'inhiber l'adhésion de BCG, suggérant qu'une molécule exprimée à la surface de BCG est capable d'interagir avec les cellules épithéliales via les sucres sulfatés. En utilisant cette propriété d'affinité pour les sucres sulfatés, une protéine de 28 kDa a été isolée d'un lysat de BCG et de *M. tuberculosis*. Elle a été nommée « Heparin Binding HemAgglutinin » (HBHA) car elle est capable d'agglutiner des hématies de lapin de façon dose dépendante mais également d'induire l'agrégation de *M. tuberculosis*. L'utilisation de l'anticorps 4057D2 spécifique de la HBHA a permis de la distinguer clairement de la FAP et des protéines du complexe antigénique 85 (<sup>153</sup>Menozzi, 1996). Ces capacités d'hémagglutination, d'agrégation et d'adhésion de la HBHA de BCG sont inhibées par cet anticorps anti-HBHA 4057D2.

La HBHA a été localisée en surface de la bactérie d'une part par microscopie électronique (<sup>153</sup>Menozzi, 1996) et d'autre part par « Atomic Force Microscopy » (AFM) (<sup>72</sup>Duprés, 2005). Le rôle de la HBHA dans l'adhésion cellulaire bactérienne a été mis en évidence *in vitro* grâce à des souches de BCG et de *M. tuberculosis* déficientes pour le gène de la HBHA testées sur cellules épithéliales (A-549) et cellules phagocytaires (J774A.1, MH-S et U937). Les résultats montrent que l'adhésion des souches mutante, parentale ou complémentée, est similaire sur toutes les cellules phagocytaires alors que sur les cellules épithéliales, on observe

une diminution de l'adhérence de 60% pour la souche mutante en comparaison avec les souches parentale et complétementée (<sup>184</sup>Pethe, 2001). La HBHA a été identifiée et caractérisée chez d'autres espèces mycobactériennes telles que *M. leprae* (<sup>238</sup>Soares de Lima, 2005) et *M. smegmatis* (<sup>34</sup>Biet, 2007).

***La HBHA est impliquée dans la liaison aux cellules non phagocytaires par l'intermédiaire des sucres sulphatés présents à la surface des cellules épithéliales.***

#### II-4-2 Organisation de la protéine

Chez BCG et *M. tuberculosis*, le gène *hbhA* code pour une adhésine de 199 aa qui ne contient ni histidine, ni cystéine, ni tryptophane et ni méthionine sous sa forme mature. La HBHA peut être définie en quatre parties distinctes : un domaine hydrophobe (HP), un domaine coiled-coil (CcD), une région linker (L) et un domaine de liaison à l'héparine (HBD) (Figure 24).

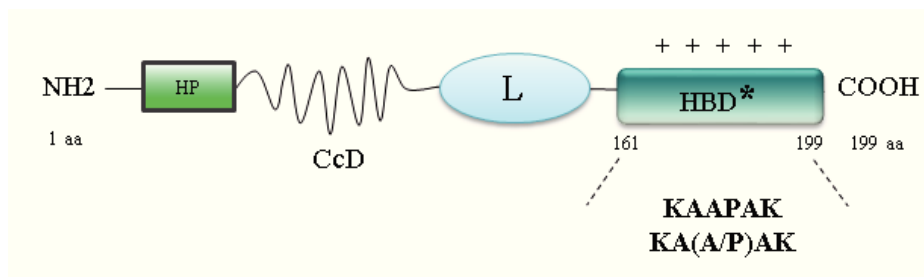


Figure 24 : Caractérisation moléculaire de la HBHA de *M. tuberculosis*

HP – *Hydrophobic segment* ; CcD – *Coiled-coil Domain* ; L – *Linker part* ; HBD – *Heparin Binding Domain* ; + Présence de modifications post-traductionnelles (méthylations). En gras – motifs impliqués dans l'adhésion.

i) Le domaine hydrophobe (6-19 aa) sert potentiellement de domaine transmembranaire pour l'ancrage de la HBHA à la surface de la bactérie (<sup>65</sup>Delogu, 1999). Bien que la HBHA ne présente pas de peptide signal de type LPXTGX dans sa partie N-terminale, elle est exposée à la surface de la bactérie (<sup>150</sup>Menozzi, 1998) ; ii) Le domaine coiled coil (25-110 aa) pourrait intervenir dans l'interaction protéine/protéine pour former des dimères ou multimères de HBHA organisés en nano-domaines à la surface des mycobactéries (<sup>65</sup>Delogu, 1999 ; <sup>72</sup>Duprés, 2005 ; <sup>275</sup>Verbelen, 2007) ; iii) La région linker (111-160 aa) déterminée récemment par Lomino *et al.*, n'a pas de rôle défini (<sup>139</sup>Lomino, 2011) ; iv) Le domaine HBD (161-199 aa) est riche en résidus alanines et lysines et s'organise en deux types de séquences répétées : KAAPAK et KA(A/P)AK répétées trois fois pour chacune d'elle. Ce domaine est le site

d'interaction avec les GAGs et les résidues prolines présents dans ce type de répétition KA(A/P)AK jouent un rôle important dans l'adhésion (<sup>134</sup>Lebrun, 2012) (<sup>185</sup>Pethe, 2000), le complément (<sup>168</sup>Mueller-Ortiz, 2001) et l'actine (<sup>152</sup>Menozzi, 2006 ; <sup>274</sup>Verbelen, 2008 ; <sup>78</sup>Esposito, 2011).

### II-4-3 Importance du domaine C-terminal de la HBHA

#### II-4-3-1 Motifs d'interaction

Deux nomenclatures pour les répétitions peuvent être appliquées, celle de Lebrun *et al.*, décrite ci-dessus ou celle de Pethe *et al.*, qui définit R1 : KKAAPA et R2 : KKAAAKK. L'importance de ces répétitions d'alanine et de lysine dans l'interaction avec l'hôte a été mise en évidence. La production d'une HBHA recombinante tronquée de son domaine C-terminal (rHBHAΔC) supplémentée d'une, deux ou trois répétitions R1 a été analysée par chromatographie d'affinité pour l'héparine. Les résultats montrent qu'une répétition R1 seule n'est pas capable de se lier à l'héparine, que deux domaines R1 présentent une affinité faible et que trois répétitions R1 renforcent l'affinité pour l'héparine mais n'est pas égale à la forte affinité observée pour la HBHA entière. De plus, la « *Maltose Binding Protein* » (MBP), qui ne possède aucune activité d'interaction, greffée avec 1R1+2R2 présente moins d'affinité pour l'héparine que la construction avec 3R1+2R2 (région C-terminale totale). Ces résultats suggèrent que toutes les répétitions d'alanine et de lysine présentes dans la partie C-terminale sont importantes dans l'interaction. Pour mettre en évidence l'implication totale du domaine C-terminal dans l'interaction, la comparaison entre la rHBHAΔC, la rHBHA, la MBP 3R1+2R2 et la MBP seule a été effectuée par SPR et *in vitro* sur cellules A-549. Les données démontrent que la HBHA sans son domaine C-terminal est incapable de se lier à l'héparine ou aux cellules épithéliales A-549 (<sup>185</sup>Pethe, 2000).

La purification de la HBHA produite par l'espèce *M. smegmatis* (HBHA-MS), espèce non-pathogène, par chromatographie d'affinité pour l'héparine dans les conditions standard décrites pour la HBHA de BCG (HBHA-BCG) n'a pas abouti. Face à cet échec, l'analyse *in silico* de la séquence de HBHA-MS a montré un cadre ouvert de lecture code pour une protéine de 232 aa. En comparaison avec la HBHA-BCG, on remarque que le domaine C-terminal est plus long avec une insertion entre les résidus 174-192 aa de 5 résidus d'acide glutamique. Ces résidus apportent des charges négatives en plus à la molécule, ce qui entraîne



une diminution de l'affinité pour l'héparine. Les conditions salines de la chromatographie ont été adaptées aux spécificités de la partie C-terminale de la HBHA-MS. Cette étude démontre l'importance du nombre et de la répartition des charges positives portées par la partie C-terminale. L'étude de l'interaction de la HBHA-MS avec les cellules épithéliales A-549 a montré une absence d'adhésion qui peut s'expliquer par le fait que *M. smegmatis* est une espèce saprophyte non-pathogène qui n'a donc pas besoin d'interagir avec un hôte (<sup>34</sup>Biet, 2007).

***Les répétitions de résidus alanine et lysine présentes sur la partie C-terminale de la HBHA sont indispensables pour l'interaction avec la cellule hôte.***

#### II-4-3-2 Modifications post-traductionnelles

Tout comme la LBP, le poids moléculaire apparent de la HBHA native de BCG (HBHA-BCG) est supérieur à celui de la HBHA recombinante produite dans *E. coli*. (<sup>150</sup>Menozzi, 1998). Cette différence de taille est due à la présence de modifications post-traductionnelles identifiées, par spectrométrie de masse, dans la région C-terminale qui sont essentiellement des méthylations mises en évidence par la présence de groupements méthyles sur les résidus de lysines sous forme mono- ou di-méthyles (<sup>186</sup>Pethe, 2002). Les méthylations sont catalysées par une ou plusieurs S-adenosyl-L-méthionine et la réaction enzymatique a lieu au niveau de la paroi (<sup>186</sup>Pethe, 2002 ; <sup>103</sup>Host, 2007). En revanche, les profils de méthylation comme les méthyltransférases impliquées dans ce processus ne sont pas connues à ce jour.

Deux rôles majeurs ont été attribués à ces méthylations. D'une part, elles ont un rôle de protection de la HBHA contre la protéolyse et d'autre part, elles confèrent à la protéine une immunogénicité. La stabilité de la HBHA recombinante (rHBHA) méthylée et non méthylée a été testée *in vitro* par l'incubation de la protéine en présence de trypsine ou de fluide alvéolaire avec ou sans inhibiteur de protéase. Les résultats obtenus sans inhibiteur de protéase montrent que la rHBHA-BCG est fortement dégradée après 1h de contact (<sup>150</sup>Menozzi, 1998). La capacité à induire une réponse immunitaire a été mise en évidence chez la nHBHA-BCG et à moindre efficacité chez la rHBHA-BCG produite chez *M. smegmatis* (<sup>180</sup>Parra, 2004 ; <sup>252</sup>Temmerman, 2004).

---

***L'adhésine HBHA subit des modifications post-traductionnelles représentées par des méthylation sur les résidus lysines sur son domaine C-terminal. Ces modifications protègent la protéine de la protéolyse et sont responsables de sa capacité immunogène.***

#### II-4-4 Rôles majeurs de la HBHA

##### II-4-4-1 Facteur de dissémination

Grâce à la construction de souches de *M. tuberculosis* et BCG mutées pour le gène *hbhA*, des tests *in vivo* ont pu être réalisés chez la souris. Après inoculation par voie intra-nasale, le nombre de bactéries présentes dans le poumon est similaire entre les souches mutante, complémentée et sauvage, ce qui indique que la HBHA n'est pas impliquée dans l'infection initiale au niveau du poumon alors que contrairement à la souche complémentée ou sauvage, le mutant *hbhA* n'est pas retrouvé au niveau de la rate. La capacité de colonisation et de survie dans la rate de la souche mutante *hbhA* a été démontrée après inoculation par voie intraveineuse. Tous ces résultats montrent que la HBHA n'est pas nécessaire pour l'initiation et la persistance de l'infection au niveau du poumon mais sa présence semble indispensable à l'échappement du bacille du poumon vers les organes profonds. La HBHA est donc un facteur crucial pour la dissémination extra-pulmonaire de l'infection (<sup>184</sup>Pethe, 2001).

##### II-4-4-2 Antigène protecteur

Le potentiel de la HBHA comme antigène protecteur a été mis en évidence dans le modèle murin par Temmerman *et al.*, (<sup>252</sup>Temmerman, 2004). La stimulation de cellules provenant de souris infectées par le BCG produit une réponse IFN $\gamma$  largement supérieure quand les cellules sont stimulées par la nHBHA-BCG que par la rHBHA-BCG méthyliée par *M. smegmatis* ou chimiquement. De plus, la protection induite par la nHBHA-BCG est comparable à celle du vaccin BCG alors qu'avec une rHBHA la protection est nulle. La HBHA réduit d'environ 0,7 log l'infection à *M. tuberculosis* chez la souris. Ces résultats mettent en évidence que les méthylation sont indispensables à l'immunogénicité de la HBHA-BCG (<sup>180</sup>Parra, 2004 ; <sup>91</sup>Guerreo, 2011). Cependant, le domaine N-terminal de la HBHA est également capable, à lui seul, d'induire une réponse immunitaire cellulaire et humorale (<sup>90</sup>Guerrero, 2008 ; <sup>252</sup>Temmerman, 2004). Cette capacité à induire une réponse protectrice a été étudiée afin d'améliorer le vaccin BCG actuellement disponible. Le vaccin BCG « boosté » par la nHBHA-BCG montre une meilleure efficacité vaccinale comparée au vaccin BCG administré seul (<sup>206</sup>Rouanet, 2009 ; <sup>89,91</sup>Guerrero, 2010 ; 2011).

## II-4-4-3 Diagnostic de la tuberculose latente

La tuberculose est une pathologie chronique, complexe que l'on retrouve sous forme latente, qui peut durer plusieurs années ou sous forme active où la maladie se déclenche faisant apparaître des signes cliniques. Le diagnostic de la phase latente est un enjeu important dans la prévention et le contrôle épidémiologique de la tuberculose. Actuellement, ce sont les tests IGRAs qui sont utilisés. Ils mesurent, de façon indirecte, la réponse immunitaire à médiation cellulaire en mesurant la quantité d'IFN $\gamma$  sécrété après stimulation des LT par un antigène. Actuellement, deux antigènes sont utilisés dans les kits commercialisés, la « *Early Secreted Antigenic Target, 6 kDa* » (ESAT-6) et la « *Culture Filtrate Protein, 10 kDa* » (CFP-10). Ces deux protéines sécrétées tout au long de la pathologie permettent de diagnostiquer la maladie mais ne distinguent pas les deux formes de la tuberculose (latente vs active).

Récemment, le concept des tests IGRAs a été testé avec la HBHA native de BCG (nHBHA-BCG) utilisée comme antigène stimulant. Les résultats montrent qu'elle est reconnue différemment chez les patients ayant une tuberculose active de ceux ayant une tuberculose latente. Lors d'une tuberculose latente, après stimulation des cellules T par la nHBHA-BCG, on observe un fort taux d'IFN $\gamma$  sécrété alors qu'avec les antigènes ESAT-6 et CFP-10 le taux d'IFN $\gamma$  est plus faible. Inversement lors d'une tuberculose active, la quantité d'IFN $\gamma$  produite après stimulation par la nHBHA-BCG est plus faible que celui mesuré avec les antigènes ESAT-6 et CFP-10 (<sup>104</sup>Hougardy, 2007).

La croissance lente des mycobactéries est un problème majeur à surmonter pour pouvoir purifier la nHBHA-BCG. Delogu *et al.*, ont analysé la capacité stimulatrice de la HBHA de *M. tuberculosis* exprimée dans *M. smegmatis* (rHBHA-MTB-Smg), mycobactérie à croissance rapide, qui permettrait de purifier la protéine en grande quantité. La rHBHA-MTB-Smg induit une réponse cellulaire un peu moins importante que la nHBHA-BCG. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que le profil de méthylation de la rHBHA-MTB-Smg met en évidence la présence d'environ 16 groupements méthyles contre 23 pour la nHBHA-BCG (<sup>66</sup>Delogu, 2011).

La nHBHA-BCG est un biomarqueur qui permet de discriminer la forme latente et la forme active de la tuberculose (<sup>148</sup>Masungi, 2002 ; <sup>295</sup>Zanetti, 2005 ; <sup>104</sup>Hougardy, 2007 ; <sup>212</sup>Savolainen, 2008).

*Ces études montrent que la HBHA est un facteur de dissémination extra-pulmonaire de la maladie mais également un antigène majeur qui a un potentiel diagnostique et vaccinal important.*

# OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE

---

En dehors des macrophages, les mycobactéries sont également capables d'interagir et d'entrer dans des cellules non phagocytaires telles que les cellules de Schwann dans l'infection à *M. leprae* ou encore les pneumocytes dans le cas de tuberculose pulmonaire permettant ainsi leur survie dans l'organisme hôte. Ces études d'interaction hôte/mycobactérie ont permis de mettre en évidence deux adhésines majeures nommées HBHA (*Heparin Binding HemAgglutinin*) et LBP (*Laminin Binding Protein*) impliquées dans le processus d'adhésion de la bactérie (<sup>153</sup>Menozzi, 1996 ; <sup>225</sup>Shimoji, 1999).

Malgré sa découverte il y a plus d'un siècle, la paratuberculose reste une des maladies bovines les plus préoccupantes, en France comme dans la plupart des pays industrialisés. La prévalence de cette pathologie ne cesse de progresser depuis l'échec des plans de maîtrise et de contrôle mis en place depuis plusieurs décennies. Un autre élément à considérer est que *M. a. paratuberculosis* est suspecté d'être transmis à l'homme par la voie alimentaire et d'être impliqué dans certains cas de maladie de Crohn. Ces enjeux justifient de nouvelles stratégies de recherche destinées à mieux comprendre la pathogénie de *M. a. paratuberculosis*. S'il est clairement établi que le site primaire de l'infection à *M. a. paratuberculosis* est l'intestin grêle et plus particulièrement l'iléon et le jéjunum, les mécanismes moléculaires d'interaction, d'entrée et de dissémination du bacille restent largement méconnus (<sup>48</sup>Clarke, 1997). Certaines études suggèrent qu'en dehors des cellules M, les entérocytes pourraient également être une porte d'entrée pour *M. a. paratuberculosis* (<sup>209</sup>Sangari, 2001 ; <sup>213</sup>Schleig, 2005 ; <sup>32</sup>Bermudez, 2010). Dans la littérature, seulement quelques articles décrivent des molécules impliquées dans l'adhésion du bacille aux cellules épithéliales : la FAP (*Fibronectin Attachment Protein*) (<sup>220</sup>Secott, 2001 ; <sup>221</sup>2002 ; <sup>222</sup>2004), la MMP (*Major Membrane Protein*) (<sup>17</sup>Bannantine, 2003) et la HBHA (<sup>219</sup>Sechi, 2006). Ces études n'ont pas permis de préciser les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la phase précoce de l'infection à *M. a. paratuberculosis*. Des études préliminaires ont montré que la laminine et l'héparine peuvent influencer l'adhésion de *M. a. paratuberculosis* aux cellules épithéliales. Dans ce contexte, mon projet de thèse vise à progresser dans la compréhension du mécanisme d'interaction entre *M. a. paratuberculosis* et les cellules épithéliales intestinales. Cette étude portera sur la caractérisation et la définition du rôle des adhésines HBHA et LBP produites par *M. a. paratuberculosis* dans la voie entérocytaire. Pour mieux répondre à cet objectif, différentes approches seront entreprises.

---

- Génétique : L'identification des gènes *hbhA* et *lbp* sur la séquence du génome de *M. a. paratuberculosis* permettra une analyse *in silico*. La localisation et l'expression des protéines codées par les gènes *hbhA* et *lbp* sera visualisée par western-blot. Le clonage et l'expression de ces protéines en système hétérologue, chez *E. coli* et *M. smegmatis* seront réalisés. Grâce à notre collection d'isolats de *M. a. paratuberculosis* de types C et S disponibles au laboratoire, nous allons explorer la biodiversité des gènes *hbhA* et *lbp* par PCR. En marge de cette partie, la construction d'une souche de *M. a. paratuberculosis* mutée pour les gènes *hbhA* et/ou *lbp* sera réalisée par recombinaison homologue.

- Biochimique : L'isolement et la purification des protéines HBHA et LBP natives de *M. a. paratuberculosis*, par chromatographie d'affinité pour l'héparine, sera nécessaire pour réaliser leur caractérisation biochimique.

- Relation structure/fonction : Les propriétés adhésives des protéines HBHA et LBP seront analysées *in vitro* sur matrices isolées (héparine, Lm, collagène) par ELISA et sur différents types de cellules épithéliales. Nous utiliserons des billes recouvertes de protéines recombinantes afin de réaliser des tests d'adhésion sur différentes lignées cellulaires (intestinales, pulmonaires ou mammaires et d'origine humaine ou bovine), provenant d'hôtes et d'organes différents.

- Immunologique : L'antigénicité et l'immunogénicité de ces protéines seront déterminées pour définir le potentiel diagnostique de ces protéines dans la phase précoce de l'infection. Pour cela, nous utiliserons des tests sérologiques et les tests IGRAs en utilisant comme antigène le PPDj, la HBHA et la LBP afin d'examiner leur capacité à induire une réponse Th1 via le dosage de l'IFN $\gamma$ .

- Par la suite, la mise en évidence d'un récepteur cellulaire pourra être envisagée par traitement des cellules avec des enzymes spécifiques par exemple de l'héparinase ou de la chondroitinase. De plus, une étude menée chez *M. tuberculosis* a montré que le gène *hbhA* était régulé différemment selon le type cellulaire utilisé (macrophage ou cellule épithéliale) (<sup>67</sup>Delogu, 2006). Par conséquent, nous étudierons l'expression des gènes *hbhA* et *lbp*, après contact avec ces différents types cellulaires, par extraction des ARN bactériens analysés par RT-PCR.

# RESULTATS



---

Article I - Characterization of the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* laminin-binding/histone-like protein (Lbp/Hlp) which reacts with sera from patients with Crohn's disease.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2011.02.002>

*Louise H. Lefrancois, Céline Pujol, Christelle C. Bodier, Ana Paula Teixeira-Gomez, Hervé Drobecq, Marie-Laure Rosso, Dominique Raze, André Alves Dias, Jean-Pierre Hugot, Ofelia Chacon, Raul G. Barletta, Camille Loch, Maria Cristina Vidal Pessolani, Franck Biet.*

**Introduction :** Comme nous l'avons abordé dans l'exposé bibliographique (Introduction-Chapitre 3), la LBP est une protéine très conservée chez les mycobactéries. Elle a été découverte, caractérisée chez *M. leprae* (<sup>229</sup>Shimoji, 1999) et joue un rôle important dans l'adhésion du bacille aux cellules de Schwann. (<sup>238</sup>Soares de Lima, 2005). Il a été montré qu'elle est capable d'interagir avec de nombreux composés de la matrice extracellulaire tels que les GAGs (héparanes sulfates, héparine, chondroïtines sulfates et acide hyaluronique) et plus précisément avec la laminine 2 abondante dans la matrice extracellulaire des cellules de Schwann(<sup>12</sup>Aoki, 2004 ; <sup>238</sup>Soares de Lima, 2005 ; <sup>191</sup>Portugal, 2008). Des tests de compétition, nous ont permis d'observer que l'adhésion de *M. a. paratuberculosis* aux cellules pulmonaires A-549 était significativement augmentée après ajout de laminine exogène, suggérant qu'une molécule de type LBP était exprimée par la bactérie.

**Objectif :** Identifier et caractériser au niveau moléculaire la LBP impliquée dans l'adhésion cellulaire chez *M. a. paratuberculosis*.

**Résultats :** L'analyse *in silico* du génome de *M. a. paratuberculosis* K-10 nous a indiqué que le gène *lbp* était présent et conservé. La purification de la LBP native de *M. a. paratuberculosis* a été réalisée par chromatographie d'affinité pour l'héparine, précédemment utilisée pour purifier les adhésines d'autres mycobactéries. La LBP de *M. a. paratuberculosis* a été identifiée par spectrométrie de masse. L'analyse a mis en évidence la présence de groupements méthyles, qui sont des modifications post-traductionnelles, portées par la partie C-terminale de la protéine.

Nous avons démontré le rôle d'adhésine joué par la LBP de *M. a. paratuberculosis* par des tests d'adhésion *in vitro*. La LBP recombinante seule est capable d'adhérer à différents composants de la matrice extracellulaire (héparine, laminine et collagène) et aux cellules épithéliales HBE (*Human Bronchial Epithelial cells*).

L'immunogénicité de la LBP a été recherchée contre du sérum d'animaux infectés par *M. a. paratuberculosis* mais également avec du sérum de patients atteints de la maladie de Crohn. Dans le contexte de la maladie de Crohn, Cohavy *et al.*, avaient montré une réactivité du serum de patients de Crohn contre un antigène partiellement défini comme HupB (= LBP) et présent chez les mycobactéries (<sup>52</sup>Cohavy, 1999). En utilisant la LBP recombinante de *M. a. paratuberculosis* et un panel de sérums de patients atteints de Crohn nous avons confirmé, par immuno-blot et ELISA, que dans certain cas de Crohn la LBP pouvait être révélée.

**Conclusion-Discussion** : Cette étude décrit pour la première fois la caractérisation génétique et biochimique de la LBP de *M. a. paratuberculosis*. L'implication de cette protéine dans l'adhésion du bacille a été mise en évidence par différents tests d'interactions cellulaires : bactéries/cellules, protéines/cellules et protéines/composants de la matrice extracellulaire. L'adhésine LBP participe à l'adhésion à la cellule hôte en coopération avec d'autres adhésines précédemment décrites telles que la FAP (<sup>222-224</sup> Secott, 2004) ou la protéine de 35 kDa (<sup>17</sup>Bannantine, 2003) mais qui n'ont aucune similitude de séquence avec la LBP.

La maladie de Crohn est une pathologie très complexe qui met en jeu des facteurs génétiques, environnementaux et microbiens. Dans les années 90, Cohavy *et al.*, avait tenté d'identifier l'autoantigène d'une population d'anticorps nommée pANCA (*Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies*) présente à 25% chez les patients de Crohn. Leur analyse avait établi que l'antigène identifié comme HupB pouvait être reconnu par les fractions Fab des pANCA et qu'une réponse IgA anti-HupB était associée spécifiquement aux cas de Crohn. Avec de meilleures connaissances de cet antigène HupB, qui correspond en fait à la LBP, il était intéressant de revisiter cette observation avec la LBP recombinante de *M. a. paratuberculosis*. La reconnaissance de la LBP par un panel de sérums de patients de Crohn, en accord avec les résultats de Cohavy, semble suggérer que la LBP peut jouer un rôle dans la pathogénie de *M. a. paratuberculosis* et dans un autre contexte que la paratuberculose, en particulier dans la maladie de Crohn ou *M. a. paratuberculosis* peut être isolé.

Original article

## Characterization of the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* laminin-binding/histone-like protein (Lbp/Hlp) which reacts with sera from patients with Crohn's disease

Louise H. Lefrançois<sup>a,1</sup>, Céline Pujol<sup>a,1</sup>, Christelle C. Bodier<sup>a</sup>, Ana Paula Teixeira-Gomez<sup>b</sup>,  
Hervé Drobecq<sup>c,d,e</sup>, Marie-Laure Rosso<sup>a</sup>, Dominique Raze<sup>d,e,f,g</sup>, André Alves Dias<sup>h</sup>,  
Jean-Pierre Hugot<sup>i</sup>, Ofelia Chacon<sup>j</sup>, Raul G. Barletta<sup>j</sup>, Camille Locht<sup>d,e,f,g</sup>,  
Maria Cristina Vidal Pessolani<sup>h</sup>, Franck Biet<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> INRA, UR1282, Infectiologie Animale, Santé Publique (IASP-311), F-37380 Nouzilly, France

<sup>b</sup> INRA, Plate forme d'Analyse Intergrative de Biomarqueur, F-37380 Nouzilly, France

<sup>c</sup> CNRS UMR 8525, Lille, France

<sup>d</sup> Univ Lille Nord de France, Lille, France

<sup>e</sup> Institut Pasteur de Lille, Lille, France

<sup>f</sup> INSERM U1019, Lille, France

<sup>g</sup> CNRS UMR 8204, Lille, France

<sup>h</sup> Laboratory of Cellular Microbiology, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>i</sup> INSERM UMR 843, Université Paris Diderot, Hôpital Robert Debré, Paris, France

<sup>j</sup> School of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, University of Nebraska, Lincoln, NE 68583, USA

Received 21 October 2010; accepted 2 February 2011

Available online 18 February 2011

### Abstract

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) causes a chronic enteric disease in ruminants, called paratuberculosis or Johne's disease. The current model proposes that after ingestion by the host, *Map* crosses the intestinal barrier via internalization by the M cells. Experimental observations suggest, however, that *Map* may also transcytose the intestinal wall via the enterocytes, but the mechanisms involved in this process remain poorly understood. Cytoadherence assays performed on epithelial cells with *Map* revealed that the addition of laminin to the cell culture increases adhesion. A *Map* protein was isolated by heparin–Sepharose chromatography and identified as a laminin-binding protein like. The gene encoding this protein named Lbp/Hlp was identified in the *Map* genome sequence at locus MAP3024 (annotated Hup B). The deduced *Map* Lbp/Hlp amino acid sequence reveals 80% identity with that reported for other mycobacteria. The C-terminal domain involved in adhesion is mainly composed of arginine and lysine residues modified by methylation. In vitro tests demonstrated that recombinant Lbp/Hlp binds laminin, heparin, collagen and epithelial cells. Interestingly, we found that this adhesin corresponds to the antigen described as the target of pANCA and serum antibodies of patients with Crohn's disease.

© 2011 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*; Adhesin; Laminin-binding; Crohn

\* Corresponding author. Tel.: +33 2 47 42 78 69; fax: +33 2 47 42 77 79.

E-mail address: Franck.Biet@tours.inra.fr (F. Biet).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

## 1. Introduction

*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (*Map*) is an intracellular pathogen that has adapted to the gastrointestinal tract of ruminants and other animals. This pathogen causes a slowly developing, but eventually fatal, inflammatory disorder called Johne's disease or paratuberculosis. The main lesions of paratuberculosis in ruminants are located in the small intestine. One route for *Map* entry into the small intestine is through M cells found in the follicle-associated epithelium lining the domes of the Peyer's patches [1]. Another route may include translocation into the intestinal mucosa through epithelial cells [2,3]. This dual translocation has recently been shown to occur in a B cell-deficient mouse model of *Map* infection [4]. Upon translocation, *Map* readily infects and multiplies within inactivated intestinal macrophages [5–8].

The molecular determinants involved in the adherence of *Map* to epithelial cells have not all been identified yet. Previous studies have identified and characterized mycobacterial surface-exposed adhesins, such as the laminin-binding protein (Lbp) [9,10], also called histone-like protein (Hlp) [11,12] or mycobacterial DNA-binding protein (Mdp1) [13] and annotated HupB in the genomic database. This protein was initially described to play a role in the interaction between *Mycobacterium leprae* and Schwann cells [14–17]. More recently Lbp/Hlp was also shown to mediate the adhesion of mycobacteria to epithelial respiratory cells by interacting with proteoglycan-containing receptors such as heparan sulphate and hyaluronic acid [10,13]. In this study, cytoadherence assays have revealed that interaction of *Map* with epithelial cells is increased in the presence of laminin. These observations suggest that *Map* expresses a surface-exposed laminin-binding protein with properties similar to Lbp/Hlp. In the present study, we describe the purification and characterization of the *Map* Lbp/Hlp homologue.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains, growth conditions and DNA manipulations

*M. avium* subsp. *paratuberculosis*, strains K-10 (ATCC BAA-968), (ATCC 19698) and Linda, *M. avium* subsp. *hominis* strain 104 (*Mah*), *M. avium* subsp. *avium* ATCC 25291 (*Maa*) and *Mycobacterium smegmatis* strain mc<sup>2</sup>155 were grown at 37 °C in Sauton medium [18] or Middlebrook 7H9 broth (Difco Laboratories, Detroit, MI), with glycerol 0.2% and ADC (albumin-dextrose-catalase enrichment medium, Becton Dickinson, Le Pont de claux, France). *Map* cultures were also supplemented with 2 mg L<sup>-1</sup> mycobactin J (IDVET, Montpellier, France). Bacteria were harvested at mid-log phase and kept frozen (–80 °C) in aliquots until use. *Escherichia coli* BL21(DE3) (Novagen, Darmstadt, DE), *E. coli* TOP10 (Invitrogen Carlsbad, CA) and *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, Le Jolla, CA) were grown in LB medium [19] supplemented with 30 µg ml<sup>-1</sup> kanamycin as appropriate.

Restriction enzymes, T4 DNA ligase and other molecular biology reagents were purchased from New England Biolabs, Roche or Promega. PCRs were performed using a Bio-Rad thermal cycler model iCycler, and the PCR products were sequenced by GenomExpress (Grenoble, France).

### 2.2. Construction of bioluminescent and fluorescent *Map* strains

Green fluorescent protein (GFP)- and luciferase-expressing strains were obtained by electroporation of the pSMT3LxEGFP [20] carrying both the *GFP*- and the bacterial *luciferase*-coding genes (*Lux*) into *Map* strains K-10 and Linda. Bacterial cultures (150 ml) were grown to mid-log phase in Sauton medium and were centrifuged at 4500 × *g* for 15 min. The pellets were resuspended in 150 ml 10% glycerol. Cells were centrifuged again, washed three times with 75 ml 10% glycerol, and resuspended in 5 ml 10% glycerol. Electroporation-ready mycobacterial cells were aliquoted and frozen at –80 °C until further use. For transformation, 1 µg of pSMT3LxEGFP DNA was mixed with 50 µl of electroporation-ready cell suspension and pulsed with a Cellject electroporator (Eurogentec, Liège, Belgium) at 2.5 kV, 800 Ω and 25 µF. The cells were then harvested in 1 ml Sauton medium and plated onto the Middlebrook 7H10 medium supplemented with ADC, 0.2 µg ml<sup>-1</sup> mycobactin and 50 µg ml<sup>-1</sup> of hygromycin. The plates were incubated at 37 °C, and colonies were isolated after 30–40 days.

### 2.3. Cytoadherence of *Map* to A549 epithelial cells

A549 cells were routinely grown at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, in DMEM (Lonza) containing 10% fetal bovine serum (Invitrogen), and supplemented with L-glutamine 2 mM. Twenty four hours before the adhesion assay, 1.5 × 10<sup>5</sup> cells/well were seeded in a 24 well plate. To prepare the inocula, the mycobacteria were grown in static conditions in enriched 7H9 Middlebrook broth supplemented with 0.05% Tween 80. Mid-log phase bacteria were washed once with phosphate buffered saline (10 mM phosphate buffer pH 7.2, 0.15 M NaCl; PBS) and resuspended in DMEM. The suspension was vigorously shaken and passed through a 27-G needle three times to disrupt bacterial aggregates. The presence of isolated mycobacterial cells was confirmed by microscopic observation. Confluent monolayers were washed twice by PBS before the addition of the appropriate fluorescent-bioluminescent *Map* strain e.g., Linda/GFPlux and K-10/GFPlux (green). The bacterial concentration was adjusted in DMEM and monolayers were infected at a multiplicity of infection of 10. After 3 h of contact, the infected cells were washed three times with PBS and then lysed for 10 min in 0.1% Triton X-100 followed by another 10 min after addition of an equal volume of 0.025% SDS. The percentage of adhesion was estimated by fluorescence and calculated by luciferase assays, as described below. Cytoadherence of *Map* to A549 cells was analyzed by fluorescence microscopy. The samples were fixed with PFA, and stained with Evans Blue to stain the eukaryotic cells. Images

were taken with a 40× objective. The number of cell-associated bacteria is expressed as relative light units (RLU).

Luminescence was measured by using a Berthold Lumat LB 9507 tube luminometer. As needed, the crude cell lysates were diluted in PBS containing 0.05% Tween 80. Aliquots (100 µl) of each sample were transferred into a polystyrene test tube (Falcon, PLAM0908) containing 900 µl dilution buffer and the luciferase activity was measured. Prior to substrate addition, automatic background subtraction was performed for 1 s. 100 µl of 1% decanal (Sigma) in ethanol was then automatically injected into each tube and the bioluminescence was measured over 20 s. Raw data were collected in triplicate and the mean RLU readings were automatically calculated by the luminometer in-core software. Adhesion assays were performed in triplicate. The percentage of adhesion was calculated by the following formula: (cell-associated RLU/RLU of the inoculum) × 100. The average and the standard deviation were calculated with the GraphPad Prism software.

#### 2.4. Cloning, sequencing and recombinant expression of the *Map Lbp/Hlp*-encoding gene

The *Lbp/Hlp*-encoding gene (MAP3024c) was amplified by PCR from chromosomal DNA using the *Pfu* DNA polymerase (Promega) and two synthetic oligonucleotides (Sigma) with the following sequences: 5'-TATACATATGCACCACCACCA CCACCACATGAACAAGGCAGAGCTCATTGATG-3' (*Map Lbp/Hlp S*) and 5'-ATATAAGCTTCTACTTGCGGCCGCGA CGCGCGG-3' (*Map Lbp/Hlp AS*), containing an *NdeI* and *HindIII* sites, respectively (underlined). The oligonucleotide *Map Lbp/Hlp S* sequence was designed to produce a hybrid protein carrying a His-tag at the N-terminal position used for affinity purification of the recombinant protein. The PCR product containing the *Lbp/Hlp*-coding sequence was digested by *NdeI* and *HindIII* and then inserted into pET-24d(+) (Novagen), generating pET::Lbp/Hlp. This plasmid was used to transform *E. coli* XL1-Blue for sequencing and *E. coli* BL21(DE3) for protein purification. The recombinant *Map Lbp/Hlp* was purified as previously described [21]. The GenBank accession numbers for the *Map Lbp/Hlp* (strains K-10, 19698 and 316F), *Maa-Lbp/Hlp* and *Mah-Lbp/Hlp* sequence are mapK10\_Lbp/Hlp GU324235, map19698\_Lbp/Hlp GU324236, map316F\_Lbp/Hlp GU324237, maa25291\_Lbp/Hlp GU324238, mav104\_Lbp/Hlp GU324239, respectively.

#### 2.5. Purification of native *Lbp/Hlp* from *Map* by heparin–Sepharose chromatography

Mycobacteria were grown at 37 °C in static conditions using 250 cm<sup>2</sup>-Roux flasks containing 150 ml Sauton medium. Once the stationary phase was reached, the cultures were centrifuged at 10,000 × *g* for 20 min and the bacilli were resuspended in PBS and sonicated at 4 °C. The soluble material obtained after centrifugation at 25,000 × *g* for 25 min at 4 °C was applied onto a heparin–Sepharose CL-4B (Amersham Pharmacia Biotech) column (1 × 5 cm) equilibrated with PBS 0.5×. Native *Lbp/Hlp*

were eluted using a linear 0–800 mM NaCl prepared in 80 ml PBS. The fractions eluted at ca. 600 mM NaCl were analysed by SDS-PAGE, transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Immobilon P; Millipore) and probed with monoclonal antibody 3921E4 as described elsewhere [22].

#### 2.6. Mass spectrometry analysis

As previously described [22] purified proteins were separated by SDS-PAGE under reducing conditions and stained with 0.1% Coomassie brilliant blue R250 in 20% methanol/0.5% acetic acid. The selected protein band was excised and subjected to in-gel digestion with modified trypsin (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). The resulting peptides were extracted with 60% acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid, applied onto a 0.2 × 50 mm C18 capillary reverse phase column (Michrom BioResources, Auburn, CA) and eluted with an increasing acetonitrile gradient using a MicroPro capillary HPLC system (Eldex Laboratories, Napa, CA). The reverse phase effluent was introduced directly into a Finnigan LCQ (Thermoquest, San Jose, CA) electrospray mass spectrometer, and the peptides were analyzed by MS and MS/MS. The electrospray needle was operated at 4 kV with a sheath gas flow of N<sub>2</sub> at 40 p.s.i. and a capillary temperature of 200 °C. MS/MS was automatically performed on the most dominant ion of the previous MS scan and the collision energy was set at 40%. MS/MS spectra were searched against the *Map* database by using Xcalibur, Bioworks 3.1 turbo SEQUEST software (ThermoFinnigan, San Jose, CA). The software was set to consider protein *M<sub>r</sub>* ranging from 500 to 3,500, trypsin digest (two missed cleavage sites) peptide mass tolerance ±1.5 Da, fragment ions mass tolerance ±0.5 Da, monoisotopic mass, the oxidation of methionine (+16.0), the acrylamide modification of cysteine (+71.0) and mono-, di- and tri-methylation of lysine (+14, +28 and +42, respectively). The ion scores of the non-methylated peptide and the methylated peptide were 6.2 and 2.0, respectively. Sequest results were confirmed by manually comparing observed and predicted fragmentation patterns for the identified peptides.

#### 2.7. DNA and protein analysis

Multiple DNA and amino acid alignments were performed with CLUSTAL W [23] (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>).

#### 2.8. Binding of recombinant *Map Lbp/Hlp* to laminin, collagen and heparin

To monitor the capacity of recombinant *Map Lbp/Hlp* to bind to laminin-2 (human merosin purchased from Invitrogen, Carlsbad, CA), heparin or collagen I (Sigma, St. Louis, MO), 1.0 µg ml<sup>-1</sup> of each of these components in 50 µl 0.1 M carbonate buffer (pH 9.6) were used to coat the wells of polystyrene microplates (Corning, New York, NY). The microtiter plates were incubated overnight at 4 °C. The wells were then washed with PBS and blocked for 2 h with 200 µl PBS-3% bovine serum albumin (BSA) at room temperature. After washing with PBS/0.05% Tween 20 (PBS/T), 50 µl of

different concentrations of recombinant *Map* Lbp/Hlp or *M. leprae* rGCP/ML0379 were added to the wells and incubated at 37 °C for 2 h. The wells were then rinsed with PBS/T and incubated with the anti-Lbp/Hlp monoclonal antibody 5G9 [14] (1:500) for 1 h at 37 °C. After washing with PBS/T, rabbit anti-mouse IgG peroxidase conjugate (Sigma; 1:1000) or anti-His mouse monoclonal antibody (1:3000; Amersham Pharmacia Biotech) was added and incubated for an additional 50 min at 37 °C. Peroxidase activity was revealed with hydrogen peroxide and O-phenylenediamine (OPD). The reaction was stopped with HCl and read at 490 nm with a TitertekPlus microplate reader (ICN Biomedicals Inc., Costa Mesa, CA). Control wells coated with BSA were included in all binding assays.

### 2.9. *In vitro* adherence assays with recombinant *Map* Lbp/Hlp

16 HBE cells ( $7 \times 10^4$  cells/well) were cultured in 24 well plates containing glass slips. Polystyrene beads (3- $\mu$ m diameter, Sigma) were coated with recombinant *Map* Lbp/Hlp or BSA (50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) for 3 h at room temperature in 0.2 M carbonate–bicarbonate buffer (pH 9.6). All beads were washed twice with PBS and blocked with 2% of BSA in PBS for 2 h. After washing, beads were added to the cells (10:1 ratio) for 1 h at 37 °C. Cells were then washed six times with PBS, fixed with methanol and stained by crystal violet. The numbers of microspheres attached to 100 cells were counted by light microscopy (Optiphot-2, Nikon, Tokyo, Japan).

### 2.10. Immunoblots analyses and ELISA

Immunoblots and ELISA were carried out to analyze the presence of antibodies against Lbp/Hlp in human serum of Crohn's disease (CD) patients and serum from cattle naturally infected with *Map*. The sera were collected from the St. Antoine and R. Debré hospitals, Paris, France, and recently described [24]. The clinical status of all patients was determined from their medical records. The human sera included eight serum samples from patients with an active form of CD (6 males, 2 females) and eight control sera from healthy donors (4 males, 4 females). Cattle sera were obtained from *Map*-infected and non-infected animals [25].

Diagnoses were established by ELISA (Bovigam Prionics Zurich Switzerland and ELISA Paratuberculosis, Institut Pourquier Montpellier France) and bacteriological culture of *Map*. For ELISA, Maxisorp microtiter plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with 50  $\mu$ l of recombinant *Map* Lbp/Hlp at 0.1 mg ml<sup>-1</sup> in PBS at 37 °C overnight. Plates were then washed three times with PBS/T and blocked for 1 h at 37 °C with PBS/T containing 0.5% (w/v) Gelatine (PBS/T/G). Each serum sample was diluted at 1:100 in 50  $\mu$ l PBS/T/G, and plates were incubated for 2.5 h at 37 °C. Plates were then washed five times with PBS/T and incubated for 90 min at 37 °C with 50  $\mu$ l Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-human-IgG, GAHu/Ig/PO (Nordic Immunological Laboratories, The Netherlands) diluted at 1:500 dilution in PBS/T/G, or

peroxidase-conjugated anti-ruminant-IgG (CHEKIT, Bern, Schweiz) diluted at 1:600 in PBS/T/G. Plates were washed five times with PBS/T, and 50  $\mu$ l peroxidase substrate was added. After 30 min incubation at 37 °C, the reaction was stopped with 50  $\mu$ l 2 N HCl, and the plates were read photometrically at 414 nm.

Cell extracts and recombinant *Map* Lbp/Hlp were subjected to SDS-PAGE on a 15% gel, as described [26]. Proteins were then transferred onto Protean nitrocellulose membrane (Whatman, Germany). The membranes were blocked with 1% BSA in PBS/T for 90 min. The membranes were then incubated with monoclonal antibodies 3921E4 or 4057D2, as described previously [27–29], or with serum from patients with CD or from healthy donors, at a 1:100 dilution in 1% BSA in PBS/T, or with sera from cattle infected or not by *Map* at 1:100 dilution in 1% BSA in PBS/T. The membranes were then washed three times with PBS/T and incubated with goat anti-human alkaline phosphatase-conjugated antibody (Jackson immuno research, Baltimore PA) at 1:10,000 dilution, goat anti-mouse alkaline phosphatase-conjugated antibody (Caltag, Burlingame CA) at 1:2000 dilution, or mouse anti-bovine/ovine antibody (Serotec, Oxford UK) at 1:200 dilution. Nitro blue tetrazolium and 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate substrates were used to develop the immunoblots.

## 3. Results

### 3.1. Increase of *Map* adherence to epithelial cells by exogenous laminin

Previous reports have shown that adherence of mycobacteria to epithelial cells can be modulated by the addition of extracellular matrix [30]. Using the recombinant *Map* strain Linda/GFPlux and K10/GFPlux we tested whether soluble exogenous laminin increases the cytoadherence of *Map* to A549 epithelial cells. As shown in Fig. 1A, *Map* Linda/GFPlux (Green) is able to adhere to the A549 epithelial cells, stained with Blue Evans (red) and assessed qualitatively by fluorescence microscopy. This process is more efficient in the presence of laminin (Fig. 1A, right panel). Quantification of *Map* adherence by the luciferase assay indicated that this adhesion to epithelial cells is significantly increased from 10 to 18% in the presence of exogenous laminin (Fig. 1B).

### 3.2. Purification and identification of recombinant *Map* Lbp/Hlp onto heparin–Sepharose

The increased adherence of *Map* to epithelial cells induced by laminin suggests that *Map* expresses an adhesin on its surface, which could be a homologue of Lbp/Hlp. This same protein is referred to by several names, such as laminin-binding protein Lbp [17], histone-like protein/laminin-binding protein Hlp/Lbp [11] or mycobacterial DNA-binding protein Mdp1 [13]. Thus, to isolate and identify the *Map* protein expressing this activity, we performed a heparin–Sepharose chromatography assay on a soluble extract from the *Map* strain K-10 culture. This assay has previously been developed to

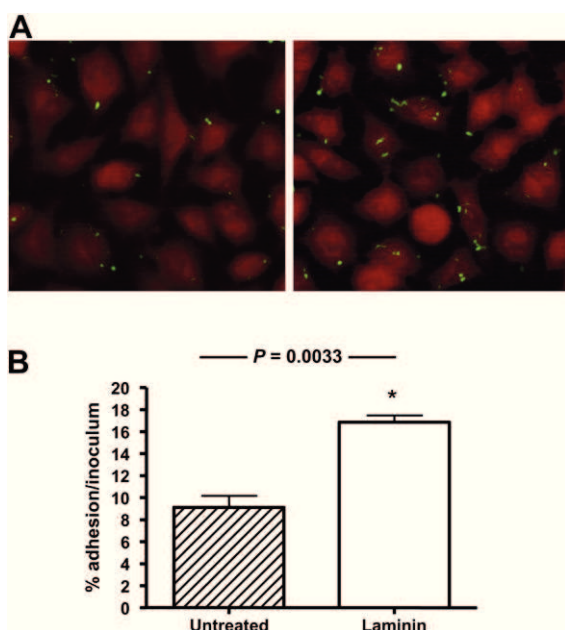


Fig. 1. Cytoadherence of *Map* to A549 epithelial cells increases in the presence of exogenous laminin. A549 cells were infected by the *Map* strain Linda/GFPlux in the presence or absence of laminin. (A) Fluorescence microscopy analysis of the A549 cells infected by Linda/GFPlux (green). The samples were fixed with PFA and stained with Evans Blue (red). Images taken with a 40 $\times$  objectives represent the overlay of Evans Blue and GFP signals. (B) Quantification of Linda/GFPlux adhesion by luciferase assays. The percentage of adhesion is calculated as the number of 100  $\times$  cell-associated RLU/RLU of the inoculum. The graph shows the averages of triplicate samples from one representative of four independent experiments. \**P* value was calculated using an unpaired two-tailed *t*-test using GraphPad Prism version 5.00 for Windows where *P* < 0.05 was considered statistically significant. The error bars represent the standard deviation.

purify orthologous Lbp/Hlp proteins from other mycobacteria [22]. As shown in Fig. 2A, SDS-PAGE analysis of the eluted fractions revealed that a 31-kDa protein was predominantly detected in the 600 mM NaCl fractions (fractions 11–13). The protein band was excised from the gel and subjected to trypsin digestion. Mass spectrometry analysis of the resulting peptides and BLASTP analysis revealed that it corresponds to the mycobacterial laminin-binding/histone-like protein (Lbp/Hlp), previously described in *M. leprae*, *M. smegmatis* and *M. tuberculosis*. As described for orthologous Lbp/Hlp proteins, the *Map* counterpart (MAP3024c, *hupB*) is recognized by monoclonal antibody 3921E4 [10], as depicted in Fig. 2B. This cross-reaction confirmed that *Map* Lbp/Hlp shares the epitope APAKKAA.

Amino acid sequence analysis shows that MAP3024c, *hupB* codes for a 212-amino acid protein *Map* Lbp/Hlp. The alignment of the amino acid sequences of the Lbp/Hlp from different mycobacterial species indicates that these molecules are highly conserved (Fig. 3). Within the *M. avium* complex (MAC) the amino acid sequences of Lbp/Hlp show 100% identity. Sequences were analysed after sequencing of the Lbp/Hlp gene from the following representative MAC strains: *Mah* strain 104, *Maa* reference strain ATCC 25291, *Map* strains K-10 ATCC BAA-968, the reference strain ATCC 19698 and the vaccine

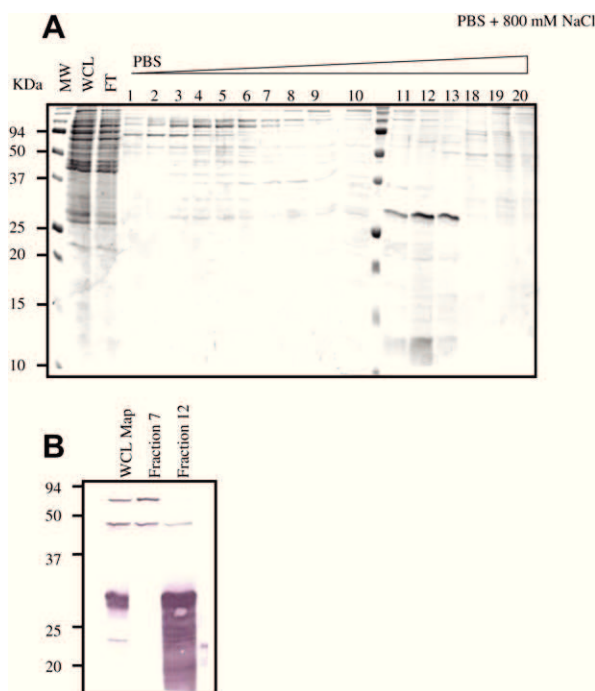


Fig. 2. Purification of native Lbp/Hlp by heparin–Sepharose chromatography. *Map* was grown at 37  $^{\circ}$ C in static conditions. At the stationary phase, the cultures were disrupted by sonication, and the soluble material was applied onto a heparin–Sepharose CL-4B column. Lbp/Hlp was eluted using a linear NaCl gradient (panel A). The fractions eluted at ca. 600 mM NaCl (fractions 11–13) contained Lbp/Hlp, as determined mass spectrometry and immunoblot analyses using monoclonal antibody 3921E4 (panel B). MW, Molecular Weight; WCL, Whole Cell Lysate; FT, Flow-Through.

strain 316F Merial. *Map* Lbp/Hlp shares 80% identity and 84% similarity with the *M. tuberculosis* complex orthologues, including *M. tuberculosis*, *M. bovis* and *M. bovis* BCG. *Map* Lbp/Hlp is also related to the *M. leprae* Lbp/Hlp with 77% identity and 80% similarity. In addition, a high score of similarity was found with the Lbp/Hlp produced by the non-pathogenic strain *M. smegmatis* with 86% identity and 91% similarity. Sequence similarities among the Lbp/Hlp are particularly high in the N-terminal part, up to residue 119 with more than 93% identity and 97% similarity. The apparent divergence in the C-terminal regions, containing 75% L-alanine and L-lysine residues, is due to variations of the number of lysine-rich repeats.

### 3.3. Evidence for post-translational methylation of *Map* Lbp/Hlp

Previous studies indicated that native Lbp/Hlp exhibits an apparent molecular weight slightly higher than that predicted from the amino acid sequence [22,31]. This suggests that the Lbp/Hlp-(like) protein may be post-translationally modified. Biochemical analyses of the *M. smegmatis* and *M. tuberculosis* Lbp/Hlp proteins revealed that the lysine-rich repeats in the C-terminal domain are methylated by post-translational modifications [9], resulting in a protein with increased molecular weight. We therefore compared by immunoblot

```

Mtb 1 MNKAELIDVLTQKLGSDRRQATAAENVVDTIVRAVHKGDVSVITGFVFVEQRRRAARVARNPRTGETVVKVKPTSVPAFR 80
Mb 1 MNKAELIDVLTQKLGSDRRQATAAENVVDTIVRAVHKGDVSVITGFVFVEQRRRAARVARNPRTGETVVKVKPTSVPAFR 80
BCG 1 MNKAELIDVLTQKLGSDRRQATAAENVVDTIVRAVHKGDVSVITGFVFVEQRRRAARVARNPRTGETVVKVKPTSVPAFR 80
M1 1 MNKAELIDVLTQKLGSDRRQATAAENVVDTIVRAVHKGDVSVITGFVFVEQRRRAARVARNPRTGETVVKVKPTSVPAFR 80
Map 1 MNKAELIDVLTQKLNDRRQATAAENVVDTIVRAVHKGDVSVITGFVFVEQRRRAARVARNPRTGETVVKVKPTSVPAFR 80
Maa 1 MNKAELIDVLTQKLNDRRQATAAENVVDTIVRAVHKGDVSVITGFVFVEQRRRAARVARNPRTGETVVKVKPTSVPAFR 80
Mah 1 MNKAELIDVLTQKLNDRRQATAAENVVDTIVRAVHKGDVSVITGFVFVEQRRRAARVARNPRTGETVVKVKPTSVPAFR 80
Ms 1 MNKAELIDVLTQKLNDRRQATAAENVVDTIVRAVHKGDVSVITGFVFVEQRRRAARVARNPRTGETVVKVKPTSVPAFR 80
C ***** :*.;*****

Mtb 81 PGAQFKAVVSGAQRLEAEGPAVKRGGVGAASAARK-VA-KKAPAKKA----TKAAKKAATKAPARKAAT-KAPAKKAATKAP 153
Mb 81 PGAQFKAVVSGAQRLEAEGPAVKRGGVGAASAARK-VA-KKAPAKKA----TKAAKKAATKAPARKAAT-KAPAKKAATKAP 153
BCG 81 PGAQFKAVVSGAQRLEAEGPAVKRGGVGAASAARK-VA-KKAPAKKA----TKAAK-----KAAT-KAPAKKAATKAP 144
M1 81 PGAQFKAVVSGAQRLEAEGPAVKRGGVATSAARK-AAIKKAPVKKA-----LAK-----KAAT-KAPAKK-AVKAP 142
Map 81 PGAQFKAVVSGAQRLEPSEGPVKRGGVGGAAKKTAA-KKAPAKKAAAKKAPAKKAAAKKAPAKKAAVKKAPARKAATKAP 159
Maa 81 PGAQFKAVVSGAQRLEPSEGPVKRGGVGGAAKKTAA-KKAPAKKAAAKKAPAKKAAAKKAPAKKAAVKKAPARKAATKAP 159
Mah 81 PGAQFKAVVSGAQRLEPSEGPVKRGGVGGAAKKTAA-KKAPAKKAAAKKAPAKKAAAKKAPAKKAAVKKAPARKAATKAP 159
Ms 81 PGAQFKAVVSGAQRLEPSEGPVKRGGVGGAAKKTAA-KKAPAKKAAAKKT-ATKAAAKKAPAKKAAAT-KAPAKKAATKAP 156
C ***** :**.*. :***** ..***.* ***** * ***** * ** * *****
                                          *

Mtb 154 AKKAVKATKSPAKKVTAKVKTAVKASVRKAATKAPAKKAAAKRPAATKAPAKKAT-ARRGRK 214
Mb 154 AKKAVKATKSPAKKVTAKVKTAVKASVRKAATKAPAKKAAAKRPAATKAPAKKAT-ARRGRK 214
BCG 145 AKKAVKATKSPAKKVTAKVKTAVKASVRKAATKAPAKKAAAKRPAATKAPAKKAT-ARRGRK 205
M1 143 AKKIVTAVKVPAKKATKVVKVAAPVRKATTRALAKKAAVK----KAPAKVTAAKRGRK 200
Map 160 VRKA--ATKAPAKKV-----AAKAPAKKAATKAPAKKAAKAPARKAAAKKTT-ARRGRK 212
Maa 160 VRKA--ATKAPAKKV-----AAKAPAKKAATKAPAKKAAKAPARKAAAKKTT-ARRGRK 212
Mah 160 VRKA--ATKAPAKKV-----AAKAPAKKAATKAPAKKAAKAPARKAAAKKTT-ARRGRK 212
Ms 157 AKKA--ATKAPAKK-----AATKAPAKKAAAKAPAKKAAKAPARKAAAKKAP-ARRGRK 208
C .:* *.* **** *.*..*.:* * ***** * ** *.*.***** *.;**
    
```

Fig. 3. Sequence alignment of the mycobacterial Lbp/Hlp. The amino acid sequences of the *M. tuberculosis* Lbp were aligned with those of its homologues from other mycobacterial species by using the Clustal W program with the BLOSUM64 matrix allowing gaps (–). \*, identical residues; ., conserved substitutions; ;, semi-conserved substitutions. The boxed heptapeptide APAKKAA constitutes part of the epitope recognized by the monoclonal antibody mAb 3921E4. Mtb, *Mycobacterium tuberculosis*; Mb, *Mycobacterium bovis*; BCG, *Mycobacterium bovis* BCG; M1, *Mycobacterium leprae*; Map, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*; Maa, *Mycobacterium avium* subsp. *avium*; Mah, *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*; Ms, *Mycobacterium smegmatis*; C, consensus.

analysis the apparent molecular weights of purified native and recombinant *Map* Lbp/Hlp. Monoclonal antibody 4057D2 used to probe the immunoblot reacted more intensively with the native *Map* Lbp/Hlp, exhibiting an apparent molecular weight slightly higher than the recombinant Lbp/Hlp (Fig. 4B). This result strongly suggests that native Lbp/Hlp also undergoes post-translational modifications in *Map*. To confirm the post-translational modifications of *Map* Lbp/Hlp and to identify its nature, mass spectrometry analysis of *Map* Lbp/Hlp was carried out. The mass spectrometry analysis revealed two peptides within the C-terminal lysine-rich repeats domain of the *Map* Lbp/Hlp which are methylated.

### 3.4. Map Lbp/Hlp binds mammalian extracellular matrix and promotes adhesion to epithelial cells

The presence of a large lysine-rich C-terminal domain in *Map* Lbp/Hlp and its NaCl elution profile from immobilized heparin suggest that ionic interactions are likely involved in the interaction of this protein with heparin and laminin. This hypothesis is in agreement with a recent study that mapped the binding domain of the *M. leprae* Lbp/Hlp [32]. We evaluated whether purified recombinant *Map* Lbp/Hlp was able to bind heparin and different matrix proteins including laminin-2 and collagen I by using a solid phase interaction assay. As shown in Fig. 5A, recombinant *Map* Lbp/Hlp did not bind to BSA. In contrast, it was able to interact with laminin-2, heparin and collagen I in a dose-dependent and saturable manner. The irrelevant his-tagged recombinant protein (rGCP/ML0379) showed levels of binding similar to the background. These results confirm the direct and specific interaction between the Lbp/Hlp and the mammalian extracellular matrix containing heparan sulphate chains. To determine the capacity of this protein to promote the adhesion to epithelial cells, latex beads coated with recombinant *Map* Lbp/Hlp were prepared. Fig. 5B shows that Lbp/Hlp was able to significantly increase the adherence of latex beads to epithelial cells when compared with the control beads coated with BSA.

### 3.5. Sera from Crohn's disease patients react with Map Lbp/Hlp

Intestinal bacteria have been increasingly implicated as an environmental factor in inflammatory bowel disease (IBD), due to their mucosal localization and antigenic and immunomodulatory

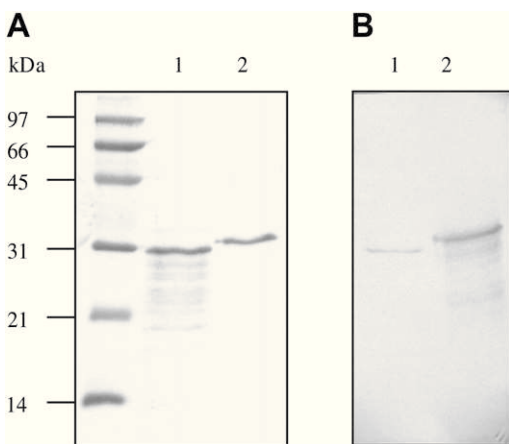


Fig. 4. Evidence for a post-translational methylations of *Map* Lbp/Hlp. SDS-PAGE (A) and immunoblot (B) analysis of purified recombinant *Map* Lbp/Hlp produced in *E. coli* BL21(DE3) (lanes 1) and native *Map* Lbp/Hlp purified by heparine–Sepharose chromatography (lanes 2). The immunoblots were probed with monoclonal antibody 4057 D2. Sizes of molecular weight markers (kDa) are indicated to the left.



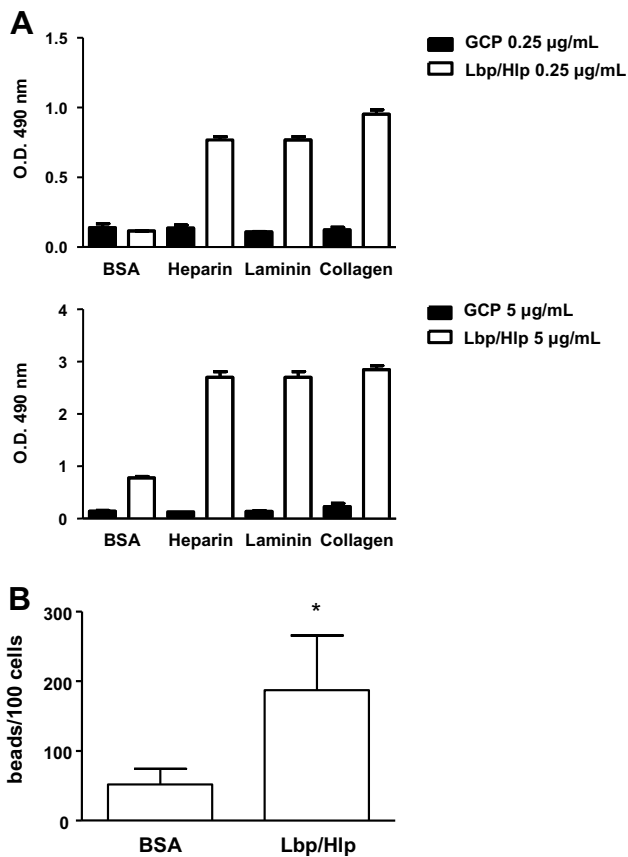


Fig. 5. Recombinant *Map* Lbp/Hlp promotes adhesion to laminin, collagen, heparin to epithelial cells. (A) Laminin-2, heparin and collagen I were used to coat the wells of polystyrene microplates. The wells were then washed with PBS and blocked with PBS-3% BSA. 50 µl of increasing concentrations of rLbp/Hlp or rGCP/ML0379 were then added to the wells and incubated for 2 h. The wells were rinsed with PBS/T and incubated with anti-Hlp monoclonal antibody 5G9 (1:500) or anti-His monoclonal antibody (1:3000). After washing with PBS/T, rabbit anti-mouse IgG peroxidase conjugate was added to the wells. Binding is expressed in absorbency units at 490 nm. Data represent the means  $\pm$  standard deviations of typical experiments carried out in duplicate. Three experiments were carried with similar results. (B) 16 HBE cells were treated with beads pre-coated with Lbp/Hlp or BSA for 1 h, washed extensively with PBS, fixed and stained with crystal violet. The number of beads attached to 100 cells was counted by light microscopy. The data represent the mean values  $\pm$  SD from three experiments with duplicate samples. \* $P < 0.05$ .

components. The human disease-specific immune response might be useful for the identification of microorganisms involved in the disease. High sera levels of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) are a marker of the immune response in IBD associated with ulcerative colitis (UC) and a subset of CD patients. In this context, Cohavy et al. [33] described that specific IgA associated with CD were directed against HupB (Lbp/Hlp, MAP3024c). Moreover, *Map* expresses a higher amount of this protein than other mycobacterial species. This observation led to the speculation that HupB-like proteins produced by *Map* and other colonic bacteria may play an important role in triggering the onset of CD. To confirm that the Lbp/Hlp (MAP3024c, annotated as HupB) described here exhibits similar antigenic properties as HupB described by Cohavy et al. we performed immunoblot analyses and ELISA using sera from well characterized

CD patients on *Map* Lbp/Hlp. The sera from CD patients (Fig. 6A, lane 4) and from cattle with active paratuberculosis (Fig. 6A, lane 6) reacted with purified recombinant *Map* Lbp/Hlp. Eight sera each from CD and healthy controls were then tested individually by ELISA (Fig. 6B). The absorbance for the CD group was significantly higher compared to that of the healthy controls group. Control experiments using an antiserum from healthy or clinical paratuberculosis cattle gave similar results (Fig. 6C). Thus, these results confirm the findings of Cohavy et al. who revealed that the presence of HupB antigen is associated with CD and expand these studies to confirm a similar reactivity in cattle with Johne's disease.

#### 4. Discussion

To mediate adherence during the early steps of infection microbes often hijack eukaryotic cell surface molecules that normally mediate physiological cell processes, including signal transduction, cell to cell signalling, as well as cell and extracellular matrix adhesion. The major part of the cell extracellular matrix consists of glycosaminoglycan (GAGs) molecules, glycolipids and glycoproteins [30]. Many pathogenic and commensal microorganisms have evolved to use

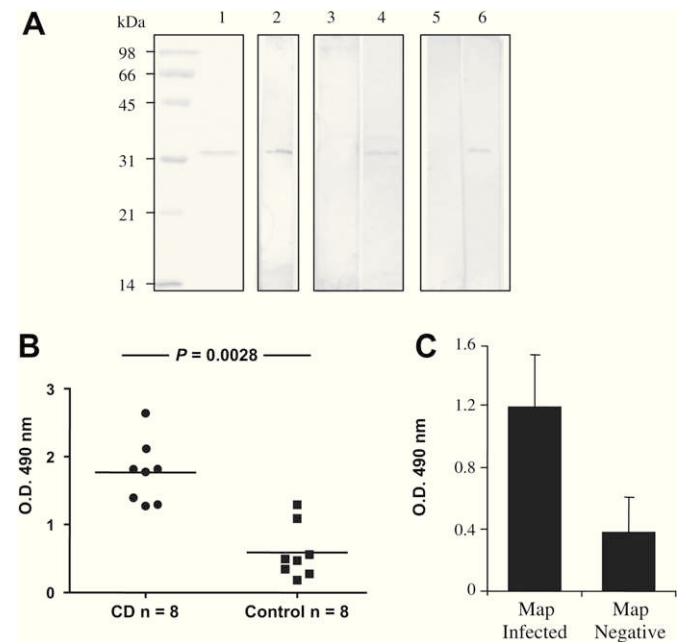


Fig. 6. Reactivity of a CD patient serum with *Map* Lbp/Hlp. (A) Purified *Map* Lbp/Hlp was transferred from 12% polyacrylamide gels (lane 1, stained with Coomassie blue) onto nitrocellulose membranes. Membranes were incubated for 1 h with monoclonal antibody mAb 3921E4 (lane 2), human antiserum from a healthy donor (lane 3), from a CD patient (lane 4), antiserum from uninfected cattle (lane 5) or from cattle infected with *Map* (lane 6). Sizes of molecular weight markers (kDa) are indicated in the left margin. (B) Anti-*Map* Lbp/Hlp antibody responses were determined individually from a panel of CD patient sera and human healthy donors by ELISA. (C) Anti-*Map* Lbp/Hlp antibody responses were determined in sera from infected (negative) *Map*-infected cattle. The results are reported as scatter plots and medians or as means  $\pm$  SD. Group-to-group comparison was performed with the nonparametric Wilcoxon test using GraphPad Prism version 5.00 for Windows where  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

these molecules as receptors for adherence and invasion of eukaryotic cells. In mycobacteria, adhesins HBHA and Lbp have been reported to be involved in these specific interactions with GAGs molecules, such as heparan sulphate present on the surface of various eukaryotic cells types [10,12,31,34]. This study focuses on the *Map* Lbp/Hlp, an adhesin also referred to as Lbp [17], Lbp/Hlp [11] and Mdp1 [13]. It has been reported that Lbp/Hlp is a pivotal adhesion molecule in the mycobacterial pathogenesis. By interacting with laminin present on the surface of the Schwann cells, the Lbp/Hlp produced by *M. leprae* functions as a critical surface adhesin that facilitates bacterial entry into these cells [17]. Lbp/Hlp was shown to play a role in the binding of mycobacteria to alveolar epithelial cells and macrophages [10].

In this study we isolated Lbp/Hlp produced by *Map*. An initial observation showed that the interaction of epithelial cells with *Map* can be mediated by laminin. This observation led us to isolate and characterize the molecule of *Map* involved in this function. These preliminary assays also showed that *Map* is capable of adhering to lung epithelial cells despite *Map* having a tropism for intestinal tissues [1,4]. Purification and mass analysis of native *Map* Lbp/Hlp revealed the characteristic features of this basic highly conserved mycobacterial protein. It consists of a large highly conserved N-terminal domain, covering half of the protein, and a C-terminal domain consisting essentially of lysine/arginine-rich repeats involved in the interaction with GAGs. Native *Map* Lbp/Hlp was found to be methylated. Interestingly this finding has been reported for both mycobacterial HBHA and Lbp [10,11,21]. To date the role of methylation of proteins in prokaryotes is poorly documented. The methylation of the functionally important domain of HBHA has been shown to be crucial for protection against proteolytic degradation. In addition for stabilizing the protein, the methylation of HBHA was shown to play a major role in both B and T cell antigenicity [9,35]. The enzyme(s) involved in these post-translational modifications have not yet been identified. Likewise, it remains unknown whether methylation patterns are identical from one species to another.

Several observations have indicated that the adhesive properties of the Lbp/Hlp are carried by its C-terminal lysine-rich region involved in the electrostatic interactions with laminin and GAGs [11]. Moreover, it was shown that these interactions do not depend on the presence of the methyl groups, which are absent in the recombinant protein produced by *E. coli* [21]. The capacity of Lbp/Hlp to bind epithelial cells and multiple extracellular matrix components highlights its important potential role as adhesin. Interestingly, the binding of Lbp/Hlp to laminin and collagen I observed in this study suggests that this protein may also interact with the host basal membrane. This has been recently described for the *Borrelia burgdorferi* protein CRASP-1 that favours adhesion and tissue invasion via interaction with laminin and collagen I [36]. Lbp/Hlp may act in conjunction with other adhesins in the process of mycobacterial invasion of the host cells. Previous reports have characterized adhesins such as Fibronectin Attachment Protein [36,37], that interacts with integrin type cell receptors, and the surface-exposed 35 kDa protein

(MAP2121c) described to be involved in invasion of epithelial cells but having no sequence similarity with the Lbp/Hlp [2]. Both proteins are involved in interactions with the apical pole of epithelial cells.

Genetic polymorphisms in several genes involved in interaction with microbes predispose to complex diseases such as CD, a major type of inflammatory bowel disease [38]. It is not clear why some individuals with a given polymorphism develop disease, whereas others remain unaffected. The concept that environmental factors, including intestinal bacteria, trigger disease in individuals with a certain genetic background is broadly recognized. The role of certain microorganisms, particularly mycobacteria, is under intense investigation, as specific pattern-recognition receptors involved in the host response are important targets for mycobacterial compounds [39,40]. In this context the human disease-specific immune response might be useful in the identification of microbes involved in the disease. In order to characterize the autoantigen of pANCA, an antibody highly represented in IBD, Cohavy et al. [33] have shown that recombinant HupB from *M. tuberculosis* can be recognized by recombinant Fab of pANCA and specifically reacts with sera from CD patients. Interestingly, the anti-HupB IgA response was shown to be specifically associated with CD but not with other IBD or with healthy donors. Our study characterized the adhesive properties of Lbp/Hlp (HupB) involved in the interaction with the host epithelium that may explain the detection of IgA directed against this antigen. In agreement with observations of Cohavy et al. [33], our results suggest that Lbp/Hlp plays an important role in the association of *Map* with CD. Interestingly, people with CD have 7:1 odds of having a documented presence of *Map* in the blood or gut tissues than those who do not have CD [41]. However, the presence of *Map* could be a secondary phenomenon due to increased gut permeability in CD, or the inability of macrophages from CD patients to kill *Map*.

We have also shown that Lbp/Hlp is detected by the serum of animals with clinical paratuberculosis, which strengthens the notion that Lbp/Hlp may be important in the pathogenesis of Johne's disease. In conclusion, we showed that *Map* Lbp/Hlp is an adhesin that binds laminin, cell receptors containing GAGs and epithelial cells. The immune response observed in the tested CD patients and animals with active paratuberculosis to this protein suggests that Lbp/Hlp may be a relevant adhesin for host infection. Studies are needed to better understand how the bacterium uses Lbp/Hlp in combination with other adhesins to attach to the host gastrointestinal tract epithelium.

## Acknowledgements

Plasmid pSMT3LxEGFP was kindly provided by Graham Stewart, University of Surrey, UK and Olivier Neyrolles, IPBS-University of Toulouse, FR. We are grateful to Florence B. Gilbert INRA IASP-311 for assistance in protein purification. This work was supported by funds from (AFA) Association François Aupetit, la maison des MICI, Paris, and the (OC, RGB) USDA Cooperative State Service Project NEB

14–141, and the School of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences. We dedicate this article to the memory of Franco D. Menozzi.

## References

- [1] E. Momotani, D.L. Whipple, A.B. Thiermann, N.F. Cheville, Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves, *Vet. Pathol.* 25 (1988) 131–137.
- [2] J.P. Bannantine, J.F. Huntley, E. Miltner, J.R. Stabel, L.E. Bermudez, The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 35 kDa protein plays a role in invasion of bovine epithelial cells, *Microbiology* 149 (2003) 2061–2069.
- [3] O.G. Sigurdardottir, A.M. Bakke-McKellep, B. Djonne, O. Evensen, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* enters the small intestinal mucosa of goat kids in areas with and without Peyer's patches as demonstrated with the everted sleeve method, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 28 (2005) 223–230.
- [4] L.E. Bermudez, M. Petrofsky, S. Sommer, R.G. Barletta, Peyer's patch-deficient mice demonstrate that *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* translocates across the mucosal barrier via both M cells and enterocytes but has inefficient dissemination, *Infect. Immun.* 78 (2010) 3570–3577.
- [5] R.P. Feola, M.T. Collins, C.J. Czuprynski, Hormonal modulation of phagocytosis and intracellular growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine peripheral blood monocytes, *Microb. Pathog.* 26 (1999) 1–11.
- [6] B.Y. Zhao, C.J. Czuprynski, M.T. Collins, Intracellular fate of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in monocytes from normal and infected, interferon-responsive cows as determined by a radiometric method, *Can. J. Vet. Res.* 63 (1999) 56–61.
- [7] B.G. Zurbrick, C.J. Czuprynski, Ingestion and intracellular growth of *Mycobacterium paratuberculosis* within bovine blood monocytes and monocyte-derived macrophages, *Infect. Immun.* 55 (1987) 1588–1593.
- [8] B.G. Zurbrick, D.M. Follett, C.J. Czuprynski, Cytokine regulation of the intracellular growth of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine monocytes, *Infect. Immun.* 56 (1988) 1692–1697.
- [9] K. Pethe, P. Bifani, H. Drobecq, C. Sergheraert, A.S. Debrie, C. Locht, F.D. Menozzi, Mycobacterial heparin-binding hemagglutinin and laminin-binding protein share antigenic methyllysines that confer resistance to proteolysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99 (2002) 10759–10764.
- [10] K. Pethe, V. Puech, M. Daffe, C. Josenhans, H. Drobecq, C. Locht, F.D. Menozzi, *Mycobacterium smegmatis* laminin-binding glycoprotein shares epitopes with *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding haemagglutinin, *Mol. Microbiol.* 39 (2001) 89–99.
- [11] C. Soares de Lima, L. Zulianello, M.A. Marques, H. Kim, M.I. Portugal, S.L. Antunes, F.D. Menozzi, T.H. Ottenhoff, P.J. Brennan, M.C. Pessolani, Mapping the laminin-binding and adhesive domain of the cell surface-associated Hlp/LBP protein from *Mycobacterium leprae*, *Microbes Infect.* 7 (2005) 1097–1109.
- [12] M.C. Vidal Pessolani, M.A. Marques, V.M. Reddy, C. Locht, F.D. Menozzi, Systemic dissemination in tuberculosis and leprosy: do mycobacterial adhesins play a role? *Microbes Infect.* 5 (2003) 677–684.
- [13] K. Aoki, S. Matsumoto, Y. Hirayama, T. Wada, Y. Ozeki, M. Niki, P. Domenech, K. Umemori, S. Yamamoto, A. Mineda, M. Matsumoto, K. Kobayashi, Extracellular mycobacterial DNA-binding protein 1 participates in mycobacterium-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 39798–39806.
- [14] M.A. de Melo Marques, S. Mahapatra, D. Nandan, T. Dick, E.N. Sarno, P.J. Brennan, M.C. Vidal Pessolani, Bacterial and host-derived cationic proteins bind alpha2-laminins and enhance *Mycobacterium leprae* attachment to human Schwann cells, *Microbes Infect.* 2 (2000) 1407–1417.
- [15] A. Rambukkana, Molecular basis for the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*, *Curr. Opin. Microbiol.* 4 (2001) 21–27.
- [16] A. Rambukkana, H. Yamada, G. Zanazzi, T. Mathus, J.L. Salzer, P.D. Yurchenco, K.P. Campbell, V.A. Fischetti, Role of alpha-dystroglycan as a Schwann cell receptor for *Mycobacterium leprae*, *Science* 282 (1998) 2076–2079.
- [17] Y. Shimoji, V. Ng, K. Matsumura, V.A. Fischetti, A. Rambukkana, A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96 (1999) 9857–9862.
- [18] B. Sauton, Sur la nutrition minérale du bacille tuberculeux, *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci.* 155 (1912) 860–861.
- [19] J. Sambrook, F.E. Fritsch, T. Maniatis (Eds.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.
- [20] I.R. Humphreys, G.R. Stewart, D.J. Turner, J. Patel, D. Karamanou, R.J. Snelgrove, D.B. Young, A role for dendritic cells in the dissemination of mycobacterial infection, *Microbes Infect.* 8 (2006) 1339–1346.
- [21] K. Pethe, M. Aumercier, E. Fort, C. Gatot, C. Locht, F.D. Menozzi, Characterization of the heparin-binding site of the mycobacterial heparin-binding hemagglutinin adhesin, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 14273–14280.
- [22] F. Biet, M. Angela de Melo Marques, M. Grayon, E.K. Xavier da Silveira, P. J. Brennan, H. Drobecq, D. Raze, M.C. Vidal Pessolani, C. Locht, F.D. Menozzi, *Mycobacterium smegmatis* produces an HBHA homologue which is not involved in epithelial adherence, *Microbes Infect.* 9 (2007) 175–182.
- [23] J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 4673–4680.
- [24] F. Biet, L. Gendt, E. Anton, E. Ballot, J.P. Hugot, C. Johanet, Serum antibodies to *mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* combined with anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies in Crohn's disease patients: prevalence and diagnostic role, *Dig. Dis. Sci.* 8 (2010) [Epub ahead of print].
- [25] F. Biet, S. Bay, V.C. Thibault, D. Euphrasie, M. Grayon, C. Ganneau, P. Lanotte, M. Daffe, R. Gokhale, G. Etienne, J.M. Reyat, Lipopeptide induces a strong host humoral response and distinguishes *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from *M. avium* subsp. *avium*, *Vaccine* 26 (2008) 257–268.
- [26] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [27] F.D. Menozzi, R. Bischoff, E. Fort, M.J. Brennan, C. Locht, Molecular characterization of the mycobacterial heparin-binding hemagglutinin, a mycobacterial adhesin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95 (1998) 12625–12630.
- [28] D.A. Rouse, S.L. Morris, A.B. Karpas, J.C. Mackall, P.G. Probst, S.D. Chaparas, Immunological characterization of recombinant antigens isolated from a *Mycobacterium avium* lambda gt11 expression library by using monoclonal antibody probes, *Infect. Immun.* 59 (1991) 2595–2600.
- [29] D.A. Rouse, S.L. Morris, A.B. Karpas, P.G. Probst, S.D. Chaparas, Production, characterization, and species specificity of monoclonal antibodies to *Mycobacterium avium* complex protein antigens, *Infect. Immun.* 58 (1990) 1445–1449.
- [30] T. Wadstrom, A. Ljungh, Glycosaminoglycan-binding microbial proteins in tissue adhesion and invasion: key events in microbial pathogenicity, *J. Med. Microbiol.* 48 (1999) 223–233.
- [31] F.D. Menozzi, J.H. Rouse, M. Alavi, M. Laude-Sharp, J. Muller, R. Bischoff, M.J. Brennan, C. Locht, Identification of a heparin-binding hemagglutinin present in mycobacteria, *J. Exp. Med.* 184 (1996) 993–1001.
- [32] M.I. Portugal, A.R. Todeschini, C.S. de Lima, C.A. Silva, R. Mohana-Borges, T.H. Ottenhoff, L. Mendonca-Previato, J.O. Previato, M.C. Pessolani, Characterization of two heparan sulphate-binding sites in the mycobacterial adhesin Hlp, *BMC Microbiol.* 8 (2008) 75.
- [33] O. Cohavy, G. Harth, M. Horwitz, M. Eggena, C. Landers, C. Sutton, S.R. Targan, J. Braun, Identification of a novel mycobacterial histone H1 homologue (HupB) as an antigenic target of pANCA monoclonal antibody and serum immunoglobulin A from patients with Crohn's disease, *Infect. Immun.* 67 (1999) 6510–6517.
- [34] F.D. Menozzi, V.M. Reddy, D. Cayet, D. Raze, A.S. Debrie, M.P. Dehouck, R. Cecchelli, C. Locht, *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding haemagglutinin adhesin (HBHA) triggers receptor-

- mediated transcytosis without altering the integrity of tight junctions, *Microbes Infect.* 8 (2006) 1–9.
- [35] S. Temmerman, K. Pethe, M. Parra, S. Alonso, C. Rouanet, T. Pickett, A. Drowart, A.S. Debric, G. Delogu, F.D. Menozzi, C. Sergheraert, M.J. Brennan, F. Mascart, C. Locht, Methylation-dependent T cell immunity to *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding hemagglutinin, *Nat. Med.* 10 (2004) 935–941.
- [36] T. Hallstrom, K. Haupt, P. Kraiczy, P. Hortschansky, R. Wallich, C. Skerka, P. F. Zipfel, Complement regulator-acquiring surface protein 1 of *Borrelia burgdorferi* binds to human bone morphogenic protein 2, several extracellular matrix proteins, and plasminogen, *J. Infect. Dis.* 202 (2010) 490–498.
- [37] T.E. Secott, T.L. Lin, C.C. Wu, Fibronectin attachment protein homologue mediates fibronectin binding by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Infect. Immun.* 69 (2001) 2075–2082.
- [38] D.C. Baumgart, S.R. Carding, Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology, *Lancet* 369 (2007) 1627–1640.
- [39] F. Coulombe, M. Divangahi, F. Veyrier, L. de Leseleuc, J.L. Gleason, Y. Yang, M.A. Kelliher, A.K. Pandey, C.M. Sasseti, M.B. Reed, M.A. Behr, Increased NOD2-mediated recognition of N-glycolyl muramyl dipeptide, *J. Exp. Med.* 206 (2009) 1709–1716.
- [40] I. Olsen, S. Tollefsen, C. Aagaard, L.J. Reitan, J.P. Bannantine, P. Andersen, L.M. Sollid, K.E. Lundin, Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* reactive CD4 T cells from intestinal biopsies of Crohn's disease patients, *PLoS One* 4 (2009) e5641.
- [41] C. Nacy, M. Buckley, *Mycobacterium avium paratuberculosis*: Infrequent human pathogen or public health threat?, A report from American Academy of Microbiology. <http://www.asm.org/ASM/files/ccLibraryFiles/FileName/000000004169/MAP.pdf> (2008).

## Article II - A novel phenotypic features of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* highlighted by characterization of the adhesin HBHA

*Louise H. Lefrancois, Christelle C. Bodier, Thierry Cochard, Florence. B. Gilbert, Sylvie Canepa, Sophie Lecher, Dominique Raze, Philippe Lanotte, Eve Haguenoer, Iker A. Seville, Karen Stevenson, Marcel Behr, Desmond M. Collins, Camille Locht, Franck Biet.*

**Introduction :** Aujourd'hui il est bien établi que la sous-espèce *paratuberculosis* peut être subdivisée en deux grandes familles définies par leurs caractères génétiques : *M. a. paratuberculosis* de type C (« Cattle ») et *M. a. paratuberculosis* de type S (« Sheep ») (<sup>258</sup>Turenne, 2008 ; <sup>6</sup>Alexander, 2009). Ces deux types de *M. a. paratuberculosis* sont adaptés à l'appareil digestif des ruminants et sont à l'origine d'une même pathologie, la paratuberculose. Néanmoins, ils présentent certaines spécificités phénotypiques. Des études récentes ont montré que ces deux groupes étaient divergents par la production de cytokines induites après stimulation de macrophages (<sup>113</sup>Janagama, 2006 ; <sup>166</sup>Motiwala, 2006 ; <sup>38</sup>Borrmann, 2011), par leur métabolisme vis-à-vis du fer (<sup>114</sup>Janagama, 2010), par leur pigmentation (<sup>245</sup>Stevenson, 2002) et surtout par leur vitesse de croissance (<sup>284</sup>Whittington, 2011). Concernant l'étude des adhésines, en particulier la « *Heparin Binding HemAgglutinin* » (HBHA), très peu de choses sont décrites chez *M. a. paratuberculosis* de type C et S.

**Objectif :** Explorer et caractériser la HBHA produite par les souches de *M. a. paratuberculosis* de type C et S.

**Résultats :** Les premiers résultats de PCR, réalisées sur les souches de référence, ont confirmés que le gène codant pour la HBHA diverge entre les espèces et mettent en évidence une variabilité intra-espèce chez *M. a. paratuberculosis*. De façon surprenante, via une analyse de la séquence protéique, nous avons constaté que la HBHA produite par les souches de type C présente un domaine C-terminal court tandis que celle de type S possède un domaine C-terminal long similaire à celui des HBHA des espèces du MAC et du complexe *tuberculosis* (HBHA-C = 190 aa ; HBHA-S = 205 aa ; HBHA-MAH = 205 aa ; HBHA-TB =

199 aa). Grâce à notre collection de souches génotypées et disponibles au laboratoire, nous avons élargi l'analyse à un panel de souches couvrant l'ensemble des génotypes représentant la sous-espèce *paratuberculosis*. Nous voulions savoir si cette divergence de *hbhA* était due à un phénomène ponctuel ou clonal. Pour cela, nous avons amplifié par la méthode de GeneMapper® la partie C-terminale du gène de la *hbhA* de 65 souches de type C, 16 souches de type S, 52 souches de *M. a. hominissuis* et 3 souches de *M. a. avium*. Les amplicons analysés nous indiquent clairement que le domaine C-terminal de la HBHA, déduit de la séquence nucléotidique, exprimé par les souches de *M. a. paratuberculosis* de type S est plus long que celui de la HBHA de *M. a. paratuberculosis* de type C. Les résultats obtenus confirment que chaque type de HBHA est spécifique de chaque groupe de *M. a. paratuberculosis* suggérant ainsi un phénomène clonal.

Les données obtenues nous ont conduit à nous demander si la différence du domaine C-terminal de la HBHA produite par les deux groupes de *M. a. paratuberculosis* influençait leur capacité d'adhésion. Pour répondre à cela, deux méthodes indépendantes ont été utilisées pour mettre en évidence une relation structure/fonction : d'une part, la chromatographie d'affinité pour l'héparine et d'autre part, la méthode Biacore®. Les résultats de chromatographie montrent que la HBHA de type C, avec un domaine C-terminal court est élué à 200 mM NaCl alors que la HBHA de type S est élue à 400 mM NaCl en présence d'un même gradient de sel. La quantification plus précise de l'interaction entre les différentes HBHA et l'héparine a été réalisée et va dans le même sens. La constante de dissociation (kD) de la HBHA de type C est de 314 nM et celui de la HBHA de type S proche de 20 nM ce qui se traduit par une interaction plus forte de la HBHA de type S avec l'héparine que celle de type C. Ces observations montrent que les deux types de HBHA produites par *M. a. paratuberculosis* ont une affinité pour l'héparine différente.

Dans cette étude, nous avons également ajouté la souche de *M. a. paratuberculosis* LN20 qui est génotypée comme une souche de type S dans l'analyse phylogénétique réalisée par analyse des LSP (<sup>6</sup>Alexander, 2009). La HBHA produite par cette souche est de taille intermédiaire comprise entre celle de la HBHA de type C et celle de type S et présente une affinité pour l'héparine intermédiaire.

Nous avons décidé d'explorer l'antigénicité de ces deux types de HBHA produites par *M. a. paratuberculosis*. Des sérums provenant de bovins et d'ovins infectés respectivement par des

---

souches de *M. a. paratuberculosis* de type C et S ont été utilisés. Les deux antigènes sont reconnus avec la même intensité par les deux types de sérum, montrant donc une réaction croisée.

**Conclusion-Discussion :** Dans cette étude, nous avons mis en évidence que la sous-espèce *paratuberculosis* exprime deux formes de HBHA en corrélation avec les types C et S. Elles se différencient par leur domaine C-terminal variable alors que leur domaine N-terminal est parfaitement conservé. Cette différence, dans leur séquence d'acides aminés, change la distribution des charges positives ce qui influence leur affinité pour l'héparine. Contrairement à la HBHA de type C, une forte affinité a été observée pour la HBHA de type S. Récemment il a été montré que la HBHA de *M. a. avium*, identique à 98,6% à celle de *M. a. paratuberculosis* de type S, a une affinité équivalente à celle de *M. tuberculosis* (<sup>134</sup>Lebrun, 2012). Ces deux phénotypes de HBHA de *M. a. paratuberculosis* suggèrent que les souches de type C et S pourraient avoir des interactions différentes avec les matricules de l'hôte.

Les résultats obtenus par l'analyse sérologique montrent une réactivité similaire des HBHA. Ces résultats ne sont pas surprenants et peuvent s'expliquer par une structure très proche de ces deux antigènes HBHA de type C et S, qui diverge seulement de 15 aa qui sont en réalité des répétitions de motif plus ou moins nombreuses. Si la réponse sérologique peut être quantifiée, les HBHA de type C et S doivent être évaluées pour leur capacité à induire une réponse à médiation cellulaire spécifique.

L'étude menée sur la HBHA de *M. a. paratuberculosis* a permis de mettre en évidence un nouveau marqueur phénotypique qui vient confirmer la distinction phylogénétique entre les souches de type C et de type S. Des études complémentaires doivent être entreprises pour montrer les conséquences en termes de virulence, de spécificité d'hôte liées à l'expression de ces deux formes de HBHA. Ces différentes formes de HBHA, très précisément caractérisées, doivent également être évaluées pour leur potentiel diagnostique de la paratuberculose.

1 **A novel phenotypic features of *Mycobacterium avium* subspecies**  
2 ***paratuberculosis* highlighted by characterization of the adhesin**  
3 **HBHA**

4  
5 Louise H. Lefrancois<sup>1</sup>, Christelle. C. Bodier<sup>1</sup>, Thierry Cochard<sup>1</sup>, Florence B. Gilbert<sup>1</sup>, Sophie  
6 Lecher<sup>2</sup>, Dominique Raze<sup>2</sup>, Philippe Lanotte<sup>3</sup>, Eve Haguenoer<sup>3</sup>, Iker A. Sevilla<sup>4</sup>, Karen  
7 Stevenson<sup>5</sup>, Marcel A. Behr<sup>6,7</sup>, Desmond M. Collins<sup>8</sup>, Camille Loch<sup>2</sup> and Franck. Biet<sup>1\*</sup>

8  
9 <sup>1</sup>*INRA-Centre de Tours. UMR1282, Infectiologie, Santé Publique (ISP-311). F-37380 Nouzilly, France.*

10 <sup>2</sup>*CIIL, INSERM U1019, CNRS UMR 8204, Univ Lille Nord de France, Institut Pasteur de Lille F-59021 Lille*  
11 *Cedex, France*

12 <sup>3</sup>*Service Bactériologie-Virologie, Hôpital Bretonneau-CHRU de Tours, 2 boulevard Tonnellé F-37044 Tours*  
13 *cedex, France.*

14 <sup>4</sup>*Neiker-tecnalia. Dpto. de Sanidad Animal, Berreaga 1, 48160 Derio, Bizkaia, Spain.*

15 <sup>5</sup>*Moredun Research Institute, Pentlands Science Park, Bush M Loan, Penicuik, EH26 0PZ Scotland, United*  
16 *Kingdom.*

17 <sup>6</sup>*Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montreal, QC, H3A 2B4, Canada,*

18 <sup>7</sup>*Department of Medicine, McGill University Health Centre, Montreal, QC, H3G 1A4, Canada.*

19 <sup>8</sup>*AgResearch, National Centre for Biosecurity and Infectious Disease, Wallaceville, P.O. Box 40063, Upper*  
20 *Hutt, New Zealand*

21 Running title:

22 Key words:

23 \*Corresponding author

24 Mailing address: Infections Mycobactériennes Animales, UMR1282 , Infectiologie Santé

25 Publique (ISP-311) INRA Centre de Tours, F-37380 Nouzilly, France. Phone: (33) 2 47 42 78

26 69. Fax: (33) 2 47 42 77 79. E-mail: [Franck.biet@tours.inra.fr](mailto:Franck.biet@tours.inra.fr)



27 **ABSTRACT**

28 In the subspecies *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) two groups, known as  
29 Cattle (C) and Sheep (S), have been defined by genotyping. Recent studies show that *Map* C  
30 and S have different phenotypes with respect to infection of macrophages, the rate of grow  
31 and iron metabolism. *Map* is adapted to the gastrointestinal tract of ruminant, but the  
32 mechanism of entry is currently unknown. In this study, we investigated the phenotype of the  
33 *Map*-host interaction, involving the virulence factor heparin-binding hemagglutinin (HBHA),  
34 for both groups of *Map*. HBHA is described in *M. tuberculosis* as a major adhesin required  
35 for extrapulmonary dissemination of the tubercle bacillus.

36 A large collection of *Map* isolates (types C & S) were genotyped by MIRU-VNTR and RFLP-  
37 IS900 was used to investigate the polymorphism of the *hbha* gene by fragment analysis using  
38 GeneMapper technology. Structure-functions properties of recombinant HBHA (types C & S)  
39 were analyzed by heparin-Sepharose chromatography and SPR analysis.

40 *In silico* analyses of both types of *Map* have revealed two forms of *hbha*. This observation,  
41 showing that *hbha* is distinct according to the group, was confirmed using GeneMapper on 83  
42 *Map* strains (65 *Map* C & 16 *Map* S) with various genotypes. We found that *Map* type C  
43 produces HBHA with a short C-terminal domain, while that of type S presents a long C-  
44 terminal domain, similar to that of HBHA produced by *M. tuberculosis*. The purification of  
45 HBHA from *Map* type C and S by heparin-Sepharose chromatography highlighted a  
46 correlation between their affinities to heparin and the length of their C-terminal domain  
47 confirmed by Biacore analysis.

48 We show for the first time that the types C and S of *Map* may be distinguished by the type of  
49 HBHA they produce, which differs in size and adherence properties. Thus, HBHA  
50 participates in the genotypic and phenotypic differences observed between the C and S types  
51 of *Map*.

52 **INTRODUCTION**

53 Recent genomic study revealed that *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*), the  
54 etiologic agent of Johne's disease (paratuberculosis), evolved into two distinct lineages  
55 related to the host provenance. One referred to as 'Cattle or C-type' and another, to as 'Sheep  
56 or S-type' (1, 32). These distinct types can be distinguished by most of genotyping tools  
57 available such as the reference method based on restriction fragment length polymorphism  
58 using *IS900* (*IS900* RFLP) (6, 7). In addition to genotypic differences (8, 9), strains belonging  
59 to these two lineages exhibit phenotypic differences including pigmentation, growth rate (8, 9,  
60 12), utilization of different iron metabolic pathways (12), profile of cytokine responses  
61 induced in bovine macrophages (11) or transcriptional profiles in a human macrophage model  
62 (21).

63 Because of their culture very limiting, the pathogenicity of strains of type S still little  
64 explored. We can assume that the mechanism of infection is similar for both types S and C,  
65 since either lineage can cause paratuberculosis in all types of ruminant. Using strain of C type  
66 it was established that *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cross the intestinal  
67 barrier though the M cells or epithelial cells present in the dome of Peyer's patches (4, 20,  
68 29). During the early steps of mycobacterial infection, adhesins play a crucial role. One of the  
69 most characterized is the heparin-binding hemagglutinin (HBHA) initially identified in  
70 *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) (18,  
71 19) but also present in many other mycobacteria including pathogenic and non-pathogenic  
72 species (5, 25, 28).

73 The HBHA is located on the surface of the mycobacteria and was shown to be involved in the  
74 binding of the bacillus to epithelial cells and the fibroblasts (19). The adhesion mechanism  
75 established that the HBHA interacts with glycoconjugates present on the surface of the host  
76 cells. During infection it was demonstrated that the HBHA plays a role in the dissemination of

77 *Mycobacterium tuberculosis* from the lungs to the deeper tissues (23). Probably due its  
78 location and his role in the extrapulmonary dissemination, it was shown that HBHA have  
79 diagnostic potential for detection of latent tuberculosis (17, 30).

80 In this study we identified and characterized the HBHA produced in *Mycobacterium avium*  
81 subsp. *paratuberculosis* of type C and type S. We provide evidence that each *Mycobacterium*  
82 *avium* subsp. *paratuberculosis* lineages produce an HBHA that differ in structure and  
83 functions. These original data add new phenotypic evidence that distinguished the two types  
84 of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

85

## 86 **MATERIALS AND METHODS**

87

### 88 **Bacterial strains, growth conditions and DNA manipulations**

89 Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1 and in supplementary  
90 data table. Mycobacterial strains were grown at 37 °C in Sauton medium or Middlebrook 7H9  
91 broth (Difco Laboratories, Detroit, MI) with glycerol 0,2% and ADC (albumin-dextrose-  
92 catalase enrichment medium, Becton Dickinson, Le Pont de claix, France). *Mycobacterium*  
93 *avium* subsp. *paratuberculosis* cultures were supplemented with 2 mg L<sup>-1</sup> mycobactin J  
94 (Allied Monitor). Bacteria were harvested at mid-log phase and kept frozen (-80 °C) in  
95 aliquots until use. *Escherichia. coli* TOP10 (Invitrogen Carsbad, CA) and *E. coli* BL21(DE3)  
96 (Novagen, Darmstadt, DE) were grown in LB medium supplemented with 25 µg ml<sup>-1</sup>  
97 kanamycin or 100 µg ml<sup>-1</sup> ampicillin as appropriate. Restriction enzymes, T4 DNA ligase and  
98 other molecular biology reagents were purchased from New England Biolabs, Roche or  
99 Promega. PCRs were performed using a TC-512 Techne thermal cyler and the PCR products  
100 were sequenced by GenomExpress (Takeley, Royaume Uni).

### 101 **Plasmid constructions, sequencing and production of recombinant HBHA in *E. coli***

102 The HBHA-encoding gene was amplified by PCR from chromosomal DNA using the *Pfu*  
103 DNA polymerase (Promega). Chromosomal DNA were prepared from culture of  
104 *Mycobacterium avium* subsp. *avium* strain 25291, *Mycobacterium avium* subsp.  
105 *paratuberculosis* type C strain K-10, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type S  
106 strain 19I, *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*  
107 strain LN20 with synthetic oligonucleotides (Sigma) listed in Table 2.

108 The fragment was amplified after a short denaturation cycle of 3 min at 95 °C by using 35  
109 cycles as follows: 95 °C for 30 s, 57 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s with a final elongation  
110 cycle at 72 °C for 10 min. The PCR product containing the HBHA-coding sequence including  
111 a stop codon, was digested by *NdeI* and *HindIII* and then inserted into pET-24a(+) (Novagen).  
112 These plasmids listed TABLE 1 was used to transform *E. coli* TOP 10 for sequencing and *E.*  
113 *coli* BL21(DE3) for protein expression. After transformation, *E. coli* BL21(DE3) cells were  
114 grown at 37 °C in 250 ml LB broth supplemented with 25 µg ml<sup>-1</sup> kanamycin. At an OD<sub>600</sub> of  
115 0.5, IPTG was added to a final concentration of 1 mM, and growth was continued for 4 h. The  
116 culture was then centrifuged at 7,000 g for 15 min at 4 °C. The cells were washed twice in 20  
117 ml of 20 mM Tris-HCl (pH 7.2) Tween 80 0.05% and centrifuged at 13,000 g for 20 min at  
118 4°C. The pellet was resuspended with 15 ml of 20 mM Tris-HCl (pH 7.2) Tween 80 0.05%  
119 and sonicated twice for 5 min at 4°C using a Branson Sonifier 250D. The bacterial lysates  
120 were then centrifuged at 13,000 g for 20 min at 4°C, filtered at 0.45µ and applied to heparin  
121 Sepharose chromatography as described above.

122 The gene coding the truncated mapS-HBHA (mapSHBHAΔCter) was generated by PCR  
123 using chromosomal DNA of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type S strain 19I  
124 and the oligonucleotides described in TABLE 2 designed to produce a hybrid protein carrying  
125 a His-tag and lacking amino acids 158 to 205. The PCR products was digested by *NdeI* and  
126 *HindIII* and then inserted into expression vector pET (Novagen), generating

127 pET::mapSHBHAΔCter. This plasmid was used to transform *E. coli* BL21(DE3) for protein  
128 purification. The recombinant mapSHBHAΔCter was purified onto Ni-NTA agarose resins  
129 (Sigma) according to manufacturer recommendations.

130

### 131 **Purification of recombinants HBHA by heparin Sepharose chromatography**

132 The recombinant HBHA produce in *E. coli* without any tag were purified by heparin  
133 Sepharose chromatography as described (Lefrancois et al BMC Research Note). The  
134 recombinant *E. coli* were then centrifuged at 7,000 g for 15 min at 4 °C. The cells were  
135 washed twice in 20 ml 20 mM Tris-HCl (pH 7.2) Tween 80 0.05% and centrifuged at 13,000  
136 g for 20 min at 4°C. The pellet was resuspended with 15 ml of 20 mM Tris-HCl (pH 7.2)  
137 Tween 80 0.05% and sonicated 5 min at 4°C using a Branson Sonifier 250D. The bacterial  
138 lysates were then centrifuged at 13,000 g for 20 min at 4°C. The soluble material was filtered  
139 at 0.45μ and applied to heparin-Sepharose matrix. All chromatographic steps were carried out  
140 on the Biologic chromatography system (BioRad), at room temperature and absorbance at 260  
141 nm was continuously monitored during purification with the HiTrap Heparin HP (1ml, GE  
142 Healthcare) column (0.7 X 2.5 cm) prepacked with heparin Sepharose. The column was  
143 washed with 100 ml of 20 mM Tris-HCl (pH 7.2) until the absorbance at 280 nm is close to 0.  
144 The bound material was eluted by a 0-1M NaCl linear gradient using a flow rate maintained at  
145 0.6 ml min<sup>-1</sup> and automatically collected in 1 ml fractions. Whole cell lysates, flow through  
146 material and eluted fractions were analyses on 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide  
147 gel electrophoresis (SDS-PAGE) performed according to Laemmli (13)

148

149

150

151 **SDS-PAGE and immunoblot**

152 Mycobacterial whole cell lysat and the recombinants HBHA purified were analyzed by SDS-  
153 PAGE. Polyacrylamide gel electrophoresis was conducted with 12% running gels and 4%  
154 stacking gels. Proteins were then transferred onto nitrocellulose membranes (Whatman,  
155 Germany). The membranes were blocked with 1% BSA in PBS/Tween 0, 05%, washed three  
156 times in PBS/Tween 0, 05% BSA1% before incubation with anti-HBHA monoclonal antibody  
157 3921E4 (18, 27). After three washing PBS/Tween 0, 05%, membranes were incubated with  
158 goat anti-mouse alkaline phosphatase-conjugated antibody (Caltag, Burlingame CA) at  
159 1:2000 dilution. The substrates nitro blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  
160 phosphate were used to develop the immunoblots.

161

162 **Protein analysis**

163 Multiple amino acid alignments were performed with CLUSTAL W  
164 (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>).

165

166 **Biotinylation of heparin**

167 Biotynylated heparin was prepared following the procedure described by Osmond et al. (22).  
168 Briefly, 10 mg of low molecular weight heparin (Lovenox) was reductively aminated at 70°C  
169 under stirring one time by 200 mg following by 100 mg of NaCNBH<sub>3</sub> (Sigma) during 48h for  
170 each reaction. After 4 days, modified heparin was dialyzed with NaHCO<sub>3</sub> 0,1M pH 7, 4 and  
171 coupled to 0, 75 mg of sulfo-NHS-LC-biotin (Uptima) over night at 4°C under stirring  
172 conditions. Biotynylated heparin was dialyzed with H<sub>2</sub>O and lyophilized to stockage until use.

173

174

175

176 **Surface Plasmon Resonance analysis**

177 The BIAcore T100 (GE Healthcare) was used for analysis of the molecular interactions  
178 between HBHA-MAPC, HBHA-MAPS, HBHA-MAPLN20, HBHA-MAA, HBHA-TB,  
179 HBHA-SMG, rHBHA $\Delta$ C (Control) and heparin. Recombinant streptavidine (Pierce) was  
180 covalently bound on two flow cells (Fc) of a CM4 sensorchip (GE Healthcare) with HBS (10  
181 mM HEPES 150 mM NaCl 0.05% Tween 20 pH 7.4) as running buffer. Standard amine  
182 coupling was performed according to the manufacturer's instructions, generating an  
183 immobilization signal of 1000 resonance units. After three 60 second injections of 1M NaCl  
184 50 mM NaOH, 5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> of biotinylated heparin was injected at a flow rate of 2  $\mu$ l min<sup>-1</sup> for  
185 90 sec onto one streptavidin-coated Fc to obtain 30 Resonance Units (RU). The other  
186 streptavidin-coated Fc was unmodified and used as a control surface. Binding analyses were  
187 performed 25 °C, with 50mM Tris 50mM NaCl 0.05% Tween 20 pH 7.2 as running buffer.  
188 The protein solutions were injected over the two flow cells for 180 seconds at 30  $\mu$ l min<sup>-1</sup> at  
189 concentrations ranging from 1.2 to 300 or 900 nM. The dissociation was studied for 180  
190 seconds. Regeneration of the surfaces was performed with a 60 second 1M NaCl solution  
191 followed by a 60 second 100 UI/ml heparin solution and a 120 second buffer wash. Signal  
192 responses were subtracted with signals obtained on the control surface and with the buffer  
193 injection. Constant affinities were calculated at equilibrium with the steady-state method and  
194 BIAevaluation software 2.03.

195

196 **Fluorescent fragment analysis**

197 Analysis was performed on 65 strains of MAPC, 16 strains of MAPS, 1 strain of LN20 and 55  
198 strains of MAA and MAH selected according to genotype (Supplementary data). The C-  
199 terminal domain of the encoding *hbha* gene was amplified with primer 5' FAM-HBHA C-ter  
200 S labelled in 5' with a 6-carboxyfluorescein fluorophore and HBHA C-ter AS primer (Table

201 2) following the manufacturer's recommendations (Applied bioscience, USA). The fragment  
202 was amplified after denaturation cycle of 5 min at 94 °C by using only 23 cycles as follows:  
203 94 °C for 30 sec, 61 °C for 30 sec, and 72 °C for 30 sec with a final elongation cycle at 72 °C  
204 for 5 min. The PCR product was mixed with Hi-Di formamide and 600 LIZ<sup>®</sup> size standards  
205 (Applied bioscience, USA). Results were visualized using the ABI GeneMapper<sup>®</sup> software v.  
206 4.0 (Applied bio-science, USA).

207

### 208 **ELISA assays**

209 For ELISA Maxisorp microtiter plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with 50 µl of  
210 PPDj, recombinant BCG HBHA, *Map* type S HBHA or *Map* type C at 0.1 mg ml<sup>-1</sup> in PBS at  
211 37 °C overnight. Plates were then washed three times with PBS/T and blocked for 1 h at 37  
212 °C with PBS/T containing 0.5% (w/v) Gelatine (PBS/T/G). Serum used include a *Map*  
213 positive commercial serum (1) a *Map* negative commercial serum (2) and serums obtained  
214 from ruminants infected by *Map* of type C (3) or type S (4). Each serum sample was diluted at  
215 1:100 in 50 µl PBS/T/G, and plates were incubated for 2.5 h at 37 °C. Plates were then  
216 washed five times with PBS/T and incubated for 90 min at 37 °C with 50 µl peroxidase-  
217 conjugated anti-ruminant-IgG (CHEKIT, Bern, Schweiz) diluted at 1:600 in PBS/T/G. Plates  
218 were washed five times with PBS/T, and 50 µl peroxidase substrate was added. After 30 min  
219 incubation at 37 °C, the reaction was stopped with 50 µl 2 N HCl, and the plates were read  
220 photometrically at 490 nm.

221

222



## 223 RESULTS

224

### 225 Variability on the C-terminal domain of encoding *hbha* gene

226 Comparative genomic shown that the *hbha* is highly conserved among Mycobacteria. The  
227 alignment of the protein sequences of the HBHA revealed that a large N-terminal part was  
228 strictly conserved while the C-terminal domain shown heterogeneity between mycobacterial  
229 species (Lefrancois et al. BMC RN, Locht ASM press). To identify the *hbha* gene within the  
230 S strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* PCR analyses was performed to  
231 amplify either the part of the gene corresponding to the N terminal domain of the HBHA or  
232 that corresponding to the C-terminal domain. The results shown that the *hbha* gene is present  
233 in S strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and the PCR product encoding  
234 the N-terminal moiety of the *hbah* is invariable among all the mycobacterial species analyzed  
235 (FIG. 1A). Surprisingly the size of the PCR product encoding the C-terminal domain of the  
236 HBHA in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* of type S is longer than that  
237 identify in C type strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* yet of the same  
238 subspecies. Other interesting result, analysis shown that the LN20 strain, described as an  
239 intermediate clone between lineage S and C, has a *hbha* gene of an intermediate size between  
240 those of C and S type (FIG.1B).

241 The *hbha* gene identifies in type S strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*  
242 exhibit an identic size to that of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium*  
243 *avium* subsp. *hominissuis*. In this analysis the shorter *hbha* was only observed for strain of  
244 type C of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. No diversity of *hbha* was observed  
245 in strain of MTB member analyzed neither in strains of MAC member other than subspecies  
246 paratuberculosis (FIG. 1B).

247

248 **Specificity of *hbha* gene according to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis***  
249 **lineage**

250 To confirm observation that within the subspecies *paratuberculosis* two major *hbha*  
251 distinguish each lineage, we have performed fluorescent PCR fragment analysis on the C-  
252 terminal domain of encoding *hbha* gene from a large panel of isolates from our  
253 comprehensive collection of strains. The panel of *Mycobacterium avium* subsp.  
254 *paratuberculosis* strains consists in isolates originating from various animals (cattle, sheep,  
255 goat, red deer, rabbit) and humans from various geographical origins (see supplement TABLE  
256 2) and to add level of stains diversity we selected isolates having distinct mini satellite and  
257 RFLP (IS900) profiles as described (Biet et al BMC revision). This panel was completed by 3  
258 strains of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* isolated from birds and 73 human isolates of  
259 *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* previously described (31).

260 The fluorescent fragment technology used ABI GeneMapper software was used to determine  
261 the absolute size of amplified fragment. The results showed that the PCR analysis were  
262 perfectly reproducible on all strains analyzed (data not shown). The PCR made with 65  
263 chromosomal DNA from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* of type C amplified  
264 without variability a fragment of 142 pb against 156 pb with chromosomal DNA from  
265 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* LN20 and 186 pb with chromosomal DNA  
266 from 16 strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* of type S, 3 strains of  
267 *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and 52 *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (FIG.  
268 3. A-D). These results ascertained that within the subspecies *paratuberculosis* the lineage S  
269 and C can be distinguished by their *hbha*. The lineage C exhibits the shorter *hbha* while  
270 within the lineage S the size of the *hbha* gene is identical to those of the other MAC members.  
271 Again, the strain LN20 found the unique strain with a *hbha* gene of intermediate size.

272

273 **Natives expression of the two forms HBHA produced by *Mycobacterium avium* subsp.**  
274 ***paratuberculosis***

275 To ascertain that *in vivo* *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type S express a  
276 HBHA longer to that of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type C immunoblot  
277 analyses were performed. Whole cell lysate of *Mycobacterium avium* subsp.  
278 *paratuberculosis* type C (strain K-10) and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*  
279 type S (strain 85/14) were analyzed using the monoclonal antibody 3921E4 (26). These  
280 analyses clearly shown the different form of HBHA produced in each lineage of  
281 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with an HBHA (type C) of approximately 22  
282 kDa against a HBHA (type S) of approximately 28 kDa (FIG. 4).

283

284 **The sequences features of the HBHA homologues**

285 To determine the exact feature of HBHA homologues, *hbha* genes of each lineage have been  
286 sequenced. The amino acid sequence deduced from the ORF sequences were aligned (FIG. 5).  
287 It confirms the data obtained by PCR. The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* of  
288 S type HBHA is 205 amino acid residues long whereas the *Mycobacterium avium* subsp.  
289 *paratuberculosis* of type C HBHA is 190 amino acids long and the *Mycobacterium avium*  
290 subsp. *paratuberculosis* strain LN20 HBHA is 199 amino acids long. The sequence  
291 similarities among the HBHA proteins are particularly high up to residue 162. The sequences  
292 were more divergent in the C-terminal regions of the proteins. The C-terminal lysine-rich  
293 repeats region of HBHA is responsible of the heparin binding. The divergences observed in  
294 the C-terminal regions of the HBHA correspond mainly to absence or differences in the  
295 lysine-rich repeats. In FIG 4B, sequences are read as a succession of the repetitions defined by  
296 Lebrun et al (14). Interestingly it was shown that the divergence of the HBHA correspond to  
297 different numbers of repeats (FIG5 B). In addition, Pethe et al. (24) and recently Lebrun et al.

298 (14) shown a direct correlation between number of Lysine-rich repeats and heparin binding  
299 activity. Since the HBHA produced by the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* of  
300 type S contains 5 repeats R2 we can speculate that its heparin binding activity should be  
301 similar to that of HBHA produced in *Mycobacterium avium* subsp. *avium*.

302

### 303 **Capacity of HBHA-Map to bound heparin Sepharose**

304 To confirm that, due to the presence of 5 lysine-rich repeats, the HBHA produced by the S type  
305 of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* may have more affinity to heparin in  
306 comparison to HBHA of type C, recombinant *E. coli* producing each HBHA were analyzed  
307 by heparin-Sepharose chromatography. As previously described the HBHA of type C bound  
308 weakly to heparin-Sepharose because it could be eluted at 200 mM NaCl. The presence of a  
309 third R2 motif in HBHA of LN20 strengthened the interaction with heparin because elution  
310 required 410 mM NaCl. The high affinity binding observed for HBHA of type S containing 5  
311 R2 repeats and eluted with 600 mM NaCl highlights an important phenotypic difference  
312 within the subspecies *paratuberculosis*.

313

### 314 **SPR analysis of the HBHA-Heparin interactions**

315 Surface Plasmon Resonance technology was used to quantify specific interaction of  
316 recombinant HBHA with heparin. The recombinant HBHA from *Mycobacterium avium*  
317 subsp. *paratuberculosis* of type C rHBHA-Map type C, *Mycobacterium avium* subsp.  
318 *paratuberculosis* of type S rHBHA-Map type S, *Mycobacterium avium* subsp.  
319 *paratuberculosis* strain LN20 rHBHA-Map LN20 were produced in *E. coli* and purified by  
320 heparin-Sepharose. In addition, rHBHA-Ms from *Mycobacterium smegmatis*, rHBHA-BCG  
321 from *Mycobacterium bovis* BCG and rHBHA $\Delta$ C-terminal from *Mycobacterium avium* subsp.  
322 *paratuberculosis*, described in the literature, have been used in this study as controls (5, 24).

323 As shown on Fig 7, rHBHA $\Delta$ C-terminal was unable to interact with heparin sensor chip  
324 whereas others rHBHA bind heparin with different affinity levels. HBHA were distinguished  
325 into two groups: HBHA with low affinity including rHBHA-*Ms*, rHBHA-*Map* type C and  
326 rHBHA-*Map* LN20 with a KD estimated at 249, 314 and 110 nM, respectively. While another  
327 group composed by rHBHA-BCG, rHBHA-*Maa* and rHBHA-*Map* type S show high affinity  
328 to heparin with a KD close to 20 nM. The interpretation of KD is: more the KD is low more  
329 the affinity is higher. These results are in concordance with qualitative results obtained by  
330 affinity chromatography and strengthen the relation between structure of HBHA and function  
331 to bind heparin is related to the number and disposition of positive charges bore by the C-  
332 terminal domain.

333

334 **Sera from Johne's disease animals react with HBHA produced by *Mycobacterium avium***  
335 **subsp. *paratuberculosis***

336 To determine the antigenic properties of HBHA produced by *Map*, we performed ELISA  
337 using sera well characterized from clinical infected animals by *Map* type C or S on rHBHA-  
338 *Map* of type C and S. The sera from animals infected by *Map* of type C or Type S reacted  
339 similarly with rHBHA of type S or C (FIG. 8). The HBHA-BCG and PPD of *Mycobacterium*  
340 *avium* subsp. *paratuberculosis* strain K-10 used as control are detected by sera. The difference  
341 in their sequence didn't affect the antigenic properties of the HBHA.

342

343

344 **DISCUSSION**

345

346 During the early step of infection, pathogenic microorganisms interact with cell surface  
347 receptors of eukaryotes cells that are normally required for their physiological processes to  
348 mediate signal transduction, as well as cell-cell and cell-matrix extracellular components  
349 interactions. In mycobacteria, two major adhesins named HBHA and LBP have been reported  
350 (2, 5, 10, 16, 19) to be involved in these specific interactions with GAGs molecules, such as  
351 heparan sulphate present on the surface of various eukaryotic cells types (33). This study  
352 focused on the HBHA initially described in *Mycobacterium tuberculosis* (19). Here we  
353 identify the HBHA expressed by the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* of type S  
354 and compared his biochemical properties to that of type C.

355 *In silico* analyses shown that the C-terminal of the HBHA identifies in *Mycobacterium avium*  
356 subsp. *paratuberculosis* diverged according to the type S v.s. C. Until now, the HBHA  
357 reported for the subspecies *paratuberculosis*, were of type C and shown having identical  
358 sequences (15, 28). The divergence observed within a same subspecies contrast with previous  
359 analysis showing that HBHA are strictly conserved among species of mycobacteria (Locht et  
360 al. ASM press). In addition these data adds new phenotypic evidence to distinguish the type S  
361 versus C strains according to phylogenetic study (32).

362 The variability of HBHA expressed by the type S versus C concerns the C-terminal domain of  
363 the protein. This is particularly important for it function as adhesin because this domain is  
364 responsible for the binding of the HBHA to heparan sulphate (14, 24).

365 One of the major outcomes of this study was to discover that the strains of type S-HBHA was  
366 98.6% similar to that expressed in *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. Furthermore a recent  
367 study shown that, through their penta lysine-rich repeats, the affinity of these HBHA for  
368 heparin was as high as that HBHA expressed in *Mycobacterium tuberculosis* (14). Therefore,

369 the polymorphism of HBHA adds new evidence that in the subspecies *paratuberculosis* the  
370 strains of lineage S and C have a distinct phenotype. These data also join the results of  
371 phylogeny which places *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* of type S close to the  
372 subspecies *avium* in the model of evolution of the MAC (3, 32). Typing methods were able to  
373 subdivide the S type in at least two other types (Biet et al BMC 2012). In our study we found  
374 no sequences variability of HBHA intra type except for LN20 strain. But for this particular  
375 strain the analyses of Alexander et al. (1) have shown that in the evolution model, LN20 is an  
376 intermediate between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* of type S and C.  
377 This study revealed that *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* expressed distinct  
378 HBHA, differing in structure and function, according each lineage S versus C. Further studies  
379 should be undertaken to show the consequences of these two forms of HBHA expressed in  
380 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in terms of virulence or host specificity. These  
381 two forms of HBHA precisely characterized must also be evaluated for their potential in the  
382 diagnosis of paratuberculosis.

383

#### 384 **ACKNOWLEDGMENTS**

385 FB, LL, CB, TC, FG and APTG were supported by the Institut National de la Recherche  
386 Agronomique.

387

388

389 **REFERENCES**

- 390 1. **Alexander, D. C., C. Y. Turenne, and M. A. Behr.** 2009. Insertion and deletion  
391 events that define the pathogen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J*  
392 *Bacteriol* **191**:1018-25.
- 393 2. **Aoki, K., S. Matsumoto, Y. Hirayama, T. Wada, Y. Ozeki, M. Niki, P. Domenech,**  
394 **K. Umemori, S. Yamamoto, A. Mineda, M. Matsumoto, and K. Kobayashi.** 2004.  
395 Extracellular mycobacterial DNA-binding protein 1 participates in mycobacterium-  
396 lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid. *J Biol Chem* **279**:39798-806.
- 397 3. **Bannantine, J. P., C. W. Wu, C. Hsu, S. Zhou, D. C. Schwartz, D. O. Bayles, M.**  
398 **L. Paustian, D. P. Alt, S. Sreevatsan, V. Kapur, and A. M. Talaat.** 2012. Genome  
399 Sequencing of Ovine Isolates of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*  
400 Offers Insights Into Host Association. *BMC Genomics* **13**:89.
- 401 4. **Bermudez, L. E., M. Petrofsky, S. Sommer, and R. G. Barletta.** 2010. Peyer's  
402 patch-deficient mice demonstrate that *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*  
403 translocates across the mucosal barrier via both M cells and enterocytes but has  
404 inefficient dissemination. *Infect Immun* **78**:3570-7.
- 405 5. **Biet, F., M. Angela de Melo Marques, M. Grayon, E. K. Xavier da Silveira, P. J.**  
406 **Brennan, H. Drobecq, D. Raze, M. C. Vidal Pessolani, C. Locht, and F. D.**  
407 **Menzio.** 2007. *Mycobacterium smegmatis* produces an HBHA homologue which is  
408 not involved in epithelial adherence. *Microbes Infect* **9**:175-82.
- 409 6. **Biet, F., I. A. Sevilla, L. H. Lefrancois, T. Cochard, V. C. Thibault, J. Garrido, I.**  
410 **Heron, R. Juste, J. McLuckie, P. Supply, and K. Stevenson.** 2012. Inter- and Intra-  
411 subtype genotypic differences that differentiate *Mycobacterium avium* subspecies  
412 *paratuberculosis* strains. *BMC microbiology*.



- 413 7. **Castellanos, E., B. Romero, S. Rodriguez, L. de Juan, J. Bezos, A. Mateos, L.**  
414 **Dominguez, and A. Aranaz.** 2010. Molecular characterization of *Mycobacterium*  
415 *avium* subspecies *paratuberculosis* Types II and III isolates by a combination of  
416 MIRU-VNTR loci. *Vet Microbiol* **144**:118-26.
- 417 8. **Collins, D. M., D. M. Gabric, and G. W. de Lisle.** 1990. Identification of two groups  
418 of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and  
419 DNA hybridization. *J Clin Microbiol* **28**:1591-6.
- 420 9. **De Lisle, G. W., D. M. Collins, and H. F. Huchzermeyer.** 1992. Characterization of  
421 ovine strains of *Mycobacterium paratuberculosis* by restriction endonuclease analysis  
422 and DNA hybridization. *Onderstepoort J Vet Res* **59**:163-5.
- 423 10. **de Melo Marques, M. A., S. Mahapatra, D. Nandan, T. Dick, E. N. Sarno, P. J.**  
424 **Brennan, and M. C. Vidal Pessolani.** 2000. Bacterial and host-derived cationic  
425 proteins bind alpha2-laminins and enhance *Mycobacterium leprae* attachment to  
426 human Schwann cells. *Microbes Infect* **2**:1407-17.
- 427 11. **Janagama, H. K., K. Jeong, V. Kapur, P. Coussens, and S. Sreevatsan.** 2006.  
428 Cytokine responses of bovine macrophages to diverse clinical *Mycobacterium avium*  
429 subspecies *paratuberculosis* strains. *BMC Microbiol* **6**:10.
- 430 12. **Janagama, H. K., S. Kumar, J. P. Bannantine, A. Kugadas, P. Jagtap, L. Higgins,**  
431 **B. Witthuhn, and S. Sreevatsan.** 2010. Iron-sparing Response of *Mycobacterium*  
432 *avium* subsp. *paratuberculosis* is strain dependent. *BMC Microbiol* **10**:268.
- 433 13. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head  
434 of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- 435 14. **Lebrun, P., D. Raze, B. Fritzinger, J. M. Wieruszkeski, F. Biet, A. Dose, M.**  
436 **Carpentier, D. Schwarzer, F. Allain, G. Lippens, and C. Locht.** 2012. Differential

- 437 contribution of the repeats to heparin binding of HBHA, a major adhesin of  
438 *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One 7:e32421.
- 439 15. **Lefrancois, L. H., C. Bodier, S. Lecher, F. Gilbert, A. P. Texiera-Gomez, D. Raze,**  
440 **C. Locht, and F. Biet.** submitted. Purification of native HBHA from *M. avium subsp.*  
441 *paratuberculosis*: optimization of culture conditions and development of the FPLC  
442 purification on heparin Sepharose. BMC Research Notes.
- 443 16. **Lefrancois, L. H., C. Pujol, C. C. Bodier, A. P. Teixeira-Gomez, H. Drobecq, M.**  
444 **L. Rosso, D. Raze, A. A. Dias, J. P. Hugot, O. Chacon, R. G. Barletta, C. Locht,**  
445 **M. C. Vidal Pessolani, and F. Biet.** 2011. Characterization of the *Mycobacterium*  
446 *avium subsp. paratuberculosis* laminin-binding/histone-like protein (Lbp/Hlp) which  
447 reacts with sera from patients with Crohn's disease. Microbes Infect 13:585-94.
- 448 17. **Masungi, C., S. Temmerman, J. P. Van Vooren, A. Drowart, K. Pethe, F. D.**  
449 **Menozi, C. Locht, and F. Mascart.** 2002. Differential T and B cell responses  
450 against *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding hemagglutinin adhesin in  
451 infected healthy individuals and patients with tuberculosis. J Infect Dis 185:513-20.
- 452 18. **Menozi, F. D., R. Bischoff, E. Fort, M. J. Brennan, and C. Locht.** 1998.  
453 Molecular characterization of the mycobacterial heparin-binding hemagglutinin, a  
454 mycobacterial adhesin. Proc Natl Acad Sci U S A 95:12625-30.
- 455 19. **Menozi, F. D., J. H. Rouse, M. Alavi, M. Laude-Sharp, J. Muller, R. Bischoff, M.**  
456 **J. Brennan, and C. Locht.** 1996. Identification of a heparin-binding hemagglutinin  
457 present in mycobacteria. J Exp Med 184:993-1001.
- 458 20. **Momotani, E., D. L. Whipple, A. B. Thiermann, and N. F. Cheville.** 1988. Role of  
459 M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into  
460 domes of ileal Peyer's patches in calves. Vet Pathol 25:131-7.

- 461 21. **Motiwala, A. S., H. K. Janagama, M. L. Paustian, X. Zhu, J. P. Bannantine, V.**  
462 **Kapur, and S. Sreevatsan.** 2006. Comparative transcriptional analysis of human  
463 macrophages exposed to animal and human isolates of *Mycobacterium avium*  
464 subspecies paratuberculosis with diverse genotypes. *Infect Immun* **74**:6046-56.
- 465 22. **Osmond, R. I., W. C. Kett, S. E. Skett, and D. R. Coombe.** 2002. Protein-heparin  
466 interactions measured by BIAcore 2000 are affected by the method of heparin  
467 immobilization. *Anal Biochem* **310**:199-207.
- 468 23. **Pethe, K., S. Alonso, F. Biet, G. Delogu, M. J. Brennan, C. Locht, and F. D.**  
469 **Menozi.** 2001. The heparin-binding haemagglutinin of *M. tuberculosis* is required for  
470 extrapulmonary dissemination. *Nature* **412**:190-4.
- 471 24. **Pethe, K., M. Aumercier, E. Fort, C. Gatot, C. Locht, and F. D. Menozzi.** 2000.  
472 Characterization of the heparin-binding site of the mycobacterial heparin-binding  
473 hemagglutinin adhesin. *J Biol Chem* **275**:14273-80.
- 474 25. **Reddy, V. M., and B. Kumar.** 2000. Interaction of *Mycobacterium avium* complex  
475 with human respiratory epithelial cells. *J Infect Dis* **181**:1189-93.
- 476 26. **Rouse, D. A., S. L. Morris, A. B. Karpas, J. C. Mackall, P. G. Probst, and S. D.**  
477 **Chaparas.** 1991. Immunological characterization of recombinant antigens isolated  
478 from a *Mycobacterium avium* lambda gt11 expression library by using monoclonal  
479 antibody probes. *Infect Immun* **59**:2595-600.
- 480 27. **Rouse, D. A., S. L. Morris, A. B. Karpas, P. G. Probst, and S. D. Chaparas.** 1990.  
481 Production, characterization, and species specificity of monoclonal antibodies to  
482 *Mycobacterium avium* complex protein antigens. *Infect Immun* **58**:1445-9.
- 483 28. **Sechi, L. A., N. Ahmed, G. E. Felis, I. Dupre, S. Cannas, G. Fadda, A. Bua, and S.**  
484 **Zanetti.** 2006. Immunogenicity and cytoadherence of recombinant heparin binding

- 485 haemagglutinin (HBHA) of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: functional  
486 promiscuity or a role in virulence? *Vaccine* **24**:236-43.
- 487 29. **Sigurdardottir, O. G., A. M. Bakke-McKellep, B. Djonne, and O. Evensen.** 2005.  
488 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* enters the small intestinal mucosa of  
489 goat kids in areas with and without Peyer's patches as demonstrated with the everted  
490 sleeve method. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **28**:223-30.
- 491 30. **Temmerman, S., K. Pethe, M. Parra, S. Alonso, C. Rouanet, T. Pickett, A.**  
492 **Drowart, A. S. Debrie, G. Delogu, F. D. Menozzi, C. Sergheraert, M. J. Brennan,**  
493 **F. Mascart, and C. Locht.** 2004. Methylation-dependent T cell immunity to  
494 *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding hemagglutinin. *Nat Med* **10**:935-41.
- 495 31. **Thibault, V. C., M. Grayon, M. L. Boschioli, C. Hubbans, P. Overduin, K.**  
496 **Stevenson, M. C. Gutierrez, P. Supply, and F. Biet.** 2007. New variable number  
497 tandem repeat markers for typing *M. avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium*  
498 strains: comparison with IS900 RFLP and IS1245 RFLP typing. *J Clin Microbiol*  
499 **45**:2404-2410.
- 500 32. **Turenne, C. Y., D. M. Collins, D. C. Alexander, and M. A. Behr.** 2008.  
501 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* subsp. *avium* are  
502 independently evolved pathogenic clones of a much broader group of *M. avium*  
503 organisms. *J Bacteriol* **190**:2479-87.
- 504 33. **Wadstrom, T., and A. Ljungh.** 1999. Glycosaminoglycan-binding microbial proteins  
505 in tissue adhesion and invasion: key events in microbial pathogenicity. *J Med*  
506 *Microbiol* **48**:223-33.
- 507

508 **FIGURE LEGENDS**

509

510 **FIG. 1. Variability inter and intra-species on the *hbha* gene.**

511 PCR amplification product of the gene coding for the N- terminal domain **(A)** and C-terminal  
512 domain **(B)** of HBHA using genomic DNA of : 1. *Mycobacterium tuberculosis*; 2.  
513 *Mycobacterium bovis* BCG; 3. *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*; 4. *Mycobacterium*  
514 *avium* subsp. *avium* (one representative sample of 28 strains analyzed); 5. *Mycobacterium*  
515 *avium* subsp. *sylvaticum*; 6. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* of type S (one  
516 representative sample of 18 strains analyzed); 7. *Mycobacterium avium* subsp.  
517 *paratuberculosis* LN20; 8. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* of type C (one  
518 representative sample of 34 strains analyzed). Primers used were deduced from the HBHA-  
519 encoding gene of MTB. The molecular weight markers (100bp-ladder, Promega®) are  
520 indicated in the left margin. The graph shows analyse of one strain

521

522 **FIG. 2. Distinct *hbha* within the subspecies *paratuberculosis* ascertain on a large**  
523 **collection of isolates.**

524 The gene coding for the C-terminal domain of HBHA was amplified by PCR on genome  
525 DNA using primers labelled in 5' with a 6-carboxyfluorescein as fluorophore. Results were  
526 visualized using the ABI GeneMapper software v. 4.0 with a 600 LIZ<sup>®</sup> size standards  
527 (Applied bio-science, USA). The expected sizes of the PCR products are 150 bp with Map C,  
528 genome DNA, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* of type C **(A)** 165 bp for Map  
529 LN20, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* LN20 **(B)** 195 bp for Map S,  
530 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* of type S **(C)** and *Mycobacterium avium*  
531 subsp. *avium* / *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* **(D)**. Analysis was performed on 65  
532 strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* of type C, 16 strains of

533 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* of type S, 52 *Mycobacterium avium* subsp.  
534 *hominissuis* strains and 3 strains of *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. n, number strains  
535 analyzed.

536

537 **FIG. 3. Natives HBHA expressed by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* of**  
538 **type C and S.**

539 Whole cell lysates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* of type C (lane 1) and  
540 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* of type S (lane 2) were separated by 12%  
541 SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose membranes. Blots were incubated with the  
542 monoclonal antibody anti-HBHA 3921E4. The molecular mass markers expressed in kDa are  
543 indicated in the left margin.

544

545 **FIG. 4. Alignment of the HBHA sequences from different mycobacterial species.**

546 (A) The amino acid sequences of the *M. tuberculosis* HBHA were aligned with those of its  
547 homologues from other mycobacterial species by using the ClustalW program with the  
548 BLOSUM64 matrix allowing gaps (-). \*, identical residues; :, conserved substitutions;  
549 semiconserved substitutions. (B) Multiple alignment of the C-terminal heparin-binding  
550 domain of the HBHA. The lysine-rich repeats R1 (blue) and R2 (Green) defined by Lebrun et  
551 al. (14) are indicated. The number of charges distributed within the C-terminal domain of  
552 different HBHA homologues (158-232) and the isoelectric point (IP) are indicated on the right.  
553 Mtb, *Mycobacterium tuberculosis*; Mb, *Mycobacterium bovis*; Ml, *Mycobacterium leprae*;  
554 Mah, *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*; Maa, *Mycobacterium avium* subsp. *avium*;  
555 Map S, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* of type S; Map LN20, *Mycobacterium*  
556 *avium* subsp. *paratuberculosis* LN20; Map C, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*  
557 of type C; Ms, *Mycobacterium smegmatis*; C, *concensus*.

558 **FIG. 5. Difference of heparin interaction of rHBHA from *Mycobacterium avium* subsp.**  
559 ***paratuberculosis* of type C, LN20 and S by heparin-Sepharose chromatography.**

560 Lysates of *E. coli* expressing recombinants HBHA of *Mycobacterium avium* subsp.  
561 *paratuberculosis* of type C (A), *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* LN20 (B) and  
562 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* of type S (C) were sonicated. The soluble  
563 material was subjected onto heparin-Sepharose chromatography and eluted using a 0-1M  
564 NaCl gradient. SDS-PAGE analyses were performed on Whole cell lysate (WCL), flow-  
565 through (FT) and elution fractions of rHBHA. The molecular mass markers (MM) expressed  
566 in kDa are indicated in the left margin.

567

568 **FIG. 6. Quantification of binding activity to heparin of rHBHA of *Mycobacterium avium***  
569 **subsp. *paratuberculosis* of type C, LN20 and S by Biacore<sup>®</sup> technology.**

570 SPR analysis of recombinant HBHA binding to heparin was performed on BIAcore<sup>®</sup> T100  
571 (GE Healthcare). Biotinylated heparin was immobilized on a streptavidine coated CM4  
572 sensor-chip. Recombinant HBHA, previously purified by heparin sepharose chromatography,  
573 were injected over a range of concentrations at a flow rate of 30  $\mu\text{l min}^{-1}$ . Recombinant  
574 HBHA $\Delta\text{C}$  was used as negative control. KD was determined by the equilibrium method.

575

576 **FIG. 7. Identical reactivity of a panel of serum from infected cattle and sheep with the**  
577 **rHBHA from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* of type C or S.**

578 Plates were coated with 50  $\mu\text{l}$  of PPDj, recombinant BCG HBHA, *Mycobacterium avium*  
579 subsp. *paratuberculosis* type S HBHA or *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type  
580 C at 0.1  $\text{mg ml}^{-1}$  in PBS at 37 °C overnight. Plates were then washed and blocked for 1 h at  
581 37 °C with PBS/T containing 0.5% Gelatine (PBS/T/G). Serum used include a  
582 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* positive commercial aserum (1) a

583 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* negative commercial serum (2) and serums  
584 obtained from ruminants infected by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* of type C  
585 (3) or type S (4). Each serum sample was diluted at 1:100 in 50 µl PBS/T/G, and incubated  
586 for 2.5 h at 37 °C. Plates were then washed and incubated for 90 min at 37 °C with 50 µl  
587 peroxidase-conjugated anti-ruminant-IgG diluted at 1:600 in PBS/T/G. After washing, plates  
588 were washed and 50 µl of peroxidase substrate was added during 30 min at 37 °C. The  
589 reaction was stopped with 50 µl NHCl and the plates were read photometrically at 490 nm.  
590 The graph shows the averages of triplicate samples from one representative of three  
591 independents experiments.



Fig. 1

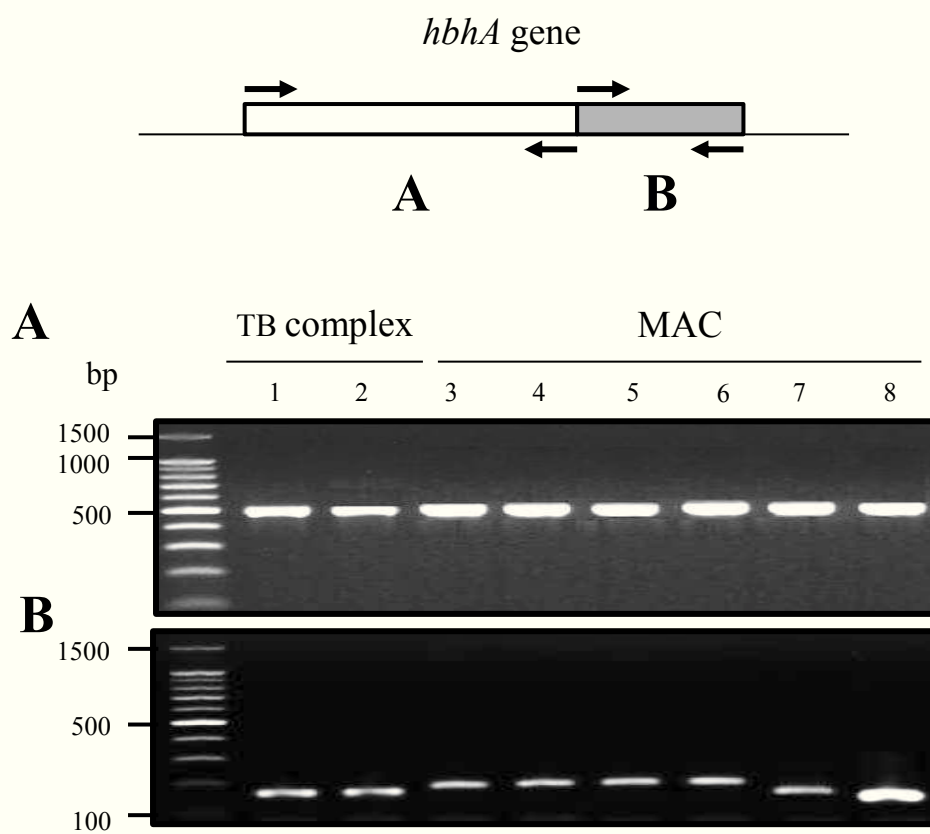


Fig. 2

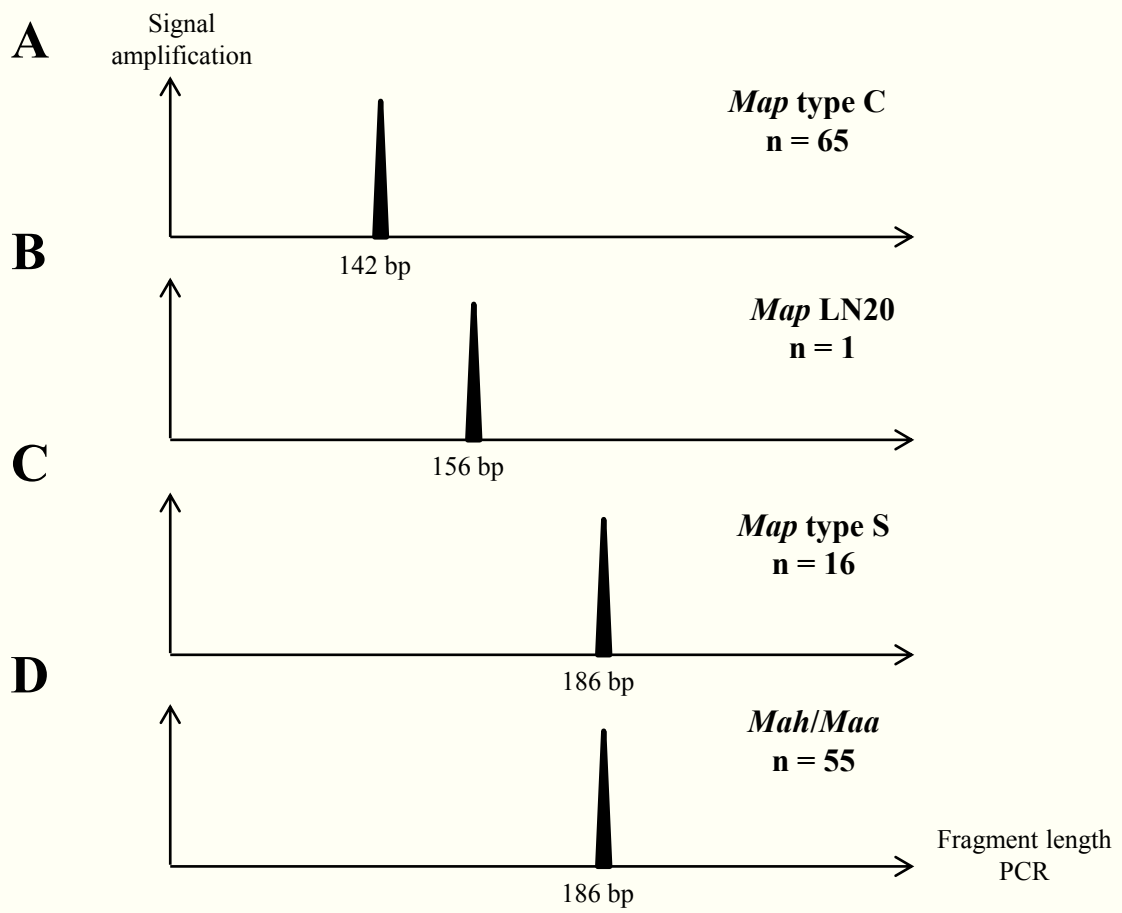


Fig. 3

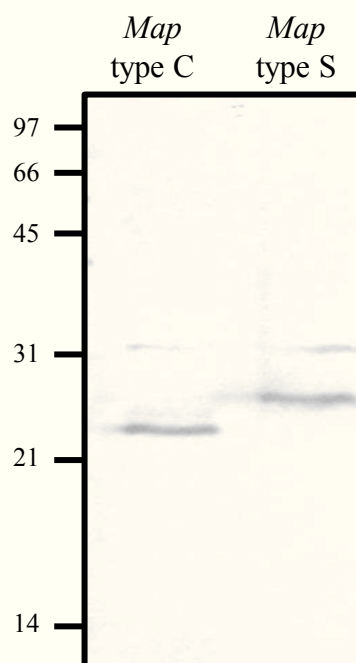


Fig. 4

**A**

Mtb	1	MAEN--SNIDDIKAPLLAALGAADLALATVNELITNLRERAEEETRTDTRSRRVEESRARLTKLQEDLPEQLTELREKFT-----AELRKAEGYLEAATSRYNELVERGEAALERL	109
Mb	1	MAEN--SNIDDIKAPLLAALGAADLALATVNELITNLRERAEEETRTDTRSRRVEESRARLTKLQEDLPEQLTELREKFT-----AELRKAEGYLEAATSRYNELVERGEAALERL	109
Ml	1	MAEN--PNVDDLRAPELLAALGAADLALATVNLVGNMRRERAEEETRIDTRSRRVEESRARVAKLQEVLPHEHLSELREKFT-----ADELRKAEGYLEAATNRYNELVERGEAALERL	109
Mah	1	MAEN--PNIDDLPAPELLAALGAADLALATVNDLIANLRERAEEETRAETRTRVEERRARLTKFQEDLPEQFIELRDKFT-----TEELRKAEGYLEAATNRYNELVERGEAALQRL	109
Maa	1	MAEN--PNIDDLRAPELLAALGAADLALATVNDLIANLRERAEEETRAETRTRVGERARRLTKFQEDLPEQFTELRDKFT-----TEELRKAEGYLEAATNRYNELVERGEAALQRL	109
MapS	1	MAEN--PNIDDLPAPELLAALGAADLALATVNDLIANLRERAEEETRAETRTRVEERRARLTKFQEDLPEQFIELRDKFT-----TEELRKAEGYLEAATNRYNELVERGEAALQRL	109
MapLN20	1	MAEN--PNIDDLPAPELLAALGAADLALATVNDLIANLRERAEEETRAETRTRVEERRARLTKFQEDLPEQFIELRDKFT-----TEELRKAEGYLEAATNRYNELVERGEAALQRL	109
MapC	1	MAEN--PNIDDLRAPELLAALGAADLALATVNDLIANLRERAEEETRAETRTRVEERRARLTKFQEDLPEQFTELRDKFT-----TEELRKAEGYLEAATNRYNELVERGEAALQRL	109
Ms	1	MADKTQPTVEELKAPLLAAVGAADLALATVNEIIATLLERAGEARSDAEARVEESRARLTKLQEELPSQFGEELREKLNSDELKKLNSEELRKAESYADQATATYNKLVERGEAALERL	120
Consensus		**:: :.::: *****:*****:***::: .: ** *: * :.:.* * **:::*.** **::: **::*. :.*****.* : ** **::*****:***	
Mtb	110	RSQSFEEVSARAEGYVDQAVELTQEALGTVASQTRAVGERAAKLVGIELPKKAAAPAKKAA---PAKKAAPAKKAA-----AKKAPAKKA-----AAKVTQK-	199
Mb	110	RSQSFEEVSARAEGYVDQAVELTQEALGTVASQTRAVGERAAKLVGIELPKKAAAPAKKAA---PAKKAAPAKKAA-----AKKAPAKKA-----AAKVTQK-	199
Ml	110	RSRPVFEEDASARAEGYVDQAVELTQEALGTVASQTRAVGGRAAKLVGIELPKKAA-----APARKAP-----AKKAPAKKA-----PAKKVTQK-	188
Mah	110	RSQTAFEDASARAEGYVDQAVELTQEALGTVASQTRAVGERAAKLVGIELPGKAEAAAGK-----KAQKAIAPAKKAPAKKAPAKKAPAKKA-----AAKVTQK-	205
Maa	110	RSQTAFEDASARAEGYVDQAVELTQEALGTVASQTRAVGERAAKLVGIELPGKAEAAAGK-----KAQKAIAPAKKAPAKKAPAKKAPAKKAPAKKA-----AAKVTQK-	205
MapS	110	RSQTAFEDASARAEGYVDQAVELTQEALGTVASQTRAVGERAAKLVGIELPGKAEAAAGK-----KAQKAIAPAKKASAKKAPAKKAPAKKA-----AAKVTQK-	205
MapLN20	110	RSQTAFEDASARAEGYVDQAVELTQEALGTVASQTRAVGERAAKLVGIELPGKAEAAAGK-----KAQKAIAPAK-----AKKAPAKKA-----AAKVTQK-	195
MapC	110	RSQTAFEDASARAEGYVDQAVELTQEALGTVASQTRAVGERAAKLVGIELPGKAEAAAGK-----KAQKAIAPAK-----AKKAP-----AKKVTQK-	190
Ms	121	RNQPALEEAATRVTETDQAVELTQEALGTVASQTRAVGERAAKLVGVELPKRAEAAAETAEEAETAEPVKKAAAPAKKAAAPAKKAAAPAKKATPAKSAAKAPAKKVTQK-	232
Consensus		*.: :*:::*. * .***** *****:*** :*	

**B**

			N° Charges +	PI
Mtb	160	P-----KKAAPAKKAAPAKKAAPAKKAAAKKAPAKKAAAKKVTQK-	15	9.6
Mah	160	PGKAEAAAGKKAQKAIAPAKKAPAKKAPAKKAPAKKAAAKKVTQK-	16	10.2
Maa	160	PGKAEAAAGKKAQKAIAPAKKAPAKKAPAKKAPAKKAAAKKVTQK-	16	10.2
MapS	160	PGKAEAAAGKKAQKAIAPAKKASAKKAPAKKAPAKKAAAKKVTQK-	16	9.9
MapLN20	160	PGKAEAAAGKKAQKAIAPAKKAPAKKAAAKKVTQK-	12	8.9
MapC	160	PGKAEAAAGKKAQKAIAPAKKAPAKKVTQK-	10	7
Ms	191	PVKKAAAPAAK---KAAPAKKAAPAK-KATPAKSAAKAPAKKVTQK-	13	8.8

Fig. 5

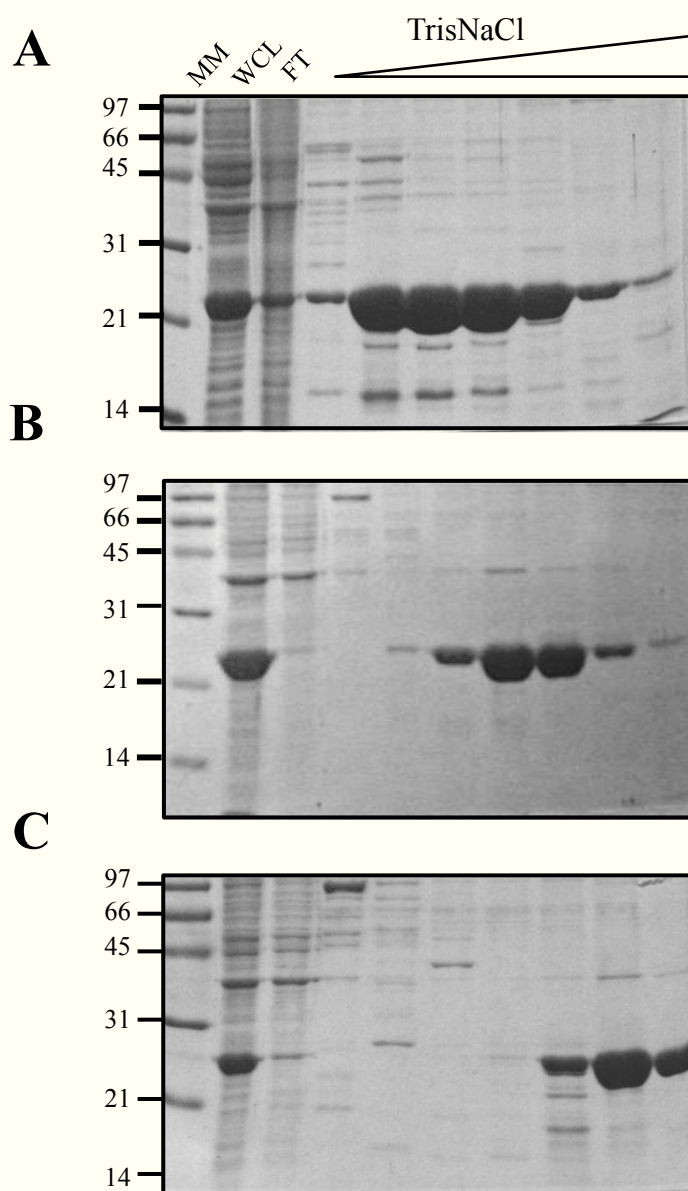


Fig. 6

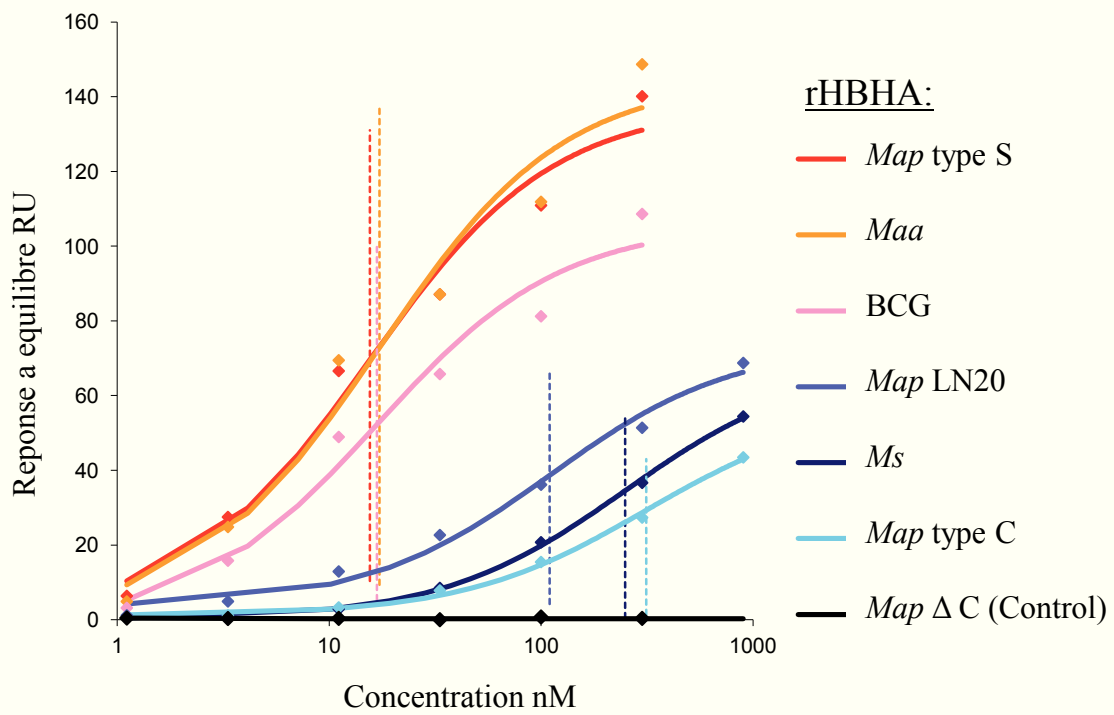


Fig. 7

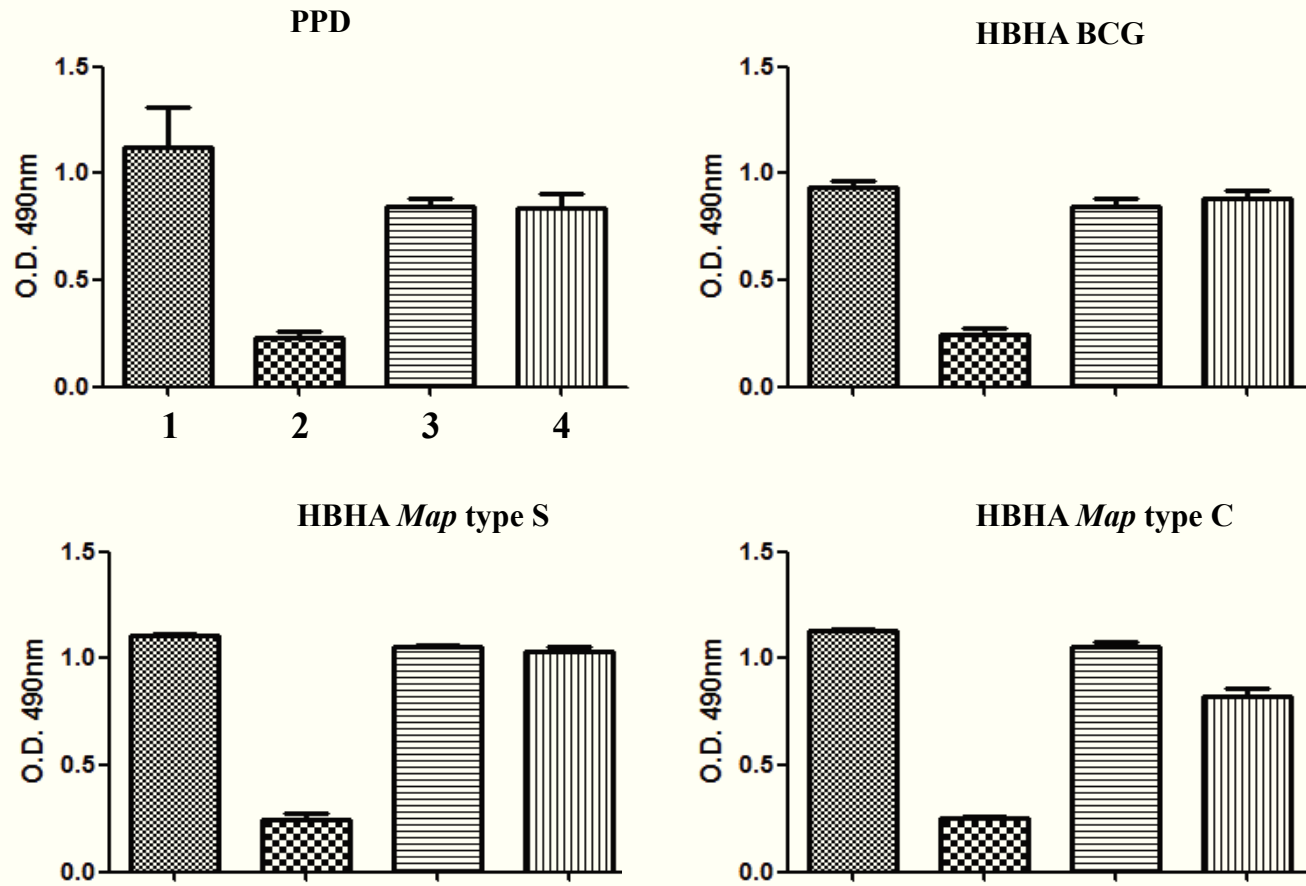


Table 1 : Strains or plasmids used in this study

Strain or plasmid	Genotype and/or description	Reference or source
<u><i>Mycobacterium</i> strains</u>		
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> K10 (ATCCBAA-968)	Bovine Isolate, Ctype	Li et al. 2005
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (ATCC 19698) <sup>T</sup>	Bovine Isolate, C type	Thorel et al. 1990
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> 85/14	Ovine Isolate, S type	Turenne et al. 2008
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> LN20	Porcine isolate, S type	Turenne et al. 2008
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> (ATCC 25291) <sup>T</sup>	Bird isolate	Thorel et al. 1990
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> ST18	Bird isolate	Thorel et al. 1990
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> ST59	Bird isolate	Thorel et al. 1990
<i>M. avium</i> subsp. <i>sylvaticum</i> 6409 (ATCC 49884) <sup>T</sup>	Wood pigeon isolate	Mijs et al. 2002
<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> 104	Human isolate	Thorel et al. 1990
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	Human isolate	Cole et al. 1998
<i>M. bovis</i> BCG	Vaccine strain	WHO
<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 (ATCC 700084)	Lab strain	
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	65 isolate of C type including various genotype	Biet et al. BMC 2012
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	16 isolate of S type including various genotype	Biet et al. BMC 2012
<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	52 isolate with including genotype	Biet et al. BMC 2012
<u><i>E. coli</i> strains</u>		
TOP 10	F- <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74 recA1 araD139 <math>\Delta</math>(<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i></i>	Invitrogen®
BL21 (DE3)	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB-, mB-) <i>gal dcm</i> (DE3)	Invitrogen®
<u>Plasmids</u>		
PCR2 pET (+)	<i>lacZa</i> gene, T7 and Sp6 promoters, Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> T7 promoter, His-Tag coding sequence, <i>lacI</i> gene, Kan <sup>R</sup> or Amp <sup>R</sup>	Invitrogen® Novagen®
<u>Plasmids construction</u>		
pET ::PS-HBHA	pET22b+ :: <i>hbha</i> Map type S (Amp <sup>R</sup> )	This study
pET ::PS-HBHA $\Delta$ C	pET24a+ :: <i>hbha</i> $\Delta$ C-terminal Map type S (1-157Aa)- HisTag N-terminal – (Kan <sup>R</sup> )	This study
pET::PL-HBHA	pET22b+ :: <i>hbha</i> Map LN20 (Amp <sup>R</sup> )	This study
pET::B-HBHA	pET24d+:: <i>hbha</i> BCG (Kan <sup>R</sup> )	This study
pET::Sm-HBHA	pET24d+:: <i>hbha</i> <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 (Kan <sup>R</sup> )	Biet et al. 2007
pET::Av-HBHA	pET24d+:: <i>hbha</i> <i>M. a. avium</i> 25291 (Kan <sup>R</sup> )	This study
pET::PC-HBHA	pET24d+:: <i>hbha</i> Map type C 19698 (Kan <sup>R</sup> )	This study



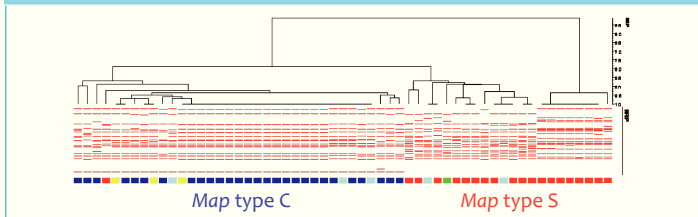
Table 2 : List of primers used in this study

Primers ID	Sequence
HBHA MAPS S	ATATACATATGGCGGAAAACCCG
HBHA MAPS AS	ATATAAAGCTTTCACCTTCTGGGTGACC
HBHA TB-MAA-MAPC S	TATACATATGACCATGGCGGAAAACCCGAACATCG
HBHA TB-MAA-MAPC AS	ATATAAAGCTTGGTACCCACGAGGTGGTTCACGCC
HBHA SMG S	TATACATATGACCATGGCTGACAAGACCCAACCC
HBHA SMG AS	ATATAAAGCTTAAAATAATGACGCCCGCAAGGTCGG
HBHA $\Delta$ C-ter S	ATATCATATG CACCACCACCACCACATGGCGGAAAACCCG
HBHA $\Delta$ C-ter AS	ATATAAAGCTTCTAGATGCCACCAGCTTGGC
5' FAM-HBHA C-ter S	TCGCAGACCCGCGCGGTCCG
HBHA C-ter AS	CTACTTCTGGGTGACCTTCTTGGC

Lefrancois, L.H<sup>1</sup>, Bodier, C.C<sup>1</sup>, Cochard, T<sup>1</sup>, Gilbert, F<sup>1</sup>, Canepa, S<sup>2</sup>, Lecher, S<sup>3</sup>, Raze, D<sup>3</sup>, Lanotte, P<sup>4</sup>, Haguenoer, E<sup>4</sup>, Sevilla, I.A<sup>5</sup>, Stevenson, K<sup>6</sup>, Behr, M<sup>7</sup>, Collins, D<sup>8</sup>, Loch, C<sup>3</sup> and Biet, F<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA, ISP Centre de Tours, Nouzilly, France <sup>2</sup>INRA, PAIB, UMR7247 Centre de Tours, Nouzilly, France <sup>3</sup>CILL, INSERM, CNRS, University of Lille Nord, Institut Pasteur, Lille, France <sup>4</sup>CHRU Bretonneau, Tours, France <sup>5</sup>Neiker-tecnalia, Bizkaia, Spain <sup>6</sup>Moredun Research Institute, Pentlands, Scotland, United Kingdom <sup>7</sup>McGill University, QC, H3G 1A4 Montreal, Canada <sup>8</sup>AgResearch, National Centre for Biosecurity and Infectious Disease, Wallaceville, New Zealand

## FROM GENOTYPE



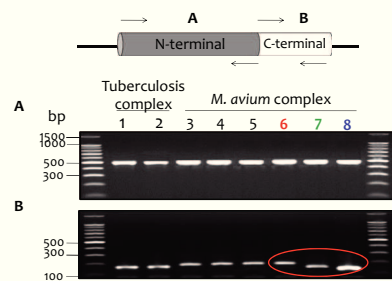
**Figure 1. C and S Map strains are distinguished by their RFLP profile.** Dendrogram based on IS900-RFLP analysis show distinctly the groups of Map strains: type C and S. Similarities were calculated as Dice coefficients. Colour code: dark blue=bovin; green=pig (Map LN20); light blue=caprin; red=ovin & yellow=deer. Results were analyzed by BioNumerics® software v. 6.5 (Applied Maths, Belgium).

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) is the etiologic agent of **Johne's disease** (or paratuberculosis), a highly prevalent **chronic enteric disease** causing significant economic loss worldwide (1). Map strains are isolated essentially from **ruminants** but it can also affect a wide range of other species (2). Genotyping methods have clearly discriminate two groups of Map called **type C** and **type S** for **Cattle and Sheep**, respectively (3). Both types are adapted to the gastrointestinal tract but the **mechanism of entry** through the M cells and epithelial cells is not fully elucidated.

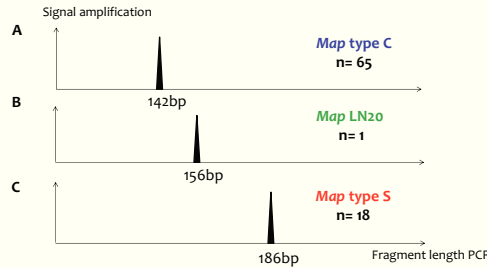
In this study, we investigated the **phenotype of Map-host interaction** for each type of Map through the characterization of the major **Heparin Binding Hemagglutinin Adhesin (HBHA)**, described in *M. tuberculosis* for playing a crucial role for extrapulmonary dissemination of the bacillus (4, 5).

**References:** (1) Clark et al, J. Comp. Path, 1997; (2) Stevenson et al, BMC Mic, 2009; (3) Turenne et al, J. Bact, 2008; (4) Menozzi et al, PNAS, 1998; (5) Pethe et al, Nature, 2001.

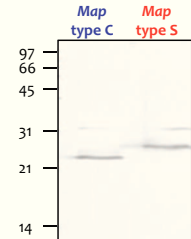
## TO PHENOTYPE



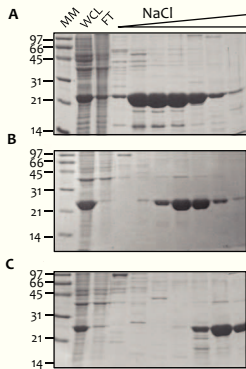
**Figure 2. Variability inter- and intra- species on the hbha gene.** Schematic representation of the PCR performed on the N-terminal domain (A) and C-terminal domain (B) of hbha gene. 1. *M. tuberculosis* 2. *M. bovis* BCG 3. *M. a. hominissuis* 4. *M. a. avium* 5. *M. a. sylvaticum* 6. *Map type S* 7. *Map LN20* 8. *Map type C*. The molecular weight markers (100bp-ladder, Promega®) are indicated in the left margin.



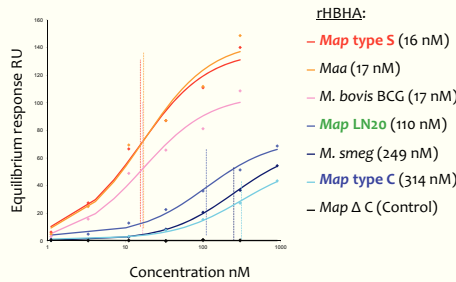
**Figure 3. Distinct hbha gene ascertain on a large collection of Map isolates.** The PCR product corresponding to the C-terminal domain of the hbha gene was amplified using sequences of hbha primers labelled in 5' with a 6-carboxyfluorescein as fluorophore. Results were visualized using the ABI GeneMapper software v. 4.0 with a 600 LIZ® size standards (Applied bio-science, USA). The theoretical values are expected to size is 150bp for Map type C (A) 165bp for Map LN20 (B) and 195bp for Map type S (C). Analysis was performed on 65 strains of Map type C and 18 strains of Map type S including all main genotypes of this subspecies. n: number strains analyzed.



**Figure 4. Natives HBHA expressed by Map type C and S.** Whole cell lysate of Map type C and Map type S were analyzed by western blot using a monoclonal antibody 3921E4 and revealed with goat anti-mouse Ig G & M coupled with phosphatase alcaline. The molecular mass markers expressed in kDa are indicated in the left margin.



**Figure 5. Difference in binding activity to heparin of rHBHA of Map subtype C, LN20 and S by chromatography.** Lysates of *E. coli* recombinants for HBHA of Map were sonicated, the soluble material was subjected onto heparin sepharose chromatography and eluted using a 0-1M NaCl gradient. SDS-PAGE analysis were performed on Whole Cell Lysat (WCL), Flow-Through (FT) and elution fractions of rHBHA. Recombinant HBHA from Map type C (A), Map LN20 (B) and Map type S (C). The molecular mass markers (MM) expressed in kDa are indicated in the left margin.



**Figure 6. Quantification of binding activity to heparin of rHBHA of Map subtype C, LN20 and S by Biacore® technology.** SPR analysis of recombinant HBHA binding to heparin was performed on Biacore® T100 (GE Healthcare). Biotinylated heparin were immobilized on a streptavidin coated CM4 sensorchip. Recombinant HBHA, previously purified by heparin sepharose chromatography, were injected over a range of concentrations at a flow rate of 30µl min<sup>-1</sup>. Running buffer was Tris 50mM, NaCl 50mM, 0,05% Tween 20, pH 7,2. Recombinant HBHA Δ C was used as negative control. KD were determined by the equilibrium method.

➤ The amino-acid sequence and distribution of positive charges in the **C-terminal domain of HBHA** in Map subspecies shows **variability**

➤ **Two forms of HBHA** are highlighted in the Map subspecies: Map type S expresses HBHA with a long C-terminal domain similar to that of *M. a. hominissuis* unlike to HBHA expressed in Map of type C which has a short C-terminal domain

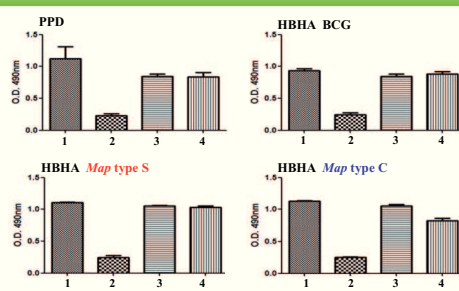
➤ **Correlation** between the length of their C-terminal domain and their **affinities to heparin** was characterized

➤ HBHA produced by Map type C and S are **recognized by sera from infected cattle and sheep without specificity**

❖ HBHA provides a new phenotypic evidence of a subdivision of the Map strain in a type C and S

❖ HBHA expressed by Map is an adhesin but also a biomarker of each type of this subspecies

## SEROLOGICAL RESPONSE



**Figure 7. HBHA from Map type C and S are recognized by sera from infected cattle and sheep showing no specificity.** Plates were coated with 50 µl of PPD, recombinant BCG HBHA, Map type S HBHA or Map type C at 0.1 mg ml<sup>-1</sup> in PBS at 37 °C overnight. Plates were then washed and blocked for 1 h at 37 °C with PBS/T containing 0.5% Gelatine (PBS/T/G). Serum used include a Map positive commercial serum (1) a Map negative commercial serum (2) and sera obtained from ruminants infected by Map of type C (3) or type S (4). Each serum sample was diluted at 1:100 in 50 µl PBS/T/G, and incubated for 2,5 h at 37 °C. Plates were then washed and incubated for 90 min at 37 °C with 50 µl peroxidase-conjugated anti-ruminant-IgG diluted at 1:600 in PBS/T/G. After washing, plates were washed and 50 µl peroxidase substrate was added during 30 min at 37 °C. The reaction was stopped with 50 µl NHCl and the plates were read photometrically at 490 nm.

---

## Article III - Purification of native HBHA from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: optimization of culture conditions and development of the FPLC purification on heparin Sepharose.

*Louise H. Lefrancois, Christelle C. Bodier, Sophie Lecher, Florence B. Gilbert, Thierry Cochard, Ana Paula Teixeira-Gomez, Dominique Raze, Camille Locht and Franck Biet.*

**Introduction :** Le potentiel diagnostique et vaccinal de la HBHA de *M. a. paratuberculosis* K-10 (HBHA-C) ne peut être évalué qu’avec la forme native de la protéine dû à la présence de modifications post-traductionnelles. Par ailleurs, la purification des adhésines natives des mycobactéries est une étape indispensable pour pouvoir analyser leurs propriétés biochimiques et leurs capacités immunogènes. Dans notre précédente étude (Résultats-ARTICLE II), nous avons constaté que la HBHA de *M. a. paratuberculosis* de type C possède un domaine C-terminal plus court, moins chargé positivement et se traduisant par un point isoélectrique plus faible que la HBHA de *M. tuberculosis*.

**Objectifs :** Connaissant les difficultés de croissance de *M. a. paratuberculosis* et les spécificités de structure de la HBHA-C, nous devons optimiser les conditions de culture et définir les conditions optimales de chromatographie pour purifier la HBHA-C native.

**Résultats :** La purification de l’antigène HBHA-C a été réalisée par la méthode de chromatographie d’affinité pour l’héparine. Le premier essai de purification à partir de lysat de *M. a. paratuberculosis* K-10, avec la méthode décrite pour la HBHA de *M. smegmatis* (<sup>34</sup>Biet, 2007), n’a pas permis de mettre en évidence la HBHA-C. Il a été démontré que les charges portées par les répétitions riches en lysines, sur le domaine C-terminal de la HBHA de *M. smegmatis*, influencent l’affinité de la molécule pour l’héparine (<sup>34</sup>Biet, 2007).

Dans un premier temps, la mise au point de la méthode de chromatographie a été réalisée avec des HBHA recombinantes sans tag histidine produites chez *E. coli* (rHBHA). Obtenir une biomasse suffisante pour une purification nécessite un temps d’attente long dû à la croissance extrêmement lente de *M. a. paratuberculosis*. La rHBHA-C a été analysée sur deux types de matrice d’héparine : i) Une matrice d’héparine en poudre emballée dans une colonne « maison » ; ii) Une matrice calibrée déjà emballée dans une colonne commerciale. La rHBHA-C a pu être isolée à partir d’un lysat de *E. coli* de façon équivalente. Pour des raisons

pratiques de reproductibilité, de contamination et de rendement, nous avons décidé de purifier les adhésines natives sur les colonnes prépaquées HiTrap.

Les essais de purification à partir de lysat de *M. a. paratuberculosis* nécessite une biomasse importante. En parallèle de la mise en place de la chromatographie, nous avons comparé une culture de *M. a. paratuberculosis* en fermenteur sous agitation avec une culture statique en flacon afin d'évaluer les conditions de croissance les plus favorables pour obtenir une biomasse suffisante. Les résultats ont montré, par trois expériences indépendantes, que la production de biomasse de *M. a. paratuberculosis* de type C en bio-fermenteur est 5 fois supérieure à celle obtenue en flacon. Les culots de bactéries ont été congelés à -20°C afin être utilisés pour la purification de la HBHA-C native.

Après plusieurs essais, nous avons démontré que l'utilisation d'un tampon 20 mM TrisHCl moins salin que le 0,5 X PBS était préférable pour favoriser l'accrochage efficace de la HBHA-C native sur la colonne d'héparine. Après isolement, la spectrométrie de masse (MS/MS) a permis d'identifier la HBHA-C et l'analyse partielle des modifications post-traductionnelles a été réalisée. Grâce à la purification de la forme native, nous avons pu mettre en évidence, la présence de deux groupements méthyles sur la partie C-terminale de la protéine ainsi que l'acétylation de la partie N-terminale de la HBHA-C apporté par des modifications post-traductionnelles.

**Conclusion-Discussion** : Dans cet article, nous retrouvons deux informations majeures concernant la HBHA-C native ; i) Après 40 jours de culture, la biomasse de *M. a. paratuberculosis* obtenue en fermenteur est plus importante d'un facteur 5 que celle mesurée en flacon ; ii) L'adaptation de la méthode de chromatographie d'affinité, mise en place au laboratoire, nous permet de purifier la HBHA-C sous forme native. L'analyse en masse a révélé que la HBHA-C ne possède pas de méthionine, que le premier résidu est une alanine et que le domaine N-terminal est acétylé, ce qui est fréquent chez les mycobactéries (<sup>175</sup>Okkels, 2004 ; <sup>107, 178</sup>Hwang, 2010). Enfin, la présence de deux groupements méthyles sur les résidus lysines du domaine C-terminal de la HBHA de *M. a. paratuberculosis* a été mise en évidence. Ces modifications post-traductionnelles ont été précédemment décrites sur la HBHA de *M. tuberculosis* et la LBP de *M. smegmatis* (<sup>187</sup>Pethe, 2001 ; <sup>186</sup>2002). L'identification du profil exact de méthylation pourra être mis en évidence acide aminé par acide animé pour identifier toutes les modifications post-traductionnelles présentes.

1 **Purification of native HBHA from *Mycobacterium avium* subsp.**

2 ***paratuberculosis***

3  
4 **Louise H. Lefrancois<sup>1</sup>, Christelle C. Bodier<sup>1</sup>, Sophie Lecher<sup>2,3,4,5</sup>, Florence B. Gilbert<sup>1</sup>,**  
5 **Thierry Cochard<sup>1</sup>, Grégoire Harichaux<sup>6-7-8</sup>, Valérie Labas<sup>6-7-8</sup>, Ana Paula Teixeira-**  
6 **Gomes<sup>1-6</sup>, Dominique Raze<sup>2,3,4,5</sup>, Camille Locht<sup>2,3,4,5</sup> and Franck Biet<sup>1§</sup>**

7  
8 <sup>1</sup>INRA, UMR ISP 1282 Infectiologie et Santé Publique, F-37380 Nouzilly, France

9 <sup>2</sup>CNRS UMR 8204, Lille, France ; <sup>3</sup>INSERM U1019, Lille, France ; <sup>4</sup>Institut Pasteur de Lille,  
10 Lille, France ; <sup>5</sup>Univ Lille Nord de France, F-59000 Lille, France

11 <sup>6</sup>INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements Plate-forme  
12 d'Analyse Intégrative des Biomarqueurs ; <sup>7</sup>CNRS, UMR7247 ; <sup>8</sup>IFCE, F-37380 Nouzilly,  
13 France

14  
15 §Corresponding author. Tel.: +33 2 47 42 78 69; fax: +33 2 47 42 77 79. E-mail address:  
16 Franck.Biet@tours.inra.fr

17

18

19

20

21

22 Email addresses:

23

24 LL: [llefrancois@tours.inra.fr](mailto:llefrancois@tours.inra.fr)

25 CB: [Christelle.Bodier@tours.inra.fr](mailto:Christelle.Bodier@tours.inra.fr)

26 SL: [sophie.lecher@ibl.fr](mailto:sophie.lecher@ibl.fr)

27 FG: [Florence.Gilbert@tours.inra.fr](mailto:Florence.Gilbert@tours.inra.fr)

28 TC: [Thierry.Cochard@tours.inra.fr](mailto:Thierry.Cochard@tours.inra.fr)

29 GH: [gregoire.harichaux@tours.inra.fr](mailto:gregoire.harichaux@tours.inra.fr)

30 VL: [Valerie.Labas@tours.inra.fr](mailto:Valerie.Labas@tours.inra.fr)

31 APTG: [Ana-Paula.Teixeira@tours.inra.fr](mailto:Ana-Paula.Teixeira@tours.inra.fr)

32 DR: [dominique.raze@ibl.fr](mailto:dominique.raze@ibl.fr)

33 CL: [camille.locht@pasteur-lille.fr](mailto:camille.locht@pasteur-lille.fr)

34 FB: [Franck.Biet@tours.inra.fr](mailto:Franck.Biet@tours.inra.fr)

35

## 36 **Abstract**

### 37 **Background**

38 Paratuberculosis remains today a major global problem in animal health, especially for dairy  
39 cattle. However, the diagnosis of its etiologic agent, *Mycobacterium avium* subsp.  
40 *paratuberculosis* (Map), still lacks sensitivity through lack available antigens. Only little is  
41 known on the virulence factors for this pathogen. In this study we have developed a method to  
42 produce and purify the heparin-binding hemagglutinin (HBHA), a major adhesin of  
43 *Mycobacteria*, from a culture of Map.

### 44 **Results**

45 For this extremely slow-growing *Mycobacterium*, a culture was established in a 2-liter  
46 bioreactor. Using the bioreactor the amount of Map biomass was increased by a factor 5  
47 compared to a classical culture in flasks. The map-HBHA was purified from a Map lysate by  
48 heparin-Sepharose fast low-pressure chromatography on HiTrap columns. Binding of map-  
49 HBHA onto the heparin-Sepharose matrix may be reduced in the presence of salt.  
50 Consequently, all steps of sample preparation and column equilibration were carried out in 20  
51 mM Tris-HCl (pH 7.2) buffer. The map-HBHA was eluted by a linear NaCl gradient.

52 High resolution mass spectrometry analyses revealed that the native form of map-HBHA has  
53 post translational modifications, including the removal of the initiation methionine,  
54 acetylation of the alanine residue at the N-terminal extremity and the presence of methylated  
55 lysines in the C-terminal domain of the protein.

### 56 **Conclusions**

57 An optimized culture of Map in a bioreactor was established to purify the native map-HBHA  
58 from a Map lysate by heparin-Sepharose chromatography. The availability of this antigen  
59 offers the possibility to study the structure of the protein and to examine its role in  
60 pathogenicity, in particular to better understand the specific interactions of Map with the

61 intestinal tissue. The map-HBHA obtained in its native immunogenic form may also be useful  
62 to improve the diagnostic test, especially for the development of a new T-cell-based interferon  
63 gamma release assays.

64 **Keywords**

65

66 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, HBHA, heparin-Sepharose chromatography

67



## 68 **Background**

69

70 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) is the etiologic agent of a severe  
71 granulomatous inflammatory bowel disease in ruminants, known as Johne's disease or  
72 paratuberculosis [1, 2]. This enzootic remains today a major animal health problem with a  
73 high global prevalence causing significant economic losses in the cattle industry [2-6]. One  
74 characteristic feature of Map is its adaptation to the gastrointestinal tract of ruminants.  
75 However, the molecular and cellular mechanisms of its interactions with M cells [7] and  
76 epithelial cells [8] are not fully elucidated. *Mycobacterium*-epithelium interactions, much better  
77 studied with *M. tuberculosis*, involve an adhesin called heparin binding hemagglutinin  
78 (HBHA), which plays a crucial role in the binding of the mycobacteria to epithelial cells and  
79 other non-phagocytic cells [9, 10]. HBHA is an adhesin that binds sulphated carbohydrates,  
80 such as heparin, present on the surface of various eukaryotic cell types, via its C-terminal  
81 domain containing lysine-rich motifs [11]. Native HBHA from *M. tuberculosis* carries methyl  
82 groups added post-translationally, which are important for its antigenicity [12]. Several  
83 investigations demonstrated that a HBHA-specific IFN- $\gamma$  response, indicative of latent *M.*  
84 *tuberculosis* infection, and protective immunogenicity depend on the methylation of the  
85 antigen [13-16].

86 Comparative genomics suggests that HBHA is also present in Map. In order to study the  
87 biochemical characteristics of the HBHA from Map (map-HBHA) and to evaluate its  
88 potential in diagnostics and vaccine development, it is essential to dispose of the native map-  
89 HBHA form. Our first attempts to purify map-HBHA by heparin-Sepharose chromatography  
90 under conditions used to purify HBHA from *M. tuberculosis* failed to isolate the map-HBHA.  
91 In addition, the purification was hampered by the difficulty to obtain sufficient biomass of  
92 Map due to the extremely slow growth of this microorganism.

93 In this study we describe a new purification procedure which led to the isolation of native  
94 map-HBHA. In addition, we established a new method of Map culture, using a bioreactor,  
95 which substantially increased the biomass yield and shortened the time of culture.

## 97 **Results Discussion**

98

### 99 **Optimization of Map biomass production in bioreactor**

100 Map is one of the slowest-growing *Mycobacteria* with a mean generation time of 1.38 days  
101 [17]. Map cultures thus require long time periods with limited opportunities for recording and  
102 correcting parameters. Furthermore, the final product of these cultures was shown to contain  
103 high proportions of dead bacilli that may reduce the quality of the proteins harvested [18]. To  
104 circumvent these difficulties, we chose to investigate the growth of Map in bioreactor to  
105 increase the biomass, standardize the culture conditions and control contaminations. Previous  
106 studies using bioreactor described the standardization of *M. bovis* BCG cultures for vaccine  
107 production [19, 20]. Growth of Map in bioreactor was compared to conventional culture  
108 flasks inoculated in parallel with the same Map pre-culture at OD<sub>600nm</sub> of 0.06. After 40 days,  
109 the cultures were centrifuged and the biomasses harvested were weighed. As shown in Figure  
110 1, the biomass harvested from the bioreactor was significantly more important in comparison  
111 to the conventional culture in flasks. Using the bioreactor we obtained, as an average of three  
112 independent experiments, five times more bacteria than with flask cultures (4 versus 20 g L<sup>-1</sup>).

113

### 114 **Protein purification**

115 Our first attempts to purify map-HBHA by heparin-Sepharose chromatography under  
116 conditions used to purify HBHA from *M. tuberculosis* have been unsuccessful. The  
117 explanations come partly from the nature of the protein. Although the alignment of the HBHA  
118 amino acid sequences from different mycobacterial species indicates that these molecules are  
119 highly conserved, the C-terminal lysine-rich domain is rather divergent (Figure 2A). These  
120 differences may modify the affinity of the proteins for the heparin-coupled matrix, due to the  
121 differences in the distribution of the positively charged lysine involved in the cation- and

122 anion-exchange chromatography (Figure 2B). In a previous study, we have shown that the  
123 isolation of the *M. smegmatis* HBHA requires a modification of the elution parameters, as its  
124 C-terminal end is less positively charged, compared to the *M. tuberculosis* HBHA [21]. As  
125 indicated in Figure 2B, the C-terminal sequence of the map-HBHA contains one acidic  
126 residue and 9 positively charged lysines compared to 14 positively charged lysines in HBHA  
127 from *M. tuberculosis*. The predicted isoelectric point (7) is lower than that calculated for  
128 HBHA of *M. tuberculosis* (9.6) or *M. smegmatis* (8.8), suggesting that the binding buffer and  
129 elution parameters have to be adjusted. Because of the slow growth of Map, the  
130 chromatography conditions were first established with a recombinant form of map-HBHA  
131 producing in *E. coli*.

132

### 133 **Heparin-Sepharose column**

134 First, a lysate of recombinant *E. coli* producing map-HBHA was applied onto two types of  
135 heparin-Sepharose columns in 0.5 X PBS: the prepacked HiTrap column or heparin-  
136 Sepharose CL6B poured into a Pharmacia column. As shown in Figure 3, the recombinant  
137 map-HBHA was successfully purified from a lysate of *E. coli*. It was eluted from the heparin-  
138 Sepharose column at low salt concentration starting from 100 mM NaCl. Although both  
139 columns showed similar performances with a lysate containing large amounts of recombinant  
140 map-HBHA, the HiTrap column, more reproducible in our hand, was preferred.

141

### 142 **Buffer conditions**

143 Surprisingly, when a supernatant of whole-cell lysate of Map was subjected to purification  
144 under the conditions established for recombinant map-HBHA, the native map-HBHA was not  
145 isolated. As shown in Figure 4 in late elution fractions only one protein corresponding to  
146 Lbp/Hlp was previously described to bind heparin with strong affinity [22], was eluted at 500

147 mM NaCl in this study. These results suggest that binding buffer and elution parameters need  
148 to be changed to isolate native map-HBHA. The 0.5 X PBS loading buffer was thus replaced  
149 by a 20 mM Tris-HCl (pH 7.2) buffer to reduce the presence of salt that can inhibit the  
150 binding of the protein to the matrix. The map-HBHA prepared in 20 mM Tris-HCl (pH 7.2)  
151 was able to bind efficiently heparin-Sepharose and was eluted at approximately 200 mM  
152 NaCl (Figure 5). The early elution of map-HBHA in the NaCl gradient suggests a relationship  
153 between the number of positive charges in the protein and the binding force to the sulfated  
154 sugars. As indicated in Figure 5, Lbp/Hlp eluted later, at 500 mM NaCl.

155

### 156 **Mass spectrometry analysis**

157 To ascertain the identities of the proteins eluted from heparin-Sepharose chromatography,  
158 High Resolution tandem Mass Spectrometry (HR-MS/MS) analyses using a bottom-up  
159 approach GeLC-MS/MS were carried out. These analyses confirmed that the 25-kDa protein  
160 eluted at 200 mM NaCl corresponded to map-HBHA, and that the 31-kDa protein eluted at  
161 500 mM NaCl corresponded to map-Lbp/Hlp. In addition, HR-MS/MS also revealed  
162 important characteristics of the native proteins purified from the Map culture (Table 1).  
163 Similar to the *M. tuberculosis* HBHA [23], native map-HBHA contained no initial methionine  
164 at N-terminus and the first amino acid was an alanine residue. The cleavage of the initial  
165 methionine is a post-translational common process in *Mycobacteria* [24, 25]. HR-MS/MS  
166 analyses also indicated that the amino-terminal alanine was acetylated. This post-translational  
167 modification already reported for other mycobacterial proteins may be an important regulator  
168 of protein functions [26, 27].

169 Another feature of native map-HBHA, revealed by HR-MS/MS, was the presence of  
170 methylated amino acid (Table 1). Among the peptides analyzed in this study, the lysine  
171 residues 154 and 168 were mono-methylated. Another proteomic analysis should be applied

172 to determine the complete methylation profile of the HBHA expressed in Map. Although the  
173 exact role of the methylation remains to be elucidated, this post-translational modification  
174 was shown crucial for the immunogenicity of the *M. tuberculosis* HBHA. Indeed, only the  
175 native methylated protein is able to induce strong IFN- $\gamma$  secretion by peripheral blood  
176 mononuclear cells from latently infected human [14], and when administered in combination  
177 with strong Th1-promoting adjuvants only the methylated form was able to confer protection  
178 against *M. tuberculosis* in mouse models [16].

179 Altogether these data highlight the importance to dispose of proteins in their native form with  
180 their specific post-translational modifications to understand their function, their location and  
181 to envisage their use as antigen for diagnostic or vaccine development.

## 182 **Conclusions**

183

184 The objective of this study was to develop the conditions that allow the purification of native  
185 HBHA from a lysate of Map. To obtain sufficient biomass of Map, for which the culture is  
186 slow and tedious, a bioreactor culture method was developed. Under these conditions it was  
187 possible to obtain a biomass of 20 g per liter of culture, a 5 times higher yield than in  
188 traditional culture conditions. Native map-HBHA was purified by low pressure heparin-  
189 Sepharose chromatography. HiTrap columns gave the best and most reproducible results. Due  
190 to the specific chemical characteristics of native map-HBHA, in particular the charges present  
191 in the C-terminal part of the protein, the Map lysate had to be prepared in 20 mM Tris-HCl  
192 (pH 7.2) to allow for optimal binding of map-HBHA to heparin-Sepharose matrix. HR-  
193 MS/MS analyses revealed post-translational modifications, such as presence of an acetyl  
194 alanine residue at the N-terminus and methyl-lysines in the C-terminal part of the protein. In  
195 this study, we have thus optimized the Map culture conditions and the purification of native

196 map-HBHA which is therefore now available for structure-function studies and investigations  
197 for use in diagnosis or vaccines against Map.

198

## 199 **Methods**

200

### 201 **Bacterial strains, growth conditions and DNA manipulations**

202 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) strain K-10 (ATCC BAA-968) was  
203 grown at 37 °C in Sauton medium, with 0.2% glycerol and ADC (albumin-dextrose-catalase)  
204 and supplemented with 2 mg L<sup>-1</sup> of mycobactin J (IDVET, Montpellier, France). *E. coli*  
205 TOP10 (Invitrogen Carsbad, CA) and *E. coli* BL21(DE3) (Novagen, Darmstadt, DE) were  
206 grown in LB medium supplemented with 25 µg mL<sup>-1</sup> kanamycin as appropriate. Restriction  
207 enzymes, T4 DNA ligase and other molecular biology reagents were purchased from New  
208 England Biolabs, Roche or Promega. PCRs were performed using a Bio-Rad thermal cycler  
209 model iCycler, and the PCR products were sequenced by GenomExpress (Grenoble, France).

### 210 **Cultivation of Map K-10 in bioreactor**

211 A Map strain K-10 pre-culture was prepared in Sauton medium to obtain an initial optical  
212 density at 600 nm of 0.06. This was then inoculated either in 175 cm<sup>2</sup>-Greiner Bio-one Flasks  
213 maintained at 37 °C in static conditions or in a 2-liter bioreactor (Setric Génie Industriel,  
214 Toulouse, France) constantly kept at 37 °C with a stirring rate at 110 rpm and 12 L h<sup>-1</sup> of air.  
215 During growth, serial time samplings were performed to determine absorbance at 600 nm.  
216 Once the stationary phase was reached, the bacteria were harvested by centrifugation at 7,000  
217 x g for 15 min at 4 °C and stored at -20 °C until use.

218

### 219 **Protein purification by heparin-Sepharose chromatography**

220 A frozen Map pellet corresponding to 5 g was thawed, washed twice in 0.5 X PBS or in 20  
221 mM Tris-HCl (pH 7.2) and heated at 80 °C during 30 min. Heat-killed bacteria were  
222 centrifuged at 10,000 x g for 20 min. The Map pellet was resuspended in 45 mL 0.5 X PBS or  
223 20 mM Tris-HCl (pH 7.2) and sonicated intermittently in a Kimble HS N°45500-30 tube  
224 using a Branson Sonifier 250D for 20 min repeated 4 times, on ice. The soluble material  
225 obtained after a centrifugation at 13,000 x g for 20 min at 4°C was filtered at 0.45µ and  
226 applied onto the heparin-Sepharose matrix.

227 All chromatographic steps were carried out on the Biologic chromatography system (BioRad),  
228 at room temperature and the absorbance at 260 nm was continuously monitored during the  
229 purification. Two types of columns were investigated. One protocol used the HiTrap Heparin  
230 HP (1 mL, GE Healthcare) column (0.7 X 2.5 cm) prepacked with heparin-Sepharose. In the  
231 second protocol 1 g of heparin Sepharose CL-6B (GE Healthcare) resuspended in 5 mL of 0.5  
232 X PBS or 20 mM Tris-HCl (pH 7.2) was poured into a 1.5 x 10 cm column (Pharmacia),  
233 according to the recommendations of the supplier. The columns were washed with 100 mL of  
234 0.5 X PBS or 20 mM Tris-HCl (pH 7.2) until the absorbance at 280 nm is close to 0. The  
235 bound material was eluted by a 0-1M NaCl linear gradient using a flow rate maintained at 0.6  
236 mL min<sup>-1</sup> and automatically collected in 1 mL fractions. Whole cell lysates, flow-through  
237 material and eluted fractions were analyzed by 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide  
238 gel electrophoresis (SDS-PAGE) performed according to Laemmli [28].

239

#### 240 **Cloning, sequencing and production of recombinant map-HBHA in *E. coli***

241 The map-HBHA-encoding gene (MAP3968) was amplified by PCR from chromosomal DNA  
242 using the *Taq* DNA polymerase (Promega) and two synthetic oligonucleotides (Sigma) with  
243 the following sequences: 5'- TATACATATGACCATGGCGGAAAACCCGAACATCG -3'  
244 and 5'- ATATAAGCTTGGTACCCACGAGGTGGTTCACGCC-3', containing *Nde*I and



245 *Hind*III sites (underlined). The fragment was amplified after a short denaturation cycle of 3  
246 min at 95 °C by using 35 cycles as follows: 95 °C for 30 s, 57 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s  
247 with a final elongation cycle at 72 °C for 10 min. The PCR product containing the map-  
248 HBHA-coding sequence was digested by *Nde*I and *Hind*III and then inserted into pET-24a(+)  
249 (Novagen), generating pET::map-HBHA. This plasmid was used to transform *E. coli* TOP 10  
250 for sequencing and *E. coli* BL21(DE3) for protein expression. After transformation, *E. coli*  
251 BL21(DE3) cells were grown at 37 °C in 250 mL LB broth supplemented with 25 µg mL<sup>-1</sup>  
252 kanamycin. At an OD<sub>600</sub> of 0.5, IPTG was added to a final concentration of 1 mM, and  
253 growth was continued for 4 h. The culture was then centrifuged at 7,000 x g for 15 min at 4  
254 °C. The pellet obtained was stored at -20 °C until applied onto heparin Sepharose as described  
255 above.

256 The GenBank accession numbers for the map-HBHA (strains K-10 and ATCC19698)  
257 sequences are [mapK10\_HBHA JX536266 and map19698\_HBHA JX536267].

258

### 259 **Identification of the purified Map proteins by high resolution mass spectrometry** 260 **analysis**

261 Proteins were digested in-gel with trypsin as previously described [29]. Peptides were  
262 analyzed by nanoLC-MS/MS using an Ultimate<sup>®</sup> 3000 RSLC coupled to a LTQ Velos  
263 Orbitrap Mass Spectrometer. Samples were loaded on trap column (Acclaim PepMap 100 C<sub>18</sub>,  
264 100 µm inner diameter x 2 cm) at a flow rate of at 5µL min<sup>-1</sup> with 4 % solvent B (0.1%  
265 formic acid, 15.9% water, 84% acetonitrile) and 96% solvent A (0.1% formic acid, 97.9%  
266 water, 2% acetonitrile). Peptide separations were conducted using nano-column (Acclaim  
267 PepMap C<sub>18</sub>, 75µm inner diameter x 15 cm), with a nanoflow rate of 300 nl min<sup>-1</sup> by applying  
268 a gradient of 4-55% B for 60 min. The LTQ Velos Orbitrap instrument was operated in data-  
269 dependent mode with *R* = 30,000. In the scan range of *m/z* 300-1800, the 10 most intense

270 peptide ions with charge states  $\geq 2$  were isolated for HCD fragmentation. Raw data files were  
271 converted to MGF. The data were searched against nr NCBI database (Eubacteria) using  
272 MASCOT search engine (version 2.3). Carbamidomethylcysteine was set as a fixed  
273 modification, and oxidation of methionine, N-terminal acetylation and methylation of lysine  
274 were set as variable modifications. Two missed cleavage were allowed. The tolerance of the  
275 ions was set to 10 ppm for parent and 0.1 Da for fragment ion matches. Mascot results were  
276 subjected to Scaffold 3 software (version 3.2). Peptide identifications were accepted if they  
277 could be established at greater than 95.0% probability as specified by the Peptide Prophet  
278 algorithm [30]. Protein identifications were accepted if they could be established at greater  
279 than 99.0% probability and contained at least two identified peptide [31]. Identified post-  
280 translational modifications were validated using Scaffold PTM (version 2.0). Localization  
281 sites were accepted if they could be established at greater than 99% probability as specified by  
282 the Ascore algorithm [32].

283

## 284 **Competing interests**

285 The authors have no competing interests.

286

287 **Authors' contributions**

288 FB, LL and DR conceived of the study, participated in its design and coordination, collated  
289 and analyzed the data. FB, LL, DR and CL drafted the manuscript. CB, SL, TC, LL, FG,  
290 APTG, GH and VL participated in the laboratory and field work. All authors read, criticized  
291 and approved the final manuscript.

292

293 **Acknowledgements**

294 FB, LL, CB, TC, FG and APTG were supported by the Institut National de la Recherche  
295 Agronomique (INRA).

296 The high resolution mass spectrometer was financed (SMHART project) by the European  
297 Regional Development Fund (ERDF), the Conseil Régional du Centre, the French National  
298 Institute for Agricultural Research (INRA) and the French National Institute of Health and  
299 Medical Research

300

## 301 **References**

302

303

- 304 1. Clarke CJ: **The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and**  
305 **other species.** *J Comp Pathol* 1997, **116**(3):217-261.
- 306 2. Harris NB, Barletta RG: **Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in**  
307 **Veterinary Medicine.** *Clin Microbiol Rev* 2001, **14**(3):489-512.
- 308 3. Nielsen SS, Toft N: **A review of prevalences of paratuberculosis in farmed**  
309 **animals in Europe.** *Prev Vet Med* 2009, **88**(1):1-14.
- 310 4. Ott SL, Wells SJ, Wagner BA: **Herd-level economic losses associated with Johne's**  
311 **disease on US dairy operations.** *Prev Vet Med* 1999, **40**(3-4):179-192.
- 312 5. Smith RL, Grohn YT, Pradhan AK, Whitlock RH, Van Kessel JS, Smith JM,  
313 Wolfgang DR, Schukken YH: **A longitudinal study on the impact of Johne's**  
314 **disease status on milk production in individual cows.** *Journal of dairy science*  
315 2009, **92**(6):2653-2661.
- 316 6. Wilson DJ, Rood K, Biswas P, Byrem TM: **Herd-level prevalence of Johne's disease**  
317 **in Utah and adjacent areas of the intermountain west as detected by a bulk-tank**  
318 **milk surveillance project.** *Journal of dairy science* 2010, **93**(12):5792-5797.
- 319 7. Momotani E, Whipple DL, Thiermann AB, Cheville NF: **Role of M cells and**  
320 **macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of**  
321 **ileal Peyer's patches in calves.** *Vet Pathol* 1988, **25**(2):131-137.
- 322 8. Pott J, Basler T, Duerr CU, Rohde M, Goethe R, Hornef MW: **Internalization-**  
323 **dependent recognition of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis by**  
324 **intestinal epithelial cells.** *Cellular microbiology* 2009.

- 325 9. Menozzi FD, Bischoff R, Fort E, Brennan MJ, Locht C: **Molecular characterization**  
326 **of the mycobacterial heparin-binding hemagglutinin, a mycobacterial adhesin.**  
327 *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(21):12625-12630.
- 328 10. Pethe K, Alonso S, Biet F, Delogu G, Brennan MJ, Locht C, Menozzi FD: **The**  
329 **heparin-binding haemagglutinin of *M. tuberculosis* is required for**  
330 **extrapulmonary dissemination.** *Nature* 2001, **412**(6843):190-194.
- 331 11. Pethe K, Aumercier M, Fort E, Gatot C, Locht C, Menozzi FD: **Characterization of**  
332 **the heparin-binding site of the mycobacterial heparin-binding hemagglutinin**  
333 **adhesin.** *J Biol Chem* 2000, **275**(19):14273-14280.
- 334 12. Pethe K, Bifani P, Drobecq H, Sergheraert C, Debrie AS, Locht C, Menozzi FD:  
335 **Mycobacterial heparin-binding hemagglutinin and laminin-binding protein share**  
336 **antigenic methyllysines that confer resistance to proteolysis.** *Proc Natl Acad Sci U*  
337 *S A* 2002, **99**(16):10759-10764.
- 338 13. Masungi C, Temmerman S, Van Vooren JP, Drowart A, Pethe K, Menozzi FD, Locht  
339 C, Mascart F: **Differential T and B cell responses against Mycobacterium**  
340 **tuberculosis heparin-binding hemagglutinin adhesin in infected healthy**  
341 **individuals and patients with tuberculosis.** *J Infect Dis* 2002, **185**(4):513-520.
- 342 14. Temmerman S, Pethe K, Parra M, Alonso S, Rouanet C, Pickett T, Drowart A, Debrie  
343 AS, Delogu G, Menozzi FD *et al*: **Methylation-dependent T cell immunity to**  
344 ***Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding hemagglutinin.** *Nat Med* 2004,  
345 **10**(9):935-941.
- 346 15. Guerrero GG, Locht C: **Recombinant HBHA boosting effect on BCG-induced**  
347 **immunity against Mycobacterium tuberculosis infection.** *Clinical & developmental*  
348 *immunology* 2011, **2011**:730702.

- 349 16. Parra M, Pickett T, Delogu G, Dheenadhayalan V, Debrie AS, Locht C, Brennan MJ:  
350 **The mycobacterial heparin-binding hemagglutinin is a protective antigen in the**  
351 **mouse aerosol challenge model of tuberculosis.** *Infect Immun* 2004, **72**(12):6799-  
352 6805.
- 353 17. Lambrecht RS, Carriere JF, Collins MT: **A model for analyzing growth kinetics of a**  
354 **slowly growing Mycobacterium sp.** *Appl Environ Microbiol* 1988, **54**(4):910-916.
- 355 18. Milstien JB, Gibson JJ: **Quality control of BCG vaccine by WHO: a review of**  
356 **factors that may influence vaccine effectiveness and safety.** *Bull World Health*  
357 *Organ* 1990, **68**(1):93-108.
- 358 19. Dietrich G, Mollenkopf HJ, Weber H, Knapp B, Diehl KD, Hess J, Blackkolb F,  
359 Broker M, Kaufmann SH, Hundt E: **Cultivation of Mycobacterium bovis BCG in**  
360 **bioreactors.** *Journal of biotechnology* 2002, **96**(3):259-270.
- 361 20. Nyabenda J, Bautens E, Borremans M, Verhofstadt R, Weckx M, Marchal A: **The**  
362 **production of mycobacterial antigens by homogeneous culture in a fermentor.**  
363 *Journal of biological standardization* 1988, **16**(4):259-267.
- 364 21. Biet F, Angela de Melo Marques M, Grayon M, Xavier da Silveira EK, Brennan PJ,  
365 Drobecq H, Raze D, Vidal Pessolani MC, Locht C, Menozzi FD: **Mycobacterium**  
366 **smegmatis produces an HBHA homologue which is not involved in epithelial**  
367 **adherence.** *Microbes Infect* 2007, **9**(2):175-182.
- 368 22. Lefrancois LH, Pujol C, Bodier CC, Teixeira-Gomez AP, Drobecq H, Rosso ML,  
369 Raze D, Dias AA, Hugot JP, Chacon O *et al*: **Characterization of the**  
370 **Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis laminin-binding/histone-like**  
371 **protein (Lbp/Hlp) which reacts with sera from patients with Crohn's disease.**  
372 *Microbes Infect* 2011, **13**(6):585-594.

- 373 23. Menozzi FD, Rouse JH, Alavi M, Laude-Sharp M, Muller J, Bischoff R, Brennan MJ,  
374 Loch C: **Identification of a heparin-binding hemagglutinin present in**  
375 **mycobacteria.** *J Exp Med* 1996, **184**(3):993-1001.
- 376 24. Kanudia P, Mittal M, Kumaran S, Chakraborti PK: **Amino-terminal extension**  
377 **present in the methionine aminopeptidase type 1c of Mycobacterium tuberculosis**  
378 **is indispensable for its activity.** *BMC biochemistry* 2011, **12**:35.
- 379 25. Zhang X, Chen S, Hu Z, Zhang L, Wang H: **Expression and characterization of two**  
380 **functional methionine aminopeptidases from Mycobacterium tuberculosis**  
381 **H37Rv.** *Current microbiology* 2009, **59**(5):520-525.
- 382 26. Hwang CS, Shemorry A, Varshavsky A: **N-terminal acetylation of cellular proteins**  
383 **creates specific degradation signals.** *Science* 2010, **327**(5968):973-977.
- 384 27. Okkels LM, Muller EC, Schmid M, Rosenkrands I, Kaufmann SH, Andersen P,  
385 Jungblut PR: **CFP10 discriminates between nonacetylated and acetylated ESAT-6**  
386 **of Mycobacterium tuberculosis by differential interaction.** *Proteomics* 2004,  
387 **4**(10):2954-2960.
- 388 28. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of**  
389 **bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**(259):680-685.
- 390 29. Bourin M, Gautron J, Berges M, Attucci S, Le Blay G, Labas V, Nys Y, Rehaul-  
391 Godbert S: **Antimicrobial potential of egg yolk ovoinhibitor, a multidomain**  
392 **Kazal-like inhibitor of chicken egg.** *Journal of agricultural and food chemistry*  
393 2011, **59**(23):12368-12374.
- 394 30. Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R: **Empirical statistical model to**  
395 **estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database**  
396 **search.** *Analytical chemistry* 2002, **74**(20):5383-5392.

- 397 31. Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R: **A statistical model for identifying**  
398 **proteins by tandem mass spectrometry.** *Analytical chemistry* 2003, **75**(17):4646-  
399 4658.
- 400 32. Beausoleil SA, Villen J, Gerber SA, Rush J, Gygi SP: **A probability-based approach**  
401 **for high-throughput protein phosphorylation analysis and site localization.**  
402 *Nature biotechnology* 2006, **24**(10):1285-1292.
- 403
- 404
- 405



## 406 **Figure legends**

407

### 408 **Figure 1: Increasing biomass production using bioreactor**

409 Cultures of Map K-10 (ATCC BAA-968) in flask or bioreactor were inoculated with OD<sub>600 nm</sub>  
410 of 0.06. Both cultures were maintained at 37 °C during 40 days under agitation and air in  
411 bioreactor and under static conditions in flask. The cultures were collected by centrifugation,  
412 and the biomasses were weighed. The figure represents the average of three independent  
413 experiments (+/- standard deviations).

414

### 415 **Figure 2: Sequence alignment of different HBHA proteins**

416 (A) Multiple sequence alignment was performed using the Clustal W program with the  
417 BLOSUM64 matrice allowing gaps (-). \* indicate identical residues. : indicate conserved  
418 substitutions. . indicate semi-conserved substitutions. Mtb, *M. tuberculosis*; BCG, *M. bovis*  
419 BCG; Mah, *M. avium* subsp. *hominissuis* and Map, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. (B)  
420 Distribution of charges within the C-terminal domain of HBHA. The isoelectric point of each  
421 protein is indicated in brackets. Colors code: Polar charged residus HKR (Red); Non polar  
422 aromatic residus FWY (Blue); Non polar aliphatic residus ILMV (Green) and other residus  
423 GPST (Orange).

424

### 425 **Figure 3: Heparin-Sepharose chromatography of recombinant map-HBHA produced in** 426 *E. coli*

427 A culture of recombinant *E. coli* producing map-HBHA was sonicated in 0.5 X PBS. The  
428 soluble material was loaded onto a heparin-Sepharose HiTrap column and eluted using a 0-  
429 1M NaCl gradient. Whole cell lysate (WCL), flow-through material (FT) and eluted material  
430 were analyzed by SDS-PAGE. The fractions eluted between 100 and 350 mM NaCl contained

431 map-HBHA as determined by HR-MS/MS. The molecular weights (MW) expressed in kDa  
432 are indicated in the left margin.

433

434 **Figure 4: Heparin-Sepharose chromatography of a Map lysate in PBS buffer**

435 A Map K-10 culture obtained using the bioreactor was centrifuged, and the pellet was  
436 resuspended in 0.5 X PBS. The bacteria were then sonicated and centrifuged. The whole cell  
437 lysate (WCL) was applied onto a heparin-Sepharose HiTrap column and eluted using a 0-1M  
438 NaCl gradient. WCL and the indicated elution fractions were analyzed by SDS-PAGE. The  
439 fractions 20 and 25, eluted around 500 mM NaCl, contained map-Lbp/Hlp, as determined  
440 HR-MS/MS. The molecular weights (MW) expressed in kDa are indicated in the left margin.

441

442 **Figure 5: Native map-HBHA purified by heparin-Sepharose chromatography in Tris-**  
443 **HCl buffer**

444 Using a 20 mM TrisHCl buffer a whole cell lysate (WCL) of Map was subjected to heparin-  
445 Sepharose HiTrap chromatography. SDS-PAGE analysis shows that the material eluted in  
446 fraction 11 at ca. 200 mM NaCl contained map-HBHA, as determined by HR-MS/MS. The  
447 map-Lbp/Hlp has been identified in fraction 28, eluted at ca. 500 mM NaCl. The molecular  
448 weights (MW) expressed in kDa are indicated in the left margin.

449

450

451

452 Table 1. Identification of map-HBHA by mass spectrometry analysis

Peptides identified by HR-MS/MS	Peptide position Start - End	Peptide modification
<sup>2</sup> A <sub>ac</sub> ENPNIDDLR <sup>11</sup>	2-11	Acetylated
<sup>60</sup> FQEDLPEQFTELRL <sup>72</sup>	60-72	
<sup>73</sup> DKFTTEELR <sup>81</sup>	73-81	
<sup>82</sup> KAAEGYLEAATNR <sup>94</sup>	82-94	
<sup>83</sup> AAEGYLEAATNR <sup>94</sup>	83-94	
<sup>109</sup> LRSQTAFEDASAR <sup>121</sup>	109-121	
<sup>111</sup> SQTAFEDASAR <sup>121</sup>	111-121	
<sup>111</sup> SQTAFEDASARAEGYVDQAVELTQEALGTVASQTR <sup>145</sup>	111-145	
<sup>122</sup> AEGYVDQAVELTQEALGTVASQTR <sup>145</sup>	122-145	
<sup>151</sup> AAK <sub>me</sub> LVGIELPGK <sup>162</sup>	151-162	Methylated
<sup>154</sup> LVGIELPGK <sup>162</sup>	154-162	
<sup>154</sup> LVGIELPGKAEAAAGK <sub>me</sub> <sup>168</sup>	154-168	Methylated
<sup>154</sup> LVGIELPGKAEAAAGKK <sup>169</sup>	154-169	

Peptides highlighted onto sequence<sup>a</sup>

MA<sub>ac</sub>ENPNIDDLRAPLLAALGAADLALATVNDLIANLRERAEETRAETRTRVEERRARL  
TKFQEDLPEQFTELRLDKFTTEELRKAAEGYLEAATNRYNELVERGEAALQRLRSQTA  
FEDASARAEGYVDQAVELTQEALGTVASQTRAVGERAAK<sub>me</sub>LVGIELPGKAEAAAGK<sub>me</sub>KA  
QKAIKAPAKKAPAKRVTQK

453 <sup>a</sup>The 13 peptides identified by HR-MS/MS, indicated in red, correspond to 52% of sequence  
454 coverage

455

456

457

458

459

Figure 1

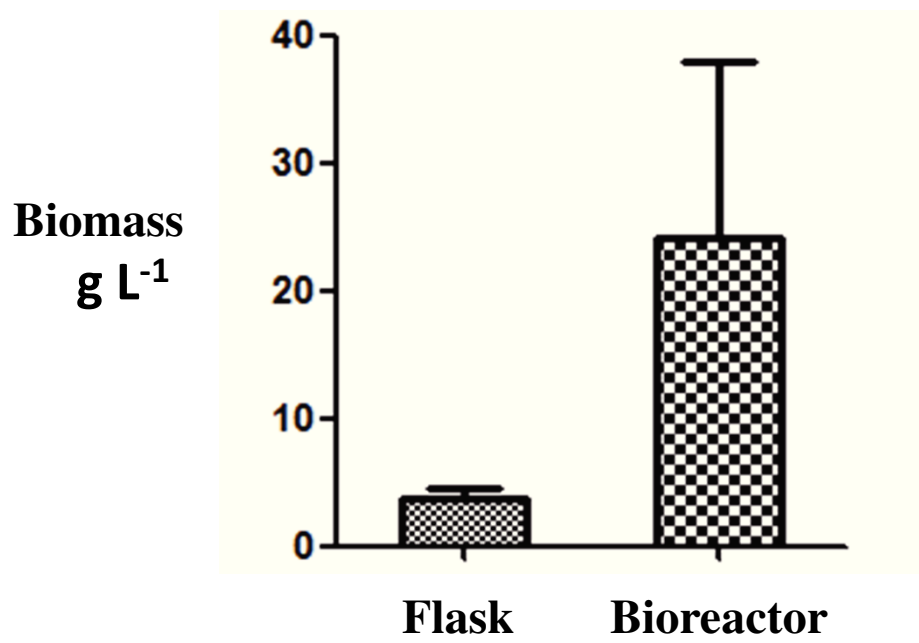


Figure 2

# A

```

Mtb MAEN--SNIDDIKAPLLAALGAADLALATVNELITNLRERAEE TRDTRSRVEESRARLTKLQEDLPEQLTELRKFT-----AEELRKAAEGYLEAATSRYNELVERGEAA 105
BCG MAEN--SNIDDIKAPLLAALGAADLALATVNELITNLRERAEE TRDTRSRVEESRARLTKLQEDLPEQLTELRKFT-----AEELRKAAEGYLEAATSRYNELVERGEAA 105
Mah MAEN--PNIDDLRAPLLAALGAADLALATVNDLIANLRERAEE TRAETRTRVGEERRARLTKFQEDLPEQFTELDRKFT-----TEELRKAAEGYLEAATNRYNELVERGEAA 105
Map MAEN--PNIDDLRAPLLAALGAADLALATVNDLIANLRERAEE TRAETRTRVEERRARLTKFQEDLPEQFTELDRKFT-----TEELRKAAEGYLEAATNRYNELVERGEAA 105
Msmeg MADKTQPTVEELKAPLLA AVGAADLALATVNEI IATLLERAGEARSDAEARVEESRARLTKLQEE LPSQFGE LREKLNSDELRRKLNSEELRKAESYADQATATYNKLVERGEAA 107
*::: .:::***:***:***::*.* ** * **:::* * *****:*.**.*: **.*:. :*****.* : * ***:*****

```

```

Mtb LERLRSQQSFEEVSARAEGYVDQAVELTQEALGTVASQTRAVGERAAKLVGIELPKKAAPA-KKAAPA-----KKAAPAKKAAKKAP-----AKKAAAKKV TQK 199
BCG LERLRSQQSFEEVSARAEGYVDQAVELTQEALGTVASQTRAVGERAAKLVGIELPKKAAPA-KKAAPA-----KKAAPAKKAAKKAP-----AKKAAAKKV TQK 199
Mah LQRLRSQTA FEDASARAEGYVDQAVELTQEALGTVASQTRAVGERAAKLVGIELPGKAE AAGKKAQKA-----IAKAPAKKAPAKKAPAKKAPAKKAAAKKV TQK 205
Map LQRLRSQTA FEDASARAEGYVDQAVELTQEALGTVASQTRAVGERAAKLVGIELPGKAE AAGKKAQKA-----IAKAPAKKAP-----AKKV TQK 190
Msmeg LERLRNQPALEEAATRVET YTDQAVELTQEALGTVASQTRAVGERAAKLVGIELPKRAE AAE TASEAAAE TAE PVKKAAPAAKKAAPAKKAPAKKATPAKSA AKAPAKKV TQK 232
*:*.* * :*:***:*. * * *****:*** :* . * : * * *****

```

# B

```

Mtb ELP++----++----++----++----++----++----++VTQK (9.6)
BCG ELP++----++----++----++----++----++----++VTQK (9.6)
Mah ELP-+-E----++-+-----+----++----++----++----++VTQK (10.2)
Map ELP-+-E----++-+-----+----++----++VTQK (7)
Msmeg ELP++-E--E--E--E--E--++----++----++----++----++----+----+----++VTQK (8.8)

```

Figure 2

Figure 3

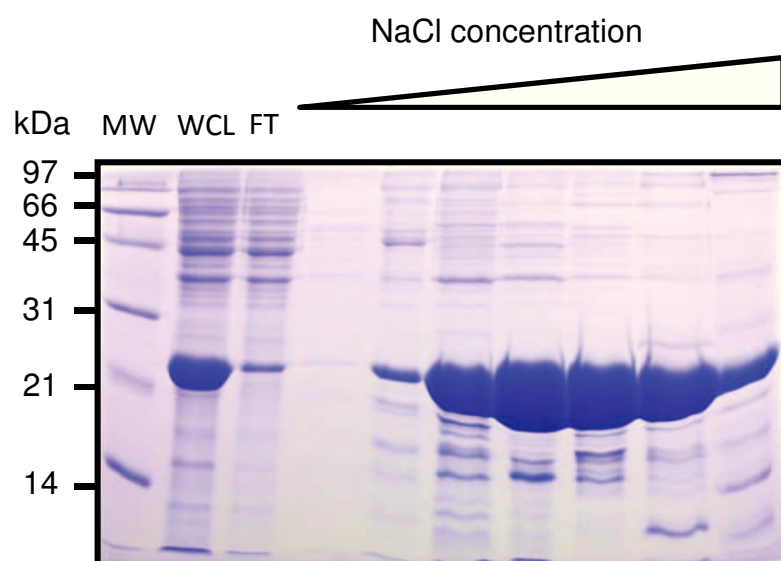


Figure 4

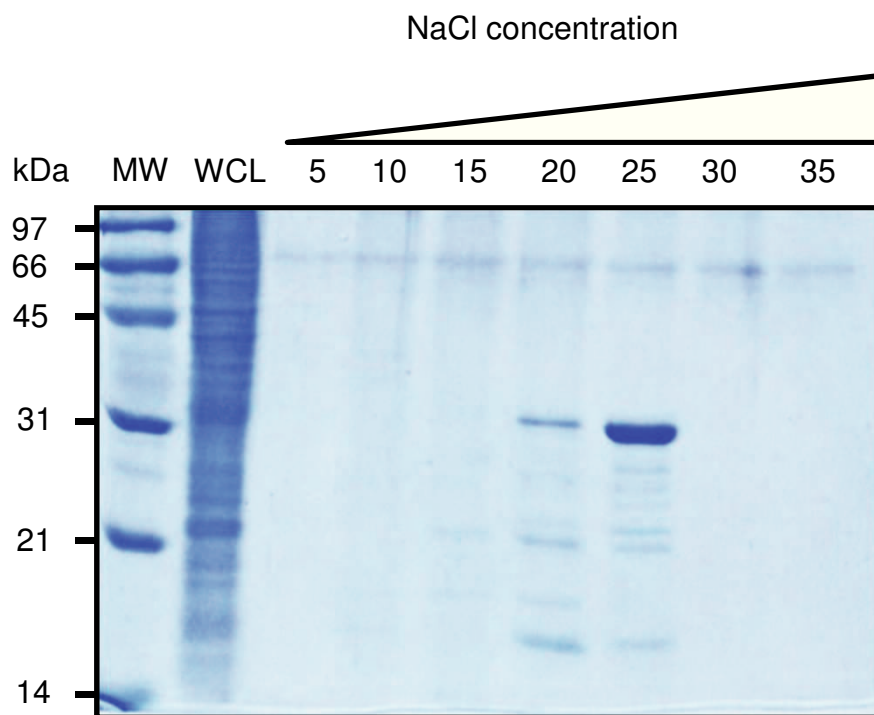
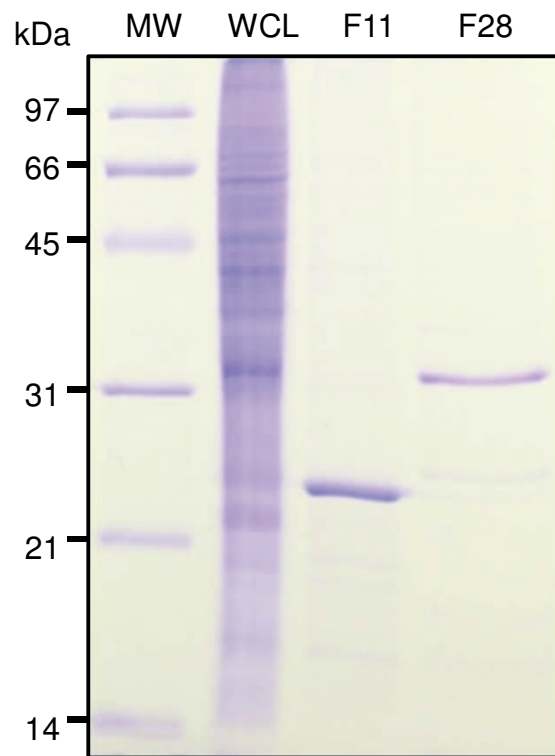


Figure 5





Louise H. Lefrancois<sup>1</sup>, Ana-Paula Teixeira-Gomes<sup>1-2</sup>, Grégoire Harichaux<sup>2-3</sup>, Christelle C. Bodier<sup>1</sup>, Florence B. Gilbert<sup>1</sup>,

Thierry Cochard<sup>4</sup>, Sophie Lecher<sup>4-5-6-7</sup>, Dominique Raze<sup>4-5-6-7</sup>, Camille Locht<sup>4-5-6-7</sup>, Valérie Labas<sup>2-3</sup>, Franck Biet<sup>1</sup>

(1) INRA, UMR 1282, Infectiologie et Santé Publique, F-37380 Nouzilly, France – Université François Rabelais, UMR 1282, Infectiologie et Santé Publique, F-37000 Tours, France.

(2) INRA, Plate-forme d'Analyse Intégrative des Biomarqueurs (PAIB), F-37380 Nouzilly, France.

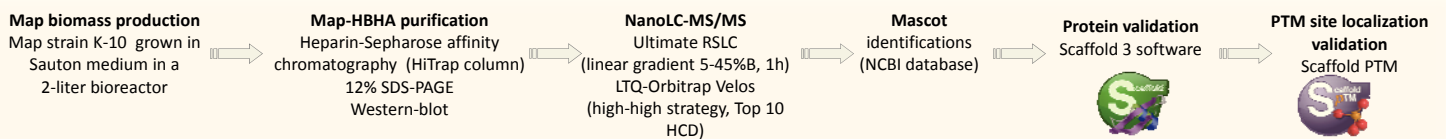
(3) INRA, UMR INRA 85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements – UMR CNRS 7247 – Université de François Rabelais–IFCE, F-37380 Nouzilly, France.

(4) CNRS UMR 8204, Lille, France; (5) INSERM U1019, Lille, France; (6) Institut Pasteur de Lille, Lille, France; (7) Univ Lille Nord de France, Lille, France.

## INTRODUCTION

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) is the etiological agent of paratuberculosis or Johne's disease, a chronic enteric disease causing significant economic losses in the bovine sector. The diagnosis of this pathogen still lacks of sensitivity through lack available specific antigen. Also virulence mechanisms implemented by the bacteria remain largely unknown at the present time. In *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), the heparin binding hemagglutinin adhesin (HBHA) has been described as major virulence factor involved in the mechanism of extra-pulmonary spread which is a key step to the pathogenesis of MTB. When this protein is produced in native form its carboxyl-terminal domain contains methylations which are essential for inducing a protective response and also crucial to induce an immune response used for early diagnosis of tuberculosis. The objectives of this study were to purify, identify and establish the biochemical characteristics of the adhesin HBHA homologue expressed by Map (map-HBHA).

## EXPERIMENTAL APPROACH AND RESULTS



### 1- Analysis of the HBHA sequences

First tests to purify map-HBHA by heparin-Sepharose with conditions used to purify *M. tuberculosis* HBHA have been unsuccessful (data not shown). Comparative amino acid sequence analysis of the HBHA from different mycobacterial species shows that these molecules are highly conserved but the C-terminal lysine rich domain is more divergent (Fig. 1A). These differences might modify the affinity of the adhesin for heparin matrix due to the distribution of the positively charged lysine involved in the cation- and anion-exchange chromatography (Fig. 1B).

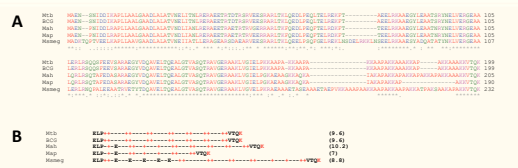


Fig. 1 : (A) Multiple sequence alignment was performed using the Clustal W program with the BLOSUM64 matrix allowing gaps (-). "\*" : identical residues in all sequences. "." : conserved substitutions. "x" : semi-conserved substitutions. Mtb, *M. tuberculosis*; BCG, *M. bovis* BCG; Mah, *M. avium* subsp. *Hominissuis*; Map, *M. avium* subsp. *Paratuberculosis* and Msmeg, *M. smegmatis*. (B) Distribution of positives charges within the C-terminal domain of HBHA. The isoelectric point of each protein is indicated in bracket.

### 2- Native map-HBHA purification

Due to the specific biochemical characteristics of HBHA expressed by Map, in particular the charges present in the C-terminal of the protein part, Map lysate must be prepared in 20 mM Tris-HCl (pH 7.2) buffer, to allow an optimal binding of the map-HBHA onto the heparin-Sepharose. HBHA was purified in its native form in the fraction number 10 at ca. 200 mM NaCl (Fig. 2A). Immunoblotting analysis of this fraction with the monoclonal antibody 3921E4 allowed identify map-HBHA (Fig. 2B). The map-Lbp/Hlp has been identified by mass spectrometry between fraction number 20 to 28 eluted at ca. 450 mM NaCl.

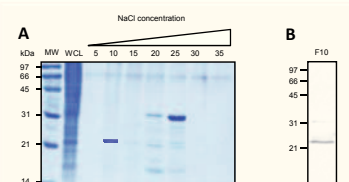


Fig. 2 : (A) Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel of WCL and elution fractions obtained after heparin-Sepharose affinity chromatography. MW: molecular weight; WCL : Whole Cell Lysat; F5 to F35 correspond to elution fraction number. (B) Immunoblotting analysis of the fraction 10 contained the map-HBHA, revealed by the monoclonal antibody 3921E4.

### 3- Identification and structural characterization of native map-HBHA by mass spectrometry

Identification of native map-HBHA from fraction 10 was confirmed by mass spectrometry analysis. It was identified as the first hit with 13 unique peptides in 158 total spectra and 49% sequence coverage. Characterization of map-HBHA allowed to identify three post-translational modification types: N-terminal alanine acetylation (+42) with the removal of N-terminal methionine and two lysine methylation sites in the C-terminal domain of the protein (Fig. 3 and Table 1).

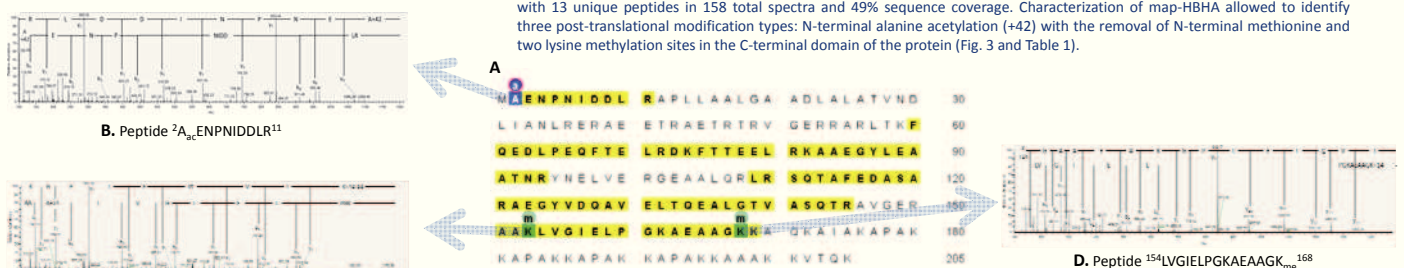


Fig. 3 : (A) Amino acid sequence of Heparin-binding hemagglutinin adhesin with identified peptides highlighted in yellow and sites of post-translational modifications localized by Scaffold PTM drawn in blue or green. (B) MS/MS spectrum of acetylated peptide with removal of initiator methionine <sup>2</sup>A<sub>n</sub>ENPNIDDLR<sup>11</sup>. (C) MS/MS spectrum of methylated peptide <sup>151</sup>AAK<sub>me</sub>LVGIELPGK<sup>162</sup>. (D) MS/MS spectrum of methylated peptide <sup>154</sup>LVGIELPGKAEAAAGK<sub>me</sub><sup>168</sup>.

**Table 1** : Modified peptides identified from native map-HBHA. Post-translational sites localization are determined by the Ascore algorithm used in Scaffold PTM and are marked by pound (\*). The Ascore is specific for site localization and uses the Peptide Score to determine the most-likely candidates. Sites with Ascore values  $\geq 20$  are considered confidently localized (p $\leq 0.05$ ). The Peptide Score is a probability-based score for the entire peptide match (not just the modification sites).

Peptide sequence	Mass deviation (ppm)	Type of modification	Site	Peptide score	Ascore
A <sup>n</sup> ENPNIDDLR	-0.8	Acetylation	A2	205.33	1000.00
AAK <sup>me</sup> LVGIELPGK	-1.3	Methylation	K153	240.40	271.01
LVGIELPGKAEAAAGK <sup>me</sup>	-1.5	Methylation	K168	268.88	105.70

## CONCLUSION

In this study, we described a new purification procedure which led to the isolation of the native map-HBHA. The mass spectrometry analysis has revealed the presence of several post-translational modifications including acetylation on the N-terminal end of the protein, initiator methionine removal and two sites of lysine methylation in the carboxyl-terminal domain of the protein. The prospects of this work will seek to complete characterization of post-translational modification sites in this protein and to discover if they play a role, on the one hand, in pathogenicity and on the other hand, on the induction of a cellular immune response in order to improve the diagnostic test.

Nous avons réalisé l'étude suivante en marge du projet de thèse. *M. intracellulare* est un pathogène humain avec un tropisme pulmonaire qui est génétiquement distinct de l'espèce *avium*. Nous avons eu l'opportunité d'obtenir des isolats cliniques humains provenant de différents sites infectieux, c'est pourquoi nous avons caractérisé les adhésines HBHA et LBP de *M. intracellulare* et étudié leur polymorphisme, ce qui rentre dans le cadre de l'étude des adhésines du MAC.

## Etude IV - Profil d'expression d'adhésines chez *Mycobacterium intracellulare*.

*Louise H. Lefrançois, Thierry Cochard, Christelle C. Bodier, Eve Haguenoer, Philippe Lanotte, Jeanette Maugein, Franck Biet.*

### *Résultats non publiés*

#### 1. Introduction

---

Le complexe *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC) regroupe deux espèces très proches *Mycobacterium avium* et *Mycobacterium intracellulare* (Mi) qui n'étaient pas aisément différenciables jusqu'à ces dernières années. Les progrès récents de génétique bactérienne et les moyens d'identification moléculaire permettent maintenant de bien les individualiser. Ces mycobactéries, non tuberculeuses, sont des pathogènes opportunistes chez l'homme et responsables de maladies parfois sévères chez de nombreuses espèces animales. Chez l'homme, *M. intracellulare* représente la deuxième cause de maladie après les mycobactéries du complexe *tuberculosis* avec un pouvoir pathogène plus important que *M. avium* chez le patient séronégatif pour le VIH (<sup>97</sup>Han, 2005). Cette bactérie, également retrouvée dans l'environnement, est responsable très majoritairement d'atteintes pulmonaires qui surviennent plus particulièrement chez les patients aux antécédents de cancer pulmonaire ou d'hémopathie maligne. *M. intracellulare* est un membre du MAC et a un tropisme adapté au poumon, ce qui nous a conduit à nous demander si la HBHA produite par cette espèce est ou non responsable de la spécificité tissulaire. De plus, très peu de données permettent de comprendre les facteurs impliqués dans la pathogénicité de *M. intracellulare*. C'est pourquoi nous avons cherché à identifier, isoler et caractériser les adhésines de la famille des HBHA (*Heparin-Binding HemAgglutinin*) et LBP (*Laminin-Binding Protein*) dans cette étude à partir de la souche de référence et également à partir d'un panel d'isolats cliniques humains provenant de différentes pathologies (<sup>61</sup>Dauchy, 2010).

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1 Souches utilisées dans cette étude

Grâce à une collaboration étroite avec le Dr Philippe Lanotte du service Bactériologie-Virologie de l'hôpital Bretonneau de Tours, nous avons pu obtenir des isolats cliniques génotypés de *M. intracellulare* provenant de différentes pathologies (<sup>61</sup>Dauchy, 2010). Ces 16 souches sont répertoriées dans le tableau ci-dessous. La souche de référence utilisée est la souche *M. intracellulare* ATCC 13950 qui est séquencée et assemblée (<sup>123</sup>Kim, 2012).

Tableau 2 : Caractéristiques des isolats cliniques de *M. intracellulare* utilisés dans l'étude des adhésines

N° souches	Origine clinique	Pathologie/terrain
1	Lavage Broncho-Alvéolaire (LBA)	Mucoviscidose
2	Expectoration	Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO)
3	LBA	Mucoviscidose
4	LBA / Sang	Leucémie Aigue Lymphoblastique
5	Expectoration	Mucoviscidose
6	Expectoration	BPCO
7	Expectoration	Dilatation Des Bronches (DDB)
8	Expectoration	Cancer pulmonaire
9	Expectoration	
10	Expectoration	DDB
11	Expectoration	Cancer pulmonaire
12	LBA	DDB
13	LBA / Sang	Virus Immunodéficience humain (VIH)
14	LBA	DDB
15	Asp bronchique	Pneumopathie à l'amiante
16	Expectoration	Cancer pulmonaire

### 2.2 Polymerase Chain Reaction

Les amorces utilisées pour amplifier le gène codant pour la HBHA et la LBP de *M. intracellulare* sont indiquées dans le tableau suivant :

Tableau 3 : Liste des amorces utilisées dans l'étude des adhésines de *M. intracellulare*

Nom	Séquence des amorces
<i>hbhA</i> -Mi	P1: Sens - ATATACATATGGCGGAAAACCCG P2 : Antisens - TATAAAGCTTCTACTTCTGGGTGACCTTCTTGGCC
<i>lbp</i> -Mi	P3 : Sens - ATATACATATGAATAAGGCAGAGCTCATTGATG P4 : Antisens - ATATAAGCTTCTACGCGCGGCCGCGACGCGCGG

Les conditions PCR sont les suivantes : dans un volume final de 25  $\mu\text{L}$ , 2,5  $\mu\text{L}$  de chaque couple d'amorces P1-P2 ou P3-P4 à 10  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{L}$  de dNTP 2 mM (Promega), 5  $\mu\text{L}$  de tampon GoTaq 5X, 1,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM (Promega), 1  $\mu\text{L}$  de DMSO (Dimethyl sulfoxide) (Sigma-Aldrich™), 0,1  $\mu\text{L}$  de GoTaq Flexi® (Promega) à 1U/ $\mu\text{L}$  et 1  $\mu\text{L}$  d'ADN. Le cycle PCR a été réalisé dans un thermocycleur TC-512 (Techne) de la manière suivante : une étape de dénaturation à 94°C pendant 5 min puis 40 cycles comprenant une étape de dénaturation pendant 30 s à 94°C, une étape d'hybridation pendant 30 s à 60°C et une étape d'élongation pendant 30 s à 72°C suivie d'une élongation finale pendant 7 min à 72°C.

### 2.3 Chromatographie d'affinité pour l'héparine

La purification des adhésines de *M. intracellulare* ATCC 13950 a été réalisée dans les conditions précédemment décrites (Résultats - PARTIE II).

Le culot de *M. intracellulare* ATCC 13950 est repris dans du TpA, centrifugé 20 min à 13.000g puis repris dans 15 mL de 20 mM TrisHCl 0,05% Tween 80 (pH 7,2). Les échantillons sont conservés dans la glace durant les prochaines étapes afin d'éviter la protéolyse. Les bactéries sont ensuite lysées par sonication (Branson 250D) (pulsations 60% ; intervalle 0,01sec ; durée pulsation 20 min). Les lysats sont centrifugés à 4 °C pendant 20 min à 13.000g et les surnageants sont filtrés à 0,45  $\mu$  avant d'être appliqués sur une colonne HiTrap Heparin HP de 1 mL préalablement équilibrée avec du 20 mM TrisHCl (pH 7,2). L'échantillon est passé sur la colonne avec un débit constant de 0,4 mL min<sup>-1</sup>. La colonne est ensuite lavée avec du 20 mM TrisHCl (pH 7,2) jusqu'à obtenir une absorbance proche de 0 puis les protéines liées à la matrice sont éluées par un gradient linéaire de 0-1M NaCl/20mM TrisHCl (pH 7,2) à 0,6 mL min<sup>-1</sup>. Les fractions d'éluion de 1 mL, collectées automatiquement, sont ensuite analysées par SDS-Page.

### 2.4 Analyse par SDS-PAGE et immunoblot

Les lysats des différents isolats cliniques de *M. intracellulare* et les fractions d'éluion de la chromatographie d'affinité pour l'héparine sont analysés sur un gel SDS-PAGE avec 12% d'acrylamide comme décrit précédemment (<sup>129</sup>Laemmli, 1970). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant 4 h. Après 1 h de saturation avec du PBS/Tween/BSA, la membrane est incubée avec un anticorps monoclonal 3921E4 (<sup>207</sup>Rouse, 1991) pendant 1 h à 37 °C. Après plusieurs lavages au PBS/Tween, l'anticorps secondaire

(anti-IgG IgM de souris) couplé à la phosphatase alcaline est ajouté durant 1 h à température ambiante. La réaction est révélée par ajout de NBT/BCIP (Promega).

### 2.5 Construction d'une souche de *M. intracellulare* bioluminescente et fluorescente

Les gènes de la « *Green Fluorescent Protein* » (*gfp*) et de la luciférase (*lux*) sont portés par le plasmide pSMT3LxEGFP (<sup>105</sup>Humphreys, 2006), ce qui nous permet, par électroporation, d'obtenir des souches mycobactériennes recombinantes pour ces deux gènes. Une culture de *M. intracellulare* ATCC 13950 en phase exponentielle a été centrifugée pendant 15 min à 4.000 g à 4°C. Le culot obtenu a ensuite été lavé plusieurs fois avec du glycérol 10% pour obtenir des bactéries compétentes. Pour la transformation, 1 µg de plasmide pSMT3LxEGFP a été mis en contact avec 70 µL de bactéries électro-compétentes puis soumis à un choc électrique de 2,5 kV, 800 Ω et 25 µF avec le Gene Pulser XCell (Biorad). Les bactéries ont été reprises dans 1 mL de milieu 7H9 Middlebrook supplémenté de 10% d'ADC puis étalées sur milieu 7H11 agar supplémenté de 10% OADCet d'hygromycine (50 µg/ml). La boîte est ensuite incubée à 37 °C pendant une quinzaine de jours, donnant ainsi la souche *M. intracellulare*-GFPLux.

### 2.6 Cytoadhérence de *M. intracellulare*

Les cellules épithéliales pulmonaires humaines A-549 sont maintenues à 37 °C avec 5% CO<sub>2</sub> dans le milieu DMEM (Lonza) supplémenté avec 10% Sérum Veau Fœtal décomplémenté (Invitrogen), 2 mM L-glutamine et 1 % de sodium pyruvate. Vingt-quatre heures avant le test d'adhésion 2. 10<sup>5</sup> cellules/puits ont étéensemencées dans une plaque 24 puits contenant dans une partie des lames de verre pour l'observation microscopique. La souche recombinante de *M. intracellulare* ATCC 13950 possédant le plasmide qui porte les gènes *gfp* et *Lux* a été utilisée comme inoculum. Ainsi, nous pouvons observer de façon qualitative l'adhésion de *M. intracellulare*-GFP aux cellules épithéliales et la quantifier par comptage d'unités formant colonie (UFC). Pour préparer l'inoculum, la souche recombinante *M. intracellulare*-GFPLux a été lavée avec du PBS puis remise en suspension dans du DMEM. Les cellules A-549 confluentes ont été lavées avec du PBS puis infectées avec *M. intracellulare*-GFPLux avec une « multiplicity of infection » (m. o. i) de 100 bactéries/cellule (environ 10<sup>7</sup> bactéries/mL) en présence ou en absence d'héparine (80 µg/mL) et de laminine (20 µg/mL) dans le milieu de culture. Après 3 h d'infection, les puits ont été lavés avec du PBS et traités de deux façons

: i) Une partie des cellules infectées ont été fixées avec 500 µL de paraformaldehyde 10%, colorées avec 500 µL de bleu Evans 0,01% et observées par microscopie à fluorescence à objectif 40 ; ii) L'autre partie des cellules infectées a été traitée avec 500 µL de SDS 0,025% et 500 µL de tyloxapol 0,1%. Puis, des dilutions successives ont été réalisées, étalées sur milieu 7H11 + 10% OADC + Hygromycine (50 µg/mL) et les colonies ont été comptées après 15 jours d'incubation à 37 °C. La quantification des propriétés adhésives de *M. intracellulare* a été rapportée en UFC/mL. \* P value a été calculée grâce au « unpaired two tailed t-test » réalisé sur le logiciel GraphPad Prism version 5.00 où P <0,05 est considérée comme statistiquement significative. La barre d'erreur représente l'écart-type et les résultats ont été obtenus en «triplicate».

### 3. Résultats

---

#### 3.1 Caractérisation des adhésines de la souche de référence de *M. intracellulare*

##### 3.1.1 Analyse *in silico*

Tout d'abord, nous avons cherché et identifié *in silico* la présence des gènes *hbhA* et *lbp* sur le génome de *M. intracellulare* ATCC 13950. L'analyse montre que ces gènes n'ont pas de fonction connue et sont très homologues à ceux décrits pour les espèces du MAC. La HBHA (205 aa) est identique à 100% alors que la LBP (218 aa) se distingue légèrement des autres espèces du MAC avec une homologie de 90%. Ces données nous confirment que la famille des HBHA et LBP est très conservée chez les mycobactéries bien que les espèces *avium* et *intracellulare* soit phylogénétiquement distinctes.

##### 3.1.2 Cytoadhérence

Différents rapports montrent que l'ajout de composants de la matrice extracellulaire serait capable de moduler l'adhérence des bactéries aux cellules épithéliales (<sup>280</sup>Wastrom, 1999). Comme *M. intracellulare* a un tropisme pulmonaire dans 90% des cas, l'utilisation des pneumocytes A-549 comme modèle est donc tout à fait justifié. Les résultats mettent en évidence que *M. intracellulare*-GFPLux est capable d'adhérer aux cellules épithéliales pulmonaires. L'ajout de composants exogènes tels que l'héparine ou la Lm a une influence antagoniste sur l'adhérence du bacille. En effet, une diminution de l'adhésion est observée lorsque les bactéries sont pré-incubées avec de l'héparine alors qu'une augmentation

significative de l'adhésion est observée lorsqu'elles sont pré-incubées avec de la laminine (Figure 25A et B). Ces résultats suggèrent que deux adhésines de type HBHA et LBP produites par *M. intracellulare* pourraient être impliquées dans l'adhésion par deux mécanismes qui semblent être indépendants l'un de l'autre.

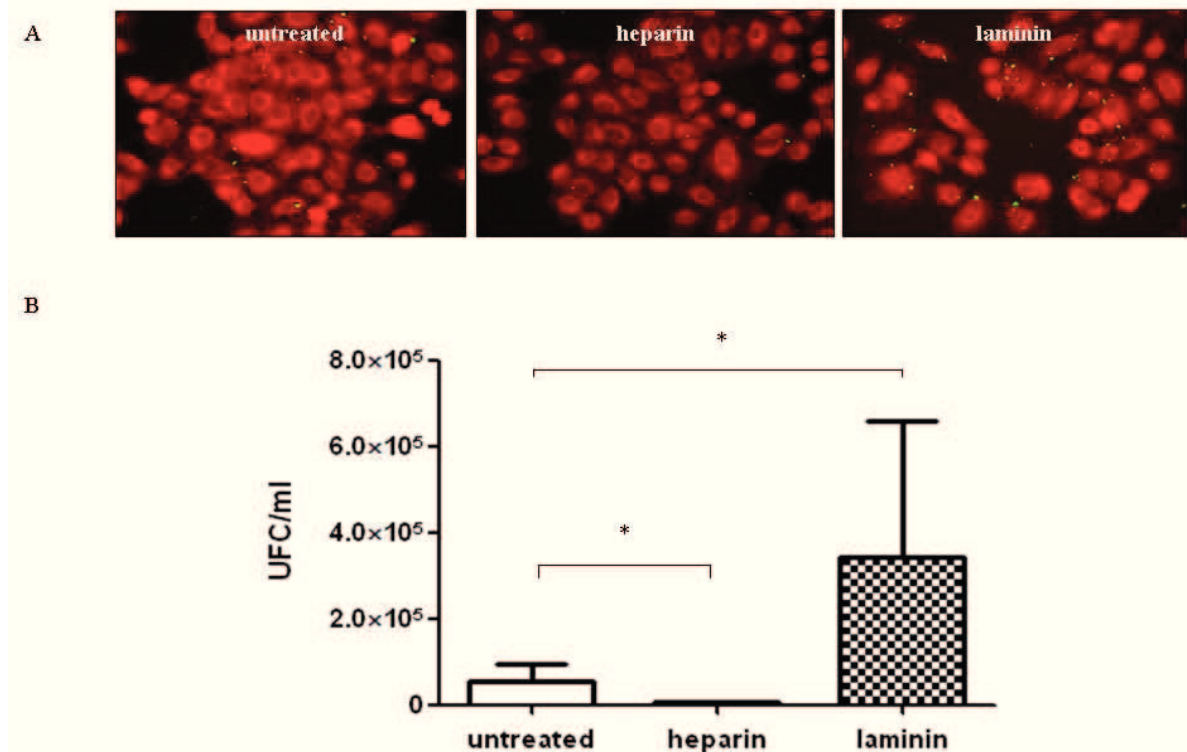


Figure 25 : Mise en évidence de l'adhésion de *M. intracellulare* aux cellules épithéliales pulmonaires A-549. Les cellules A-549 ont été infectées par *M. intracellulare*-GFP avec une m.o.i de 100, en présence et/ou absence d'héparine (80 µg/ml) et de laminine (20 µg/ml). (A) Les cellules infectées sont observées par microscopie à fluorescence à objectif 40. (B) Les cellules infectées sont étalées sur milieu 7H11 + 10% OADC + Hygromycine (50 µg/ml) et les colonies ont été comptées après 15 jours de culture. La quantification des propriétés adhésives de Mi a été rapportée en UFC/ml. \* P value a été calculée grâce au « unpaired two tailed t-test » réalisé sur le logiciel GraphPad Prism version 5.00 où P <0,05 est considérée comme statistiquement significative. La barre d'erreur représente l'écart-type et les résultats ont été obtenus en « triplicate ».

### 3.1.3 Expression et purification des adhésines de *M. intracellulare*

Les effets des composants de la matrice extracellulaire laissent supposer que *M. intracellulare* exprimerait à sa surface des adhésines homologues à la HBHA et la LBP qui seraient capables de médier l'adhésion du bacille. La reconnaissance, par l'anticorps monoclonal 3921 E4, de deux bandes à 28 kDa et ~31 kDa dans le lysat de *M. intracellulare* par immunoblot a révélé la présence et l'expression de ces deux adhésines HBHA et LBP (Figure 26A).

Les protéines impliquées dans ces processus ont été purifiées par la chromatographie d'affinité pour l'héparine réalisée à partir d'un lysat de *M. intracellulare* par la méthode



décrite précédemment (<sup>153</sup>Menozzi, 1996 ; <sup>34</sup>Biet, 2007 ; Résultats-ARTICLE III). L'analyse des fractions d'élution par SDS-PAGE a mis en évidence deux bandes à 28 kDa et ~31 kDa qui ont été identifiées en spectrométrie de masse comme la HBHA et la LBP de *M. intracellulare*, respectivement (Figure 26B). Les résultats montrent également la présence de modifications post-traductionnelles sur le domaine C-terminal de ces deux protéines, mises en évidence par l'identification de groupements méthyles.

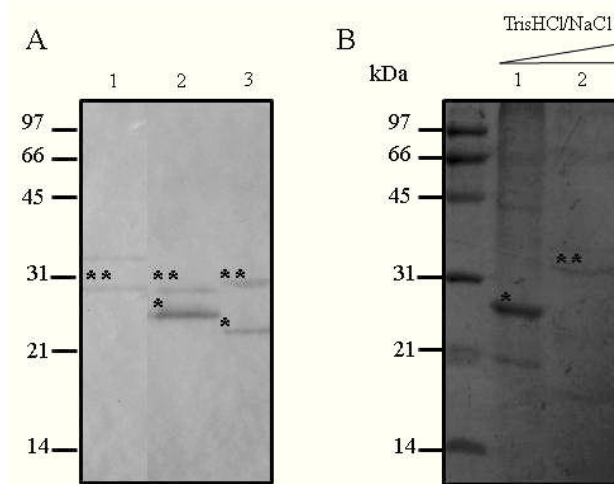


Figure 26 : Expression et purification des adhésines de *M. intracellulare* en conditions natives (A) En contrôle la LBP native purifiée de *Map* (1). Les lysats de *M. a. paratuberculosis* K-10 (2) et *M. intracellulare* ATCC 13950 (3) ont été analysés par Western-Blot avec l'anticorps monoclonal 3921 E4 qui présente un épitope commun à la HBHA et LBP. (B) Les fractions d'élution de la chromatographie d'affinité pour l'héparine montre (1) une bande à environ 28 kDa = \*HBHA et (2) une bande supérieure à 31 kDa = \*\*LBP

### 3.2 Étude de la diversité sur des isolats cliniques de *M. intracellulare*

#### 3.2.1 Étude du polymorphisme par PCR

Disposant d'un panel d'isolats cliniques provenant de différentes pathologies pulmonaires, nous avons d'une part recherché la présence des gènes *hbha* et *lbp* et d'autre part étudié leur polymorphisme par méthode PCR. Les résultats indiquent que les deux gènes *hbh* (Figure 27A) et *lbp* (Figure 27B) sont présents pour les 16 isolats cliniques de *M. intracellulare* analysés et ne montrent pas de polymorphisme d'un isolat à l'autre. Ces résultats nous permettent de dire que la HBHA et la LBP des souches de *M. intracellulare* sont très homogènes et comparables à la souche de référence.

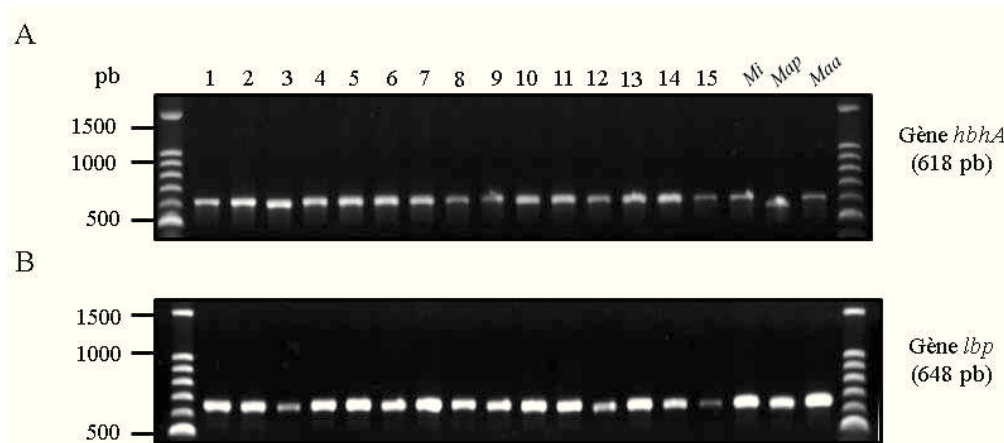


Figure 27 : Absence de polymorphisme entre les gènes *hbhA* et *lbp* des différents isolats cliniques de *M. intracellulare*. Amplification par PCR du gène codant pour (A) la HBHA et (B) la LBP de Mi. Les numéros correspondent aux souches décrites dans le tableau 2. *M. intracellulare* ATCC 13950 (Mi), *M. a. paratuberculosis* K-10 (Map), *M. a. avium* ATCC 25291 sont utilisées comme souches contrôle.

### 3.2.2 Profil d'expression des adhésines d'isolats cliniques

Par la suite, nous avons analysé le profil d'expression de ces deux adhésines par Immuno-blot sur une partie des isolats cliniques de *M. intracellulare* (Figure 28). Ces résultats confirment les précédents, à savoir les isolats cliniques expriment une HBHA et une LBP homologues à celles des espèces du MAC.

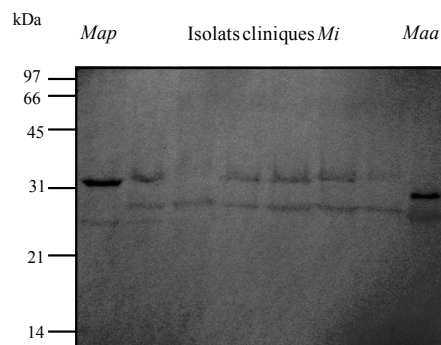


Figure 28 : Les isolats cliniques de *M. intracellulare* expriment une HBHA et une LBP homologues à celles du MAC

L'expression des adhésines HBHA et LBP a été analysée par Western-Blot sur des lysats bactériens issus d'isolats cliniques. L'anticorps monoclonal 3921 E4 a été utilisé et révélé avec un anticorps anti-souris Ig G & M couplé à une phosphatase alcaline. En référence *M. a. paratuberculosis* K-10 (Map) et *M. a. avium* ATCC 25291 (Maa).

#### 4. Conclusion-Discussion

---

Cette étude, menée en parallèle de mon projet de thèse, a été réalisée dans le but d'avoir une idée globale sur les adhésines exprimées par les espèces du MAC. L'étude *in silico* a démontré la présence des deux gènes, *hbha* et *lbp*, sur le génome de *M. intracellulare* ATCC 13950 et l'analyse par immunoblot nous a permis de visualiser l'expression de ces protéines. Les premières données obtenues concernant l'adhésion de *M. intracellulare* aux cellules épithéliales A-549 suggèrent que *M. intracellulare* exprime à sa surface une HBHA et une LBP capables d'interagir avec les composés de la matrice extracellulaire. Les résultats d'adhésion cellulaire sont similaires à ceux obtenus dans l'étude des adhésines de *M. a. paratuberculosis* (<sup>136</sup>Lefrancois, 2011 et données non illustrées).

Suite à ces observations, nous avons purifié par chromatographie d'affinité pour l'héparine et caractérisé par spectrométrie de masse les adhésines HBHA et LBP natives exprimées par *M. intracellulare*.

L'adhésine HBHA de *M. intracellulare* (205 aa) est identique à celles du MAC : *M. a. avium*, *M. a. hominissuis* et de *M. a. paratuberculosis* de type S (205 aa). Alors que la LBP de *M. intracellulare* est très proche mais différente. La présence de groupements méthyles sur les résidus lysines de la protéine a également été mise en évidence sur la HBHA de BCG, *M. smegmatis* et sur la LBP de *M. a. paratuberculosis* (<sup>153</sup>Menozzi, 1996 ; <sup>34</sup>Biet, 2007 ; <sup>136</sup>Lefrancois, 2011). Comme pour les autres espèces mycobactériennes, le profil exact de méthylation, les méthyltransférases impliquées ainsi que le processus moléculaire mis en jeu n'est pas encore défini. Actuellement, seul leurs rôles dans la protection et l'immunogénicité de la protéine ont été démontrés (<sup>147</sup>Menozzi, 1998 ; <sup>150, 186</sup>Pethe, 2002 ; <sup>183</sup>Pethe, 2002 ; <sup>178</sup>Parra, 2004 ; <sup>180, 252</sup>Temmerman, 2004)

Disposant d'isolats cliniques humains de *M. intracellulare* provenant de différentes pathologies, nous avons cherché à identifier une relation entre les adhésines, HBHA et LBP, et la particularité des infections à *M. intracellulare*, forme pulmonaire ou disséminée. Pour cela, nous avons analysé le polymorphisme de ces deux gènes par PCR et par immunoblot. On observe que la HBHA et la LBP exprimées par les isolats cliniques sont strictement conservées entre elles et comparables à la HBHA et la LBP exprimées par la souche de référence, suggérant une absence de polymorphisme dans l'espèce *intracellulare*. En

revanche, chez d'autres pathogènes humains tels que *Haemophilus* et *Streptococcus* le polymorphisme génétique est associé à des origines géographiques, d'hôtes ou à des pathologies spécifiques. Cette observation est également valable chez *M. a. paratuberculosis* (<sup>87</sup>Gousset, 1999 ; <sup>95</sup>Haguenoer, 2011 ; Résultats-ARTICLE II).

Dans cette étude, nous avons caractérisé les adhésines HBHA et LBP de *M. intracellulare* qui s'avèrent être similaires aux adhésines des espèces du MAC, ce qui renforce l'originalité des résultats obtenus avec les adhésines polymorphes de *M. a. paratuberculosis*.

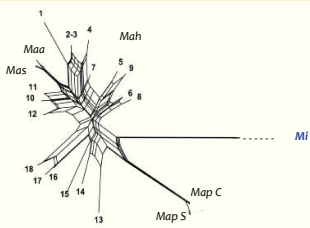
# Profil d'expression d'adhésines chez *Mycobacterium intracellulare*

L. H. Lefrançois<sup>1\*</sup>, T. Cochard<sup>1</sup>, C. Bodier<sup>1</sup>, E. Haguenoer<sup>2</sup>, P. Lanotte<sup>2\*\*</sup>, J. Maugein<sup>3</sup> et F. Biet<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRA-Centre de Tours, UR1282, Infectiologie Animale et Santé Publique (IASP-311), F-37380 Nouzilly, France. <sup>2</sup> Service Bactériologie-Virologie, Hôpital Bretonneau-CHRU de Tours, 2 boulevard Tonnellé, 37044 Tours & EA3854 Université François Rabelais, Tours, France. <sup>3</sup> Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Haut-Lévêque-CHU de Bordeaux, Avenue Magellan, F-33604 Pessac France.

Le complexe *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC) regroupe deux espèces très proches *Mycobacterium avium* et *Mycobacterium intracellulare* (Mi) qui n'étaient être aisément différenciés jusqu'à ces dernières années. Les progrès récents de génétique bactérienne et les moyens d'identification moléculaire permettent maintenant de bien les individualiser. Ces mycobactéries, non tuberculeuses, sont des pathogènes opportunistes chez l'homme et responsables de maladies parfois sévères chez de nombreuses espèces animales. De plus, ces bactéries sont isolées de différentes sources environnementales. Chez l'homme, *M. intracellulare* représente la deuxième cause de maladie après les mycobactéries du complexe tuberculose avec un pouvoir pathogène plus important que *M. avium* chez le patient séronégatif pour le VIH (1). Cette bactérie est responsable très majoritairement d'atteintes pulmonaires qui surviennent plus particulièrement chez les patients aux antécédents de cancers pulmonaires ou d'hémopathies malignes. Peu de données permettent de comprendre les facteurs impliqués dans la pathogénicité de *M. intracellulare*. Dans cette étude, nous avons cherché à identifier, isoler et caractériser les adhésines de la famille des HBHA (Heparin-Binding HemAgglutinin) et LBP (Laminin-Binding Protein) à partir de la souche de référence et d'un panel d'isolats cliniques.

## Complexe MAC

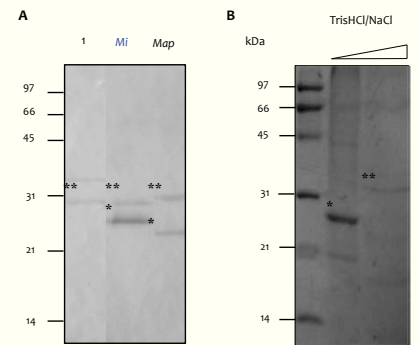


**Figure 1. Représentation phylogénétique de *M. intracellulare* dans le complexe *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC).** L'analyse des SNPs (Single nucleotide polymorphisms) et des MLSA (Multilocus sequence analysis) a été réalisée sur 10 gènes conservés de *M. a. hominissuis* (Mah), *M. a. avium* (Maa), *M. a. sylvaticum* (Mas), *M. a. paratuberculosis* de type C (Map C) et de type S (Map S). D'après Turenne et al. (2).

## Caractérisation de la HBHA et de la LBP

A	Nb aa	Espèce(s)	% Homologie	Représentation schématique
205	Mah, Maa, Mas, Map S, Mi	100		
190	Map C	97		
B	Nb aa	Espèce(s)	% Homologie	Représentation schématique
218	Mi	90		
215	Mah, Maa, Mas, Map C	100		
205	Map S	96		

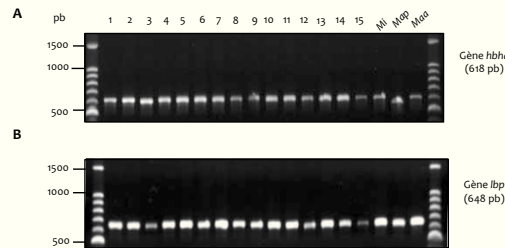
**Figure 2. Comparaison des adhésines HBHA et LBP de *Mi* à celles de MAC.** Analyse *in silico* de la HBHA (A) et de la LBP (B). Le tableau contient : le nombre total d'acides aminés, les différentes souches analysées et le pourcentage d'homologie calculé par blast de séquences nucléotidiques avec le logiciel Clustal W2. Un schéma du domaine N-terminal et C-terminal est représenté pour les deux adhésines. *M. a. hominissuis* (Mah), *M. a. avium* (Maa), *M. a. sylvaticum* (Mas), *M. a. paratuberculosis* type C (Map C), type S (Map S) et *M. intracellulare* (Mi).



**Figure 4. Expression et purification des adhésines de *Mi* en conditions natives.** (A) Les lysats de *M. a. paratuberculosis* K10 (Map) et *M. intracellulare* ATCC 13950 (Mi) ont été analysés par Western-Blot avec l'anticorps monoclonal 3921 E4 qui présente un épitope commun à la HBHA et LBP. (1) En contrôle la LBP native purifiée de Map. \*HBHA, Heparin-Binding HemAgglutinin; \*\*LBP, Laminin-Binding Protein. (B) Purification par chromatographie d'affinité pour l'héparine de la HBHA et LBP de *Mi* à partir d'une culture de *M. intracellulare* ATCC 13950. Après lyse par des ultra-sons, le surmoutage de culture a été appliqué sur une colonne d'héparine HiTrap (GE Healthcare). Les protéines retenues ont été éluées grâce à un gradient de NaCl (0-1 M) et analysées par SDS-PAGE. La bande à environ 28kDa a été identifiée par spectrométrie de masse comme étant la HBHA «hypothetical protein MintA\_07759» N° accession 254819803 => Heparin-Binding Hemagglutinin. Le marqueur de poids moléculaire est indiqué à gauche.

**Tableau 1. Caractéristiques des isolats cliniques de *Mi* utilisés dans l'étude des adhésines (3).**

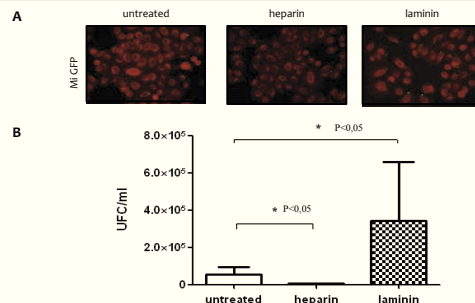
N° souches	Origine clinique	Pathologie/terrain
1	Lavage Broncho-Alvéolaire (LBA)	Mucoviscidose
2	Expectoration	Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO)
3	LBA	Mucoviscidose
4	LBA / Sang	Leucémie Aigue Lymphoblastique
5	Expectoration	Mucoviscidose
6	Expectoration	BPCO
7	Expectoration	Dilatation Des Bronches (DBB)
8	Expectoration	Cancer pulmonaire
9	Expectoration	DBB
10	Expectoration	DBB
11	Expectoration	Cancer pulmonaire
12	LBA	DBB
13	LBA / Sang	Virus immunodéficience humaine (VIH)
14	LBA	DBB
15	Asp bronchique	Pneumopathie à l'amiante
16	Expectoration	Cancer pulmonaire



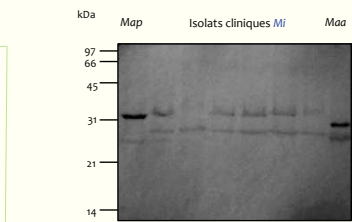
**Figure 3. Absence de polymorphisme sur les gènes *hbha* et *lbp* des isolats cliniques de *Mi*.** Amplification par PCR (A) des gènes *hbha* et (B) *lbp* de *Mi*. Les numéros correspondent aux souches décrites dans le tableau 1. *M. intracellulare* ATCC 13950 (*Mi*), *M. a. paratuberculosis* K10 (*Map*), *M. a. avium* ATCC 25291 (*Maa*) sont utilisées comme souches de référence.

## Rôle de la HBHA et de la LBP dans l'adhésion

**Figure 6. Mise en évidence de l'adhérence de *Mi* aux cellules épithéliales pulmonaire A-549.** Les cellules A-549 ont été infectées par *Mi* ATCC 13950 avec une m.o.i (multiplicity of infection) de 100, en présence et/ou absence d'héparine (80 µg/ml) et de laminine (20 µg/ml). (A) Les cellules infectées ont été fixées avec du paraformaldéhyde, colorées au bleu Evans et observées par microscopie à fluorescence à objectif 40. (B) Les cellules infectées ont été traitées avec du SDS et du tyloxapol. Puis, des dilutions successives ont été réalisées, étalées sur milieu 7H11 et les colonies ont été comptées après 15 jours de culture. La quantification des propriétés adhésives de *Mi* a été rapportée en UFC/ml. \* P value a été calculée grâce à un «unpaired two tailed t-test» réalisée sur le logiciel GraphPad Prism version 5.00 où P < 0,05 est considérée comme statistiquement significatif. La barre d'erreur représente l'écart type et les résultats ont été obtenus en «triplicate».



- *M. intracellulare* possède les gènes codant pour une HBHA et une LBP homologues aux adhésines du complexe MAC.
- La HBHA et la LBP natives de *M. intracellulare* ont été purifiées par chromatographie d'affinité pour l'héparine.
- Les isolats cliniques, analysés par Western Blot, expriment une HBHA et une LBP comparables à la souche de référence.
- Ces deux adhésines semblent jouer un rôle sur l'adhésion de *M. intracellulare* aux cellules épithéliales pulmonaires.



**Figure 5. Les isolats cliniques de *Mi* expriment une HBHA et une LBP homologues à celles de MAC.** L'expression des adhésines HBHA et LBP a été analysée sur des lysats bactériens d'isolats cliniques par Western-Blot. L'anticorps monoclonal 3921 E4 a été utilisé et révélé avec un anticorps anti-souris Ig G & M couplé à une phosphatase alcaline. En référence *M. a. paratuberculosis* K10 (*Map*) et *M. a. avium* ATCC 25291 (*Maa*).

- Des analyses complémentaires sont nécessaires afin d'affirmer le rôle exact de la HBHA et de la LBP dans la physiopathologie de l'infection à *M. intracellulare*.
- La présence d'anticorps dirigés contre la HBHA ou la LBP de *M. intracellulare* pourrait permettre de distinguer infection et colonisation.

Références : (1) Han et al., JCM, 2005. (2) Turenne et al., J Bact, 2008. (3) Dauchy et al., BMC Microbiology, 2010.

# CONCLUSION – PERSPECTIVES

Depuis sa découverte il y a plus de deux siècles, la paratuberculose reste aujourd'hui une préoccupation majeure en santé animale. L'agent étiologique *M. a. paratuberculosis* est responsable d'inflammations chroniques de l'intestin des ruminants et est suspecté d'être transmis à l'homme dans certains cas de maladie de Crohn. Les plans de maîtrise et de contrôle mis en place depuis plusieurs décennies n'ont pas permis de contenir cette pathologie dont la prévalence ne cesse de progresser. Les études scientifiques sont essentiellement dédiées au développement et à l'amélioration du diagnostic par la recherche d'antigènes plus spécifiques mais aussi capables de déceler la phase précoce de l'infection. Par conséquent l'interaction de *M. a. paratuberculosis* avec l'hôte et les adhésines impliquées dans ces processus sont très peu étudiées ce qui montre l'originalité de notre étude.

Les cellules eucaryotes présentent à leur surface un panel de récepteurs impliqués dans leur processus physiologique. Les microorganismes ont su évoluer et s'adapter à leur hôte en détournant ces récepteurs à leur profit. Les mécanismes d'interaction hôte/pathogène chez les mycobactéries ont démontré l'importance de l'adhésine HBHA (*Heparin Binding HemAgglutinin*) chez *M. tuberculosis* et LBP (*Laminin Binding Protein*) chez *M. leprae*. En revanche, peu d'études s'intéressent à comprendre la stratégie utilisée par *M. a. paratuberculosis* pour s'implanter dans son hôte et à caractériser les molécules impliquées dans l'implantation et la colonisation de l'intestin par le bacille.

L'objectif de mon projet de recherche visait à isoler et caractériser ces deux adhésines mycobactériennes majeures, la HBHA et la LBP, chez *M. a. paratuberculosis* et de définir leurs rôles spécifiques ainsi que le(s) mécanisme(s) utilisé(s) pour interagir avec les cellules épithéliales intestinales. Mon travail a permis de mettre en évidence trois études principales et complémentaires concernant :

- La caractérisation au niveau génétique et biochimique des adhésines natives HBHA et LBP de *M. a. paratuberculosis* (Résultats-ARTICLE I et III).
- La mise en place d'une méthode de chromatographie d'affinité pour l'héparine adaptée à la HBHA de *M. a. paratuberculosis* et utilisée en routine au laboratoire (Résultats-ARTICLE II).
- L'étude du polymorphisme et de la biodiversité des gènes *hbhA* et *lbp* grâce notre large collection d'isolats de *M. a. paratuberculosis* (Résultats-ETUDE IV).

➤ Les adhésines natives, pourquoi faire ?

La mise en place au laboratoire de la méthode de chromatographie d'affinité pour l'héparine s'est avérée incontournable pour la suite de mon projet. Les formes natives des antigènes sont particulièrement importantes pour leur caractérisation biochimique et leur utilisation en tant qu'antigène immuno-modulateur. L'obstacle majeur a été la croissance extrêmement lente et délicate de *M. a. paratuberculosis*. Pour surmonter ces difficultés nous avons dû tester la culture de *M. a. paratuberculosis* en fermenteur et trouver les conditions de purification adaptées aux spécificités de la HBHA de *M. a. paratuberculosis* de type C.

Actuellement, nous disposons des antigènes natifs HBHA et LBP de *M. a. paratuberculosis* type C en quantité suffisante pour tester leurs potentiels pour le diagnostic de la paratuberculose. L'analyse par spectrométrie de masse sur les protéines extraites et purifiées à partir d'un lysat de *M. a. paratuberculosis* nous a permis de révéler la présence de certaines modifications post-traductionnelles et en particulier des groupements méthyles présents sur les résidus lysines du domaine C-terminal de la HBHA et de la LBP de *M. a. paratuberculosis*. Les analyses mériteraient d'être poursuivies pour déterminer avec précision toutes les modifications post-traductionnelles présentes sur ces adhésines.

L'étude sérologique réalisée dans cette étude montre que la HBHA de *M. a. paratuberculosis* est un antigène à fort potentiel diagnostique dont nous devons tester la capacité à induire une réponse immunitaire à médiation cellulaire. Ces dernières années, la HBHA a été proposée comme antigène pour le diagnostic de la tuberculose latente chez l'homme (<sup>104</sup>Hougardy, 2007). En effet, les antigènes ESAT-6 et CFP-10 utilisés commercialement et, contrairement à la HBHA, ne permettent pas de discriminer une phase latente d'une tuberculose active. L'antigène HBHA pourrait être utilisé en complément des antigènes ESAT-6 et CFP-10 pour discriminer une infection latente d'une tuberculose active par *M. tuberculosis*. Cette différence est mise en évidence par des tests *in vitro* mesurant la quantité d'IFN $\gamma$  sécrété, caractéristique d'une réponse à médiation cellulaire (test IGRAs). Mais, la production et la disponibilité de cet antigène sous forme native restent un facteur limitant dans l'utilisation de la HBHA native. Pour surmonter ce problème de croissance de *M. tuberculosis* ou BCG, il avait été envisagé de produire l'antigène HBHA-MTB par *M. smegmatis*, une mycobactérie à croissance rapide également capable d'induire des modifications post-traductionnelles. Les résultats de stimulation ont montré que la réponse en IFN $\gamma$  obtenue avec l'antigène produit dans *M. smegmatis* était réduite par rapport à celle obtenue avec la HBHA native. Cette



observation peut s'expliquer par la présence de 16 groupements méthyles sur HBHA-MTB produite par *M. smegmatis* contre 23 pour une HBHA-MTB native (<sup>66</sup>Delogu, 2011). Les méthodes de diagnostic disponibles pour détecter la paratuberculose sont peu sensibles et reposent sur des tests sérologiques qui ne permettent pas de détecter la phase précoce de l'infection. Dans ce contexte, il serait intéressant de tester la capacité de l'antigène HBHA natif spécifique de *M. a. paratuberculosis* de type C à induire une réponse cellulaire spécifique via la sécrétion d'IFN $\gamma$  marqueur de la phase précoce.

De plus, nous avons remarqué que la sous-espèce *paratuberculosis* produit deux formes de HBHA qui sont chacune spécifiques des types C et S. Nous voudrions savoir si les HBHA de type C et de type S sont-capables de discriminer une infection par une souche de *M. a. paratuberculosis* de type C ou de type S ? Pour cela, la sécrétion d'IFN $\gamma$  par des cellules bovines et ovines infectées, respectivement, sera quantifiée.

Pour aborder cette dernière hypothèse, nous devons obtenir une biomasse de *M. a. paratuberculosis* de type S suffisante pour pouvoir isoler la HBHA native. L'obstacle majeur est la croissance extrêmement lente des souches de *M. a. paratuberculosis* de type S qui est encore plus contraignante que celle des souches de type C. Pour répondre à ces problèmes nous allons transférer le « savoir-faire » des équipes qui maîtrise la culture de ces souches. Pour les tests IGRAs, nous pourrions également utiliser la HBHA native de *M. a. avium* qui est identique à 98,6% avec la HBHA produite par *M. a. paratuberculosis* de type S.

En fonction des résultats de l'étude *in vitro* de stimulation antigénique par la HBHA de *M. a. paratuberculosis*, nous déterminerons le profil et le degré exact de méthylation par spectrométrie de masse acide aminé par acide aminé. Le degré de méthylation obtenu pourra être comparé avec celui de HBHA-MTB pour savoir si les méthylations sont identiques d'une espèce à l'autre et d'une culture à l'autre. Nous pourrions également méthyler chimiquement la HBHA recombinante de *M. a. paratuberculosis*, évitant ainsi l'étape fastidieuse de croissance (<sup>186</sup>Pethe, 2002). Enfin, l'identification et l'isolement de la ou les métyltransférase(s) impliquée(s) dans ce processus de méthylation pourront être envisagés.

➤ Le polymorphisme de ces adhésines, et alors ?

L'une des observations les plus intéressantes de mon travail est le polymorphisme du gène *hbhA* chez *M. a. paratuberculosis*. De façon surprenante, nous avons également constaté que la sous-espèce *paratuberculosis* produit également deux types de LBP qui diffèrent dans leur domaine C-terminal (résultats non montrés). Cette surprenante variabilité est observée pour la première fois et uniquement au sein de la sous-espèce *paratuberculosis*. Le polymorphisme observé sur ces deux adhésines est un argument de plus qui vient compléter les différences phénotypiques qui divisent la sous-espèce *paratuberculosis*. Concernant l'évolution de l'espèce *avium*, ces nouveaux éléments s'inscrivent plutôt dans le schéma d'une évolution distincte et indépendante des types C et S de *M. a. paratuberculosis* précédemment décrite par Alexander *et al.*, (<sup>6</sup>Alexander, 2009).

La relation structure/fonction mise en évidence par l'interaction avec l'héparine a besoin d'être affinée et précisée. Nous avons donc commencé à étudier l'impact de ces deux formes de HBHA produites par *M. a. paratuberculosis* sur l'interaction avec différents composés de la matrice extracellulaire et *in vitro* sur différents types cellulaires pour répondre à plusieurs interrogations :

- La HBHA de type S, avec un domaine C-terminal plus long que la HBHA de type C, a-t-elle une affinité plus forte pour les composés de la matrice extracellulaire, spécifique d'un tissu ou d'un organe ou d'un hôte ?

Comme décrit dans les objectifs de cette étude, la quantification de l'interaction entre les adhésines HBHA et LBP de *M. a. paratuberculosis* avec différents composés de la matrice extracellulaire (laminine, héparine et collagène) a été étudiée par ELISA et comparée aux HBHA de *M. smegmatis*, *M. a. avium* et BCG décrites dans la littérature. Les données préliminaires montrent que les HBHA recombinantes, de toutes les espèces, interagissent avec l'héparine et la laminine. Nous avons pu distinguer deux groupes majeurs : un groupe de forte affinité qui comprend la HBHA de *M. a. paratuberculosis* de type S et un groupe de plus faible affinité pour la laminine et l'héparine qui contient la HBHA de *M. a. paratuberculosis* de type C. Cette tendance est à confirmer.

- *M. a. paratuberculosis* de type C est-il capable d'adhérer, par l'intermédiaire de la HBHA, aux cellules épithéliales A-549?

Les résultats préliminaires obtenus au laboratoire montrent, par des tests de compétition avec l'héparine, que l'adhésion de *M. a. paratuberculosis* de type C est fortement diminuée en présence d'héparine, ce qui suggère que la HBHA joue un rôle dans l'adhésion du bacille à la cellule hôte malgré un domaine C-terminal court.

- La différence de HBHA entre les espèces mycobactériennes et au sein de la sous-espèce *paratuberculosis* est-elle responsable d'une spécificité cellulaire, tissulaire ou d'hôte observée pour les infections mycobactériennes ? Le tropisme intestinal et la spécificité d'hôte de *M. a. paratuberculosis* sont-ils en relation avec les adhésines ? Est-ce que la forme longue de HBHA des souches de *M. a. paratuberculosis* de type S est un avantage pour sa virulence ?

Pour aborder ces hypothèses, nous avons commencé à réaliser des tests d'adhésion sur différents types cellulaires : les cellules épithéliales pulmonaires A-549, les cellules épithéliales intestinales Caco-2 et les cellules de Schwann ST88-14 ont été utilisées pour essayer de mettre en évidence une spécificité cellulaire et/ou tissulaire des HBHA. Ces lignées proviennent toutes de lignées cellulaires humaines donc la spécificité d'hôte ne pourra pas être étudiée. L'interaction de billes recouvertes de HBHA de BCG, de *M. a. paratuberculosis* et de *M. leprae* avec les différents types cellulaires a été comptée par microscopie à fluorescence. Les résultats préliminaires obtenus montrent que les conditions de ce test ne sont pas optimums et qu'elles ont besoin d'être mises au point avant de pouvoir interpréter les données et d'émettre un avis sur cette hypothèse.

#### ➤ La mutagenèse, patience...

L'implication et le rôle de la HBHA et de la LBP dans l'adhésion de *M. a. paratuberculosis* ont besoin d'être confirmés par la construction d'une souche mutante pour ces gènes. Pour réaliser la mutagenèse, nous avons choisi d'utiliser la méthode de recombinaison homologe décrite par Van Kessel *et al.*, (<sup>271</sup>Van Kessel, 2007) basée sur l'expression inductible de la recombinase d'un mycobactériophage. Nous allons prochainement vérifier l'induction de cette enzyme dans la souche de *M. a. paratuberculosis* K-10 avant de pouvoir électroporer les fragments nécessaires à l'échange allélique qui sont déjà construits et disponibles au laboratoire. Le phénotype de la souche mutante pour un des gènes *hbhA* et *lbp* (ou pour les

deux), sera analysé *in vitro* sur leur capacité d'adhésion aux cellules A-549, leur devenir dans les macrophages, leur capacité d'agrégation mais aussi dans le modèle murin.

➤ Et après...

Dans des perspectives plus lointaines, nous explorerons le dernier point cité dans les objectifs de cette étude qui porte sur la mise en évidence d'un récepteur cellulaire et la régulation des gènes *hbhA* et *lbp*.

Pour conclure sur ce projet, j'ai terminé une première étape importante sur la purification et la caractérisation de ces deux adhésines HBHA et LBP produites par *M. a. paratuberculosis*, ce qui ouvre de nouvelles perspectives pour définir leur(s) rôle(s) dans la voie entérocytaire. Travailler avec les mycobactéries et en particulier *M. a. paratuberculosis* reste un plaisir et un véritable challenge !

# BIBLIOGRAPHIE

- 1 C. Abou-Zeid, T. Garbe, R. Lathigra, H. G. Wiker, M. Harboe, G. A. Rook, and D. B. Young, 'Genetic and Immunological Analysis of Mycobacterium Tuberculosis Fibronectin-Binding Proteins', *Infect Immun*, 59 (1991), 2712-8.
- 2 C. Abou-Zeid, T. L. Ratliff, H. G. Wiker, M. Harboe, J. Bennedsen, and G. A. Rook, 'Characterization of Fibronectin-Binding Antigens Released by Mycobacterium Tuberculosis and Mycobacterium Bovis Bcg', *Infect Immun*, 56 (1988), 3046-51.
- 3 I. Abubakar, D. Myhill, S. H. Aliyu, and P. R. Hunter, 'Detection of Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis from Patients with Crohn's Disease Using Nucleic Acid-Based Techniques: A Systematic Review and Meta-Analysis', *Inflamm Bowel Dis*, 14 (2008), 401-10.
- 4 ACERSA, 'Rapport Du Groupe De Travail Relatif À La Certification En Paratuberculose Bovine ', (2002).
- 5 ACERSA, 'Réfèrentiel Technique D'une Garantie De Cheptel En Matière De Paratuberculose Bovine ', (2005).
- 6 D. C. Alexander, C. Y. Turenne, and M. A. Behr, 'Insertion and Deletion Events That Define the Pathogen Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis', *J Bacteriol*, 191 (2009), 1018-25.
- 7 K. B. Alharbi, A. Al-Swailem, M. A. Al-Dubaib, E. Al-Yamani, A. Al-Naeem, M. Shehata, M. E. Hashad, K. A. Albusadah, and O. M. Mahmoud, 'Pathology and Molecular Diagnosis of Paratuberculosis of Camels', *Trop Anim Health Prod*, 44 (2012), 173-7.
- 8 A. Amonsin, L. L. Li, Q. Zhang, J. P. Bannantine, A. S. Motiwala, S. Sreevatsan, and V. Kapur, 'Multilocus Short Sequence Repeat Sequencing Approach for Differentiating among Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Strains', *J Clin Microbiol*, 42 (2004), 1694-702.
- 9 A. Anas, T. van der Poll, and A. F. de Vos, 'Role of Cd14 in Lung Inflammation and Infection', *Crit Care*, 14 (2010), 209.
- 10 M. C. Antognoli, H. L. Hirst, F. B. Garry, and M. D. Salman, 'Immune Response to and Faecal Shedding of Mycobacterium Avium Ssp. Paratuberculosis in Young Dairy Calves, and the Association between Test Results in the Calves and the Infection Status of Their Dams', *Zoonoses Public Health*, 54 (2007), 152-9.
- 11 A. M. Anuchin, A. V. Goncharenko, G. R. Demina, A. L. Mulyukin, D. N. Ostrovsky, and A. S. Kaprelyants, 'The Role of Histone-Like Protein, Hlp, in Mycobacterium Smegmatis Dormancy', *FEMS Microbiol Lett*, 308 (2010), 101-7.
- 12 K. Aoki, S. Matsumoto, Y. Hirayama, T. Wada, Y. Ozeki, M. Niki, P. Domenech, K. Umemori, S. Yamamoto, A. Mineda, M. Matsumoto, and K. Kobayashi, 'Extracellular Mycobacterial DNA-Binding Protein 1 Participates in Mycobacterium-Lung Epithelial Cell Interaction through Hyaluronic Acid', *J Biol Chem*, 279 (2004), 39798-806.
- 13 L. Y. Armitige, C. Jagannath, A. R. Wanger, and S. J. Norris, 'Disruption of the Genes Encoding Antigen 85a and Antigen 85b of Mycobacterium Tuberculosis H37rv: Effect on Growth in Culture and in Macrophages', *Infect Immun*, 68 (2000), 767-78.
- 14 J. Aslanzadeh, E. J. Brown, S. P. Quillin, J. K. Ritchey, and T. L. Ratliff, 'Characterization of Soluble Fibronectin Binding to Bacille Calmette-Guerin', *J Gen Microbiol*, 135 (1989), 2735-41.
- 15 A. Bafica, C. A. Scanga, C. G. Feng, C. Leifer, A. Cheever, and A. Sher, 'Tlr9 Regulates Th1 Responses and Cooperates with Tlr2 in Mediating Optimal Resistance to Mycobacterium Tuberculosis', *J Exp Med*, 202 (2005), 1715-24.
- 16 K. D. Banasure, S. H. Basagoudanavar, P. Chaudhury, V. Tiwari, N. S. Parihar, and P. P. Goswami, 'Identification and Characterization of a Gene Encoding a 35-Kda

- Protein from Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis', *FEMS Microbiol Lett*, 196 (2001), 195-9.
- 17 J. P. Bannantine, J. F. Huntley, E. Miltner, J. R. Stabel, and L. E. Bermudez, 'The Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis 35 Kda Protein Plays a Role in Invasion of Bovine Epithelial Cells', *Microbiology*, 149 (2003), 2061-9.
- 18 J. P. Bannantine, T. J. Radosevich, J. R. Stabel, S. Berger, J. F. Griffin, and M. L. Paustian, 'Production and Characterization of Monoclonal Antibodies against a Major Membrane Protein of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis', *Clin Vaccine Immunol*, 14 (2007), 312-7.
- 19 J. P. Bannantine, C. W. Wu, C. Hsu, S. Zhou, D. C. Schwartz, D. O. Bayles, M. L. Paustian, D. P. Alt, S. Sreevatsan, V. Kapur, and A. M. Talaat, 'Genome Sequencing of Ovine Isolates of Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis Offers Insights into Host Association', *BMC Genomics*, 13 (2012), 89.
- 20 M. Barczyk, S. Carracedo, and D. Gullberg, 'Integrins', *Cell Tissue Res*, 339 (2010), 269-80.
- 21 R. Barresi, and K. P. Campbell, 'Dystroglycan: From Biosynthesis to Pathogenesis of Human Disease', *J Cell Sci*, 119 (2006), 199-207.
- 22 F. Bastida, and R. A. Juste, 'Paratuberculosis Control: A Review with a Focus on Vaccination', *J Immune Based Ther Vaccines*, 9 (2011), 8.
- 23 D. J. Begg, K. de Silva, N. Carter, K. M. Plain, A. Purdie, and R. J. Whittington, 'Does a Th1 over Th2 Dominancy Really Exist in the Early Stages of Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis Infections?', *Immunobiology*, 216 (2011), 840-6.
- 24 D. J. Begg, and J. F. Griffin, 'Vaccination of Sheep against M. Paratuberculosis: Immune Parameters and Protective Efficacy', *Vaccine*, 23 (2005), 4999-5008.
- 25 D. J. Begg, R. O'Brien, C. G. Mackintosh, and J. F. Griffin, 'Experimental Infection Model for Johne's Disease in Sheep', *Infect Immun*, 73 (2005), 5603-11.
- 26 D. J. Begg, and R. J. Whittington, 'Experimental Animal Infection Models for Johne's Disease, an Infectious Enteropathy Caused by Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis', *Vet J*, 176 (2008), 129-45.
- 27 M. A. Behr, and J. Hanley, 'Antimycobacterial Therapy for Crohn's Disease: A Reanalysis', *Lancet Infect Dis*, 8 (2008), 344.
- 28 J. T. Belisle, V. D. Vissa, T. Sievert, K. Takayama, P. J. Brennan, and G. S. Besra, 'Role of the Major Antigen of Mycobacterium Tuberculosis in Cell Wall Biogenesis', *Science*, 276 (1997), 1420-2.
- 29 I. Ben Salah, C. Cayrou, D. Raoult, and M. Drancourt, 'Mycobacterium Marseillense Sp. Nov., Mycobacterium Timonense Sp. Nov. And Mycobacterium Bouchedurhonense Sp. Nov., Members of the Mycobacterium Avium Complex', *Int J Syst Evol Microbiol*, 59 (2009), 2803-8.
- 30 R. D. Berghaus, T. B. Farver, R. J. Anderson, C. C. Jaravata, and I. A. Gardner, 'Environmental Sampling for Detection of Mycobacterium Avium Ssp. Paratuberculosis on Large California Dairies', *J Dairy Sci*, 89 (2006), 963-70.
- 31 L. E. Bermudez, M. Petrofsky, and J. Goodman, 'Exposure to Low Oxygen Tension and Increased Osmolarity Enhance the Ability of Mycobacterium Avium to Enter Intestinal Epithelial (Ht-29) Cells', *Infect Immun*, 65 (1997), 3768-73.
- 32 L. E. Bermudez, M. Petrofsky, S. Sommer, and R. G. Barletta, 'Peyer's Patch-Deficient Mice Demonstrate That Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Translocates across the Mucosal Barrier Via Both M Cells and Enterocytes but Has Inefficient Dissemination', *Infect Immun*, 78 (2010), 3570-7.

- 
- 33 M. Bernfield, M. Gotte, P. W. Park, O. Reizes, M. L. Fitzgerald, J. Lincecum, and M. Zako, 'Functions of Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans', *Annu Rev Biochem*, 68 (1999), 729-77.
- 34 F. Biet, M. Angela de Melo Marques, M. Grayon, E. K. Xavier da Silveira, P. J. Brennan, H. Drobecq, D. Raze, M. C. Vidal Pessolani, C. Locht, and F. D. Menozzi, 'Mycobacterium Smegmatis Produces an Hbha Homologue Which Is Not Involved in Epithelial Adherence', *Microbes Infect*, 9 (2007), 175-82.
- 35 F. Biet, S. Bay, V. C. Thibault, D. Euphrasie, M. Grayon, C. Ganneau, P. Lanotte, M. Daffe, R. Gokhale, G. Etienne, and J. M. Reyrat, 'Lipopentapeptide Induces a Strong Host Humoral Response and Distinguishes Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis from M. Avium Subsp. Avium', *Vaccine*, 26 (2008), 257-68.
- 36 F. Biet, L. Gendt, E. Anton, E. Ballot, J. P. Hugot, and C. Johanet, 'Serum Antibodies to Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis Combined with Anti-Saccharomyces Cerevisiae Antibodies in Crohn's Disease Patients: Prevalence and Diagnostic Role', *Dig Dis Sci*, 56 (2011), 1794-800.
- 37 F. Boelaert, K. Walravens, P. Biron, J. P. Vermeersch, D. Berkvens, and J. Godfroid, 'Prevalence of Paratuberculosis (Johne's Disease) in the Belgian Cattle Population', *Vet Microbiol*, 77 (2000), 269-81.
- 38 E. Borrmann, P. Mobius, R. Diller, and H. Kohler, 'Divergent Cytokine Responses of Macrophages to Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Strains of Types Ii and Iii in a Standardized in Vitro Model', *Vet Microbiol*, 152 (2011), 101-11.
- 39 A. Brancaccio, T. Schulthess, M. Gesemann, and J. Engel, 'Electron Microscopic Evidence for a Mucin-Like Region in Chick Muscle Alpha-Dystroglycan', *FEBS Lett*, 368 (1995), 139-42.
- 40 J. Brugère-Picoux, 'Actualités Sur La Paratuberculose Bovine', *Bulletin Academie de France*, 165 (2012), 9-20.
- 41 B. Bryant, D. Blyde, G. Eamens, and R. Whittington, 'Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis Cultured from the Feces of a Southern Black Rhinoceros (Diceros Bicornis Minor) with Diarrhea and Weight Loss', *J Zoo Wildl Med*, 43 (2012), 391-3.
- 42 S. R. Byrd, R. Gelber, and L. E. Bermudez, 'Roles of Soluble Fibronectin and Beta 1 Integrin Receptors in the Binding of Mycobacterium Leprae to Nasal Epithelial Cells', *Clin Immunol Immunopathol*, 69 (1993), 266-71.
- 43 E. Castellanos, A. Aranaz, B. Romero, L. de Juan, J. Alvarez, J. Bezos, S. Rodriguez, K. Stevenson, A. Mateos, and L. Dominguez, 'Polymorphisms in Gyra and Gyrb Genes among Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Type I, Ii, and Iii Isolates', *J Clin Microbiol*, 45 (2007), 3439-42.
- 44 O. Chacon, L. E. Bermudez, and R. G. Barletta, 'Johne's Disease, Inflammatory Bowel Disease, and Mycobacterium Paratuberculosis', *Annu Rev Microbiol*, 58 (2004), 329-63.
- 45 S. Chanteau, V. Rasolofo, T. Rasolonavalona, H. Ramarokoto, C. Horn, G. Auregan, and G. Marchal, '45/47 Kilodalton (Apa) Antigen Capture and Antibody Detection Assays for the Diagnosis of Tuberculosis', *Int J Tuberc Lung Dis*, 4 (2000), 377-83.
- 46 R. J. Chiodini, H. J. Van Kruiningen, R. S. Merkal, W. R. Thayer, Jr., and J. A. Coutu, 'Characteristics of an Unclassified Mycobacterium Species Isolated from Patients with Crohn's Disease', *J Clin Microbiol*, 20 (1984), 966-71.
- 47 M. A. Clark, B. H. Hirst, and M. A. Jepson, 'M-Cell Surface Beta1 Integrin Expression and Invasin-Mediated Targeting of Yersinia Pseudotuberculosis to Mouse Peyer's Patch M Cells', *Infect Immun*, 66 (1998), 1237-43.



- 48 C. J. Clarke, 'The Pathology and Pathogenesis of Paratuberculosis in Ruminants and Other Species', *J. Comp. Pathol.*, 116 (1997), 217-61.
- 49 P. C. Cleland, D. R. Lehmann, P. H. Phillips, D. V. Cousins, L. A. Reddacliff, and R. J. Whittington, 'A Survey to Detect the Presence of Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis in Kangaroo Island Macropods', *Vet Microbiol*, 145 (2010), 339-46.
- 50 C. Cocito, P. Gilot, M. Coene, M. de Kesel, P. Poupert, and P. Vannuffel, 'Paratuberculosis', *Clin Microbiol Rev*, 7 (1994), 328-45.
- 51 J. W. Coffin, C. Condon, C. A. Compston, K. N. Potter, L. R. Lamontagne, J. Shafiq, and D. Y. Kunitomo, 'Use of Restriction Fragment Length Polymorphisms Resolved by Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Subspecies Identification of Mycobacteria in the Mycobacterium Avium Complex and for Isolation of DNA Probes', *J Clin Microbiol*, 30 (1992), 1829-36.
- 52 O. Cohavy, G. Harth, M. Horwitz, M. Eggena, C. Landers, C. Sutton, S. R. Targan, and J. Braun, 'Identification of a Novel Mycobacterial Histone H1 Homologue (Hupb) as an Antigenic Target of Panca Monoclonal Antibody and Serum Immunoglobulin a from Patients with Crohn's Disease', *Infect Immun*, 67 (1999), 6510-7.
- 53 D. M. Collins, D. M. Gabric, and G. W. de Lisle, 'Identification of Two Groups of Mycobacterium Paratuberculosis Strains by Restriction Endonuclease Analysis and DNA Hybridization', *J Clin Microbiol*, 28 (1990), 1591-6.
- 54 N. Court, S. Rose, M. L. Bourigault, S. Front, O. R. Martin, J. K. Dowling, E. F. Kenny, L. O'Neill, F. Erard, and V. F. Quesniaux, 'Mycobacterial Pims Inhibit Host Inflammatory Responses through Cd14-Dependent and Cd14-Independent Mechanisms', *PLoS One*, 6 (2011), e24631.
- 55 P. M. Coussens, 'Mycobacterium Paratuberculosis and the Bovine Immune System', *Anim Health Res Rev*, 2 (2001), 141-61.
- 56 B. B. Crohn, L. Ginzburg, and G. D. Oppenheimer, 'Landmark Article Oct 15, 1932. Regional Ileitis. A Pathological and Clinical Entity. By Burril B. Crohn, Leon Ginzburg, and Gordon D. Oppenheimer', *JAMA*, 251 (1984), 73-9.
- 57 B. M. Crossley, F. J. Zagmutt-Vergara, T. L. Fyock, R. H. Whitlock, and I. A. Gardner, 'Fecal Shedding of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis by Dairy Cows', *Vet Microbiol*, 107 (2005), 257-63.
- 58 E. B. da Silva, B. D. Silva, J. R. Leon, A. Kipnis, I. K. Santos, and A. P. Junqueira-Kipnis, 'Using Bcg, Mpt-51 and Ag85 as Antigens in an Indirect Elisa for the Diagnosis of Bovine Tuberculosis', *Vet J*, 187 (2011), 276-8.
- 59 M. Daffe, and G. Etienne, 'The Capsule of Mycobacterium Tuberculosis and Its Implications for Pathogenicity', *Tuber Lung Dis*, 79 (1999), 153-69.
- 60 T. K. Dalziel, 'Thomas Kennedy Dalziel 1861-1924. Chronic Interstitial Enteritis', *Dis Colon Rectum*, 32 (1989), 1076-8.
- 61 F. A. Dauchy, S. Degrange, A. Charron, M. Dupon, Y. Xin, C. Bebear, and J. Maugein, 'Variable-Number Tandem-Repeat Markers for Typing Mycobacterium Intracellulare Strains Isolated in Humans', *BMC Microbiol*, 10 (2010), 93.
- 62 G. W. De Lisle, D. M. Collins, and H. F. Huchzermeyer, 'Characterization of Ovine Strains of Mycobacterium Paratuberculosis by Restriction Endonuclease Analysis and DNA Hybridization', *Onderstepoort J Vet Res*, 59 (1992), 163-5.
- 63 M. A. de Melo Marques, S. Mahapatra, D. Nandan, T. Dick, E. N. Sarno, P. J. Brennan, and M. C. Vidal Pessolani, 'Bacterial and Host-Derived Cationic Proteins Bind Alpha2-Laminins and Enhance Mycobacterium Leprae Attachment to Human Schwann Cells', *Microbes Infect*, 2 (2000), 1407-17.
- 64 K. de Silva, D. Begg, N. Carter, D. Taylor, L. Di Fiore, and R. Whittington, 'The Early Lymphocyte Proliferation Response in Sheep Exposed to Mycobacterium Avium

- Subsp. Paratuberculosis Compared to Infection Status', *Immunobiology*, 215 (2010), 12-25.
- 65 G. Delogu, and M. J. Brennan, 'Functional Domains Present in the Mycobacterial Hemagglutinin, Hbha', *J Bacteriol*, 181 (1999), 7464-9.
- 66 G. Delogu, T. Chiacchio, V. Vanini, O. Butera, G. Cuzzi, A. Bua, P. Molicotti, S. Zanetti, F. N. Lauria, S. Grisetti, N. Magnavita, G. Fadda, E. Girardi, and D. Goletti, 'Methylated Hbha Produced in *M. Smegmatis* Discriminates between Active and Non-Active Tuberculosis Disease among Rdl-Responders', *PLoS One*, 6 (2011), e18315.
- 67 G. Delogu, M. Sanguinetti, B. Posteraro, S. Rocca, S. Zanetti, and G. Fadda, 'The Hbha Gene of Mycobacterium Tuberculosis Is Specifically Upregulated in the Lungs but Not in the Spleens of Aerogenically Infected Mice', *Infect Immun*, 74 (2006), 3006-11.
- 68 N. Dhar, V. Rao, and A. K. Tyagi, 'Immunogenicity of Recombinant Bcg Vaccine Strains Overexpressing Components of the Antigen 85 Complex of Mycobacterium Tuberculosis', *Med Microbiol Immunol*, 193 (2004), 19-25.
- 69 V. Dheenadhayalan, K. S. Shin, C. F. Chang, C. D. Chang, S. J. Wang, S. McDonough, P. McDonough, S. Stehman, S. Shin, A. Torres, and Y. F. Chang, 'Cloning and Characterization of the Genes Coding for Antigen 85a, 85b and 85c of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis', *DNA Seq*, 13 (2002), 287-94.
- 70 J. Dietrich, K. Weldingh, and P. Andersen, 'Prospects for a Novel Vaccine against Tuberculosis', *Vet Microbiol*, 112 (2006), 163-9.
- 71 K. Dohmann, B. Strommenger, K. Stevenson, L. de Juan, J. Stratmann, V. Kapur, T. J. Bull, and G. F. Gerlach, 'Characterization of Genetic Differences between Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Type I and Type II Isolates', *J Clin Microbiol*, 41 (2003), 5215-23.
- 72 V. Dupres, F. D. Menozzi, C. Locht, B. H. Clare, N. L. Abbott, S. Cuenot, C. Bompard, D. Raze, and Y. F. Dufrene, 'Nanoscale Mapping and Functional Analysis of Individual Adhesins on Living Bacteria', *Nat Methods*, 2 (2005), 515-20.
- 73 T. M. Eckstein, S. Chandrasekaran, S. Mahapatra, M. R. McNeil, D. Chatterjee, C. D. Rithner, P. W. Ryan, J. T. Belisle, and J. M. Inamine, 'A Major Cell Wall Lipopeptide of Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis', *J Biol Chem*, 281 (2006), 5209-15.
- 74 M. Economou, and G. Pappas, 'New Global Map of Crohn's Disease: Genetic, Environmental, and Socioeconomic Correlations', *Inflamm Bowel Dis*, 14 (2008), 709-20.
- 75 S. Einheber, T. A. Milner, F. Giancotti, and J. L. Salzer, 'Axonal Regulation of Schwann Cell Integrin Expression Suggests a Role for Alpha 6 Beta 4 in Myelination', *J Cell Biol*, 123 (1993), 1223-36.
- 76 J. Emsley, C. G. Knight, R. W. Farndale, M. J. Barnes, and R. C. Liddington, 'Structural Basis of Collagen Recognition by Integrin Alpha2beta1', *Cell*, 101 (2000), 47-56.
- 77 J. D. Esko, K. Kimata, and U. Lindahl, 'Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans', (2009).
- 78 C. Esposito, D. Marasco, G. Delogu, E. Pedone, and R. Berisio, 'Heparin-Binding Hemagglutinin Hbha from Mycobacterium Tuberculosis Affects Actin Polymerisation', *Biochem Biophys Res Commun*, 410 (2011), 339-44.
- 79 J. A. Faralli, M. K. Schwinn, J. M. Gonzalez, Jr., M. S. Filla, and D. M. Peters, 'Functional Properties of Fibronectin in the Trabecular Meshwork', *Exp Eye Res*, 88 (2009), 689-93.

- 
- 80 M. E. Fecteau, and R. H. Whitlock, 'Treatment and Chemoprophylaxis for Paratuberculosis', *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 27 (2011), 547-57, v.
- 81 M. E. Fecteau, R. H. Whitlock, C. D. Buergelt, and R. W. Sweeney, 'Exposure of Young Dairy Cattle to Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis (Map) through Intensive Grazing of Contaminated Pastures in a Herd Positive for Johne's Disease', *Can Vet J*, 51 (2010), 198-200.
- 82 C. P. Figueira, J. Croda, H. A. Choy, D. A. Haake, M. G. Reis, A. I. Ko, and M. Picardeau, 'Heterologous Expression of Pathogen-Specific Genes Liga and Ligb in the Saprophyte *Leptospira Biflexa* Confers Enhanced Adhesion to Cultured Cells and Fibronectin', *BMC Microbiol*, 11 (2011), 129.
- 83 M. Furugen, S. Matsumoto, T. Matsuo, M. Matsumoto, and T. Yamada, 'Identification of the Mycobacterial DNA-Binding Protein 1 Region Which Suppresses Transcription in Vitro', *Microb Pathog*, 30 (2001), 129-38.
- 84 P. Garred, C. Richter, A. B. Andersen, H. O. Madsen, I. Mtoni, A. Svejgaard, and J. Shao, 'Mannan-Binding Lectin in the Sub-Saharan Hiv and Tuberculosis Epidemics', *Scand J Immunol*, 46 (1997), 204-8.
- 85 J. Ghosh, P. Larsson, B. Singh, B. M. Pettersson, N. M. Islam, S. N. Sarkar, S. Dasgupta, and L. A. Kirsebom, 'Sporulation in Mycobacteria', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (2009), 10781-6.
- 86 A. Gioffre, G. Echeverria-Valencia, A. Arese, C. Morsella, S. Garbaccio, F. Delgado, M. Zumarraga, F. Paolicchi, A. Cataldi, and M. I. Romano, 'Characterization of the Apa Antigen from *M. Avium* Subsp. Paratuberculosis: A Conserved Mycobacterium Antigen That Elicits a Strong Humoral Response in Cattle', *Vet Immunol Immunopathol*, 132 (2009), 199-208.
- 87 N. Gousset, A. Rosenau, P. Y. Sizaret, and R. Quentin, 'Nucleotide Sequences of Genes Coding for Fimbrial Proteins in a Cryptic Genospecies of *Haemophilus* Spp. Isolated from Neonatal and Genital Tract Infections', *Infect Immun*, 67 (1999), 8-15.
- 88 R. J. Greenstein, L. Su, R. A. Juste, and S. T. Brown, 'On the Action of Cyclosporine a, Rapamycin and Tacrolimus on *M. Avium* Including Subspecies Paratuberculosis', *PLoS One*, 3 (2008), e2496.
- 89 G. G. Guerrero, A. S. Debie, and C. Locht, 'Boosting with Mycobacterial Heparin-Binding Haemagglutinin Enhances Protection of Mycobacterium Bovis Bcg-Vaccinated Newborn Mice against *M. Tuberculosis*', *Vaccine*, 28 (2010), 4340-7.
- 90 G. G. Guerrero, F. P. Feunou, and C. Locht, 'The Coiled-Coil N-Terminal Domain of the Heparin-Binding Haemagglutinin Is Required for the Humoral and Cellular Immune Responses in Mice', *Mol Immunol*, 46 (2008), 116-24.
- 91 G. G. Guerrero, and C. Locht, 'Recombinant Hbha Boosting Effect on Bcg-Induced Immunity against Mycobacterium Tuberculosis Infection', *Clin Dev Immunol*, 2011 (2011), 730702.
- 92 S. Gumber, D. L. Taylor, I. B. Marsh, and R. J. Whittington, 'Growth Pattern and Partial Proteome of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis During the Stress Response to Hypoxia and Nutrient Starvation', *Vet Microbiol*, 133 (2009), 344-57.
- 93 S. Gumber, and R. J. Whittington, 'Analysis of the Growth Pattern, Survival and Proteome of Mycobacterium avium Subsp. Paratuberculosis Following Exposure to Heat', *Vet Microbiol*, 136 (2009), 82-90.
- 94 M. C. Gutierrez, P. Supply, and R. Brosch, 'Pathogenomics of Mycobacteria', *Genome Dyn*, 6 (2009), 198-210.
- 95 E. Haguenoer, G. Baty, C. Pourcel, M. F. Lartigue, A. S. Domelier, A. Rosenau, R. Quentin, L. Mereghetti, and P. Lanotte, 'A Multi Locus Variable Number of Tandem

- Repeat Analysis (Mlva) Scheme for Streptococcus Agalactiae Genotyping', *BMC Microbiol*, 11 (2011), 171.
- 96 K. J. Hamill, K. Kligys, S. B. Hopkinson, and J. C. Jones, 'Laminin Deposition in the Extracellular Matrix: A Complex Picture Emerges', *J Cell Sci*, 122 (2009), 4409-17.
- 97 X. Y. Han, J. J. Tarrand, R. Infante, K. L. Jacobson, and M. Truong, 'Clinical Significance and Epidemiologic Analyses of Mycobacterium Avium and Mycobacterium Intracellulare among Patients without Aids', *J Clin Microbiol*, 43 (2005), 4407-12.
- 98 M. Harboe, and H. G. Wiker, 'Secreted Proteins of Mycobacterium Leprae', *Scand J Immunol*, 48 (1998), 577-84.
- 99 C. S. Hirsch, J. J. Ellner, D. G. Russell, and E. A. Rich, 'Complement Receptor-Mediated Uptake and Tumor Necrosis Factor-Alpha-Mediated Growth Inhibition of Mycobacterium Tuberculosis by Human Alveolar Macrophages', *J Immunol*, 152 (1994), 743-53.
- 100 M. A. Holsti, J. S. Schorey, E. J. Brown, and P. M. Allen, 'Identification of Epitopes of Fibronectin Attachment Protein (Fap-a) of Mycobacterium Avium Which Stimulate Strong T-Cell Responses in Mice', *Infect Immun*, 66 (1998), 1261-4.
- 101 C. Horn, A. Namane, P. Pescher, M. Riviere, F. Romain, G. Puzo, O. Barzu, and G. Marchal, 'Decreased Capacity of Recombinant 45/47-Kda Molecules (Apa) of Mycobacterium Tuberculosis to Stimulate T Lymphocyte Responses Related to Changes in Their Mannosylation Pattern', *J Biol Chem*, 274 (1999), 32023-30.
- 102 C. Horn, P. Pescher, F. Romain, and G. Marchal, 'Characterization of Murine Monoclonal Antibodies Specific for the 45/47 Kda Antigen Complex (Apa) of Mycobacterium Tuberculosis, M. Bovis and Bcg', *J Immunol Methods*, 197 (1996), 151-9.
- 103 H. Host, H. Drobecq, C. Locht, and F. D. Menozzi, 'Enzymatic Methylation of the Mycobacterium Tuberculosis Heparin-Binding Haemagglutinin', *FEMS Microbiol Lett*, 268 (2007), 144-50.
- 104 J. M. Hougardy, K. Schepers, S. Place, A. Drowart, V. Lechevin, V. Verscheure, A. S. Debrie, T. M. Doherty, J. P. Van Vooren, C. Locht, and F. Mascart, 'Heparin-Binding-Hemagglutinin-Induced Ifn-Gamma Release as a Diagnostic Tool for Latent Tuberculosis', *PLoS One*, 2 (2007), e926.
- 105 I. R. Humphreys, G. R. Stewart, D. J. Turner, J. Patel, D. Karamanou, R. J. Snelgrove, and D. B. Young, 'A Role for Dendritic Cells in the Dissemination of Mycobacterial Infection', *Microbes Infect*, 8 (2006), 1339-46.
- 106 S. W. Hunter, B. Rivoire, V. Mehra, B. R. Bloom, and P. J. Brennan, 'The Major Native Proteins of the Leprosy Bacillus', *J Biol Chem*, 265 (1990), 14065-8.
- 107 C. S. Hwang, A. Shemorry, and A. Varshavsky, 'N-Terminal Acetylation of Cellular Proteins Creates Specific Degradation Signals', *Science*, 327 (2010), 973-7.
- 108 R. O. Hynes, 'Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines', *Cell*, 110 (2002), 673-87.
- 109 O. Ibraghimov-Beskrovnaya, A. Milatovich, T. Ozcelik, B. Yang, K. Koepnick, U. Francke, and K. P. Campbell, 'Human Dystroglycan: Skeletal Muscle Cdna, Genomic Structure, Origin of Tissue Specific Isoforms and Chromosomal Localization', *Hum Mol Genet*, 2 (1993), 1651-7.
- 110 R. R. Isberg, and G. Tran Van Nhieu, 'Binding and Internalization of Microorganisms by Integrin Receptors', *Trends Microbiol*, 2 (1994), 10-4.
- 111 E. Ishikawa, T. Ishikawa, Y. S. Morita, K. Toyonaga, H. Yamada, O. Takeuchi, T. Kinoshita, S. Akira, Y. Yoshikai, and S. Yamasaki, 'Direct Recognition of the

- Mycobacterial Glycolipid, Trehalose Dimycolate, by C-Type Lectin Mincle', *J Exp Med*, 206 (2009), 2879-88.
- 112 M. Jackson, C. Raynaud, M. A. Laneelle, C. Guilhot, C. Laurent-Winter, D. Ensergueix, B. Gicquel, and M. Daffe, 'Inactivation of the Antigen 85c Gene Profoundly Affects the Mycolate Content and Alters the Permeability of the Mycobacterium Tuberculosis Cell Envelope', *Mol Microbiol*, 31 (1999), 1573-87.
- 113 H. K. Janagama, K. Jeong, V. Kapur, P. Coussens, and S. Sreevatsan, 'Cytokine Responses of Bovine Macrophages to Diverse Clinical Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis Strains', *BMC Microbiol*, 6 (2006), 10.
- 114 H. K. Janagama, S. Kumar, J. P. Bannantine, A. Kugadas, P. Jagtap, L. Higgins, B. Witthuhn, and S. Sreevatsan, 'Iron-Sparing Response of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Is Strain Dependent', *BMC Microbiol*, 10 (2010), 268.
- 115 H.A. Johne, and L. Frothinghan, 'Ein Eigenthuemlicher Tall Van Tuberculose Beim Rind.', *Deutsche Zeitschrift für tiermedizin und Pathologie*, 21 (1895), 438-54.
- 116 G. Jubert, 'Les Plans De Lutte Des Groupements De Défense Sanitaire (Gds) Contre La Paratuberculose Bovine', *GTV*, HS (2002), 37-41
- 117 G. Jungersen, A. Huda, J. J. Hansen, and P. Lind, 'Interpretation of the Gamma Interferon Test for Diagnosis of Subclinical Paratuberculosis in Cattle', *Clin Diagn Lab Immunol*, 9 (2002), 453-60.
- 118 R. A. Juste, N. Elguezabal, J. M. Garrido, A. Pavon, M. V. Geijo, I. Sevilla, J. L. Cabriada, A. Tejada, F. Garcia-Campos, R. Casado, I. Ochotorena, A. Izeta, and R. J. Greenstein, 'On the Prevalence of M. Avium Subspecies Paratuberculosis DNA in the Blood of Healthy Individuals and Patients with Inflammatory Bowel Disease', *PLoS One*, 3 (2008), e2537.
- 119 R. S. Kashyap, A. N. Rajan, S. S. Ramteke, V. S. Agrawal, S. S. Kelkar, H. J. Purohit, G. M. Taori, and H. F. Dagainawala, 'Diagnosis of Tuberculosis in an Indian Population by an Indirect Elisa Protocol Based on Detection of Antigen 85 Complex: A Prospective Cohort Study', *BMC Infect Dis*, 7 (2007), 74.
- 120 T. Katsube, S. Matsumoto, M. Takatsuka, M. Okuyama, Y. Ozeki, M. Naito, Y. Nishiuchi, N. Fujiwara, M. Yoshimura, T. Tsuboi, M. Torii, N. Oshitani, T. Arakawa, and K. Kobayashi, 'Control of Cell Wall Assembly by a Histone-Like Protein in Mycobacteria', *J Bacteriol*, 189 (2007), 8241-9.
- 121 S. Kawaji, D. J. Begg, K. M. Plain, and R. J. Whittington, 'A Longitudinal Study to Evaluate the Diagnostic Potential of a Direct Faecal Quantitative Pcr Test for Johne's Disease in Sheep', *Vet Microbiol*, 148 (2011), 35-44.
- 122 D. J. Kennedy, L. Citer, and E. S. G. Sergeant, 'Increasing Involvement of Herd Owners in Controlling Paratuberculosis through Assurance Based Trading', *Proceedings of 8ICP* (2005), 20-25.
- 123 B. J. Kim, B. S. Choi, J. S. Lim, I. Y. Choi, J. H. Lee, J. Chun, and Y. H. Kook, 'Complete Genome Sequence of Mycobacterium Intracellulare Strain Atcc 13950(T)', *J Bacteriol*, 194 (2012), 2750.
- 124 L. Kremer, G. S. Besra, P. J. Brennan, and A. R. Baulard, 'Le Lipoarabinomannana: Structure Et Fonctions D'un Glycolipide Impliqué Dans La Pathogénie Tuberculeuse', *Médecine/Sciences Synthèse*, 15 (1999), 842-50.
- 125 L. C. Kugelman, S. Ganguly, J. G. Haggerty, S. M. Weissman, and L. M. Milstone, 'The Core Protein of Epican, a Heparan Sulfate Proteoglycan on Keratinocytes, Is an Alternative Form of Cd44', *J Invest Dermatol*, 99 (1992), 886-91.

- 
- 126 S. Kumar, A. A. Sardesai, D. Basu, K. Muniyappa, and S. E. Hasnain, 'DNA Clasp-  
ing by Mycobacterial Hsp70: The C-Terminal Region of Hsp70 Mediates Increased Specificity  
of DNA Binding', *PLoS One*, 5 (2010).
- 127 C. J. Kuo, H. Bell, C. L. Hsieh, C. P. Ptak, and Y. F. Chang, 'Novel Mycobacteria  
Antigen 85 Complex Binding Motif on Fibronectin', *J Biol Chem*, 287 (2012), 1892-  
902.
- 128 K. Kuroda, E. J. Brown, W. B. Telle, D. G. Russell, and T. L. Ratliff,  
'Characterization of the Internalization of Bacillus Calmette-Guerin by Human  
Bladder Tumor Cells', *J Clin Invest*, 91 (1993), 69-76.
- 129 U. K. Laemmli, 'Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of  
Bacteriophage T4', *Nature*, 227 (1970), 680-85.
- 130 R. S. Lambrecht, J. F. Carriere, and M. T. Collins, 'A Model for Analyzing Growth  
Kinetics of a Slowly Growing Mycobacterium Sp', *Appl Environ Microbiol*, 54  
(1988), 910-6.
- 131 E. A. Lamont, J. P. Bannantine, A. Armien, D. S. Ariyakumar, and S. Sreevatsan,  
'Identification and Characterization of a Spore-Like Morphotype in Chronically  
Starved Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Cultures', *PLoS One*, 7  
(2012), e30648.
- 132 A. Laqueyrie, P. Militzer, F. Romain, K. Eiglmeier, S. Cole, and G. Marchal,  
'Cloning, Sequencing, and Expression of the Apa Gene Coding for the Mycobacterium  
Tuberculosis 45/47-Kilodalton Secreted Antigen Complex', *Infect Immun*, 63 (1995),  
4003-10.
- 133 A. Leboeuf, 'La Paratuberculose', *Bulletin, Réseau d'alerte d'information zoonositaire  
(RAIZO)*, 31 (2001), 1-4.
- 134 P. Lebrun, D. Raze, B. Fritzing, J. M. Wieruszkeski, F. Biet, A. Dose, M. Carpentier,  
D. Schwarzer, F. Allain, G. Lippens, and C. Loch, 'Differential Contribution of the  
Repeats to Heparin Binding of Hsp70, a Major Adhesin of Mycobacterium  
Tuberculosis', *PLoS One*, 7 (2012), e32421.
- 135 J. S. Lee, S. J. Shin, M. T. Collins, I. D. Jung, Y. I. Jeong, C. M. Lee, Y. K. Shin, D.  
Kim, and Y. M. Park, 'Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Fibronectin  
Attachment Protein Activates Dendritic Cells and Induces a Th1 Polarization', *Infect  
Immun*, 77 (2009), 2979-88.
- 136 L. H. Lefrancois, C. Pujol, C. C. Bodier, A. P. Teixeira-Gomez, H. Drobecq, M. L.  
Rosso, D. Raze, A. A. Dias, J. P. Hugot, O. Chacon, R. G. Barletta, C. Loch, M. C.  
Vidal Pessolani, and F. Biet, 'Characterization of the Mycobacterium Avium Subsp.  
Paratuberculosis Laminin-Binding/Histone-Like Protein (Lbp/Hlp) Which Reacts with  
Sera from Patients with Crohn's Disease', *Microbes Infect*, 13 (2011), 585-94.
- 137 I. Leivo, and E. Engvall, 'Merosin, a Protein Specific for Basement Membranes of  
Schwann Cells, Striated Muscle, and Trophoblast, Is Expressed Late in Nerve and  
Muscle Development', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85 (1988), 1544-8.
- 138 L. Li, J. P. Bannantine, Q. Zhang, A. Amonsin, B. J. May, D. Alt, N. Banerji, S.  
Kanjilal, and V. Kapur, 'The Complete Genome Sequence of Mycobacterium Avium  
Subspecies Paratuberculosis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (2005), 12344-9.
- 139 J. V. Lomino, A. Tripathy, and M. R. Redinbo, 'Triggered Mycobacterium  
Tuberculosis Heparin-Binding Hemagglutinin Adhesin Folding and Dimerization', *J  
Bacteriol*, 193 (2011), 2089-96.
- 140 M. Maccarana, Y. Sakura, A. Tawada, K. Yoshida, and U. Lindahl, 'Domain Structure  
of Heparan Sulfates from Bovine Organs', *J Biol Chem*, 271 (1996), 17804-10.
- 141 I. Maridonneau-Parini, and M. Daffé, 'Tropisme Cellulaire Des Mycobactéries',  
*médecine/Sciences Synthèse*, 17 (2001), 388-93.

- 142 M. A. Marques, V. L. Ant nio, E. N. Sarno, P. J. Brennan, and M. C. Pessolani, 'Binding of Alpha2-Laminins by Pathogenic and Non-Pathogenic Mycobacteria and Adherence to Schwann Cells', *J Med Microbiol*, 50 (2001), 23-8.
- 143 I. B. Marsh, J. P. Bannantine, M. L. Paustian, M. L. Tizard, V. Kapur, and R. J. Whittington, 'Genomic Comparison of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Sheep and Cattle Strains by Microarray Hybridization', *J Bacteriol*, 188 (2006), 2290-3.
- 144 I. B. Marsh, and R. J. Whittington, 'Deletion of an Mmpl Gene and Multiple Associated Genes from the Genome of the S Strain of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Identified by Representational Difference Analysis and in Silico Analysis', *Mol Cell Probes*, 19 (2005), 371-84.
- 145 I. B. Marsh, 'Genomic Diversity in Mycobacterium Avium: Single Nucleotide Polymorphisms between the S and C Strains of M. Avium Subsp. Paratuberculosis and with M. A. Avium', *Mol Cell Probes*, 21 (2007), 66-75.
- 146 E. Martin, P. W. Roche, J. A. Triccas, and W. J. Britton, 'DNA Encoding a Single Mycobacterial Antigen Protects against Leprosy Infection', *Vaccine*, 19 (2001), 1391-6.
- 147 A. N. Martinez, C. F. Britto, J. A. Nery, E. P. Sampaio, M. R. Jardim, E. N. Sarno, and M. O. Moraes, 'Evaluation of Real-Time and Conventional Pcr Targeting Complex 85 Genes for Detection of Mycobacterium Leprae DNA in Skin Biopsy Samples from Patients Diagnosed with Leprosy', *J Clin Microbiol*, 44 (2006), 3154-9.
- 148 C. Masungi, S. Temmerman, J. P. Van Vooren, A. Drowart, K. Pethe, F. D. Menozzi, C. Locht, and F. Mascart, 'Differential T and B Cell Responses against Mycobacterium Tuberculosis Heparin-Binding Hemagglutinin Adhesin in Infected Healthy Individuals and Patients with Tuberculosis', *J Infect Dis*, 185 (2002), 513-20.
- 149 J. L. Mendoza, R. Lana, and M. Diaz-Rubio, 'Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis and Its Relationship with Crohn's Disease', *World J Gastroenterol*, 15 (2009), 417-22.
- 150 F. D. Menozzi, R. Bischoff, E. Fort, M. J. Brennan, and C. Locht, 'Molecular Characterization of the Mycobacterial Heparin-Binding Hemagglutinin, a Mycobacterial Adhesin', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (1998), 12625-30.
- 151 F. D. Menozzi, A. S. Debie, J. P. Tissier, C. Locht, K. Pethe, and D. Raze, 'Interaction of Human Tamm-Horsfall Glycoprotein with Bordetella Pertussis Toxin', *Microbiology*, 148 (2002), 1193-201.
- 152 F. D. Menozzi, V. M. Reddy, D. Cayet, D. Raze, A. S. Debie, M. P. Dehouck, R. Cecchelli, and C. Locht, 'Mycobacterium Tuberculosis Heparin-Binding Haemagglutinin Adhesin (Hbha) Triggers Receptor-Mediated Transcytosis without Altering the Integrity of Tight Junctions', *Microbes Infect*, 8 (2006), 1-9.
- 153 F. D. Menozzi, J. H. Rouse, M. Alavi, M. Laude-Sharp, J. Muller, R. Bischoff, M. J. Brennan, and C. Locht, 'Identification of a Heparin-Binding Hemagglutinin Present in Mycobacteria', *J Exp Med*, 184 (1996), 993-1001.
- 154 P. Mercier, 'Paratuberculose, Épidémiologie, Prévalence, Maîtrise, Certification', *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation*, 47 (2011).
- 155 D. E. Michele, R. Barresi, M. Kanagawa, F. Saito, R. D. Cohn, J. S. Satz, J. Dollar, I. Nishino, R. I. Kelley, H. Somer, V. Straub, K. D. Mathews, S. A. Moore, and K. P. Campbell, 'Post-Translational Disruption of Dystroglycan-Ligand Interactions in Congenital Muscular Dystrophies', *Nature*, 418 (2002), 417-22.
- 156 A. M. Middleton, M. V. Chadwick, A. G. Nicholson, A. Dewar, R. K. Groger, E. J. Brown, T. L. Ratliff, and R. Wilson, 'Inhibition of Adherence of Mycobacterium

- Avium Complex and Mycobacterium Tuberculosis to Fibronectin on the Respiratory Mucosa', *Respir Med*, 98 (2004), 1203-6.
- 157 A. M. Middleton, 'Interaction of Mycobacterium Tuberculosis with Human Respiratory Mucosa', *Tuberculosis (Edinb)*, 82 (2002), 69-78.
- 158 A. M. Middleton, M. V. Chadwick, A. G. Nicholson, A. Dewar, R. K. Groger, E. J. Brown, and R. Wilson, 'The Role of Mycobacterium Avium Complex Fibronectin Attachment Protein in Adherence to the Human Respiratory Mucosa', *Mol Microbiol*, 38 (2000), 381-91.
- 159 W. Mijs, P. de Haas, R. Rossau, T. Van der Laan, L. Rigouts, F. Portaels, and D. van Soolingen, 'Molecular Evidence to Support a Proposal to Reserve the Designation Mycobacterium Avium Subsp. Avium for Bird-Type Isolates and 'M. Avium Subsp. Hominissuis' for the Human/Porcine Type of M. Avium', *Int J Syst Evol Microbiol*, 52 (2002), 1505-18.
- 160 L. M. Milstone, L. Hough-Monroe, L. C. Kugelman, J. R. Bender, and J. G. Haggerty, 'Epican, a Heparan/Chondroitin Sulfate Proteoglycan Form of Cd44, Mediates Cell-Cell Adhesion', *J Cell Sci*, 107 ( Pt 11) (1994), 3183-90.
- 161 Y. Miyamoto, T. Mukai, F. Takeshita, N. Nakata, Y. Maeda, M. Kai, and M. Makino, 'Aggregation of Mycobacteria Caused by Disruption of Fibronectin-Attachment Protein-Encoding Gene', *FEMS Microbiol Lett*, 236 (2004), 227-34.
- 162 E. Momotani, N. M. Romona, K. Yoshihara, Y. Momotani, M. Hori, H. Ozaki, S. Eda, and M. Ikegami, 'Molecular Pathogenesis of Bovine Paratuberculosis and Human Inflammatory Bowel Diseases', *Vet Immunol Immunopathol*, 148 (2012), 55-68.
- 163 E. Momotani, D. L. Whipple, A. B. Thiermann, and N. F. Cheville, 'Role of M Cells and Macrophages in the Entrance of Mycobacterium Paratuberculosis into Domes of Ileal Peyer's Patches in Calves', *Vet Pathol*, 25 (1988), 131-7.
- 164 E. Mongodin, O. Bajolet, J. Cutrona, N. Bonnet, F. Dupuit, E. Puchelle, and S. de Bentzmann, 'Fibronectin-Binding Proteins of Staphylococcus Aureus Are Involved in Adherence to Human Airway Epithelium', *Infect Immun*, 70 (2002), 620-30.
- 165 A. S. Motiwala, A. Amonsin, M. Strother, E. J. Manning, V. Kapur, and S. Sreevatsan, 'Molecular Epidemiology of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Isolates Recovered from Wild Animal Species', *J Clin Microbiol*, 42 (2004), 1703-12.
- 166 A. S. Motiwala, H. K. Janagama, M. L. Paustian, X. Zhu, J. P. Bannantine, V. Kapur, and S. Sreevatsan, 'Comparative Transcriptional Analysis of Human Macrophages Exposed to Animal and Human Isolates of Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis with Diverse Genotypes', *Infect Immun*, 74 (2006), 6046-56.
- 167 R. Mucha, M. R. Bhide, E. B. Chakurkar, M. Novak, and I. Mikula, Sr., 'Toll-Like Receptors Tlr1, Tlr2 and Tlr4 Gene Mutations and Natural Resistance to Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Infection in Cattle', *Vet Immunol Immunopathol*, 128 (2009), 381-8.
- 168 S. L. Mueller-Ortiz, A. R. Wanger, and S. J. Norris, 'Mycobacterial Protein Hbha Binds Human Complement Component C3', *Infect Immun*, 69 (2001), 7501-11.
- 169 S. Mukhopadhyay, and S. Gordon, 'The Role of Scavenger Receptors in Pathogen Recognition and Innate Immunity', *Immunobiology*, 209 (2004), 39-49.
- 170 M. I. Murcia, E. Tortoli, M. C. Menendez, E. Palenque, and M. J. Garcia, 'Mycobacterium Colombiense Sp. Nov., a Novel Member of the Mycobacterium Avium Complex and Description of Mac-X as a New Its Genetic Variant', *Int J Syst Evol Microbiol*, 56 (2006), 2049-54.
- 171 C. Nacy, and M. Buckley, 'Mycobacterium Avium Paratuberculosis : Infrequent Human Pathogen or Public Health Threat?', *A report from American Academy of*



- Microbiology* (2008),  
<http://www.asm.org/ASM/files/ccLibraryFiles/Filename/000000004169/MAP.pdf>.
- 172 S. Nagai, H. G. Wiker, M. Harboe, and M. Kinomoto, 'Isolation and Partial Characterization of Major Protein Antigens in the Culture Fluid of Mycobacterium Tuberculosis', *Infect Immun*, 59 (1991), 372-82.
- 173 M. Naito, T. Fukuda, K. Sekiguchi, and T. Yamada, 'The Domains of Human Fibronectin Mediating the Binding of Alpha Antigen, the Most Immunopotent Antigen of Mycobacteria That Induces Protective Immunity against Mycobacterial Infection', *Biochem J*, 347 Pt 3 (2000), 725-31.
- 174 M. Naito, M. Matsuoka, N. Ohara, H. Nomaguchi, and T. Yamada, 'The Antigen 85 Complex Vaccine against Experimental Mycobacterium Leprae Infection in Mice', *Vaccine*, 18 (1999), 795-8.
- 175 M. Naito, N. Ohara, S. Matsumoto, and T. Yamada, 'The Novel Fibronectin-Binding Motif and Key Residues of Mycobacteria', *J Biol Chem*, 273 (1998), 2905-9.
- 176 S. S. Nielsen, and N. Toft, 'A Review of Prevalences of Paratuberculosis in Farmed Animals in Europe', *Prev Vet Med*, 88 (2009), 1-14.
- 177 G. Nugent, E. J. Whitford, J. C. Hunnam, P. R. Wilson, M. Cross, and G. W. de Lisle, 'Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Infection in Wildlife on Three Deer Farms with a History of Johne's Disease', *N Z Vet J*, 59 (2011), 293-8.
- 178 L. M. Okkels, E. C. Muller, M. Schmid, I. Rosenkrands, S. H. Kaufmann, P. Andersen, and P. R. Jungblut, 'Cfp10 Discriminates between Nonacetylated and Acetylated Esat-6 of Mycobacterium Tuberculosis by Differential Interaction', *Proteomics*, 4 (2004), 2954-60.
- 179 S. L. Ott, S. J. Wells, and B. A. Wagner, 'Herd-Level Economic Losses Associated with Johne's Disease on Us Dairy Operations', *Prev Vet Med*, 40 (1999), 179-92.
- 180 M. Parra, T. Pickett, G. Delogu, V. Dheenadhayalan, A. S. Debie, C. Loch, and M. J. Brennan, 'The Mycobacterial Heparin-Binding Hemagglutinin Is a Protective Antigen in the Mouse Aerosol Challenge Model of Tuberculosis', *Infect Immun*, 72 (2004), 6799-805.
- 181 I. Pavlik, L. Matlova, J. Bartl, P. Svastova, L. Dvorska, and R. Whitlock, 'Parallel Faecal and Organ Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Culture of Different Productivity Types of Cattle', *Vet Microbiol*, 77 (2000), 309-24.
- 182 P. Peake, A. Gooley, and W. J. Britton, 'Mechanism of Interaction of the 85b Secreted Protein of Mycobacterium Bovis with Fibronectin', *Infect Immun*, 61 (1993), 4828-34.
- 183 M. C. Pessolani, and P. J. Brennan, 'Mycobacterium Leprae Produces Extracellular Homologs of the Antigen 85 Complex', *Infect Immun*, 60 (1992), 4452-9.
- 184 K. Pethe, S. Alonso, F. Biet, G. Delogu, M. J. Brennan, C. Loch, and F. D. Menozzi, 'The Heparin-Binding Haemagglutinin of M. Tuberculosis Is Required for Extrapulmonary Dissemination', *Nature*, 412 (2001), 190-4.
- 185 K. Pethe, M. Aumercier, E. Fort, C. Gatot, C. Loch, and F. D. Menozzi, 'Characterization of the Heparin-Binding Site of the Mycobacterial Heparin-Binding Hemagglutinin Adhesin', *J Biol Chem*, 275 (2000), 14273-80.
- 186 K. Pethe, P. Bifani, H. Drobecq, C. Sergheraert, A. S. Debie, C. Loch, and F. D. Menozzi, 'Mycobacterial Heparin-Binding Hemagglutinin and Laminin-Binding Protein Share Antigenic Methyllysines That Confer Resistance to Proteolysis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (2002), 10759-64.
- 187 K. Pethe, V. Puech, M. Daffe, C. Josenhans, H. Drobecq, C. Loch, and F. D. Menozzi, 'Mycobacterium Smegmatis Laminin-Binding Glycoprotein Shares Epitopes with Mycobacterium Tuberculosis Heparin-Binding Haemagglutinin', *Mol Microbiol*, 39 (2001), 89-99.

- 188 M. C. Pieterse, S. W. Eisenberg, G. E. Folmer, S. Liggett, J. F. Griffin, A. P. Koets, and M. Nielen, 'Evidence of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Infection in Dutch Farmed Red Deer', *Tijdschr Diergeneeskd*, 135 (2010), 886-90.
- 189 R. B. Pillars, D. L. Grooms, and J. B. Kaneene, 'Longitudinal Study of the Distribution of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis in the Environment of Dairy Herds in the Michigan Johne's Disease Control Demonstration Herd Project', *Can Vet J*, 50 (2009), 1039-46.
- 190 K. M. Plain, A. C. Purdie, D. J. Begg, K. de Silva, and R. J. Whittington, 'Toll-Like Receptor (Tlr)6 and Tlr1 Differentiation in Gene Expression Studies of Johne's Disease', *Vet Immunol Immunopathol*, 137 (2010), 142-8.
- 191 M. I. Portugal, A. R. Todeschini, C. S. de Lima, C. A. Silva, R. Mohana-Borges, T. H. Ottenhoff, L. Mendonca-Previato, J. O. Previato, and M. C. Pessolani, 'Characterization of Two Heparan Sulphate-Binding Sites in the Mycobacterial Adhesin Hlp', *BMC Microbiol*, 8 (2008), 75.
- 192 V. Quesniaux, C. Fremond, M. Jacobs, S. Parida, D. Nicolle, V. Yermeev, F. Bihl, F. Erard, T. Botha, M. Drennan, M. N. Soler, M. Le Bert, B. Schnyder, and B. Ryffel, 'Toll-Like Receptor Pathways in the Immune Responses to Mycobacteria', *Microbes Infect*, 6 (2004), 946-59.
- 193 D. L. Rabenstein, 'Heparin and Heparan Sulfate: Structure and Function', *Nat Prod Rep*, 19 (2002), 312-31.
- 194 A. Ragas, L. Roussel, G. Puzo, and M. Riviere, 'The Mycobacterium Tuberculosis Cell-Surface Glycoprotein Apa as a Potential Adhesin to Colonize Target Cells Via the Innate Immune System Pulmonary C-Type Lectin Surfactant Protein A', *J Biol Chem*, 282 (2007), 5133-42.
- 195 L. Ramakrishnan, 'Revisiting the Role of the Granuloma in Tuberculosis', *Nat Rev Immunol*, 12 (2012), 352-66.
- 196 A. Rambukkana, P. K. Das, J. D. Burggraaf, S. Yong, W. R. Faber, J. E. Thole, and M. Harboe, 'Heterogeneity of Monoclonal Antibody-Reactive Epitopes on Mycobacterial 30-Kilodalton-Region Proteins and the Secreted Antigen 85 Complex and Demonstration of Antigen 85b on the Mycobacterium Leprae Cell Wall Surface', *Infect Immun*, 60 (1992), 5172-81.
- 197 A. Rambukkana, J. L. Salzer, P. D. Yurchenco, and E. I. Tuomanen, 'Neural Targeting of Mycobacterium Leprae Mediated by the G Domain of the Laminin-Alpha2 Chain', *Cell*, 88 (1997), 811-21.
- 198 A. Rambukkana, H. Yamada, G. Zanazzi, T. Mathus, J. L. Salzer, P. D. Yurchenco, K. P. Campbell, and V. A. Fischetti, 'Role of Alpha-Dystroglycan as a Schwann Cell Receptor for Mycobacterium Leprae', *Science*, 282 (1998), 2076-9.
- 199 T. L. Ratliff, R. McCarthy, W. B. Telle, and E. J. Brown, 'Purification of a Mycobacterial Adhesin for Fibronectin', *Infect Immun*, 61 (1993), 1889-94.
- 200 T. L. Ratliff, J. A. McGarr, C. Abou-Zeid, G. A. Rook, J. L. Stanford, J. Aslanzadeh, and E. J. Brown, 'Attachment of Mycobacteria to Fibronectin-Coated Surfaces', *J Gen Microbiol*, 134 (1988), 1307-13.
- 201 N. Reiling, C. Holscher, A. Fehrenbach, S. Kroger, C. J. Kirschning, S. Goyert, and S. Ehlers, 'Cutting Edge: Toll-Like Receptor (Tlr)2- and Tlr4-Mediated Pathogen Recognition in Resistance to Airborne Infection with Mycobacterium Tuberculosis', *J Immunol*, 169 (2002), 3480-4.
- 202 P. W. Roche, W. J. Britton, S. S. Failbus, H. Ludwig, W. J. Theuvenet, and R. B. Adiga, 'Heterogeneity of Serological Responses in Paucibacillary Leprosy--Differential Responses to Protein and Carbohydrate Antigens and Correlation with Clinical Parameters', *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 58 (1990), 319-27.

- 
- 203 P. Roger, E. Puchelle, O. Bajolet-Laudinat, J. M. Tournier, C. Debordeaux, M. C. Plotkowski, J. H. Cohen, D. Sheppard, and S. de Bentzmann, 'Fibronectin and Alpha5beta1 Integrin Mediate Binding of Pseudomonas Aeruginosa to Repairing Airway Epithelium', *Eur Respir J*, 13 (1999), 1301-9.
- 204 F. Romain, C. Horn, P. Pescher, A. Namane, M. Riviere, G. Puzo, O. Barzu, and G. Marchal, 'Deglycosylation of the 45/47-Kilodalton Antigen Complex of Mycobacterium Tuberculosis Decreases Its Capacity to Elicit in Vivo or in Vitro Cellular Immune Responses', *Infect Immun*, 67 (1999), 5567-72.
- 205 K. S. Rostand, and J. D. Esko, 'Microbial Adherence to and Invasion through Proteoglycans', *Infect Immun*, 65 (1997), 1-8.
- 206 C. Rouanet, A. S. Debrie, S. Lecher, and C. Loch, 'Subcutaneous Boosting with Heparin Binding Haemagglutinin Increases Bcg-Induced Protection against Tuberculosis', *Microbes Infect*, 11 (2009), 995-1001.
- 207 D. A. Rouse, S. L. Morris, A. B. Karpas, J. C. Mackall, P. G. Probst, and S. D. Chaparas, 'Immunological Characterization of Recombinant Antigens Isolated from a Mycobacterium Avium Lambda Gt11 Expression Library by Using Monoclonal Antibody Probes', *Infect Immun*, 59 (1991), 2595-600.
- 208 M. Salgado, M. T. Collins, F. Salazar, J. Kruze, G. Bolske, R. Soderlund, R. Juste, I. A. Sevilla, F. Biet, F. Troncoso, and M. Alfaro, 'Fate of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis after Application of Contaminated Dairy Cattle Manure to Agricultural Soils', *Appl Environ Microbiol*, 77 (2011), 2122-9.
- 209 F. J. Sangari, J. Goodman, M. Petrofsky, P. Kolonoski, and L. E. Bermudez, 'Mycobacterium Avium Invades the Intestinal Mucosa Primarily by Interacting with Enterocytes', *Infect Immun*, 69 (2001), 1515-20.
- 210 M. Sani, E. N. Houben, J. Geurtsen, J. Pierson, K. de Punder, M. van Zon, B. Wever, S. R. Piersma, C. R. Jimenez, M. Daffe, B. J. Appelmelk, W. Bitter, N. van der Wel, and P. J. Peters, 'Direct Visualization by Cryo-Em of the Mycobacterial Capsular Layer: A Labile Structure Containing Esx-1-Secreted Proteins', *PLoS Pathog*, 6 (2010), e1000794.
- 211 R. Sasisekharan, and G. Venkataraman, 'Heparin and Heparan Sulfate: Biosynthesis, Structure and Function', *Curr Opin Chem Biol*, 4 (2000), 626-31.
- 212 L. Savolainen, L. Pusa, H. J. Kim, H. Sillanpaa, I. Seppala, and T. Tuuminen, 'Pilot Study of Diagnostic Potential of the Mycobacterium Tuberculosis Recombinant Hbha Protein in a Vaccinated Population in Finland', *PLoS One*, 3 (2008), e3272.
- 213 P. M. Schlegel, C. D. Buergelt, J. K. Davis, E. Williams, G. R. Monif, and M. K. Davidson, 'Attachment of Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis to Bovine Intestinal Organ Cultures: Method Development and Strain Differences', *Vet Microbiol*, 108 (2005), 271-9.
- 214 L. S. Schlesinger, 'Macrophage Phagocytosis of Virulent but Not Attenuated Strains of Mycobacterium Tuberculosis Is Mediated by Mannose Receptors in Addition to Complement Receptors', *J Immunol*, 150 (1993), 2920-30.
- 215 L. S. Schlesinger, C. G. Bellinger-Kawahara, N. R. Payne, and M. A. Horwitz, 'Phagocytosis of Mycobacterium Tuberculosis Is Mediated by Human Monocyte Complement Receptors and Complement Component C3', *J Immunol*, 144 (1990), 2771-80.
- 216 J. S. Schorey, M. C. Carroll, and E. J. Brown, 'A Macrophage Invasion Mechanism of Pathogenic Mycobacteria', *Science*, 277 (1997), 1091-3.
- 217 J. S. Schorey, M. A. Holsti, T. L. Ratliff, P. M. Allen, and E. J. Brown, 'Characterization of the Fibronectin-Attachment Protein of Mycobacterium Avium

- Reveals a Fibronectin-Binding Motif Conserved among Mycobacteria', *Mol Microbiol*, 21 (1996), 321-9.
- 218 J. S. Schorey, Q. Li, D. W. McCourt, M. Bong-Mastek, J. E. Clark-Curtiss, T. L. Ratliff, and E. J. Brown, 'A Mycobacterium Leprae Gene Encoding a Fibronectin Binding Protein Is Used for Efficient Invasion of Epithelial Cells and Schwann Cells', *Infect Immun*, 63 (1995), 2652-7.
- 219 L. A. Sechi, N. Ahmed, G. E. Felis, I. Dupre, S. Cannas, G. Fadda, A. Bua, and S. Zanetti, 'Immunogenicity and Cytoadherence of Recombinant Heparin Binding Haemagglutinin (Hbha) of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis: Functional Promiscuity or a Role in Virulence?', *Vaccine*, 24 (2006), 236-43.
- 220 T. E. Secott, T. L. Lin, and C. C. Wu, 'Fibronectin Attachment Protein Homologue Mediates Fibronectin Binding by Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis', *Infect Immun*, 69 (2001), 2075-82.
- 221 ———, 'Fibronectin Attachment Protein Is Necessary for Efficient Attachment and Invasion of Epithelial Cells by Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis', *Infect Immun*, 70 (2002), 2670-5.
- 222 ———, 'Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Fibronectin Attachment Protein Facilitates M-Cell Targeting and Invasion through a Fibronectin Bridge with Host Integrins', *Infect Immun*, 72 (2004), 3724-32.
- 223 T.E. Secott, T.L. Lin, and C.C. Wu, 'Fibronectin Attachment Protein Homologue Mediates Fibronectin Binding by Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis.', *Infect Immun*, 69 (2001), 2075-82.
- 224 TE. Secott, T.L. Lin, and C.C. Wu, 'Fibronectin Attachment Protein Is Necessary for Efficient Attachment and Invasion of Epithelial Cells by Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis. 2002 May;70(5):2670-5.', *Infect Immun*, 70 (2002), 2670-75.
- 225 M. Semret, C. Y. Turenne, P. de Haas, D. M. Collins, and M. A. Behr, 'Differentiating Host-Associated Variants of Mycobacterium Avium by Pcr for Detection of Large Sequence Polymorphisms', *J Clin Microbiol*, 44 (2006), 881-7.
- 226 Z. Sever-Chroneos, A. Tvinnereim, R. L. Hunter, and Z. C. Chrones, 'Prolonged Survival of Scavenger Receptor Class a-Deficient Mice from Pulmonary Mycobacterium Tuberculosis Infection', *Tuberculosis (Edinb)*, 91 Suppl 1 (2011), S69-74.
- 227 I. Sevilla, J. M. Garrido, M. Geijo, and R. A. Juste, 'Pulsed-Field Gel Electrophoresis Profile Homogeneity of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Isolates from Cattle and Heterogeneity of Those from Sheep and Goats', *BMC Microbiol*, 7 (2007), 18.
- 228 N. Sharadamma, K. Khan, S. Kumar, K. N. Patil, S. E. Hasnain, and K. Muniyappa, 'Synergy between the N-Terminal and C-Terminal Domains of Mycobacterium Tuberculosis Hupb Is Essential for High-Affinity Binding, DNA Supercoiling and Inhibition of RecA-Promoted Strand Exchange', *FEBS J*, 278 (2011), 3447-62.
- 229 Y. Shimoji, V. Ng, K. Matsumura, V. A. Fischetti, and A. Rambukkana, 'A 21-Kda Surface Protein of Mycobacterium Leprae Binds Peripheral Nerve Laminin-2 and Mediates Schwann Cell Invasion', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (1999), 9857-62.
- 230 S. J. Shin, C. F. Chang, C. D. Chang, S. P. McDonough, B. Thompson, H. S. Yoo, and Y. F. Chang, 'In Vitro Cellular Immune Responses to Recombinant Antigens of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis', *Infect Immun*, 73 (2005), 5074-85.
- 231 S. J. Shin, H. S. Yoo, S. P. McDonough, and Y. F. Chang, 'Comparative Antibody Response of Five Recombinant Antigens in Related to Bacterial Shedding Levels and

- Development of Serological Diagnosis Based on 35 Kda Antigen for Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis', *J Vet Sci*, 5 (2004), 111-7.
- 232 K. Shires, and L. Steyn, 'The Cold-Shock Stress Response in Mycobacterium Smegmatis Induces the Expression of a Histone-Like Protein', *Mol Microbiol*, 39 (2001), 994-1009.
- 233 W. P. Shulaw, J. C. Gordon, S. Bech-Nielsen, C. I. Pretzman, and G. F. Hoffsis, 'Evidence of Paratuberculosis in Ohio's White-Tailed Deer, as Determined by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay', *Am J Vet Res*, 47 (1986), 2539-42.
- 234 O. G. Siguredardottir, M. Valheim, and C. M. Press, 'Establishment of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Infection in the Intestine of Ruminants', *Adv Drug Deliv Rev*, 56 (2004), 819-34.
- 235 S. P. Singh, H. Salamon, C. J. Lahti, M. Farid-Moyer, and P. M. Small, 'Use of Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Molecular Epidemiologic and Population Genetic Studies of Mycobacterium Tuberculosis', *J Clin Microbiol*, 37 (1999), 1927-31.
- 236 H. W. Sinn, B. D. Elzey, R. J. Jensen, X. Zhao, W. Zhao, and T. L. Ratliff, 'The Fibronectin Attachment Protein of Bacillus Calmette-Guerin (Bcg) Mediates Antitumor Activity', *Cancer Immunol Immunother*, 57 (2008), 573-9.
- 237 Y. Smani, M. J. McConnell, and J. Pachon, 'Role of Fibronectin in the Adhesion of Acinetobacter Baumanni to Host Cells', *PLoS One*, 7 (2012), e33073.
- 238 C. Soares de Lima, L. Zulianello, M. A. Marques, H. Kim, M. I. Portugal, S. L. Antunes, F. D. Menozzi, T. H. Ottenhoff, P. J. Brennan, and M. C. Pessolani, 'Mapping the Laminin-Binding and Adhesive Domain of the Cell Surface-Associated Hlp/Lbp Protein from Mycobacterium Leprae', *Microbes Infect*, 7 (2005), 1097-109.
- 239 C. D. Souza, O. A. Evanson, S. Sreevatsan, and D. J. Weiss, 'Cell Membrane Receptors on Bovine Mononuclear Phagocytes Involved in Phagocytosis of Mycobacterium Avium Subsp Paratuberculosis', *Am J Vet Res*, 68 (2007), 975-80.
- 240 G. S. Souza, A. B. Rodrigues, A. Gioffre, M. I. Romano, E. C. Carvalho, T. L. Ventura, and E. B. Lasunskaja, 'Apa Antigen of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis as a Target for Species-Specific Immunodetection of the Bacteria in Infected Tissues of Cattle with Paratuberculosis', *Vet Immunol Immunopathol*, 143 (2011), 75-82.
- 241 G. St-Jean, and A. D. Jernigan, 'Treatment of Mycobacterium Paratuberculosis Infection in Ruminants', *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 7 (1991), 793-804.
- 242 J. R. Stabel, 'Cytokine Secretion by Peripheral Blood Mononuclear Cells from Cows Infected with Mycobacterium Paratuberculosis', *Am J Vet Res*, 61 (2000), 754-60.
- 243 J. R. Stabel, 'Johne's Disease: A Hidden Threat', *J Dairy Sci*, 81 (1998), 283-8.
- 244 J. R. Stabel, 'Transitions in Immune Responses to Mycobacterium Paratuberculosis', *Vet Microbiol*, 77 (2000), 465-73.
- 245 K. Stevenson, V. M. Hughes, L. de Juan, N. F. Inglis, F. Wright, and J. M. Sharp, 'Molecular Characterization of Pigmented and Nonpigmented Isolates of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis', *J Clin Microbiol*, 40 (2002), 1798-804.
- 246 I. Sugawara, H. Yamada, C. Li, S. Mizuno, O. Takeuchi, and S. Akira, 'Mycobacterial Infection in Tlr2 and Tlr6 Knockout Mice', *Microbiol Immunol*, 47 (2003), 327-36.
- 247 Y. Takada, X. Ye, and S. Simon, 'The Integrins', *Genome Biol*, 8 (2007), 215.
- 248 M. Takatsuka, M. Osada-Oka, E. F. Satoh, K. Kitadokoro, Y. Nishiuchi, M. Niki, M. Inoue, K. Iwai, T. Arakawa, Y. Shimoji, H. Ogura, K. Kobayashi, A. Rambukkana, and S. Matsumoto, 'A Histone-Like Protein of Mycobacteria Possesses Ferritin Superfamily Protein-Like Activity and Protects against DNA Damage by Fenton Reaction', *PLoS One*, 6 (2011), e20985.

- 249 A. Tanghe, J. Content, J. P. Van Vooren, F. Portaels, and K. Huygen, 'Protective Efficacy of a DNA Vaccine Encoding Antigen 85a from Mycobacterium Bovis Bcg against Buruli Ulcer', *Infect Immun*, 69 (2001), 5403-11.
- 250 A. Tanne, and O. Neyrolles, 'C-Type Lectins in Immune Defense against Pathogens: The Murine Dc-Sign Homologue Signr3 Confers Early Protection against Mycobacterium Tuberculosis Infection', *Virulence*, 1 (2010), 285-90.
- 251 D. L. Taylor, L. Zhong, D. J. Begg, K. de Silva, and R. J. Whittington, 'Toll-Like Receptor Genes Are Differentially Expressed at the Sites of Infection During the Progression of Johne's Disease in Outbred Sheep', *Vet Immunol Immunopathol*, 124 (2008), 132-51.
- 252 S. Temmerman, K. Pethe, M. Parra, S. Alonso, C. Rouanet, T. Pickett, A. Drowart, A. S. Debrie, G. Delogu, F. D. Menozzi, C. Sergheraert, M. J. Brennan, F. Mascart, and C. Locht, 'Methylation-Dependent T Cell Immunity to Mycobacterium Tuberculosis Heparin-Binding Hemagglutinin', *Nat Med*, 10 (2004), 935-41.
- 253 V. C. Thibault, M. Grayon, M. L. Boschioli, C. Hubbans, P. Overduin, K. Stevenson, M. C. Gutierrez, P. Supply, and F. Biet, 'New Variable Number Tandem Repeat Markers for Typing M. Avium Subsp. Paratuberculosis and M. Avium Strains: Comparison with Is900 Rflp and Is1245 Rflp Typing', *J Clin Microbiol*, 45 (2007), 2404-10.
- 254 J. E. Thole, R. Schoningh, A. A. Janson, T. Garbe, Y. E. Cornelisse, J. E. Clark-Curtiss, A. H. Kolk, T. H. Ottenhoff, R. R. De Vries, and C. Abou-Zeid, 'Molecular and Immunological Analysis of a Fibronectin-Binding Protein Antigen Secreted by Mycobacterium Leprae', *Mol Microbiol*, 6 (1992), 153-63.
- 255 M. F. Thorel, 'Review of the Occurrence of Mycobactin Dependence among Mycobacteria Species', *Ann Rech Vet*, 15 (1984), 405-9.
- 256 M. F. Thorel, M. Krichevsky, and V. V. Levy-Frebault, 'Numerical Taxonomy of Mycobactin-Dependent Mycobacteria, Emended Description of Mycobacterium Avium, and Description of Mycobacterium Avium Subsp. Avium Subsp. Nov., Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Subsp. Nov., and Mycobacterium Avium Subsp. Silvaticum Subsp. Nov', *Int J Syst Bacteriol*, 40 (1990), 254-60.
- 257 M.F. Thorel, 'La Paratuberculose Chez Les Cervidés', *GTV*, Hors-série (2002), 88-90.
- 258 M.F. Thorel, and T. Delcroix, 'La Vaccination Contre La Paratuberculose Dans Le Monde', *GTV*, HS (2002), 91-94.
- 259 V. J. Timms, M. M. Gehringer, H. M. Mitchell, G. Daskalopoulos, and B. A. Neilan, 'How Accurately Can We Detect Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Infection?', *J Microbiol Methods*, 85 (2011), 1-8.
- 260 E. Tortoli, L. Rindi, M. J. Garcia, P. Chiaradonna, R. Dei, C. Garzelli, R. M. Kroppenstedt, N. Lari, R. Mattei, A. Mariottini, G. Mazzarelli, M. I. Murcia, A. Nanetti, P. Piccoli, and C. Scarparo, 'Proposal to Elevate the Genetic Variant Mac-a, Included in the Mycobacterium Avium Complex, to Species Rank as Mycobacterium Chimaera Sp. Nov', *Int J Syst Evol Microbiol*, 54 (2004), 1277-85.
- 261 J. A. Triccas, P. W. Roche, N. Winter, C. G. Feng, C. R. Butlin, and W. J. Britton, 'A 35-Kilodalton Protein Is a Major Target of the Human Immune Response to Mycobacterium Leprae', *Infect Immun*, 64 (1996), 5171-7.
- 262 J. A. Triccas, N. Winter, P. W. Roche, A. Gilpin, K. E. Kendrick, and W. J. Britton, 'Molecular and Immunological Analyses of the Mycobacterium Avium Homolog of the Immunodominant Mycobacterium Leprae 35-Kilodalton Protein', *Infect Immun*, 66 (1998), 2684-90.
- 263 P. Tunggal, N. Smyth, M. Paulsson, and M. C. Ott, 'Laminins: Structure and Genetic Regulation', *Microsc Res Tech*, 51 (2000), 214-27.

- 264 C. Y. Turenne, D. M. Collins, D. C. Alexander, and M. A. Behr, 'Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis and M. Avium Subsp. Avium Are Independently Evolved Pathogenic Clones of a Much Broader Group of M. Avium Organisms', *J Bacteriol*, 190 (2008), 2479-87.
- 265 C. Y. Turenne, R. Wallace, Jr., and M. A. Behr, 'Mycobacterium Avium in the Postgenomic Era', *Clin Microbiol Rev*, 20 (2007), 205-29.
- 266 F. W. Twort, and E. Mellanby, 'On Creatin-Destroying Bacilli in the Intestine, and Their Isolation', *J Physiol*, 44 (1912), 43-9.
- 267 J. Tzu, and M. P. Marinkovich, 'Bridging Structure with Function: Structural, Regulatory, and Developmental Role of Laminins', *Int J Biochem Cell Biol*, 40 (2008), 199-214.
- 268 D. M. Underhill, A. Ozinsky, A. M. Hajjar, A. Stevens, C. B. Wilson, M. Bassetti, and A. Aderem, 'The Toll-Like Receptor 2 Is Recruited to Macrophage Phagosomes and Discriminates between Pathogens', *Nature*, 401 (1999), 811-5.
- 269 P. Valentin-Weigand, and K. M. Moriarty, 'Protein Antigens Secreted by Mycobacterium Paratuberculosis', *Zentralbl Veterinarmed B*, 39 (1992), 762-6.
- 270 J. van Ingen, M. J. Boeree, K. Kusters, A. Wieland, E. Tortoli, P. N. Dekhuijzen, and D. van Soolingen, 'Proposal to Elevate Mycobacterium Avium Complex Its Sequevar Mac-Q to Mycobacterium Vulneris Sp. Nov', *Int J Syst Evol Microbiol*, 59 (2009), 2277-82.
- 271 J. C. van Kessel, and G. F. Hatfull, 'Recombineering in Mycobacterium Tuberculosis', *Nat Methods*, 4 (2007), 147-52.
- 272 N. Veillon-Vasallo, 'Les Animaux Atteints De Paratuberculose Davantage Dépistés Avec Les Nouveaux Procédés Pcr', *Le point Vétérinaire*, 313 (2011), 64-66.
- 273 C. Verbelen, and Y. F. Dufrene, 'Direct Measurement of Mycobacterium-Fibronectin Interactions', *Integr Biol (Camb)*, 1 (2009), 296-300.
- 274 C. Verbelen, V. Dupres, D. Raze, C. Bompard, C. Loch, and Y. F. Dufrene, 'Interaction of the Mycobacterial Heparin-Binding Hemagglutinin with Actin, as Evidenced by Single-Molecule Force Spectroscopy', *J Bacteriol*, 190 (2008), 7614-20.
- 275 C. Verbelen, D. Raze, F. Dewitte, C. Loch, and Y. F. Dufrene, 'Single-Molecule Force Spectroscopy of Mycobacterial Adhesin-Adhesin Interactions', *J Bacteriol*, 189 (2007), 8801-6.
- 276 M. Veugelers, B. De Cat, H. Ceulemans, A. M. Bruystens, C. Coomans, J. Durr, J. Vermeesch, P. Marynen, and G. David, 'Glypican-6, a New Member of the Glypican Family of Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans', *J Biol Chem*, 274 (1999), 26968-77.
- 277 J. vialard, 'Diagnostic Et Dépistage De La Paratuberculose Bovine', *GTV*, HS (2002), 23-27.
- 278 J. vialard, 'Epidémiologie De La Paratuberculose', *GTV*, HS (2002), 6-12.
- 279 J. vialard, 'Pathogénie De La Paratuberculose', *GTV*, HS (2002), 13-17.
- 280 T. Wadstrom, and A. Ljungh, 'Glycosaminoglycan-Binding Microbial Proteins in Tissue Adhesion and Invasion: Key Events in Microbial Pathogenicity', *J Med Microbiol*, 48 (1999), 223-33.
- 281 M. F. Weber, and H. Groenendaal, 'Effects of Infectious Young Stock on Results of Certification, Surveillance and Control Programmes for Paratuberculosis in Dairy Herds', *Vet Microbiol*, 154 (2012), 272-81.
- 282 D. C. Whiteford, J. J. Klingelhoets, M. H. Bambenek, and J. L. Dahl, 'Deletion of the Histone-Like Protein (Hlp) from Mycobacterium Smegmatis Results in Increased Sensitivity to Uv Exposure, Freezing and Isoniazid', *Microbiology*, 157 (2011), 327-35.

- 283 R. H. Whitlock, S. J. Wells, R. W. Sweeney, and J. Van Tiem, 'Elisa and Fecal Culture for Paratuberculosis (Johne's Disease): Sensitivity and Specificity of Each Method', *Vet Microbiol*, 77 (2000), 387-98.
- 284 R. J. Whittington, I. B. Marsh, V. Saunders, I. R. Grant, R. Juste, I. A. Sevilla, E. J. Manning, and R. H. Whitlock, 'Culture Phenotypes of Genomically and Geographically Diverse Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Isolates from Different Hosts', *J Clin Microbiol*, 49 (2011), 1822-30.
- 285 R. J. Whittington, D. J. Marshall, P. J. Nicholls, I. B. Marsh, and L. A. Reddacliff, 'Survival and Dormancy of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis in the Environment', *Appl Environ Microbiol*, 70 (2004), 2989-3004.
- 286 R. J. Whittington, and P. A. Windsor, 'In Utero Infection of Cattle with Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis: A Critical Review and Meta-Analysis', *Vet J*, 179 (2009), 60-9.
- 287 B. Wieles, M. van Agterveld, A. Janson, J. Clark-Curtiss, T. Rinke de Wit, M. Harboe, and J. Thole, 'Characterization of a Mycobacterium Leprae Antigen Related to the Secreted Mycobacterium Tuberculosis Protein Mpt32', *Infect Immun*, 62 (1994), 252-8.
- 288 H. G. Wiker, and M. Harboe, 'The Antigen 85 Complex: A Major Secretion Product of Mycobacterium Tuberculosis', *Microbiol Rev*, 56 (1992), 648-61.
- 289 H. G. Wiker, M. Harboe, and T. E. Lea, 'Purification and Characterization of Two Protein Antigens from the Heterogeneous Bcg85 Complex in Mycobacterium Bovis Bcg', *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 81 (1986), 298-306.
- 290 H. G. Wiker, M. Harboe, S. Nagai, and J. Bennedsen, 'Quantitative and Qualitative Studies on the Major Extracellular Antigen of Mycobacterium Tuberculosis H37rv and Mycobacterium Bovis Bcg', *Am Rev Respir Dis*, 141 (1990), 830-8.
- 291 H. G. Wiker, K. Sletten, S. Nagai, and M. Harboe, 'Evidence for Three Separate Genes Encoding the Proteins of the Mycobacterial Antigen 85 Complex', *Infect Immun*, 58 (1990), 272-4.
- 292 P. A. Windsor, and R. J. Whittington, 'Evidence for Age Susceptibility of Cattle to Johne's Disease', *Vet J*, 184 (2010), 37-44.
- 293 C. W. Wu, J. Glasner, M. Collins, S. Naser, and A. M. Talaat, 'Whole-Genome Plasticity among Mycobacterium Avium Subspecies: Insights from Comparative Genomic Hybridizations', *J Bacteriol*, 188 (2006), 711-23.
- 294 H. Yamada, T. Shimizu, T. Tanaka, K. P. Campbell, and K. Matsumura, 'Dystroglycan Is a Binding Protein of Laminin and Merosin in Peripheral Nerve', *FEBS Lett*, 352 (1994), 49-53.
- 295 S. Zanetti, A. Bua, G. Delogu, C. Pusceddu, M. Mura, F. Saba, P. Pirina, C. Garzelli, C. Vertuccio, L. A. Sechi, and G. Fadda, 'Patients with Pulmonary Tuberculosis Develop a Strong Humoral Response against Methylated Heparin-Binding Hemagglutinin', *Clin Diagn Lab Immunol*, 12 (2005), 1135-8.
- 296 W. Zhao, J. S. Schorey, M. Bong-Mastek, J. Ritchey, E. J. Brown, and T. L. Ratliff, 'Role of a Bacillus Calmette-Guerin Fibronectin Attachment Protein in Bcg-Induced Antitumor Activity', *Int J Cancer*, 86 (2000), 83-8.
- 297 W. Zhao, J. S. Schorey, R. Groger, P. M. Allen, E. J. Brown, and T. L. Ratliff, 'Characterization of the Fibronectin Binding Motif for a Unique Mycobacterial Fibronectin Attachment Protein, Fap', *J Biol Chem*, 274 (1999), 4521-6.
- 298 S. Zimmerli, S. Edwards, and J. D. Ernst, 'Selective Receptor Blockade During Phagocytosis Does Not Alter the Survival and Growth of Mycobacterium Tuberculosis in Human Macrophages', *Am J Respir Cell Mol Biol*, 15 (1996), 760-70.



# ANNEXES

## Annexe 1 : Clonages réalisés pour cette étude

Souches – Plasmides	Génotype – Description	Référence – Source
<b>Bactéries</b>		
<i>E. coli</i> TOP10	F– <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara leu</i> ) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen®
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F– <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> (rB–, mB–) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3)	Invitrogen®
<i>M. smegmatis</i>	ATCC 700084 mc <sup>2</sup> 155	Souche de laboratoire
<i>M. a. paratuberculosis</i>	Type C : ATCC BAA-968 – K10 ; Type S: 191	Souche de laboratoire
<i>M. intracellulare</i>	ATCC 13950	Souche de laboratoire
<b>Vecteurs</b>		
pCR-II TOPO	Origine de réplication <i>E. coli</i> , gène <i>Amp</i> <sup>R</sup> ou <i>Kan</i> <sup>R</sup> , origine fl, gène <i>lacZ</i> , origine pUC, T7 et SP6 promoteur	Invitrogen
p ET24a(+) ou 22b(+)	Origine de réplication <i>E. coli</i> , gène <i>Amp</i> <sup>R</sup> ou <i>Kan</i> <sup>R</sup> , origine fl, gène <i>lacI</i> , origine pBR332, T7 promoteur	Novagen
pRR3	Origine de réplication <i>E. coli</i> et mycobactérienne, gène <i>Amp</i> <sup>R</sup> et <i>Kan</i> <sup>R</sup>	Rane <i>et al.</i>
pSMT3	Origine de réplication mycobactérienne, gène <i>EGFP</i> , Hsp60 promoteur, gène <i>LuxAB</i> , 19kDa promoteur, gène <i>Hyg</i> <sup>R</sup>	Humphreys <i>et al.</i>
<b>Constructions</b>		
P-HBHA-S	pRR3 :: promoteur + <i>hbhA</i> <i>M. a. paratuberculosis</i> type S (Kan <sup>R</sup> )	Cette étude
P-HBHA-MAH	pRR3 :: promoteur + <i>hbhA</i> <i>M. a. hominissuis</i> 104 (Kan <sup>R</sup> )	Cette étude
P-HBHA-LN20	pRR3 :: promoteur + <i>hbhA</i> <i>M. a. paratuberculosis</i> LN20 (Kan <sup>R</sup> )	Cette étude
P-HBHA-C	pRR3 :: promoteur + <i>hbhA</i> <i>M. a. paratuberculosis</i> LN20 (Kan <sup>R</sup> )	Cette étude
HBHA-S	pET22b+ :: <i>hbhA</i> <i>M. a. paratuberculosis</i> type S (Amp <sup>R</sup> )	Cette étude
HBHA- $\Delta$ C	pET24a+ :: <i>hbhA</i> $\Delta$ C-terminal (1-157 aa) <i>M. a. paratuberculosis</i> type S – HisTag N-terminal – (Kan <sup>R</sup> )	Cette étude
HBHA-LN20	pET22b+ :: <i>hbhA</i> <i>M. a. paratuberculosis</i> LN20 (Amp <sup>R</sup> )	Cette étude
HBHA-BCG	pET24a+ :: <i>hbhA</i> BCG (Kan <sup>R</sup> )	Cette étude
HBHA-SMG	pET24a+ :: <i>hbhA</i> <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 (Kan <sup>R</sup> )	Biet <i>et al.</i>
HBHA-MAA	pET24a+ :: <i>hbhA</i> <i>M. a. avium</i> 25291 (Kan <sup>R</sup> )	Cette étude
HBHA-C	pET24a+ :: <i>hbhA</i> <i>M. a. paratuberculosis</i> 19698 (Kan <sup>R</sup> )	Cette étude
HBHA-MI	pET24a+ :: <i>hbhA</i> <i>M. intracellulare</i> 13950 (Kan <sup>R</sup> )	Cette étude
LBP-C	pET24a+ :: <i>lbp</i> <i>M. a. paratuberculosis</i> 19698 (Kan <sup>R</sup> )	Lefrançois <i>et al.</i>
LBP-S	pET24a+ :: <i>lbp</i> <i>M. a. paratuberculosis</i> type S (Kan <sup>R</sup> )	Cette étude
LBP-LN20	pET24a+ :: <i>lbp</i> <i>M. a. paratuberculosis</i> LN20 (Kan <sup>R</sup> )	Cette étude
Mi-GFP <sub>Lux</sub>	p SMT3 ::EGFP <sub>Lux</sub>	Cette étude
MAP-C-GFP <sub>Lux</sub>	p SMT3 :: EGFP <sub>Lux</sub>	Lefrançois <i>et al.</i>

Annexe 2 : Les 5 adhésines de *M. a. paratuberculosis*

	Fibronectin Attachement Protein (FAP)	Antigen 85 complex (Ag85 A, B & C)	Major Membrane Protein (MMP)	Laminin Binding Protein (LBP)	Heparin Binding HemAgglutinin (HBHA)
Sequence protéique	368	330-352	307	212	190*
Poids moléculaire apparent (kDa)	~ 50-60	—	~ 35	~ 31	~ 21
Poids moléculaire théorique (kDa)	36,116	36,085, 34,706, 37,768	33,671	21,936	20,772
Modifications post- traductionnelles	Glycosylations	ND	ND	Méthylations	Méthylations
Point isoélectrique (Pi)	4.540	6.263, 5.266, 7.478	4.705	12.483	7.051
Peptide signal	Oui	Oui	Non	Non	Non
Localisation membranaire	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Protéine sécrétée	Oui	—	—	—	—
Caractère spécifique	Riche en alanine Proline	—	—	Riche en alanine lysine	Riche en alanine lysine
N°accession	AAS03886	AF280067 AF219121 AF280068	AAS04438	NP_961958	AAS06518
Locus	MAP1569	MAP0216 MAP1609c MAP3531c	MAP2121c	MAP3024c	MAP3968
Annotation génome	<i>ModD</i>	<i>FbpA, Fbp, FbpC2</i>	—	<i>HupB</i>	—
Références	<sup>221-223</sup> Secott, 2001 ; 2002 ; 2004 ; <sup>138</sup> Li, 2005	<sup>127</sup> Kuo, 2011 ; <sup>138</sup> Li, 2005	<sup>16</sup> Banasure, 2001 ; <sup>17</sup> , <sup>18</sup> Bannantine, 2003 ; 2007 ; <sup>138</sup> Li, 2005	<sup>136</sup> Lefrancois, 2011 ; <sup>138</sup> Li, 2005	<sup>219</sup> Secchi, 2006 ; <sup>138</sup> Li, 2005
Synonyme chez les mycobactéries	Apa = Alanin and proline rich antigen ; 45/47kDa; mpt32	Ag 85A=p32; Ag 85B =MPB 59, Ag6, alpha Ag;	—	Hlp = Histone like protein; Mdp-1 = Mycobacterial DNA- binding protein; HupB; lbp21	—
Anticorps spécifiques disponibles	<sup>218</sup> Shorey, 1995 ; <sup>102</sup> Horn, 1996	<sup>196</sup> Rambukkana, 1992 ; <sup>290</sup> Wiker, 1990	<sup>18</sup> Bannantine, 2007 ; <sup>106</sup> Hunter, 1990	<sup>153</sup> Menozzi, 1998 ; <sup>207</sup> Rouse, 1991 ; <sup>63</sup> Marques, 2000	<sup>153</sup> Menozzi, 1998 ; <sup>207</sup> Rouse, 1991

\*190 ou 205 aa selon le type de *M. a. paratuberculosis* (Résultats – Article II)

ND : Non déterminé

## Annexe 3 : Communications scientifiques

 Congrès internationaux

**Heterogeneity of subspecies *Mycobacterium avium paratuberculosis*: From genotype to phenotype**

8<sup>th</sup> International Conference on the Pathogenesis of Mycobacterial Infections, Juillet 2011, Stockholm – Sweden

11<sup>th</sup> International Colloquium on Paratuberculosis, Février 2012, Sydney – Australia  
Young Researchers in Life Sciences, Mai 2012, Paris – France

 Congrès nationaux

**Characterization of the *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* laminin-binding protein (lbp) which reacts with sera from patients with crohn's disease.**

XVIII<sup>ème</sup> Congrès de la Société Française de Microbiologie, Juin 2010, Marseille – France => Communication orale

**Heparin binding hemagglutinin (HBHA) produced by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* revealed a double face: virulence factor and evolutionary marker.**

Journée des Microbiologistes de l'INRA, Mai 2010, Poitiers – France

Mycoclub1, Octobre 2010, Lille – France

**Heterogeneity of subspecies *Mycobacterium avium paratuberculosis*: From genotype to phenotype.**

Journée département Santé Animale, Mai 2011, Fréjus – France

Mycoclub2, Septembre 2011, Tours – France

**Profile d'expression d'adhésines chez *Mycobacterium intracellulare*.**

XII<sup>èmes</sup> Journées de Mycobactériologie de Langue Française, Octobre 2011, Reims – France

**Post-translational modifications of the HBHA of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* revealed by mass spectrometry**

Journées Françaises de spectrométrie de Masse, Septembre 2012, Orléans – France

---

## Annexe 4 : Liste des publications

✚ **L. H. Lefrancois**, C. Pujol, C. C. Bodier, H. Drobecq, D. Raze, F. D. Menozzi, J-P. Hugot, O. Chacon, R. Barletta, C. Locht, M. C. Vidal Pessolani and F. Biet. *Characterization of the Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis laminin-binding/histone-like protein (Lbp/Hlp) which reacts with sera from patients with Crohn's disease*. *Microbes and Infection* 13 (2011) 585-594. DOI information: 10.1016/j.micinf.2011.02.002

✚ F. Biet, I. A. Sevilla, T. Cochard, **L. H. Lefrancois**, J. M. Garrido, I. Heron, R. A. Juste, J. McLuckie, V. C. Thibault, P. Supply, D. M. Collins, M. A. Behr and K. Stevenson. *Inter- and Intra-subtype genotypic differences that differentiate Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis strains*. Revised by BMC Microbiology

✚ **L. H. Lefrancois**, C. C. Bodier, S. Lecher, F. B. Gilbert, T. Cochard, A. P. Texiera-Gomez, D. Raze, C. Locht and F. Biet. *Purification of native HBHA from Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: optimization of culture conditions and development of the FPLC purification on heparin Sepharose*. Submitted for BMC Research Notes

✚ **L. H. Lefrancois**, C. C. Bodier, T. Cochard, F. B. Gilbert, S. Lecher, D. Raze, P. Lanotte, E. Haguenoer, I. A. Sevilla, K. Stevenson, M. A. Behr, D. M. Collins, C. Locht and F. Biet. *A novel phenotypic features of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis highlighted by characterization of the adhesin HBHA*. In preparation for Journal of Bacteriology

✚ **L. H. Lefrancois**, M. C. Vidal Pessolani and F. Biet. *Mycobacterial adhesins : adherence properties*. In preparation



## Louise LEFRANÇOIS

Etude des adhésines HBHA et LBP impliquées dans l'interaction de *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* avec les cellules épithéliales intestinales, cibles privilégiées de la bactérie *in vivo*



### Résumé

---

*Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (Map), agent étiologique de la paratuberculose, a évolué en deux types dénommés, S pour « Sheep » et C pour « Cattle ». L'intestin grêle est le site primaire de l'infection à Map mais les mécanismes moléculaires impliqués dans l'implantation du bacille restent largement méconnus. L'objectif de mon projet de thèse visait à identifier et caractériser les adhésines exprimées par Map par des approches génétiques et biochimiques. J'ai ainsi purifié la HBHA et la LBP par chromatographie d'affinité puis les ai identifiés en spectrométrie de masse. L'originalité de ce travail repose sur le polymorphisme de ces adhésines observé entre les souches de type C et S. Cette variabilité a été mise en évidence sur le domaine d'interaction avec les sucres sulfatés de la cellule hôte influençant l'affinité des adhésines pour l'héparine. Ce travail de thèse a permis de caractériser pour la première fois ces deux adhésines produites par Map. Le polymorphisme de la HBHA et de la LBP, discriminant les types C et S, ouvre de nombreuses perspectives sur l'évolution de l'espèce *M. avium* et le rôle de ces adhésines sur le tropisme intestinal, la préférence d'hôte de Map ou encore leur potentiel diagnostique.

Mots clés : paratuberculose, *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*, adhésines, Heparin Binding HemAgglutinin (HBHA), Laminin Binding Protein (LBP), polymorphisme.

### Summary

---

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), the etiological agent of paratuberculosis, has evolved into two types called, S for "Sheep" and C for "Cattle." The small intestine is the primary site of Map infection but the molecular mechanisms involved in the establishment of bacilli are still unknown. The aim of my thesis was to identify and characterize the adhesins expressed by Map by genetic and biochemical approaches. I purified HBHA and LBP by affinity chromatography then identified them by mass spectrometry. The originality of this work is based on the polymorphism of these adhesins observed between strains of type C and S. This variability has been demonstrated in the binding domain involved in interaction with sulfated sugars of host cell influences adhesins affinity for heparin. This thesis has characterized for the first time these two adhesins produced by Map. Specific polymorphism highlighted related to the evolution of the species *avium*, opens large number questions on their role on the pathogenesis of Map including the cellular tropism, host preference or interest of these antigens to improve diagnostic.

Key words : paratuberculosis, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, adhesins, Heparin Binding HemAgglutinin (HBHA), Laminin Binding Protein (LBP), polymorphism.



