

DÉVELOPPEMENT DE STRATÉGIES ET D'OUTILS
ANALYTIQUES NOVATEURS POUR LA DÉTECTION DE
VACHES ATTEINTES DE PARATUBERCULOSE

par

David Fock-Chow-Tho

Mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, 15 décembre 2016

Le 15 décembre 2016

Le jury a accepté le mémoire de Monsieur David Fock-Chow-Tho dans sa version finale.

Membres du jury

Professeure Nathalie Bissonnette
Directrice de recherche
Professeure associée au Département de biologie
Chercheur Scientifique d'Agriculture et Agroalimentaire Canada

Professeur Viktor Steimle
Codirecteur de recherche
Département de biologie

Professeur Nicolas Gevry
Évaluateur interne
Département de biologie

Professeur Richard Blouin
Président-rapporteur
Département de biologie

SOMMAIRE

La paratuberculose bovine est une maladie causée par la mycobactérie *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Elle est responsable d'énormes pertes économiques dans le monde. En effet, cette maladie provoque la diminution de la production laitière chez les vaches ainsi qu'un état de fatigue général en raison d'une entérite chronique chez les sujets atteints. Des indices mettent également en évidence le potentiel zoonotique de MAP et malheureusement aucun traitement n'est connu à ce jour. Ainsi, les stratégies actuelles pour contrer la maladie dans les troupeaux reposent plutôt sur des actions préventives. Actuellement, le diagnostic de la paratuberculose reste difficile et la prévalence de la maladie est probablement sous-estimée dans les troupeaux en raison de la faible sensibilité des tests diagnostiques.

Dans l'optique de développer une nouvelle méthode diagnostique pour la paratuberculose, ce projet de recherche s'est établi en deux étapes : la mise en place d'un système de diagnostic robuste des animaux par les méthodes de dépistage traditionnelles, incluant une étude comparative de l'efficacité de trousse commerciales, et finalement l'étude de la prolifération cellulaire spécifique des lymphocytes comme d'une épreuve diagnostique pour la maladie. Ainsi, la comparaison des trousse commerciales a démontré un écart d'efficacité qui a permis d'établir de nouvelles recommandations pour l'analyse des animaux ainsi que l'amélioration du diagnostic de la paratuberculose dans les troupeaux. Concernant le développement d'une méthode de diagnostic basée sur la prolifération lymphocytaire, de nombreuses difficultés techniques ont entravé le bon déroulement du projet mais ces travaux montrent la possibilité de caractériser de manière plus complète les différents types lymphocytaires par cytométrie de flux chez le bovin laitier.

Mots-clés : paratuberculose bovine, lymphocytes, prolifération, diagnostic

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier le Dre Nathalie Bissonnette pour l'opportunité qu'elle m'a offert de travailler au sein de son équipe, ainsi que de m'avoir empêché de succomber à mon premier vrai hiver.

Bien entendu, je remercie également ma conjointe Laura Segondy pour son support inconditionnel et sa patience remarquable à mon égard.

Il en va de même pour ma famille que j'ai laissée loin derrière moi et sans qui aucune aventure ne se serait jamais commencée.

Clin d'œil à Olivier Ariel qui fut mon guide culturel ainsi que mon complice au cours de ces dernières années et qui restera, je l'espère, un bon ami.

Idem à Jean-Simon Brouard, arrivé un peu tard, mais qui m'a rappelé comment je faisais et devais faire les choses.

Je suis reconnaissant aux membres de mon comité de conseillers d'avoir accepté de m'encadrer, merci.

Et finalement, j'envoie mes pensées à tous les autres qui ont été là au cours de ces 3 ans, humains ou animaux, autant pour le meilleur que pour le pire.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iv
REMERCIEMENTS	v
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES	xi
CHAPITRE 1. INTRODUCTION	1
1.1. MYCOBACTERIUM AVIUM de la sous-espèce (subsp.) PARATUBERCULOSIS ...	1
1.1.1. Classification de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	1
1.1.2. Caractéristiques de MAP	2
1.1.3. Culture de MAP	5
1.1.4. Pathogénicité et risque pour la population humaine	6
1.1.5. MAP dans l'environnement	8
1.2. LE SYSTÈME IMMUNITAIRE ET MAP	9
1.2.1. Le système immunitaire inné	10
1.2.2. Le système immunitaire adaptatif	11
1.3. LA PARATUBERCULOSE BOVINE	14
1.3.1. Histoire de la maladie	14
1.3.2. Pathogénèse	15
1.3.3. Les différentes phases de la maladie	18

1.3.4. Transmission de la maladie	20
1.3.5. Traitement de la paratuberculose bovine	22
1.3.6. Diagnostic de la maladie	22
1.4. OBJECTIFS	25
CHAPITRE 2. COMPARISON OF COMMERCIAL DNA EXTRACTION KITS AND QUANTITATIVE PCR SYSTEMS FOR BETTER SENSITIVITY IN DETECTING THE CAUSATIVE AGENT OF PARATUBERCULOSIS IN DAIRY COW FECAL SAMPLES	28
2.1. ABSTRACT.....	32
2.2. INTRODUCTION	34
2.3. MATERIALS AND METHODS.....	36
2.3.1. Sampling.....	36
2.3.2. Diagnosis.....	36
2.3.3. DNA Extraction.....	37
2.3.4. qPCR Analysis	38
2.3.5. Detection Limit	38
2.3.6. Ethics Statements	40
2.3.7. Statistical Analysis	40
2.4. RESULTS	41
2.4.1. Sensitivity of MAP Detection in Spiked Feces.....	41
2.4.2. Sensitivity of the Extraction Kits in Natural MAP Shedders.....	43
2.4.3. Range of PCR Sensitivity Analysis.....	44
2.4.4. Comparison of DNA Extraction Kits in Commercial Herds.....	46
2.5. DISCUSSION	48

2.6. ACKNOWLEDGMENTS	55
2.7. REFERENCES	56
CHAPITRE 3. UTILISATION DE LA PROLIFÉRATION LYMPHOCYTAIRE COMME D'UNE ÉPREUVE DIAGNOSTIQUE POUR LA PARATUBERCULOSE BOVINE	62
3.1. INTRODUCTION DU CONTEXTE	62
3.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	64
3.2.1. Isolement des cellules.....	64
3.2.2. Mesure de la prolifération cellulaire	65
3.2.3. Culture de MAP	66
3.2.4. Stimulation des cellules.....	66
3.2.5. Immunomarquage des lymphocytes.....	67
3.3. RÉSULTATS.....	68
3.3.1. Synergie potentielle entre la conA et MAP.....	68
3.3.2. Caractérisation des populations cellulaires	71
3.3.3. Reprise des essais d'observation de la synergie conA/MAP	74
CHAPITRE 4. DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES	79
ANNEXES	86
BIBLIOGRAPHIE	90

LISTE DES ABRÉVIATIONS

µg	Microgrammes
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
BLV	<i>Bovine Leukemia Virus</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
Cellules M	<i>Microfold cells</i>
CFSE	<i>Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester</i>
conA	Concanavaline A
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Associated protein 4</i>
Ctrl	Contrôle
EDTA	Acide Éthylène-Diamine-Tétraacétique
g	Constante de gravité
GAD65	<i>Glutamic Acid Decarboxylase 65</i>
Hsp65	<i>Heat shock protein 65</i>
IFN	Interféron
IL (1β, 2, 4, 10, 12)	Interleukine
LSP	Larges sequences de polymorphismes
MAC	<i>Mycobacterium Avium Complex</i>
MAP	<i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i>
MGIT	<i>Mycobacteria Growth Indicator Tube</i>
MHC	Complexe majeur d'histocompatibilité
MIP-2	<i>Macrophage Inflammatory Protein 2</i>
MIRU	<i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Units</i>
mL	Millilitre

MOI	Multiplicité d'infection
MR	Récepteur du mannose
NOD2	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2</i>
PBMC	Cellules mononucléées du sang périphérique
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PE_PGRS	<i>Prolin-glutamic acid with polymorphic sequences</i>
PPDJ	Protéines purifiées dérivées de Johnin
qPCR	Réaction en chaîne par polymérase quantitative
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
Subsp.	Sous-espèce
TCR	Récepteur des cellules T
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TP	Température Pièce
VNTR	<i>Variable Number Tandem Repeat</i>
WC1	<i>Workshop Cluster-1</i>
ZAP-70	<i>Zeta-chain-Associated Protein of 70 kDa</i>

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Cibles courantes des amorces de PCR pour la détection de MAP.....	25
Table 2.	Comparison of the three DNA extractions kits evaluated by quantitative PCR (qPCR) in feces artificially spiked with <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (MAP).....	42
Table 3.	Evaluation of paratuberculosis diagnosis by quantitative PCR in commercial herds using different DNA extraction methods.....	47
Table 4.	Theoretical sensitivity of the extraction techniques.	49
Table S1.	Comparison of DNA extraction kits for quantity of sample used, average DNA yield, average estimated DNA concentration obtained, and average estimated DNA purity.	51
Tableau 5.	Liste des anticorps primaires utilisés pour la caractérisation des populations cellulaires.....	68

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Représentation schématique de l'infection des macrophages par MAP une fois entrée au niveau de la muqueuse intestinale.....	17
Figure 2.	Schématisation de la transmission de MAP dans les troupeaux bovins.	21
Figure 3.	Représentation de l'effet iceberg de la maladie de Johne.....	26
Figure 4.	Detection of <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> (MAP) by quantitative PCR (qPCR) in feces extracted with different commercial kits from cows grouped according to their shedding level.....	44
Figure 5.	Detection of different strains of <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> (MAP) by quantitative PCR (qPCR).....	45
Figure S1.	Integrity of DNA extracted with different commercial kits	52
Figure 6.	Réponse lymphoproliférative des PBMCs avec ou sans stimulation.....	70
Figure 7.	Caractérisation des populations lymphocytaires chez les vaches saines et infectées.....	72
Figure 8.	Réponse lymphoproliférative des PBMCs avec ou sans stimulation de vaches atteintes de paratuberculose.	74
Figure 9.	Essai de prolifération de PBMCs provenant de vaches atteintes de la paratuberculose dans différentes conditions de stimulation.....	76
Figure 10.	Réponse lymphoproliférative de PBMCs avec ou sans stimulation de vaches atteintes de paratuberculose par différentes souches de MAP + conA.....	78

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1. MYCOBACTERIUM AVIUM de la sous-espèce (subsp.) PARATUBERCULOSIS

1.1.1. Classification de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Aussi connue sous le nom de bacille de Johne, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) est une bactérie Gram positive faisant partie du *phylum* Actinobacteria, de la famille des *Mycobacteriaceae* et du genre *Mycobacterium*. La famille des mycobactéries est connue pour avoir parmi ses membres des responsables de maladies infectieuses mortelles. Elle comporte notamment *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium leprae*, causant respectivement la tuberculose et la lèpre. À l'intérieur de cette famille, MAP est classée dans le complexe *Mycobacterium avium* (MAC), qui regroupe différents pathogènes faisant partie des espèces *Mycobacterium avium* et *Mycobacterium intracellulare*. On y retrouve donc des bactéries telles que *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* ou encore *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*. A l'époque où les bactéries étaient classifiées uniquement en fonction de leurs caractères phénotypiques, *Mycobacterium paratuberculosis* était considérée différente et indépendante des autres espèces. Ce n'est qu'à partir des années 1990 que les travaux de Marie Thorel et son équipe ont suggéré que *Mycobacterium paratuberculosis* était une sous-espèce de *Mycobacterium avium* (Thorel *et al.*, 1990). Dès lors, MAP fut rebaptisée *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Il semblerait même que MAP et d'autres mycobactéries, telles que *Mycobacterium avium* subsp. *avium* ou *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*, auraient un ancêtre commun en *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (Turenne *et al.*, 2008). Cette dernière est donc présumée être à l'origine de la plupart des espèces du MAC.

En ce qui concerne MAP, il est intéressant de noter que cette espèce peut être différenciée des autres membres du MAC de par son nombre d'unités mycobactériennes répétées (MIRU)

insérées dans son génome (Bull *et al.*, 2003b). La souche K-10 est considérée de nos jours comme la souche de référence pour MAP depuis que son génome complet fut séquencé et annoté (Li *et al.*, 2005). Plusieurs souches de MAP existent à ce jour et celles-ci prennent généralement leur nom en provenance de l'animal duquel elles furent isolées. Il n'est pas rare également de voir des souches désignées par les lettres « C » ou « S », pour « cattle » (vache) ou « sheep » (mouton), qui indiquent l'espèce sur laquelle la souche a été isolée. Toutefois, cette désignation n'est pas réellement un bon indicateur de l'espèce de provenance de la souche à l'origine. En effet il a été montré qu'une souche bovine, par exemple, est capable d'infecter des cervidés ou d'autres espèces (Fernandez *et al.*, 2014; O'Brien *et al.*, 2006) et à l'inverse, on retrouve la souche de type « bison » chez des vaches laitières diagnostiquées à la paratuberculose bovine (Sohal *et al.*, 2014). Ainsi, il est difficile de retracer la provenance exacte d'une souche de MAP juste en se basant sur l'espèce de l'animal sur lequel la souche a été isolée. Le génotypage à l'aide de marqueurs discriminant les séquences d'insertion (IS) ainsi que le séquençage du génome permettent alors de bien caractériser les souches (Ahlstrom *et al.*, 2016; Sohal *et al.*, 2014).

1.1.2. Caractéristiques de MAP

Faisant partie de la famille des mycobactéries, MAP possède toutes leurs particularités qui la distinguent des autres types de bactéries communément étudiées, tout en ayant ses particularités propres. MAP est un pathogène obligatoire qui se présente sous la forme de bacilles de 0.5 à 2µm avec une tendance à former des amas (Rowe and Grant, 2006). Cette tendance est possiblement conférée par des protéines de surface de façon similaire au rôle qu'occupe PE_PGRS chez *M. tuberculosis* (Brennan *et al.*, 2001). Un élément très caractéristique de ce type de bactéries serait leur enveloppe particulière qui leur confère également des propriétés complexes. En effet, l'épaisse enveloppe cireuse des mycobactéries est composée en grande partie d'acides gras et de lipides, et ce à des proportions beaucoup plus grandes que celles retrouvées dans la paroi cellulaire des autres familles bactériennes. Alors que la plupart des eubactéries possèdent des parois comportant de 1 à 2% de lipides, les

mycobactéries en comportent plus de 60% (Rowe and Grant, 2006). Cette enveloppe cellulaire rigide et riche en lipides qu'elles synthétisent leur confère de nombreuses caractéristiques uniques telles que la résistance aux antibiotiques. Elle est composée d'un noyau peptidoglycan, plus particulièrement de l'arabinogalactane, enrobé par une bicouche lipidique. Cette bicouche lipidique est constituée d'acides mycoliques fixant l'arabinogalactane et des glycolipides de manière covalente. On retrouve 3 à 4% de glycopeptidolipides dans la paroi de bon nombre de mycobactéries non tuberculeuses, y compris celles composant le complexe *Mycobacterium avium* (Pang *et al.*, 2013). Toutefois, malgré son appartenance au MAC, MAP y fait exception. En effet, selon une étude publiée sur ce sujet, MAP, au contraire des autres mycobactéries, ne posséderait pas de glycopeptidolipide (Eckstein *et al.*, 2006). Toutefois, les auteurs ont révélé chez *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* la présence d'un lipopeptide inexistant chez les autres membres de la famille des *Mycobacteriaceae*. Ce composé, alors désigné comme étant du « C20 fatty acyl-D-Phe-N-Me-L-Val-L-Ile-L-Phe-L-Ala methyl ester », fut alors baptisé « Para-LP-01 » et est connu aujourd'hui comme le lipopentapeptide spécifique à MAP. Depuis sa découverte, différentes études ont démontré l'importance de ce lipopeptide singulier. En effet, le Para-LP-01 synthétique est capable d'induire une réponse humorale chez des vaches (Biet *et al.*, 2008) ou des moutons (Eckstein *et al.*, 2006) atteints de paratuberculose et peut discriminer les moutons infectés des moutons sains (Thirunavukkarasu *et al.*, 2013). Cependant, pour une raison encore inconnue, une stimulation avec l'antigène synthétique ne révèle pas de réponse immunitaire cellulaire, ni au niveau de la production de cytokines telles que l'interféron gamma ou interleukine 10 (Holbert *et al.*, 2015), ni au niveau de la prolifération cellulaire.

En modulant leur composition externe de phosphoglycolipides, les mycobactéries s'adaptent à différentes circonstances ou milieux pour ainsi modifier leur phénotype, incluant la morphologie des colonies sur gélose, l'hydrophobicité, l'agrégation, la motilité « sliding motility » et la formation de biofilm (Besra and Brennan, 1997; Besra *et al.*, 1997; Brennan and Besra, 1997; Maiti *et al.*, 2001). Grâce à ces différents éléments, les mycobactéries sont capables d'avoir un large champ d'action immunomodulateur chez leur hôte en commençant

par leur capacité à échapper aux activités phagolytiques du macrophage hôte (à l'intérieur ou non du phagolysosome). Un des mécanismes d'action de *Mycobacterium tuberculosis* par exemple, le responsable de la tuberculose et proche parent de MAP, consiste à utiliser le lipoarabinomannan pour bloquer l'activation des macrophages de son hôte et diminuer leur présentation antigénique (Adams *et al.*, 1993; Moreno *et al.*, 1988; Roach *et al.*, 1993).

Il est intéressant de noter également que la constitution particulière de l'enveloppe des mycobactéries est aussi responsable de leur caractère « acido-alcool-résistant », c'est-à-dire qu'après coloration, les bacilles des mycobactéries ne se décolorent ni sous l'effet d'acides, ni sous l'effet de l'alcool. L'enveloppe de MAP est également responsable de sa grande résistance naturelle à la plupart des antibiotiques communs. Des études *in vitro* ont montré néanmoins la susceptibilité d'un certain nombre de souches de MAP, notamment aux macrolides (Krishnan *et al.*, 2009) et à des dérivés du gallium (Fecteau *et al.*, 2014; Fecteau and Whitlock, 2011) et du naphthalène (Gonec *et al.*, 2014; Gonec *et al.*, 2015). Toutefois, le développement de résistance envers les macrolides survient très rapidement chez les bactéries (Doucet-Populaire *et al.*, 2002; Gillespie, 2002) et ainsi, il devient difficile de trouver une efficacité réelle des antibiotiques contre MAP. La recherche d'antibiotique contre MAP se poursuit mais les avancées sont encore minces.

Il est possible de distinguer MAP des autres bactéries grâce au typage moléculaire. La méthode de séquençage du génome entier s'est avérée très utile pour l'exploration phylogénomique des relations entre les souches de MAP (Ahlstrom *et al.*, 2016; Bryant *et al.*, 2016). Bien que l'approche soit moins discriminante, la technique de la « réaction en chaîne par polymérase » (PCR) basée sur la présence spécifique de certains éléments génétiques présents dans le génome bactérien peut servir à détecter MAP et même différencier ses souches. La discrimination de la mycobactérie et de sa provenance est possible à partir de la détection de la présence d'éléments d'insertion (Shin *et al.*, 2010), de polymorphismes associés à de grands fragments (LSP) (Alexander *et al.*, 2009a; Alexander *et al.*, 2009b; Biet *et al.*, 2012; Semret *et al.*, 2006; Sohal *et al.*, 2009), de répétitions en tandem de nombres

variables (VNTR) (Ahlstrom *et al.*, 2015; Castellanos *et al.*, 2010; Overduin *et al.*, 2004), d'unités de répétitions intercalées de type mycobactériales (MIRU) (Castellanos *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2007; van Hulzen *et al.*, 2011), de l'analyse de polymorphismes basés sur la longueur de fragments générés par des enzymes de restrictions (RFLP) (Mobius *et al.*, 2008; Whittington *et al.*, 2000) ou encore d'une combinaison de ces diverses approches (Douarre *et al.*, 2011; Mobius *et al.*, 2008; Okuni *et al.*, 2012).

1.1.3. Culture de MAP

Une autre grande caractéristique de MAP réside en son temps de croissance. Les séquences d'ARN 16S des mycobactéries sont très similaires, toutefois en se basant sur celles-ci, on peut séparer taxonomiquement ces bactéries en deux groupes : celles à croissance rapide et celles à croissance lente. Parmi les mycobactéries ayant de longs temps de réplication, on dénote les espèces *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. bovis* et *M. avium*. Étant considérée comme une sous-espèce de *Mycobacterium avium*, MAP ne fait donc pas exception à la règle et se caractérise également par sa très longue durée de croissance (Grant *et al.*, 2003). En effet, avec son temps de division de 24 heures, il faut compter environ 6 à 10 semaines pour obtenir une croissance dense en culture.

Les mycobactéries sont capables de produire des sidérophores pour se subvenir en fer depuis leur environnement. En effet, le fer est un élément essentiel au bon fonctionnement du métabolisme des êtres vivants et il en va donc de même pour les bactéries. Parmi les différents mécanismes connus pour en absorber, il y a notamment chez les mycobactéries la production de mycobactine, leur sidérophore majeur (De Voss *et al.*, 1999; Fang *et al.*, 2015; He and Xie, 2011). Une fois de plus, MAP se démarque de la plupart des mycobactéries dans le sens où elle n'est pas capable d'en produire elle-même (Lambrecht and Collins, 1992; Merkal and Curran, 1974). Il a tout de même été démontré chez une souche adaptée à la culture sur du milieu synthétique spécifique la production d'une forme de mycobactine, baptisée la mycobactine J (Merkal and McCullough, 1982). Aujourd'hui, il est devenu pratique courante

de compléter les milieux de cultures de MAP avec de petites concentrations de mycobactine J, qui est un élément limitant de sa vitesse de croissance mais qui peut avoir à l'inverse un effet inhibiteur sur celle-ci en excès (Damato and Collins, 1990; Whittington *et al.*, 2011).

1.1.4. Pathogénicité et risque pour la population humaine

MAP est responsable de la paratuberculose chez les animaux, essentiellement des ruminants. En outre, cette maladie entéro-gastrique entraîne l'apparition des mêmes symptômes que la maladie de Crohn chez l'humain. De cette observation, des hypothèses sont nées sur l'éventuelle responsabilité de MAP dans la maladie de Crohn, et donc son potentiel zoonotique (Crohn *et al.*, 1952; Dalziel, 1989; Liverani *et al.*, 2014). L'idée de considérer MAP comme une menace à potentiel infectieux pour l'homme s'est renforcée dans les années 1980 après avoir démontré que la mycobactérie pouvait être isolée auprès de patients atteints de la maladie de Crohn (Chiodini *et al.*, 1984). Les souches isolées chez les humains sont même capables d'induire la paratuberculose à leur tour chez le bovin (Allen *et al.*, 2011). Depuis, de nombreuses études ont confirmé la présence de MAP chez l'humain, soit en cultivant la bactérie depuis le sang ou le lait maternel de patients, soit par PCR, ou encore grâce à la détection d'anticorps spécifiques (Kirkwood *et al.*, 2009; Naser *et al.*, 2004; Naser *et al.*, 2000; Verdier *et al.*, 2013). Cependant, les avis sont partagés quant à l'implication de MAP dans la maladie de Crohn. En effet, plusieurs équipes ont décelé la présence de MAP auprès de patients malades mais également de patients en bonne santé (Bull *et al.*, 2003a; Tuci *et al.*, 2011), remettant en doute le lien de causalité entre la présence de la bactérie et la maladie. Il a alors été proposé que la susceptibilité génétique soit en cause. Des mutations dans certains gènes, notamment *NOD2*, seraient retrouvées autant chez le bovin (Pinedo *et al.*, 2009; Ruiz-Larranaga *et al.*, 2010) que chez des patients atteints de la maladie de Crohn (Wang *et al.*, 2010). Le produit du gène *NOD2* est un senseur intracellulaire capable de reconnaître MAP (Ferwerda *et al.*, 2007). Il est donc possible que MAP soit réellement l'agent

causal de la maladie de Crohn, mais dans certaines conditions qui faciliteraient son mécanisme d'infection.

Certaines études recherchent également l'implication de MAP dans d'autres maladies, métaboliques ou neurologiques, telles que le diabète, l'asthme, la sclérose multiple ou la maladie de Parkinson (Cossu *et al.*, 2014; Dow, 2014; Kuenstner *et al.*, 2015; Sechi *et al.*, 2008a). Toutefois, à l'instar de la maladie de Crohn, le rôle discuté de MAP dans ces autres maladies serait plutôt indirect. En effet, bien que la présence de MAP ait été décelée chez des patients atteints de diabète de type 1, il a été théorisé que la mycobactérie ne sert qu'à amorcer la survenue de la maladie par le biais d'une de ses alarmines, Hsp65, qui serait similaire à l'acide glutamique pancréatique décarboxylase, GAD 65 (Naser *et al.*, 2013; Rani *et al.*, 2010; Sechi *et al.*, 2008b). Il est intéressant toutefois de savoir que MAP n'aurait aucun rôle à jouer dans la survenue du diabète de type 2, qui a plutôt des origines environnementales et comportementales (Rosu *et al.*, 2008). Concernant la maladie de Parkinson, les hypothèses sont semblables à celles qui relient le diabète et MAP, à savoir l'existence de protéines de MAP qui auraient une réactivité croisée. Toutefois, cela reste à vérifier et à ce jour, seule la présence de MAP chez des patients atteints de la maladie de Parkinson a été démontrée (Arru *et al.*, 2016).

Finalement, la problématique concernant le potentiel zoonotique du MAP est toujours d'actualité. Les différentes études et hypothèses sur le sujet sont rapportées dans une récente revue de littérature (Waddell *et al.*, 2015) qui met en évidence une association épidémiologique entre MAP et ces maladies. De plus, cette association suggérée serait appuyée par l'avis de spécialistes qui, lors d'une enquête sur ce sujet, ont indiqué majoritairement (93%) que MAP représentait probablement un risque pour la santé humaine (Waddell *et al.*, 2016).

1.1.5. MAP dans l'environnement

MAP se reproduit exclusivement à l'intérieur de ses hôtes et se retrouve excrétée dans leurs fèces. Ainsi, il est possible de retrouver la mycobactérie dans des pâturages ou différents types de sol. Il est possible dans ce milieu que MAP survive principalement en infectant les amibes présentes et en les utilisant comme niches en attendant d'infecter d'autres animaux (Salgado *et al.*, 2015). Ce n'est toutefois pas son seul moyen de survie, car il a été démontré que MAP est capable de se mettre en état de dormance ou de produire un biofilm qui lui permet de survivre dans différents milieux (Cook *et al.*, 2010; Johansen *et al.*, 2009; Whittington *et al.*, 2004). Par ce mécanisme de préservation, MAP peut être répandu dans l'environnement en se déplaçant grâce aux cours d'eau tels que des rivières (Paratuberculosis, 2016). L'exposition de l'homme face à ce pathogène en est donc facilitée et c'est d'ailleurs une problématique mondiale. En effet, dans certains pays et notamment au Royaume-Uni, la détection de MAP dans les aérosols proches des rivières a été confirmée mais également dans les robinets ou pommeaux de douches des habitations (Pickup *et al.*, 2005; Rhodes *et al.*, 2014). De façon plus générale, MAP a été retrouvée dans de l'eau courante potable sous forme de biofilm. Cette observation implique donc que cette mycobactérie est capable de résister au traitement des eaux, tel qu'un traitement au chlore, et cette hypothèse a d'ores et déjà été confirmée par différentes études (Simoes *et al.*, 2006; Whan *et al.*, 2001; Whittington *et al.*, 2005).

Outre la possibilité de déceler la présence de MAP dans des environnements usuels, il faut noter que MAP peut être disséminée également dans du matériel biologique. Des études ont montré qu'il était possible d'isoler et de remettre en culture des souches de cette mycobactérie à partir de viande d'origine animale ou à partir de lait (Girardi, 2006; Savi *et al.*, 2015). Ces observations ont mené à l'étude de l'effet de la pasteurisation ou de la cuisson sur la viabilité de MAP (Carvalho *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2002; Hammer *et al.*, 2013) mais même si ces études sont pour la plupart encourageantes, la survie de MAP à la pasteurisation dans le lait a déjà été reportée et sa présence décelée dans du fromage (Galiero *et al.*, 2016). Les animaux sauvages sont également touchés par la paratuberculose et pourraient participer à la

dissémination de MAP. Une étude réalisée sur l'identification des souches de MAP sur 33 espèces de ruminants aux États-Unis, incluant des animaux domestiques et sauvages, a démontré chez ces animaux une répartition de seulement 8 sous-catégories de MAP (Motiwala *et al.*, 2004). Cela suggère donc très fortement une transmission entre la faune sauvage et la faune domestique et les animaux sauvages seraient donc possiblement des vecteurs de la maladie. Ainsi, les réservoirs potentiels de MAP sont très diversifiés, d'où l'importance des études visant à déterminer la pathogénicité de la mycobactérie pour l'homme ainsi que la mise en place de mesures pour la prévention de la transmission de la paratuberculose chez les animaux d'élevage. Il est donc possible de retrouver MAP dans une grande diversité de milieux.

1.2. LE SYSTÈME IMMUNITAIRE ET MAP

Lors d'une infection à un pathogène quelconque, la défense d'un individu est établie via son système immunitaire. Le système immunitaire est composé de différents types de cellules qui vont réagir suite à la rencontre du dit pathogène en produisant de l'inflammation tout en la régulant. Les cellules de l'immunité peuvent être considérées comme professionnelles, c'est-à-dire qu'elles sont programmées uniquement pour la défense de l'organisme, ou bien non professionnelles, mais qui ont quand même un rôle à jouer, même indirectement dans la protection face à un pathogène.

Les différents types cellulaires qui servent à la protection d'un individu peuvent être regroupés en deux catégories : les cellules du système immunitaire inné ou alors les cellules du système immunitaire adaptatif. Ces catégories de cellules ont le même objectif, à savoir l'élimination des pathogènes. Leur temps de réponse, d'activation et leurs mécanismes d'action sont très différents mais les deux systèmes travaillent en synergie.

Les infections d'animaux par MAP n'échappent pas à la règle et impliquent également le système immunitaire. Ainsi, il est important d'étudier le comportement des cellules de

l'immunité afin de mieux comprendre les mécanismes de MAP et ainsi mettre en place des stratégies diagnostiques, préventives ou mêmes thérapeutiques.

1.2.1. Le système immunitaire inné

Le système immunitaire inné regroupe les cellules et systèmes qui forment la première ligne de défense d'un organisme. Ces cellules ont la capacité de reconnaître les éléments du « non-soi » afin de les éliminer ou de les présenter aux cellules du système adaptatif pour mettre en place une immunité humorale. Ces cellules sont diverses et regroupent les granulocytes, les éosinophiles, les neutrophiles, ainsi que les cellules dendritiques, les monocytes et les macrophages. Les macrophages en particulier sont concernés dans la pathogénèse de la paratuberculose. En effet, ce sont les cellules hôtes favorisées par MAP (Momotani *et al.*, 1988; Zurbrick and Czuprynski, 1987). Les macrophages sont des cellules comportant différents récepteurs à motifs sur leur surface. Ces motifs sont souvent des séquences d'acides aminés caractéristiques de sucres ou lipides ou peuvent être des brins d'ARN ou ADN de pathogènes. Grâce à ces récepteurs, les macrophages peuvent reconnaître un corps étranger et alors procéder à leur phagocytose. Les pathogènes ingérés sont internalisés et contenus dans un compartiment appelé le phagosome, qui fusionne ensuite avec les lysosomes pour acidifier son contenu et éliminer les pathogènes grâce à différentes enzymes. Dans le cas d'une infection à MAP, il est intéressant de constater que MAP est reconnue par des récepteurs généralement impliqués dans la reconnaissance de pathogènes très distincts tels que des virus, des bactéries extracellulaires ou des bactéries intracellulaires. En effet, différentes études ont montré que malgré leurs différences, les différents récepteurs TLR (Toll-Like-receptor), à savoir TLR1, TLR2, TLR4, TLR9, ou d'autres récepteurs tels que le récepteur à mannose (MR), sont capables de lier différentes parties de MAP et d'influencer son devenir dans les cellules (Arsenault *et al.*, 2014; Bhide *et al.*, 2009). Grâce à son utilisation des récepteurs de surface des macrophages, y compris les différents récepteurs du système du complément (Schlesinger, 1998), MAP est alors capable de moduler le niveau d'inflammation de son milieu ou le niveau d'apoptose. La mycobactérie est aussi capable d'échapper à son élimination en bloquant la maturation du phagolysosome (Kabara and Coussens, 2012;

Rumsey *et al.*, 2006) et d'inhiber l'action des macrophages en évitant d'être présenté via les molécules du MHC (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe II afin de déjouer la surveillance du système immunitaire. Cela se fait probablement grâce aux lipides particuliers qui forment sa membrane (Souza *et al.*, 2013; Weiss *et al.*, 2008). Ainsi, le blocage du système immunitaire inné représente une part importante dans la stratégie de MAP pour survivre chez son hôte.

1.2.2. Le système immunitaire adaptatif

Le système immunitaire adaptatif fonctionne différemment que le système immunitaire inné mais avec le même objectif : mettre en place une défense contre les pathogènes. Alors que les cellules de l'immunité innée sont capables d'intercepter n'importe quel pathogène après reconnaissance de leurs motifs, les cellules de l'immunité adaptative sont à la base programmées pour répondre à la rencontre d'un pathogène en particulier. Ces cellules sont appelées les lymphocytes et elles sont généralement regroupées en 2 grandes familles, les lymphocytes T et les lymphocytes B. La prolifération des lymphocytes est un phénomène caractéristique de ces cellules en réponse à une stimulation antigénique. Après stimulation, les cellules présentatrices d'antigènes vont reconnaître le dit antigène, l'ingérer et vont entrer dans une cascade de mécanismes qui vont servir à mettre en place des moyens de suppression de l'éventuelle menace. Un de ces mécanismes consiste justement à présenter l'antigène aux lymphocytes via les molécules du MHC. Il va alors se développer une synapse immunologique à la surface des lymphocytes (Norcross, 1984). Originellement décrite dans le mécanisme d'activation des lymphocytes T, la synapse immunologique sert également à l'activation des lymphocytes B (Kupfer *et al.*, 1994; Tolar and Spillane, 2014; Yuseff *et al.*, 2013). La formation de la synapse immunologique se fait grâce à des déformations des filaments d'actine qui composent le cytosquelette (Kumari *et al.*, 2014; Le Floc'h and Huse, 2015; Lin *et al.*, 2015). La modification de la surface des cellules pour créer la synapse joue un rôle important pour la fonctionnalité des lymphocytes. En effet, elle va permettre l'ancrage des cellules afin de permettre la transmission de signaux de signalisation et va constituer une

zone enrichie en récepteurs prévus à cet effet. On y retrouvera donc particulièrement un enrichissement de récepteurs de cellules T (TCR) mais aussi de co-récepteurs tels que les combinaisons CD80-CD86, ou encore la combinaison CD40-CD40L (Lim *et al.*, 2012; Tseng *et al.*, 2008). Grâce à la formation de la synapse immunologique, les cellules vont pouvoir interagir entre elles et ce, pendant un laps de temps suffisant pour se présenter des antigènes et activer leurs récepteurs grâce à la stabilité d'ancrage conférée par la modification de leur cytosquelette. Les différents récepteurs à la surface des cellules présentatrices d'antigènes et des lymphocytes vont alors pouvoir activer des cascades de signalisation qui vont provoquer la libération de cytokines et entamer les processus de prolifération cellulaire. Ainsi, les lymphocytes vont notamment sécréter de l'interleukine-2 (IL-2) qui va favoriser la prolifération des cellules et ce processus sera régulé par l'expression de la molécule de surface CTLA-4. Cette dernière peut avoir un effet inhibiteur sur la prolifération lymphocytaire (McCoy and Le Gros, 1999) possiblement par l'activité de trans-endocytose de ces cellules (Qureshi *et al.*, 2011). Il a d'ailleurs été décrit l'augmentation de l'expression de CTLA-4 chez les lymphocytes de vaches infectées par MAP, concordant avec l'anergie proliférative observée par d'autres groupes de recherche (Leite *et al.*, 2015). Il est intéressant de noter qu'en parallèle à l'augmentation de l'activité de CTLA-4, il y a une inhibition de ZAP-70 qui fut observée, ZAP-70 étant une protéine tyrosine kinase cytoplasmique impliquée dans l'activation des lymphocytes T (Chan *et al.*, 1994; van Oers *et al.*, 1994).

Parmi les différents types de lymphocytes, les lymphocytes T ont été extensivement étudiés dû à leur rôle effecteur et à leur plasticité. Ils sont généralement classifiés en 2 grands groupes : les lymphocytes T auxiliaires CD4+, et les lymphocytes cytotoxiques CD8+. Ce sous-type de lymphocyte est capable aussi bien d'agir suite à une infection en éliminant des cellules infectées que d'agir avec un rôle de soutien, en sécrétant des cytokines pour aller activer d'autres cellules. De plus, les lymphocytes T CD4+ sont généralement retrouvés comme étant la population la plus abondante dans la circulation sanguine et sont grandement impliqués dans les mécanismes de pathologies sévères telles que le HIV chez l'humain (Sleasman *et al.*, 1996). Il n'est donc pas étonnant que bon nombre des recherches sur les lymphocytes

d'animaux atteints de paratuberculose aient porté sur les lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ (Basseby and Collins, 1997; de Silva *et al.*, 2013; de Silva *et al.*, 2015; Plattner *et al.*, 2014). Toutefois, le système immunitaire des bovins diffère de celui de l'humain ou de la souris. Dans le cas du système immunitaire adaptatif, la plus grande différence entre ces espèces repose sur les quantités des différents sous-types de lymphocytes présents dans la circulation périphérique. En effet, chez le bovin, la population de cellules CD4⁺ reste très grande, avoisinant les 20%, les CD8⁺ sont moins nombreuses, entre 5 et 15% mais c'est surtout la population de cellules $\gamma\delta$ ⁺ qui est énorme chez le bovin : entre 30 et 60% des PBMCs (Ayoub and Yang, 1996; Hein and Mackay, 1991; Tanaka *et al.*, 2008). En comparaison, les lymphocytes $\gamma\delta$ ⁺ présentes chez l'humain ne représentent que 0.5 à 10% de la population de lymphocytes (Esin *et al.*, 1996; Jutila *et al.*, 2008), ce qui est très peu en comparaison à la proportion retrouvée chez les vaches. Les lymphocytes $\gamma\delta$ ⁺ possèdent les caractéristiques des cellules professionnelles de l'immunité innée, avec leurs différents récepteurs comme les TLRs, tout en gardant des caractéristiques propres aux lymphocytes (Hedges *et al.*, 2005; Hein and Mackay, 1991; Wesch *et al.*, 2011). Ce sont des cellules polyvalentes capables de faire de la phagocytose, de la présentation d'antigène ou d'avoir un rôle similaire aux lymphocytes auxiliaires (Collins *et al.*, 1998; Coussens *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2009). Il est intéressant de noter l'existence de plusieurs sous-types de cellules $\gamma\delta$ ⁺, qui sont soit CD4⁺, soit CD8⁺. De plus, elles peuvent présenter à leur surface la molécule WC1 et seraient alors encore plus importantes dans le cas d'infection par des pathogènes intracellulaires (Pollock and Welsh, 2002; Rogers *et al.*, 2005a; Rogers *et al.*, 2005b; Welsh *et al.*, 2002). Elles auraient aussi un rôle important à jouer dans la défense contre la paratuberculose et MAP serait capable de modifier le phénotype de ces lymphocytes après infection (Baquero and Plattner, 2016; Koets *et al.*, 2002; Leite *et al.*, 2015).

Il est intéressant de noter qu'une étude qui porte sur le modèle ovin atteint de paratuberculose a rapporté le phénomène d'anergie chez les animaux à un stade avancé de la maladie en étudiant la réponse lymphoproliférative des animaux à différents stades de la maladie (Kurade and Tripathi, 2008). Pour cette étude, des agneaux ont été infectés via la voie orale puis leurs

cellules ont été prélevées à différents stades de leur maladie pour être stimulées *in vitro* avec du PPDJ. L'analyse de la prolifération des lymphocytes ainsi stimulés a permis aux auteurs de mettre en avant des niveaux de lymphoprolifération variable au cours de l'évolution de la paratuberculose. Cette anergie des lymphocytes chez les sujets atteints fut déjà observée par d'autres, et semblerait être en lien avec le type de lésions induites par la maladie (Burrells *et al.*, 1998). Chez le bovin atteint de paratuberculose, c'est surtout le comportement des différents types de lymphocytes en réponse à une stimulation par MAP ou ses dérivés qui a été reporté, particulièrement celui des lymphocytes T. De plus, la majorité des analyses ont été réalisées chez des veaux artificiellement contaminés (Plattner *et al.*, 2011; Plattner *et al.*, 2014; Plattner *et al.*, 2013).

Néanmoins, une anergie des lymphocytes au niveau prolifératif fut également retrouvée chez les vaches atteintes de paratuberculose (Weiss *et al.*, 2006). Cette anergie serait dépendante de l'organe d'origine des lymphocytes; elle fut notamment observée chez les lymphocytes provenant de l'iléon mais pas de la rate des animaux étudiés.

1.3. LA PARATUBERCULOSE BOVINE

1.3.1. Histoire de la maladie

La paratuberculose est une maladie caractérisée par le développement d'une entérite chronique, dont les premières descriptions remontent au début du 19^e siècle. Toutefois, ce n'est qu'à partir de 1894 qu'elle fut vraiment étudiée en Allemagne, par le Dr. Heinrich Albert Johne, d'où sa deuxième appellation « maladie de Johne » (Johne and Frothingham, 1895). Alors accompagné du Dr. Langdon Frothingham, le Dr. Johne eut l'opportunité d'étudier les intestins d'une vache présentant des symptômes similaires à une vache atteinte de tuberculose bovine, mais dont le test cutané était négatif. Dans ces tissus, ils découvrirent la présence d'une bactérie acido-résistante, mais qui était incapable d'infecter des cobayes. Ils pensèrent alors que cette bactérie n'était pas capable d'infecter des mammifères et était probablement

l'agent causal de la tuberculose chez les oiseaux, à savoir *Mycobacterium avium*. À cette époque, les deux chercheurs baptisèrent cette maladie « l'entérite pseudotuberculeuse ». Un peu plus tard, en 1906, le professeur Bang poursuivit les recherches sur la maladie et montra des réponses différentes entre les espèces mycobactériales lors de tests tuberculiniques (Bang, 1906). Il fut également le premier à proposer le nom de « paratuberculose » pour cette maladie ressemblant à la tuberculose intestinale. Depuis sa découverte, la paratuberculose eut de nombreuses propositions d'appellation, mais son nom actuel, ainsi que celui de « *Mycobacterium paratuberculosis* » pour son agent causal, furent officiellement adoptés en 1923 à la publication d'un livre de bactériologie (Bergey *et al.*, 1923).

Ce n'est qu'à partir de 1912 qu'il fut rendu possible d'isoler MAP et de la mettre en culture (Twort and Ingram, 1912). Les travaux sur la paratuberculose continuèrent de plus belle et il ne fallut que peu de temps pour que des chercheurs déterminent que cette maladie serait responsable de grandes pertes économiques sans prises de mesures contre sa dissémination (Meyer, 1913). Ainsi, la paratuberculose devint vite une maladie reconnue en Europe et en Amérique. De plus en plus il devint évident que la maladie se véhiculait beaucoup à cause des trafics d'animaux malades de troupeau en troupeau. Dans les années 1920, la présence de la paratuberculose sur les continents asiatiques et africains fut confirmée et une dizaine d'années plus tard ce fut le tour de l'Inde, de l'Amérique du sud ainsi que du continent océanique.

1.3.2. Pathogénèse

Une fois que MAP, l'agent causal de la paratuberculose, est ingérée par un ruminant, pour lequel MAP démontre un grand tropisme, la mycobactérie se dirige vers le tractus intestinal et plus particulièrement au niveau du petit intestin et de préférence au niveau des plaques de Peyer (Arsenault *et al.*, 2014; Sigurethardottir *et al.*, 2004). Elle traverse ensuite les défenses de l'épithélium intestinal pour infecter dans un premier temps les cellules M (Microfold cells) ainsi que les entérocytes (Bermudez *et al.*, 2010; Sigur-Dardottir *et al.*, 2001; Sigurdardottir *et al.*, 2005; Sigurethardottir *et al.*, 2004). Il a été postulé que MAP était capable de cibler les

cellules M préférentiellement grâce à la fibronectine, une protéine d'adhérence, présente à la surface de ces cellules (Secott *et al.*, 2001, 2004). En effet, cibler d'abord les cellules M ainsi que les entérocytes fait partie d'une stratégie efficace de MAP, car ces cellules forment l'interface entre l'épithélium de la muqueuse intestinale et les macrophages, ses cibles finales (Momotani *et al.*, 1988). Une fois les cellules M infectées, MAP influence les cellules pour les pousser à produire des cytokines pro-inflammatoires, dont IL-1 β , ainsi que des protéines chimioattractantes comme MIP-2 afin d'attirer des macrophages et des cellules dendritiques (Khare *et al.*, 2009). Le mécanisme d'infection de MAP a été bien étudié et a donné le jour à des revues de littérature résumant bien les différentes étapes (Figure 1) (Bannantine and Bermudez, 2013). À la sortie des cellules M, MAP est alors capable d'entrer dans les macrophages sub-épithéliaux et y rester pour proliférer en y récoltant ses nutriments. Il est intéressant de noter qu'une fois à l'intérieur des macrophages ou des cellules dendritiques, ces cellules vont être activées et vont migrer, souvent vers des nœuds lymphatiques mésentériques. Cette migration est d'ailleurs la raison pour laquelle il est possible de détecter la présence de MAP dans différents tissus ou organes chez des individus atteints et peut même servir d'indicateur de sévérité de la maladie (Dennis *et al.*, 2008; Mutharia *et al.*, 2010; Subharat *et al.*, 2012).

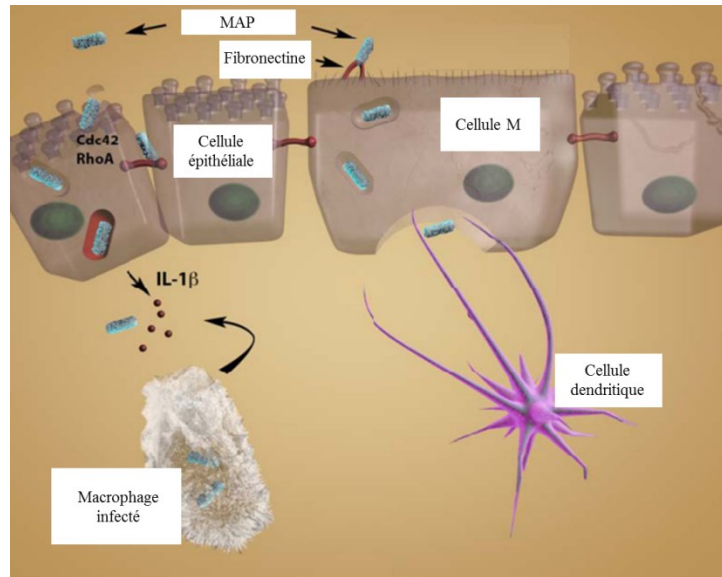


Figure 1. Représentation schématique de l'infection des macrophages par MAP une fois entrée au niveau de la muqueuse intestinale. Figure adaptée d'une revue de littérature (Bannantine and Bermudez, 2013)

Une fois les macrophages ou cellules dendritiques infectés, MAP est capable de survivre au dépens de son hôte pour s'y répliquer lentement. L'apparition des signes cliniques résulte de sa dissémination et de l'inflammation que provoque MAP dans sa progression (Aho *et al.*, 2003). En effet, les macrophages infectés s'activent et produisent des cytokines, créant un environnement favorable à une inflammation (Zurbrick and Czuprynski, 1987). Toutefois, MAP module son environnement. Il agit d'abord en régulant possiblement négativement les récepteurs MHC de classe II dans certains tissus (Alzuhri *et al.*, 1997; Okagawa *et al.*, 2015) ainsi que chez la cellule dendritique (Basler *et al.*, 2013). La mycobactérie inhiberait également l'expression de cytokines telles que IL-12 (Sommer *et al.*, 2009) et favoriserait une action anti-inflammatoire en augmentant la sécrétion d'IL-10 par les macrophages (Weiss *et al.*, 2005). Les interleukines anti-inflammatoires ainsi produites participeraient possiblement à l'inhibition de l'apoptose observée (Kabara and Coussens, 2012). Au cours du temps, la multiplication de MAP, et donc le renforcement de l'inflammation, va induire l'apparition d'une entérite et de granulomes contenant de grandes quantités de MAP (Gonzalez *et al.*, 2005). Finalement, les divers symptômes de la maladie tels que la malnutrition chez les

animaux atteints sont la conséquence de l'entérite chronique granulomateuse formée par MAP (Clarke and Little, 1996).

1.3.3. Les différentes phases de la maladie

Après avoir été exposées à une infection par MAP, les cellules d'un individu vont soit pouvoir lutter efficacement et éliminer les mycobactéries, soit se faire envahir. Dans le dernier cas, l'individu va contracter la maladie et celle-ci se développe en plusieurs phases. La paratuberculose bovine commence à l'infection initiale. Au début, la maladie est dans une phase silencieuse, c'est-à-dire qu'elle n'entraîne pas de signes cliniques visibles. Cette phase silencieuse semblable à un temps d'incubation persiste sur des années en fonction des individus. Il faut noter que les durées de chaque étape lors de l'évolution de la maladie seraient liées à plusieurs facteurs tels que l'âge de l'animal lors de sa contamination ou la quantité de MAP initiale à l'infection (Mortier *et al.*, 2013; Whitlock and Buergelt, 1996). En moyenne, la phase silencieuse dure de 2 à 5 ans. Durant toute cette période, les animaux infectés ne pourront être distingués des animaux sains. Ainsi il est difficile de séparer ces animaux infectés des troupeaux de façon précoce. Pendant cette phase, les macrophages infectés agissent en collaboration étroite avec les lymphocytes T afin de produire une réponse de type Th1 qui va tenter de contenir la propagation de l'infection (Wu *et al.*, 2007). Au cours de cette période silencieuse, soit dans les premiers temps suivant l'infection, une sécrétion d'interféron-gamma est observée. Cependant, le profil IFN-g/Th1 est de plus en plus remis en question.

L'étape suivante de la maladie survient lorsque les premiers indices diagnostiques de la maladie deviennent vérifiables. Cette phase est appelée la phase sous-clinique. Bien que les animaux soient asymptomatiques, une caractéristique importante à ce stade est le début de la dissémination de MAP dans les excréments des animaux, mais de façon intermittente (Nielsen and Toft, 2008). Il est donc possible de diagnostiquer des animaux infectés au stade sous-clinique par PCR ou cultures bactériennes fécales mais le résultat dépend de la présence ou

non du pathogène ainsi que de sa quantité dans les fèces lors de l'échantillonnage (Wells *et al.*, 2006). Durant cette phase transitoire de la maladie, une réponse immunitaire est observée, notamment la production de plusieurs cytokines pro-inflammatoires comme TNF- α , IFN- β , IL-2 ou IL-1 β produites par les macrophages et les lymphocytes face à l'infection. Au cours de la période sous-clinique, il a été émis l'hypothèse selon laquelle la réponse Th1 serait progressivement relayée par la réponse Th2, qui se caractérise plutôt par une libération de cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL10...) et la production d'anticorps (Swain *et al.*, 1988). Au cours des dernières années, ce paradigme a longtemps été suivi (Coussens *et al.*, 2002), même si d'autres études montrent que les deux réponses peuvent parfois survenir dans le même temps (Begg *et al.*, 2011; Dudemaine *et al.*, 2014). Une autre hypothèse a été émise sur le sujet à partir d'une modélisation mathématique (Magombedze *et al.*, 2014). Selon celle-ci, plusieurs scénarios seraient possibles en fonction des animaux dû à une compétition entre les cellules responsables des réponses Th1 et Th2 pour les antigènes. Par la suite, il y a une inflammation progressive qui s'installe et on peut observer chez les animaux des diarrhées occasionnelles bien que leur comportement alimentaire ne change pas.

Finalement, la maladie évolue lentement vers le stade clinique. Les mycobactéries ayant pu proliférer en quantités importantes, leur dissémination dans les tissus, les facteurs qu'elles relâchent et l'inflammation subséquente qu'elles induisent provoquent l'apparition de nouveaux symptômes chez les animaux atteints. Les vaches malades au stade clinique montrent souvent des signes d'amaigrissement malgré un appétit normal. À ce stade, la paratuberculose se caractérise également par une diarrhée liquide d'abord intermittente puis chronique, avec un fort taux d'excrétion de MAP. Au niveau des tissus, la présence de MAP est retrouvée dans les autres parties du tractus intestinal, où l'on observe également des muqueuses et nœuds lymphatiques œdématisés (Whitlock and Buergelt, 1996). En plus de ces signes, les vaches laitières voient leurs productions de lait diminuer brutalement, causant des pertes économiques pour les producteurs (Nordlund *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 1993). Une baisse de la fertilité croissante s'ajoute aussi à la liste des signes cliniques induits par la paratuberculose bovine (Merkal *et al.*, 1975). Ainsi, les animaux malades au stade clinique

sont sévèrement affaiblis par la cachexie et ne représentent que peu d'intérêt pour les producteurs. La maladie étant actuellement incurable, les animaux atteints meurent alors d'épuisement ou, généralement, se font réformer par leurs propriétaires.

1.3.4. Transmission de la maladie

Comme décrit précédemment, MAP est un agent pathogène dont le mécanisme d'infection repose principalement sur la voie oro-fécale. La bactérie se faisant expulser dans les excréments de ses hôtes, elle est capable de se retrouver disséminée dans l'environnement. Elle y persiste sous forme de biofilm jusqu'à trouver un nouvel individu qui l'ingère. Ainsi, une vache malade excrétrice de MAP va participer au cycle de MAP en contaminant son environnement et en exposant donc les autres vaches du troupeau à une potentielle infection. Ceci vaut également pour sa progéniture, on parle donc de transmission horizontale et verticale (Figure 2).

Les vaches atteintes de la paratuberculose à un stade avancé sont également capables de contaminer leurs veaux par d'autres moyens. Bien que peu d'infections résultent d'une exposition prénatale, MAP est capable de passer outre la barrière placentaire pour infecter des fœtus de veau *in-utero* (Adaska and Whitlock, 2012; Whittington and Windsor, 2009). La transmission verticale de la paratuberculose s'effectue également de façon postnatale, lors de l'alimentation des veaux avec du colostrum ou du lait contaminé (McAloon *et al.*, 2016; Sweeney, 1996). Dans certains cas, il est également possible que ce soit les mamelles des vaches qui soient contaminées et donc responsable de la transmission des infections.

Bien que l'infection des animaux adultes soit possible, les individus les plus susceptibles à une infection par MAP sont les jeunes veaux de 1 à 2 ans, principalement dû à l'immatrité de leurs défenses immunitaires (Fecteau *et al.*, 2010; Larsen *et al.*, 1975).

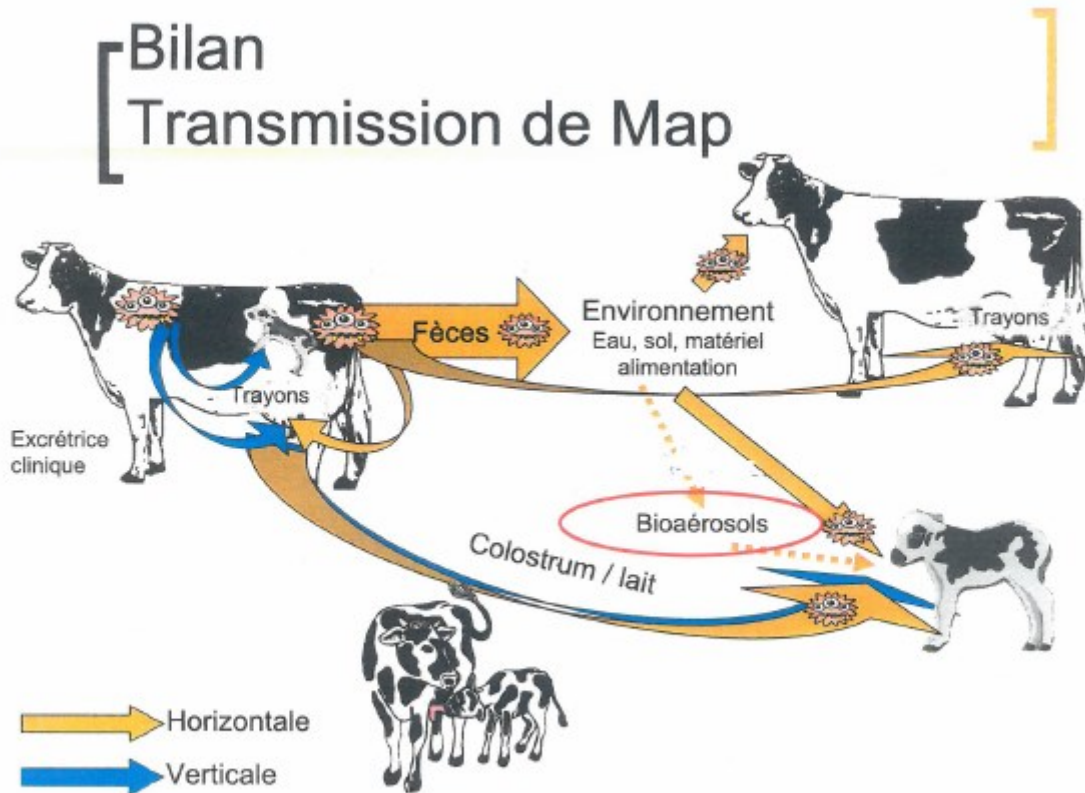


Figure 2. Schématisation de la transmission de MAP dans les troupeaux bovins. Les vaches malades excrétrices vont contaminer les eaux, sols et matériels environnants et ainsi exposer le reste du troupeau à une infection. Le même principe s’applique pour leurs veaux, mais une voie d’exposition s’ajoute : celle de l’alimentation avec du colostrum ou du lait contaminé. Figure provenant du site <http://www.gds-poitou-charentes.fr/>.

Il faut noter que la paratuberculose peut aussi se transmettre via de la semence contaminée. En effet, la présence de MAP dans du sperme de taureau atteint de paratuberculose a déjà été reportée dans plusieurs études (Ayele *et al.*, 2004; Herthnek *et al.*, 2006). Ainsi, il est possible que la maladie se transmette lors de la reproduction des animaux, ou lors des inséminations artificielles avec de la semence contaminée. De plus, MAP pouvant infecter différentes espèces, la contamination des troupeaux peut être causée par des animaux sauvages.

1.3.5. Traitement de la paratuberculose bovine

Actuellement, il n'existe aucun traitement efficace de la maladie. En effet, de par les caractéristiques de sa paroi, MAP est résistante à plusieurs traitements antibiotiques. Plusieurs études portées sur l'efficacité de traitements complexes utilisant plusieurs antibiotiques à différents spectres ont été réalisées mais ces derniers n'ont pu que ralentir la croissance de MAP au mieux (Greenstein *et al.*, 2007; St-Jean and Jernigan, 1991). L'effet de la plupart des différentes molécules a bien été résumé (St Jean, 1996). Bien que l'activité inhibitrice des antibiotiques sur MAP puisse sembler intéressante, la durée des traitements ainsi que leur coût semblent déraisonnables par rapport au bénéfice obtenu. De plus, les réglementations concernant la viande ou le lait d'animaux exposés aux antibiotiques sont assez strictes.

Mis à part les traitements directs de la maladie, des stratégies prophylactiques via les vaccins sont en cours de développement. Toutefois, leur efficacité n'est que limitée mais les vaccins vont diminuer les charges bactériennes excrétées par les animaux infectés et ralentir la survenue des signes cliniques chez ces animaux (Bastida and Juste, 2011; Rosseels and Huygen, 2008).

1.3.6. Diagnostic de la maladie

Afin de pouvoir appliquer des stratégies thérapeutiques ou préventives contre la paratuberculose, il est nécessaire de pouvoir diagnostiquer les animaux. Néanmoins, à cause des différents délais d'incubation ou d'apparition des signes cliniques, il est souvent difficile d'identifier ces animaux parfaitement. De façon générale, les tests diagnostiques pour la paratuberculose vont se regrouper en 2 parties : les tests visant la détection directe de MAP dans les échantillons, ou les tests basés sur la détection d'une réponse immunitaire spécifique à une infection par MAP. Historiquement, la détection de MAP se basait principalement sur des analyses microbiologiques, par culture sur gélose ou par culture liquide qui s'avère être plus rapide (Cousins *et al.*, 1995; Whittington *et al.*, 1998). La performance de la culture

liquide fut améliorée par la venue de différents systèmes qui reposent soit sur des capteurs d'ions pour lire la production de $^{14}\text{CO}_2$ (Bactec 460), soit sur l'analyse de la consommation d'oxygène (système VersaTREK) ou du changement de la pression (système MGIT pour « *mycobacterial growth indicator tube* ») comme indicateurs de croissance. Aujourd'hui encore la culture bactérienne est considérée comme la technique de référence pour le diagnostic de la paratuberculose. Toutefois, la communauté scientifique est à nouveau à la recherche de « gold standard » (Britton *et al.*, 2016). En effet, la technique faisant appel à du milieu sélectif et une confirmation soit par coloration de Ziehl-Neelsen, soit par qPCR, sa spécificité est grande. Néanmoins, la croissance de MAP étant très longue, le diagnostic en est d'autant plus ralenti. Il faut en moyenne de 2 à 3 mois pour avoir des résultats, voire encore plus pour être sûr de ne pas avoir de faux négatif, le temps de culture dépendant également de la charge bactérienne de l'échantillon (Whitlock and Buergelt, 1996) De plus, la culture nécessite un traitement de décontamination par antibiotiques pour enrayer la surcroissance de microorganismes autres que MAP, une étape qui diminue la sensibilité du test en éliminant 10^2 - 10^3 bactérie par échantillon (Grant *et al.*, 2003). Malgré tout, un risque de contamination persiste au final (Whipple *et al.*, 1991). La coproculture représente donc une méthode longue et coûteuse pour le diagnostic de la paratuberculose, avec une sensibilité dépendant de nombreux facteurs.

L'autre catégorie de test repose principalement sur la détection d'anticorps spécifiques à MAP par les tests ELISA, ou le dosage des interférons gamma (Jungersen *et al.*, 2012; Mikkelsen *et al.*, 2009). Ces tests diagnostiques sont plus rapides à exécuter et plus économiques. Parmi eux, le test ELISA est notamment un des plus utilisés, avec plusieurs kits commerciaux disponibles sur le marché. Le test ELISA est effectué sur de petits échantillons de sérum et se base sur la détection d'une réponse humorale spécifique à la paratuberculose. Cette réponse immunitaire est évaluée par la capture d'anticorps spécifiquement dirigés contre des protéines de MAP, lesquelles dépendent du kit utilisé. C'est une technique rapide et moins onéreuse que la culture, avec l'avantage d'avoir une très haute spécificité. Néanmoins, le test ELISA pour le diagnostic des troupeaux devrait être associé avec d'autres techniques car sa sensibilité est

faible. En effet, il a été reporté des sensibilités avoisinant 20-40% chez des animaux excréant de faibles quantités de MAP dans leur fèces et donc en stade sous-clinique, même si cette sensibilité est largement améliorée (80-100%) chez des animaux fortement excréteurs et donc probablement en phase clinique (Collins *et al.*, 2005; Donat *et al.*, 2014). Ainsi, le test ELISA employé seul est critiqué car les animaux en phase sous-clinique sont peu détectés à l'ELISA.

Une autre des techniques de diagnostic *ante mortem* principalement utilisées pour la détection de MAP dans les troupeaux est la technique de la qPCR (quantitative Polymerase Chain reaction ou PCR à temps réel). En effet, grâce à une meilleure connaissance du génome de MAP et de l'identification de certains de ses marqueurs génétiques, les tests directs par la détection de séquences d'ADN génomique spécifiques à MAP par qPCR se sont répandus. Cette approche consiste à détecter la présence d'ADN génomique de MAP dans des échantillons de fèces ou de lait après amplification grâce à des amorces spécifiques à MAP (Tableau 1). Comme pour les tests ELISA, les avantages de la qPCR reposent sur son excellente spécificité, dépendante des amorces utilisées, mais aussi de sa facilité de réalisation, sa rapidité et de son coût. Afin d'assurer la sensibilité de la détection par PCR, une étape d'extraction et de purification de l'ADN génomique est généralement requise. Cette étape est cruciale compte tenu de présence d'inhibiteurs de la PCR. Le matériel fécal est notamment riche en polysaccharides complexes et acide phytique (Angelakis *et al.*, 2016; Monteiro *et al.*, 1997; Schrader *et al.*, 2012; Thornton and Passen, 2004). Cette étape a donc un grand impact sur le résultat du diagnostic, au même titre que le choix de la cible ou des amorces (Chui *et al.*, 2004; Leite *et al.*, 2013). Malgré que la sensibilité du diagnostic par la qPCR soit meilleure que celle du test ELISA, elle demeure dépendante des mêmes facteurs que la culture fécale, à savoir la charge bactérienne de l'échantillon, ainsi que du caractère intermittent de l'excrétion des bactéries par les animaux en phase sous-clinique (Clark *et al.*, 2008; Nielsen and Toft, 2008).

Tableau 1. Cibles courantes des amorces de PCR pour la détection de MAP

Cible de l'amorce	Nombre de copies dans le génome de MAP	Taille (bp)	Références
IS900	14-18	1451 (variable)	(Green <i>et al.</i> , 1989)
ISMAP02	6	117	(Stabel and Bannantine, 2005)
ISMav2	3	390	(Strommenger <i>et al.</i> , 2001)
HspX	1	30	(Ellingson <i>et al.</i> , 1998)
F57	1	620	(Poupart <i>et al.</i> , 1993)

Liste des amorces les plus couramment utilisées pour le diagnostic de la paratuberculose, ainsi que leur taille et le nombre de copies présentes dans le génome de MAP

1.4. OBJECTIFS

La paratuberculose est responsable d'énormes pertes économiques dans l'industrie laitière au niveau mondial à cause des symptômes qu'elle entraîne. Au Canada, ces pertes sont estimées être de 15 à 90 millions de dollars par an (Chi *et al.*, 2002; McKenna *et al.*, 2006). Pour diminuer ces pertes, il est nécessaire de pouvoir empêcher la dissémination de la maladie au sein des troupeaux. La réforme des animaux atteints de la maladie de Johne est une pratique recommandée dans ce but (Sweeney *et al.*, 2012). Toutefois, elle nécessite de pouvoir diagnostiquer efficacement les animaux. Ainsi, les méthodes de prévention mises en place sont grandement dépendantes des méthodes de diagnostic utilisées dans les troupeaux et malheureusement, leur sensibilité ne permet souvent pas de dépister des animaux en phase sous-clinique ou silencieuse. Ce manque de sensibilité, dû aux raisons mentionnées précédemment, fait que la prévalence de la maladie dans les troupeaux est probablement sous-estimée. En effet, il est estimé que la plupart des tests diagnostiques ne permettent la détection que de 25 à 30% des animaux infectés dans un troupeau (Whitlock and Buergelt, 1996). De cette estimation, des modèles mathématiques ont été créés pour évaluer la prévalence réelle de la maladie dans un troupeau lors de la découverte d'un animal en phase clinique. Cette modélisation est appelée « l'effet iceberg de la maladie de Johne » (Figure 3) (Magombedze *et*

al., 2013). Selon ce modèle, un troupeau contenant un animal en phase clinique avancée en dissimule au moins deux autres en phase clinique, 4 à 8 en phase sous-clinique et 10 à 14 en phase silencieuse. Le fait de ne pas pouvoir détecter ces animaux ne favorise pas la mise en place de bonnes pratiques préventives. Il est donc important de développer de nouvelles méthodes de diagnostic de la paratuberculose chez le bovin laitier. L'idéal serait que ces nouvelles techniques s'affranchissent des limitations des méthodes actuelles et puissent permettre la détection d'animaux en phase sous-clinique ou nouvellement infectés, sans pour autant perdre en spécificité.

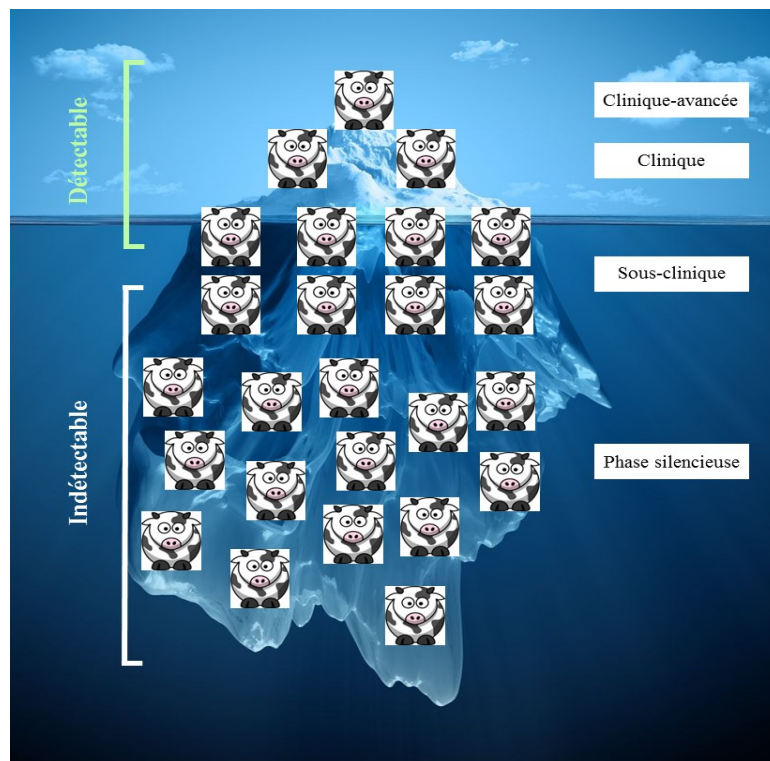


Figure 3. Représentation de l'effet iceberg de la maladie de Johne. Les animaux hors de l'eau, soit la pointe de l'iceberg, représentent des animaux détectables par les méthodes de diagnostic actuelles dans un troupeau. Pour ce nombre de vaches infectées diagnostiquées, les vaches sous l'eau représentent une estimation du nombre d'animaux infectés non diagnostiqués dans ce même troupeau. Les animaux à l'interface représentent les vaches au stade sous-clinique pouvant être détectées occasionnellement.

Ainsi, le but de ce projet était de mettre au point de nouvelles méthodes ou de nouvelles recommandations pour améliorer le diagnostic de la paratuberculose chez la vache laitière. Pour cela, il a fallu la collaboration de fermes commerciales, ainsi que la mise au point des diagnostics de leurs troupeaux par les techniques conventionnelles afin d'avoir leur statut dans notre étude. Dans un premier temps, une étude comparative de différentes trousse d'extraction d'ADN et de détection de MAP a été réalisée afin de pouvoir diagnostiquer les animaux avec le plus de sensibilité possible par PCR. Cette technique, combinée à la culture fécale et aux tests ELISA, a donc permis d'avoir le statut des animaux avec la meilleure précision qu'il est possible d'attendre à ce jour. Finalement, grâce à toute cette préparation, il était rendu possible de réaliser des essais pour tenter de mettre en place un nouveau test de diagnostic, avec des individus atteints de la maladie ainsi que des individus sains comme contrôles positifs et négatifs. Au vu des différentes approches déjà existantes pour le diagnostic, le projet s'est concentré sur la recherche d'une façon de discriminer les vaches malades des vaches saines en observant la prolifération cellulaire de leurs lymphocytes après une nouvelle rencontre avec MAP.

CHAPITRE 2
COMPARISON OF COMMERCIAL DNA EXTRACTION KITS AND
QUANTITATIVE PCR SYSTEMS FOR BETTER SENSITIVITY IN DETECTING
THE CAUSATIVE AGENT OF PARATUBERCULOSIS IN DAIRY COW FECAL
SAMPLES

D. Fock-Chow-Tho,^{*†} E. Topp,[‡] E.A. Ibeagha-Awemu,^{*} and N. Bissonnette^{*}

^{*}Sherbrooke Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada,
Sherbrooke, Quebec, J1M 0C8 Canada

[†]Department of Biology, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, J1K 2R1 Canada

[‡]London Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, London,
Ontario, N5V 4T3 Canada

Article soumis dans le Journal of Dairy Science le 30 avril 2016.

Contribution des auteurs :

L'ébauche de l'article fut rédigée par M. David Fock-Chow-Tho, puis révisée et améliorée par Mme Nathalie Bissonnette. L'échantillonnage du matériel biologique (fèces et sang) ainsi que leur traitement pour les différentes analyses ont été réalisés par Mme Catherine Thibault avec la participation de M. David Fock-Chow-Tho, Mme Emilie Constant et l'aide de différents étudiants en stage. Le design expérimental a été réalisé par Mme N. Bissonnette. Tous les auteurs ont lu et contribué à la rédaction de l'article.

Avant-propos de l'article : La contamination orale-fécale est le mode le plus important de transmission de la paratuberculose. Ainsi la détection des animaux responsables de la dissémination du pathogène par son excrétion dans les fèces est prioritaire. En utilisant la méthode de détection la plus robuste, l'identification des animaux excréteurs et une bonne régie pourraient empêcher la propagation de la maladie chez les animaux d'élevage. La détection directe de MAP fécale chez des individus par la PCR quantitative est rapide et a gagné en popularité. Pour cela, plusieurs troussees commerciales sont actuellement proposées. Suivant les résultats obtenus avec des fèces dont on a artificiellement introduit MAP, elles sont toutes aussi performantes les unes que les autres. Cependant, les études comparatives de ces troussees effectuées avec des vaches naturellement infectées sont plus rares. Les résultats de l'article du présent chapitre présentent une évaluation rigoureuse de la sensibilité des troussees commerciales en utilisant des spécimens naturellement infectés et artificiellement enrichis en MAP. Il est observé que les troussees n'ont pas les mêmes performances avec des matières fécales artificiellement ou naturellement infectés par cette mycobactérie.

Le manuscrit a été soumis à la revue *Journal of Dairy Science* et a été accepté pour publication le 4 Octobre 2016.

**AUTORISATION D'INTÉGRATION D'UN ARTICLE
ÉCRIT EN COLLABORATION, À UN MÉMOIRE OU UNE THÈSE**

(à indexer avec le mémoire ou la thèse, au moment du dépôt final, à l'adresse suivante:
<http://savoirs.usherbrooke.ca/>)

Je (ou nous), soussigné(e), soussigné(e), co-auteur(e), co-auteur(s) de l'article intitulé :

Comparison of commercial DNA extraction kits and quantitative PCR systems for better sensitivity in detecting the causative agent of paratuberculosis in dairy cow fecal samples.

Reconnais (reconnaissons) que ledit article sera inclus comme partie constituante du mémoire de la thèse

de l'étudiant(e) (nom) : David Fock-Chow-Tho

Inscrit(e) au programme de Maîtrise en biologie

de la Faculté des sciences de l'Université de Sherbrooke

En foi de quoi, j'ai (nous avons) signé cet engagement

Signature

Date

2016-07-18

Nom

Nathalie Bissonnette, chercheur scientifique

Coordonnées

Agriculture et Agroalimentaire Canada

2000 rue Collège Sherbrooke QC J1M 0C8

Signature

Date

2016-07-19

Nom

Ed Topi, chercheur scientifique

Coordonnées

Agriculture et Agroalimentaire Canada

1391 rue Sandford London ON N5Y 4T3

Signature

Date

2016-08-03

Nom

Eveline Ibeagha-Awemu, chercheur scientifique

Coordonnées

Agriculture et Agroalimentaire Canada

2000 rue Collège Sherbrooke QC J1M 0C8

Running head: DETECTING PARATUBERCULOSIS PATHOGEN IN BOVINE FECES

Comparison of commercial DNA extraction kits and quantitative PCR systems for better sensitivity in detecting the causative agent of paratuberculosis in dairy cow fecal samples

D. Fock-Chow-Tho,^{*†} E. Topp,[‡] E.A. Ibeagha-Awemu,^{*} and N. Bissonnette^{*}

^{*}Sherbrooke Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Sherbrooke, Quebec, J1M 0C8 Canada

[†]Department of Biology, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, J1K 2R1 Canada

[‡]London Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, London, Ontario, N5V 4T3 Canada

2.1. ABSTRACT

Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* (MAP) is the pathogen that causes ruminant paratuberculosis (Johne's disease) worldwide. Oral–fecal contamination is the most important mode of transmission of paratuberculosis, and thus eradicating MAP-shedding animals could prevent disease propagation. Fecal culture, a well-known method for MAP diagnosis, requires costly specialized media and a long incubation time that sometimes ends in disappointing bacterial contamination. To facilitate the efforts of control programs, we evaluated the performance of direct fecal quantitative PCR (qPCR) assays in terms of sensitivity and robustness. Commercial kits use different strategies for extracting DNA combined with qPCR systems for detecting the presence of MAP in fecal samples. In this study, we compared the sensitivity of 3 commercially available DNA extraction kits (A, B, and C) combined with 2 qPCR systems (T and V) for the detection of MAP in infectious cows. A total of 49 dairy cows from 5 different herds were sampled twice a year for 3 yr and diagnosed by fecal culture and ELISA assays. Eight replicates of their fecal samples from the first sampling were tested with each DNA extraction method and qPCR detection system. Although all 3 of the commercial DNA extraction kits were previously described as very efficient for paratuberculosis diagnosis, kit B provided the highest sensitivity. Indeed, 89% of the cows declared positive for paratuberculosis by both fecal culture and ELISA assays were identified with kit B, whereas only 23% and 43% of the cows were confirmed with kits A and C, respectively. Interestingly, kit B was able to detect some low MAP shedders. Moreover, the qPCR detection system played a critical role, with system T yielding qPCR with the highest sensitivity. The results of this study suggest that DNA extraction kit B in combination with detection system T provides the best amplification of MAP DNA from fecal samples with the highest sensitivity and specificity. Although 1 DNA extraction and qPCR analysis should be adequate for confirmation that an animal with diarrhea or other signs associated with the disease is positive, detecting low shedders with the highest sensitivity should include repetitive testing. This study demonstrates the importance of repetitions using the most

appropriate method for extracting DNA from fecal samples combined with a compatible qPCR system for identifying MAP-shedding animals.

Key words: bovine paratuberculosis, diagnosis, qPCR, fecal DNA extraction kit

2.2. INTRODUCTION

Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* (MAP) is the pathogen responsible for causing paratuberculosis (Johne's disease) worldwide. The disease has been described mainly in ruminants, although many species have been found to be infected (Beard et al., 2001; Kennedy and Benedictus, 2001), and is characterized by a slow progression to chronic granulomatous enteritis (Clarke, 1997; Stabel, 1998). During the subclinical stage, which lasts 4 to 6 yr, there are nearly no signs of the presence of the disease, but intermittent shedding of MAP in feces may occur. As the disease progresses, various symptoms such as chronic diarrhea, loss of milk production, decreased fertility, and even mastitis appear (Chiadini et al., 1984; Gonda et al., 2007). No treatment is currently available for paratuberculosis (Whan et al., 2001; Fecteau and Whitlock, 2011).

The increasing prevalence of infected animals resulting from modern farming has elevated bovine paratuberculosis to a global concern. Johne's disease is responsible for great economic losses in the livestock industry. In Canada, \$15 million to \$90 million is lost each year (Chi et al., 2002; McKenna et al., 2006). Oral–fecal contamination is the most important mode of transmission of paratuberculosis, and thus eradicating MAP-shedding animals could prevent disease propagation. Detecting MAP in herds is therefore of utmost importance, but precise diagnosis remains unsatisfactory and represents a limiting factor in preventing the disease and eradicating MAP.

Common methods for the detection of MAP include techniques such as ELISA and fecal culture. Faster and cheaper than fecal culture, ELISA assays have high specificity but lack sensitivity (Whitlock et al., 2000a; Dargatz et al., 2001; Salgado et al., 2007). Historically, Johne's disease was diagnosed in cattle mainly by direct culture of MAP from feces (Collins, 1996; Paolicchii et al., 2003; Clark et al., 2008). Unfortunately, this reference method is labor-intensive and often compromised by bacterial contamination. Therefore, this method is gradually being replaced by molecular approaches. Analysis by PCR was introduced as an

alternative to compensate for the cost, time consumption, and lack of sensitivity in diagnosis (Taddei et al., 2004; Bogli-Stuber et al., 2005; Herthnek and Bolske, 2006). For this molecular approach, the DNA extraction method must be robust and efficient and the detection system must be sensitive and specific in order to limit false-negative results.

Fecal matter is generally considered to be a difficult sample type for the molecular detection of microbes, owing to the presence of PCR inhibitors and the abundance of other microorganisms diluting the presence of MAP genome equivalents (Ge) in the DNA extract. A wide selection of commercial kits is available for MAP detection, but it is reasonable to expect that their efficacy could differ. Different studies on the subject showed that commercial DNA extraction methods, which included different sample treatments, greatly affected PCR results (Monteiro et al., 1997; Kabir, 2004) in terms of both the sensitivity and specificity of MAP detection (Chui et al., 2004; Amaro et al., 2008; Leite et al., 2013; Radomski et al., 2013). Concerning the specificity of the assay, several molecular reference markers for the detection of MAP have been described. In the present study, we compared the sensitivity of 3 commercial DNA extraction kits using 2 different MAP-specific probes, HspX and ISMAP02. The purpose of this study was to evaluate combinations of different commercial systems for the detection of MAP in artificially spiked versus naturally infected fecal samples from dairy cattle.

2.3. MATERIALS AND METHODS

2.3.1. Sampling

Fecal and blood samples were collected every 6 mo from December 2013 to December 2014 from Holstein cows ($n = 528$) in 5 different commercial tie-stall-housed dairy herds. The selected animals were lactating cows that were more than 24 mo old at first sampling. Fecal samples were taken per rectum, with a clean glove used for each cow. Because MAP is better preserved at -80°C (Raizman et al., 2011), the samples were kept cold at 4°C for a maximum of 24 h until they were aliquoted and then stored at -80°C as recommended (Whitlock and Rosenberger, 1990; Khare et al., 2008). Concurrent individual blood samples were also collected in dry tubes for serum collection (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada). Within a few hours of sampling, the tubes were centrifuged at $1,800 \times g$ at 4°C for 15 min, and sera were collected and then stored at -80°C until analysis by ELISA. A selection of 49 lactating cows for which we had 3 paired data sets and that were not culled during the sampling period was used for comparison of the extraction kits.

2.3.2. Diagnosis

Fecal samples from the first and last sampling ($n = 1,056$) were sent to the Laboratoire d'épidémiologie animale du Québec (Saint-Hyacinthe, QC, Canada). Aliquots were kept frozen at -80°C until diagnosis was made. Isolation of MAP was achieved using BD MGIT ParaTB culture medium and the BACTEC MGIT 960 system as described previously (Arango-Sabogal et al., 2016). An acid-fast bacilli stain was performed using the TB Fluorescent Stain Kit M (Fisher Scientific, Ottawa, ON). Positive samples were confirmed by real-time PCR [TaqMan MAP (Johne's) Reagents; Applied Biosystems, Foster City, CA]. Sera samples from all individuals were processed using the IDEXX Pourquier MAP antibody test kit (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME) according to the manufacturer's instructions. Optical density values were transformed to a sample-to-positive ratio as

described previously (Collins, 2002). Samples with a sample-to-positive ratio greater than or equal to 55% were considered positive. In parallel, a panel of samples from 6 animals in each of the shedding level groups, that is, animals shedding high, moderate, or low amounts of MAP, was confirmed by culture as described previously (Whitlock and Rosenberger, 1990). Three DNA extraction kits were tested on the high shedders (>100 cfu per media tube), moderate shedders (10–100 cfu per media tube), and low shedders (<10 cfu per media tube) for comparison purposes. The status of the cows was considered paratuberculosis-positive when detection by fecal culture or ELISA was positive in at least 1 of the sampling periods.

2.3.3. DNA Extraction

Three commercially available kits for sample processing (kits A, B, and C) that had previously been studied by Dr. Stabel's group (Leite et al., 2013) (who referred to them as kits A, E, and F), were tested with 49 cows from different herds that contained negative and positive cows. The sensitivity for detecting MAP in the extracted samples was compared using the same kit-specific PCR. All 3 methods included a bead-beating step, and only kits A and B included lysis buffer. Kit A was the certified MagMAX Total Nucleic Isolation Kit (Applied Biosystems) and was carried out using the MagMAX Express Magnetic Particle Processor (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. For DNA binding, kit A used paramagnetic beads, whereas kits B and C used a column-based technology. Kit B was the ZR Fecal DNA MiniPrep (Zymo Research Corp., Irvine, CA, USA). Kit C was the MAP Extraction System with the Two Grams Protocol (Tetracore Inc., Rockville, MD, USA) for maximum sensitivity as recommended by the manufacturer. The manufacturer of kit C also sells PCR reagents for the detection of MAP (quantitative PCR [qPCR] detection system V). Elution was done with 50 μ L for kits A and C but with 100 μ L for kit B, as recommended by the manufacturer. Extraction was done following the kit manufacturers' recommendations and protocols. Each fecal sample from the 49 cows was extracted 8 times with the respective commercial kits to analyze sample-to-sample variation, for a total of 392 extractions per kit, in order to determine the sensitivity of the extraction

system. The protocols followed were based on the manufacturers' instructions. Briefly, all 3 kits mechanically disrupted the bacteria using bead beating. The concentration and purity of the 1,176 DNA extracts were quantified in each sample with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA), and the extracts were stored at -80°C until qPCR analysis. The integrity of DNA was assessed by agarose gel electrophoresis.

2.3.4. qPCR Analysis

All fecal extracts from the 49 cows were extracted 8 times with the 3 DNA extraction kits (total of 1,176 extracts) and were analyzed using the 2 qPCR systems, detection system T and detection system V, in parallel. The target gene for system V (VetAlert Johne's Real-Time PCR; Tetracore Inc.) is HspX, and the target gene for system T (TaqMan MAP Johne's Reagents; Life Technologies, Foster City, CA, USA) is ISMAP02. Both targets are specific for MAP (Ellingson et al., 1998; Stabel and Bannantine, 2005). Quantitative polymerase chain reactions were performed following each manufacturer's recommendations, using 8 or 2.5 μL of each extracted sample for qPCR system T or V, respectively. For system V, the PCR program was 10 min at 95°C , and then 45 cycles of denaturation at 95°C for 15 s and annealing/extension at 62°C for 1 min. The protocol for detection kit T was 2 min at 50°C and then heating at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s and then 60°C for 45 s for annealing and extension. Positive controls were prepared with DNA extracted from pure MAP strains. For comparison between the 2 detection systems, the number of cycles for analysis with qPCR system T was increased to 45. A test was considered positive with at least 1 cycle threshold (Ct) value under 38.

2.3.5. Detection Limit

The detection limit was evaluated using theoretical considerations as well as experimental evaluations. The theoretical detection limit was defined according to the manufacturer's

protocol for each of the 3 DNA extraction kits. The procedures included different dilution steps and used different fractions of the working solution in their respective strategies, which are summarized in Table 1. To define the experimental detection limit of each kit, fecal samples from a healthy 6-yr-old cow from a paratuberculosis-free herd that tested negative by ELISA and bacterial culture over a 2-yr period were used. The feces were spiked with different amounts of living MAP (strain 39382), ranging from 10 to 1 million bacteria per gram of fecal material. Optical density was used to quantify MAP, because PCR and turbidity correlate well (Elguezabal et al., 2011). The absorbance ($A_{600\text{nm}}$) of the bacterial suspension was measured weekly to assess bacterial growth. After 10 wk, cells were harvested, washed with sterile PBS (pH 7.4), and then resuspended in PBS. The suspension was passed through a 26 gauge needle to disperse the clumps, and MAP concentration was evaluated by optical density as described elsewhere (Janagama et al., 2006; Shin et al., 2007; Zhu et al., 2008; Kralik et al., 2012; Plain et al., 2014). Spiked samples were then processed with each DNA extraction kit and analyzed by qPCR using both detection kit T and detection kit V. In addition to our analysis on artificially spiked samples, we also studied feces from naturally infected cows. Fecal samples from 6 high-, medium-, and low-shedding cows were extracted with the 3 different extraction kits and compared by qPCR using either detection kit T or V (with assays performed in triplicate) to assess their practical sensitivity.

Estimates of Ge in the suspensions of MAP were made by calculations using the molecular weight of MAP described previously (Li et al., 2005). The concentration of MAP in the suspension from 5 different strains isolated from clinical cows (gift from Dr. Jeroen De Buck, University of Calgary, Calgary, AB, Canada) was confirmed by both culture (direct evaluation) and qPCR. Standard curves using serial dilutions of MAP DNA were used to reveal the expected Ct values for different amounts of MAP Ge. The concentration of the working MAP suspension with an optical density of 0.7 $OD_{600\text{nm}}$ was confirmed to be 2×10^9 to 2.5×10^9 cfu/mL. Genomic DNA and DNA quality were evaluated using NanoDrop spectrophotometry, and serial dilutions were used to evaluate the detection limit of qPCR systems T and V.

2.3.6. Ethics Statements

All animal procedures were carried out according to the Canadian Council on Animal Care guidelines for institutional animal use, and ethical approval for the study was obtained from the Agriculture and Agri-Food Canada Animal Ethics Committee (Protocol 362).

2.3.7. Statistical Analysis

Results are expressed as means \pm standard deviations. Significant differences between the kits were calculated using the GLIMMIX procedure for generalization of our results in a linear model, followed by a Tukey's test. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

2.4. RESULTS

2.4.1. Sensitivity of MAP Detection in Spiked Feces

Extractions were performed using feces that had been artificially contaminated with a specific number of MAP units, from 50 to 50,000 cfu/g of feces. The DNA extracted with the different kits were then analyzed in combination with qPCR system V or T. Overall, MAP detection was improved using qPCR system T rather than system V (Table 2). Coupled with qPCR system V, kit C performed the best using artificially infected samples, detecting feces spiked with 5,000 cfu/g, but showed late Ct values of 40. At 50,000 cfu/g, all kits permitted MAP detection in combination with qPCR system V, but sensitivity differed greatly: kits B and C presented similar Ct values of 38.19 ± 0.96 and 37.87 ± 2.26 , respectively, whereas the sensitivity of kit A was poor, with very late PCR detection (43.47 ± 0.71). With qPCR system V, the average performance of kits B and C was 38 and 49 times better, respectively, than that of kit A, based on a twofold PCR amplification. When the DNA extraction kits were used in combination with qPCR system T, their sensitivity was improved. Kits A, B, and C could detect MAP in feces spiked with 500 cfu/g. At this level of spiking, no significant difference in Ct values was observed, but kit C would have appeared better if not for the larger variation among replicates (Table 2). At 50,000 cfu/g, a marked gap appeared between kit A on one hand and kits B and C on the other (220- and 273 fold differences, respectively). At 50 cfu/g, the signal was lost, and none of the kits permitted MAP detection.

1 **Table 2. Comparison of the three DNA extractions kits evaluated by quantitative PCR (qPCR) in feces artificially spiked with**
 2 **Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP)¹**

Fecal sample spiked with MAP (cfu/g)	qPCR system V						qPCR system T					
	Extraction kit											
	A		B		C		A		B		C	
(no MAP)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
500	ND	ND	ND	ND	ND	39.21	(0.07) ^a	38.08	(0.74) ^a	36.86	(1.61) ^a	
5,000	ND	ND	40.00	(0.36)		37.83	(2.26) ^a	35.03	(1.28) ^a	32.44	(0.15) ^a	
50,000	43.47	(0.71) ^a	38.19	(0.96) ^b	37.87	(2.26) ^b	36.03	(0.58) ^a	28.25	(0.29) ^b	27.94	(0.09) ^b

3 ^{a,b}Mean cycle threshold values within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

4 ¹The coefficient of variation is shown in parentheses. ND = not detectable.

2.4.2. Sensitivity of the Extraction Kits in Natural MAP Shedders

The detection of cows shedding MAP at different levels was assessed with the 3 DNA extraction kits combined with either qPCR system T or V (Figure 4). In the high-shedding cows, MAP was detected with all DNA extraction kits coupled with either detection system V or T. Cycle threshold values that were significantly lower, by 8 to 10, were obtained with qPCR system T. The performance of kits B and C was similar, whereas kit A reported the lowest sensitivity with both detection systems. In the medium shedders, system T also showed the best qPCR sensitivity, detecting MAP in all 6 cow replicates (6/6) of kits A and B with mean Ct values of 35.86 and 31.91, respectively. For kit C, however, only qPCR detection system V could detect the moderate shedders, and only at high Ct values. Quantitative PCR detection system V performed better (6/6) with its companion extraction kit C, whereas detection was positive for only 1/6 with kit A and 4/6 with kit B. Even though qPCR system V detected MAP, its sensitivity was very low, with Ct values around 40. In the low shedders, qPCR system V could not detect MAP in any of the kit extracts. When DNA extraction kit A was used to detect MAP in the low-shedding cows, there was no signal at all. Overall, no detection was seen in the low shedders using qPCR system V. In contrast, the combinations of kit C with system T and kit B with system T permitted the detection of 1/6 and 3/6 with mean Ct values of 38.29 and 38.16, respectively.

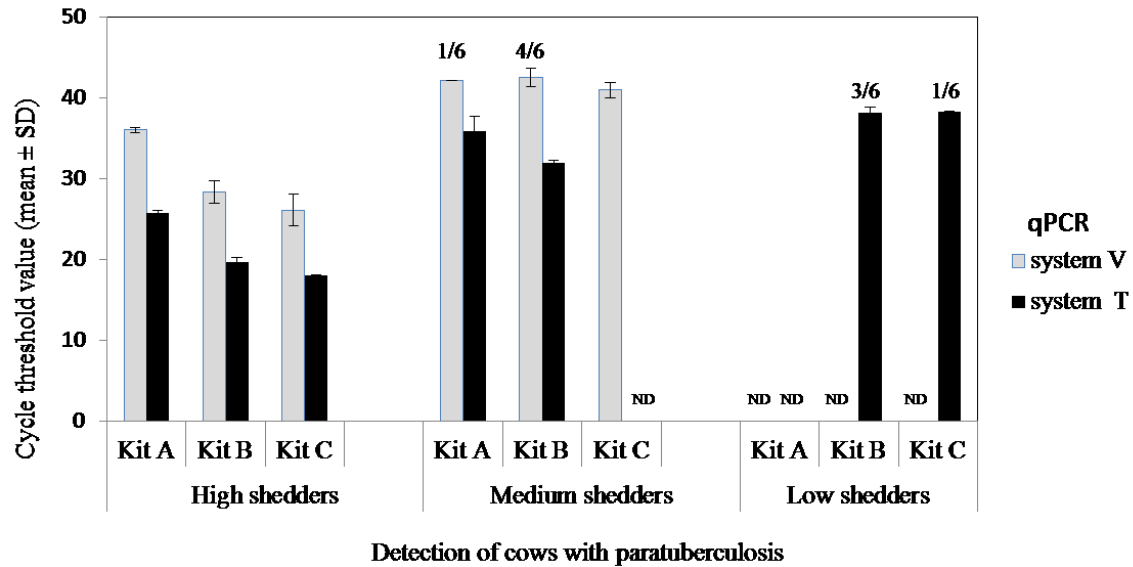


Figure 4. Detection of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis (MAP) by quantitative PCR (qPCR) in feces extracted with different commercial kits from cows grouped according to their shedding level. Samples from 6 different that were shedding high, moderate, or low amounts of MAP were grouped as follows: high shedders (>100 cfu per media tube), medium shedders (10–100 cfu per media tube), and low shedders (<10 cfu per media tube). Detections were repeated 6 times for each sample. When replicates did not permit positive detection, the number of positive tests is indicated. The abbreviation “ND” (not detectable) is used when no detection was reported for all replicates.

2.4.3. Range of PCR Sensitivity Analysis

The number of Ge of detectable MAP using qPCR system T was evaluated. The extraction of DNA from different MAP strains (A1 42, A1 75, A1 76, A1 92, and A1 139) was performed (Figure 1), and the capacity to detect MAP by qPCR using kit T was evaluated using serial dilutions ranging from 0.001 to 10 pg of genomic DNA. The Ct values were then recorded and associated with their corresponding number of MAP genome copies based on the molecular weight evaluated at 3.7×10^9 . All strains except A1 75 presented similar results in terms of minimal Ct values for detecting 1 genome,

with average Ct values ranging from 35.10 to 36.88 for 0.005 pg of MAP. The detection of strain A1 75 always resulted in a difference of 2 in Ct values in comparison with the slopes of the other strains. Interestingly, this isolated strain is the bison type (Ahlstrom et al., 2016). Repeated detections of the serial dilution points were 100% successful for all strains down to 1 MAP genome copy. At 0.2 genome copy, 50% sample detection was observed. The signal was lost below that level (“ND”; Figure 5).

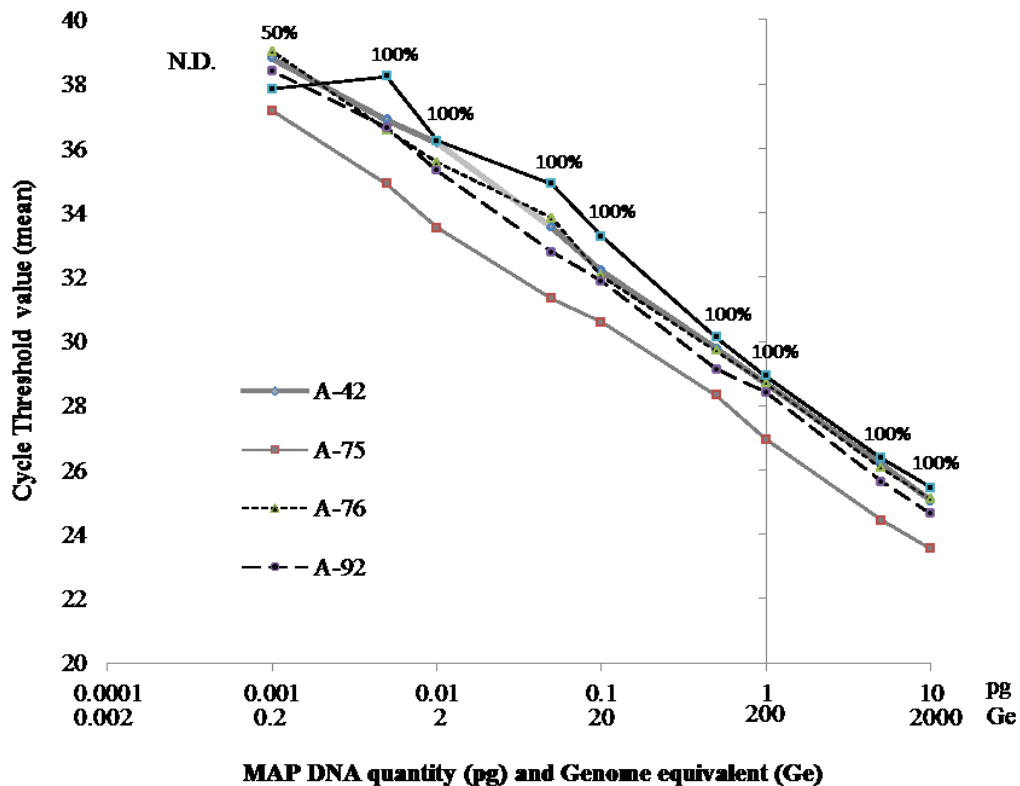


Figure 5. Detection of different strains of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis (MAP) by quantitative PCR (qPCR). Bacterial genomic DNA was extracted from 5 strains of MAP (A1-42, A-75, A-76, A-92, and A1-139). Serial dilutions of known amounts of DNA corresponding to known quantities of genome equivalents (Ge) were quantified by qPCR. Each sample quantification was repeated 6 times. Detection rates are presented as percentages.

2.4.4. Comparison of DNA Extraction Kits in Commercial Herds

The 3 DNA extraction kits were used in combination with qPCR system T on 49 cows from different herds. These cows had been previously diagnosed by fecal culture and ELISA assay and classified on the basis of their results: positive only by fecal culture, positive only by serum ELISA, or double positive (positive by both tests). Eight aliquots of the same feces sample from each cow were tested, and the number of positive extracts was recorded for the respective DNA extraction kit (Table 3). The cows were classified according to the score obtained in the 8 repetitive detections. Kits A, B, and C detected MAP in the double-positive group (7 cows) at rates of 43%, 100%, and 29%, respectively. It should be noted that the 2 double-positive cows detected with kit C had only 2/8 and 1/8 positive PCR replicates, respectively. In the fecal-culture-positive group (2 cows negative by serum ELISA), the detection rates of kits A and C were null, whereas kit B generated a steady diagnosis for 1 of the 2 cows (8 positive repetitions) but no detection for the second cow. The detections made in the ELISA-positive group were less successful for kits A and C: only 1 out of the 15 ELISA-positive cows could be detected in more than half of the repetitions for each kit, with both scores being 7/8. Kit A could detect a second cow but with low sensitivity (2/8), and that kit's overall success rate was 14%, representing 2 out of 15 cows. Kit B performed well by diagnosing 7 cows (47%) with more than half of the repetitions being detected. It should be noted that from the 14 cows that were negative by both fecal culture and ELISA assay in the first sampling, at least 1 positive result was obtained in further sampling a few months later. This "false" negative group of cows was distinguished from the "healthy" cow at first sampling and can be found in Table 2 under the "fecal-culture and ELISA negative" (false negative) group. The highest detection rate was obtained with kit B, at 29% detection. Concerning these subclinical cows, kit C detected only 1 cow with low sensitivity (2/8), whereas kit B was more sensitive (8/8) for detecting this cow. Kit A failed to detect any subclinical cows. With respect to the 11 healthy cows, no kit had any detection for this group. Overall, kit B performed better than the others. Out of the 34 cows that were found positive by bacterial culture of their feces, serum ELISA, or both assays at first sampling, 12 cows were found positive by qPCR (system T) over more

than 4/8 replicates, meaning that kit B detected significantly more positive cows than kit A ($P < 0.05$) or kit C ($P < 0.01$) did.

Table 3. Evaluation of paratuberculosis diagnosis by quantitative PCR in commercial herds using different DNA extraction methods

DNA extraction method	Number of replicates that tested positive ¹	Double positive (7) ²	Fecal-culture positive (2) ²	ELISA-assay positive (15) ²	Fecal-culture and ELISA-assay negative (14)	Healthy (11)
Kit A	0/8	4 (57%)	2 (100%)	13 (86%)	14 (100%)	11 (100%)
	<4/8	0	0	1 (7%)	0	0
	>4/8	3 (43%)	0	1 (7%)	0	0
	Total detection	43%	0%	14%	0%	0%
Kit B	0/8	0	1 (50%)	8 (53%)	10 (71%)	11 (100%)
	<4/8	0	0	3 (20%)	3 (22%)	0
	>4/8	7 (100%)	1 (50%)	4 (27%)	1 (7%)	0
	Total detection	100%	50%	47%	29%	0%
Kit C	0/8	5 (71%)	2 (100%)	14 (94%)	13 (92%)	11 (100%)
	<4/8	2 (29%)	0	0	1 (7%)	0
	>4/8	0	0	1 (6%)	0	0
	Total detection	29%	0%	6%	7%	0%

¹Each individual's sample was analyzed in 8 repetitions; results are grouped depending on the number of replicates detected as positive in each category.

²Cows that were found positive by both bacterial culture of their feces and serum ELISA assay are called “double positive”. Cows that were found positive by culture only are called “fecal-culture positive”; these cows had negative results by serum ELISA at the first sampling. The cows in the ELISA-assay positive group had no fecal-culture-positive results.

2.5. DISCUSSION

We evaluated 3 fecal DNA extraction procedures coupled with 2 different qPCR systems for the identification of subclinical cows from herds with a low prevalence of paratuberculosis. Our results contrast with the theoretical detection limit of each kit (Table 4). Kit C should have outperformed the other kits because of the larger amount of feces used in its protocol, considering the theoretical number of bacteria that can likely be found in the volume required for 1 qPCR assay. At first glance, the theoretical performance of kit C appears better, given that kit C should be able to obtain 1 MAP Ge per PCR reaction from a sample containing 20 cfu/g of feces, whereas fecal samples extracted using kit A or B would require nearly 500 or 200 cfu/g, respectively, to reach a similar Ge sensitivity. However, 50% of the 24 cows identified positive by serum or fecal culture or both at the first sampling were detected in more than half of the repetitions (>4/8) by kit B, in comparison with 17% and 4% by kits A and C, respectively (Table 3). These DNA extraction kits had been tested previously by another group (Leite et al., 2013). In that previous study, the kit that performed the most poorly was also kit C.

These results also differed from those of the spiked samples, for which differences were not significant for low-MAP samples (500 cfu/g) (Table 2). The reasons for the discordant results from the spiked and naturally infected samples, particularly with kit C, are not clear. It is possible that decantation in the pretreatment step for the fecal matter affects sensitivity. The MAP bacterium may be bound within the naturally infected fecal matter in a structure that is decanted more easily than dispersed MAP in spiked samples is. Clumps of MAP are largely reduced when the MAP culture is passed through the needle to measure the turbidity of the bacterial suspension and to determine its concentration before spiking. Although the 3 DNA isolation kits use bead beating for cell disruption, a method previously described as improving MAP detection (Odumeru et al., 2001), decantation may reduce sensitivity with naturally infected feces in contrast with spiked samples. The kit B procedure does not have a decantation step, instead using direct bead beating of the fecal matter followed by column-based DNA purification, which explains the success of this strategy.

Table 4. Theoretical sensitivity of the extraction techniques¹

Artificially spiked feces	MAP extraction kit A		MAP extraction kit B		MAP extraction kit C	
	Concentration of genome equivalents		Concentration of genome equivalents		Concentration of genome equivalents	
	In total extract (50 µL)	In qPCR rxt (8 µL) ²	In total extract (100 µL)	In qPCR rxt (8 µL) ²	In total extract (50 µL)	In qPCR rxt (2.5 µL) ³
cfu/g						
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
10	0.1	0.0	0.7	0.1	10.8	0.5
100	1.2	0.2	6.7	0.5	108.1	5.4
1,000	11.6	1.9	66.7	5.3	1,081.1	54.1
10,000	116.1	18.6	666.7	53.3	10,810.8	540.5
100,000	1,161.1	185.8	6,666.7	533.3	108,108.1	5,405.4
1,000,000	11,610.6	1,857.7	66,666.7	5,333.3	1,081,081.1	54,054.1

¹According to the manufacturer's protocol, a fraction of the initial volume of fecal sample is processed and is eluted in a final recommended volume specified in the protocol. The volume equivalence of the fecal material is evaluated to 1 mL/g of feces. The final dilution factor of the respective kits was evaluated as suggested to 0.039 for kit A, 0.444 for kit B, and 0.541 for kit C. MAP = *Mycobacterium avium* ssp. *Paratuberculosis*; qPCR = quantitative PCR; rxt = reaction.

²DNA extraction kits A and B were associated with qPCR system T. The volume used with this method is 8 µL.

³The performance (sensitivity) of DNA extraction kit C was calculated with its companion qPCR system using 2.5 µL. Because detection was totally lost using 8 µL of the extract's kit C (data not shown), it is thus nonsensical to report the theoretical yield with 8 µL. The theoretical yield was calculated using 2.5 µL, which is the volume used in kit C's companion qPCR system, system V.

Combined with qPCR system T, which uses the multicopy ISMAP02-specific target, kit B provided the highest sensitivity and perfect specificity. The detection limit with qPCR system T was confirmed using 0.2 to 1 Ge, corresponding to 0.0005 to 0.001 pg of MAP, and was found to be around 37 to 39 Ct (Figure 5); that DNA quantity is in keeping with the quantity reported in another study (Plain et al., 2014). In the artificially spiked feces, all 3 DNA extraction kits coupled with qPCR system T performed equivalently in the detection of MAP at a signal corresponding to the detection limit by real-time PCR of MAP (around 37–39 Ct).

As reported by Leite et al. (2013), better DNA yield does not correlate with better detection. Although fecal samples extracted with kit C gave the highest DNA concentrations, ranging from about 350 to 470 ng/ μ L (Table S1), kit C performed considerably poorly in low shedders (Figure 4) and infectious cows (Table 3). This lack of sensitivity may not be attributable to the inhibitory effect of high amounts of DNA, because inhibition in real-time PCR is observed with more than 10 μ g of DNA (Radomski et al., 2013). The poor performance of kit C could be explained by the low DNA integrity on gel electrophoresis (Figure S1) or by the presence of PCR inhibitors, given that is a problem usually associated with fecal material (Monteiro et al., 1997; Thornton and Passen, 2004). Fecal suspensions are often diluted in most protocols in order to decrease the concentrations of PCR inhibitors, but this strategy undeniably reduces PCR sensitivity. An easy way to estimate the presence of inhibitors is to run dilutions of the sample. A series of 1/10 dilutions of the spiked fecal samples revealed that the expected 3.3 Ct difference between the crude 2.5 μ L samples and the 1/10 samples was reduced to 1 Ct with both qPCR system T and qPCR system V. This finding suggests the presence of PCR inhibitors that were not found with dilutions of the kit A or B extracts (data not shown). Even though the protocol for kit C starts with 2 g of feces, this kit's performance was unsatisfactory, because only 22% (2/9) of the fecal-culture-positive cows were detected in these naturally infected samples.

Table S1. Comparison of DNA extraction kits for quantity of sample used, average DNA yield, average estimated DNA concentration obtained, and average estimated DNA purity¹

Kit	Sample size (mg)	DNA concentration ² (ng/μL)	DNA yield (ng)	Average DNA yield per sample (ng/100 mg)
A	300	12.19 ± 0.79 ^a	609.5 ± 39.5 ^a	203.17 ± 13.17 ^a
B	150	19.48 ± 2.82 ^c	1,948.0 ± 282.0 ^c	1,298.67 ± 188.00 ^a
C	2,000	413.06 ± 61.27 ^b	20,653 ± 3,063.5 ^b	1,032.65 ± 153.18 ^a

^{a-c}Significant differences between kits are represented by different superscript letters ($P < 0.01$).

¹Yield and concentration of DNA were determined by fluorescence measurement, and DNA purity (absorbance) was determined by spectrophotometry. Yield of DNA was averaged across all 392 samples (8 replicates of the respective 49 individual feces) within each kit. Data are expressed as means ± standard error of measurement.

²The final elution volume was 50 μL for kits A and C and 100 μL for kit B.

The sensitivity of kit A for artificially spiked feces is consistent with the theoretical value, with a detection limit of 500 cfu/g (Table 2). Indeed, the theoretical MAP load of the starting feces that gives a Ct value of nearly 38, which corresponds to a minute amount or fraction of Ge (Figure 5), ranged from 100 to 1,000 cfu/g. Thus, the theoretical sensitivity and the observed detection limit from artificially spiked samples using kit A are concordant. However, the performance of this kit with naturally infected samples is very poor, given that it detected only 33% of the culture-positive samples (3/9). In addition, the magnetic bead disruption kit A also provided the poorest Ct values, detected only 1/6 moderate shedders, and failed to detect low shedders (Figure 4). Even though the best DNA quality was achieved using a magnetic bead purification system, the beads may limit the amount of DNA that magnetically bond, a situation that is unfavorable for low-MAP-abundant samples. To obtain additional

information, we evaluated the performance of the extraction kits with a range of different amounts of MAP in spiked samples. The Ct gap between the 10 fold different concentrations should be 3.3 but was nearly 1 for kit A (39.21 ± 0.07 versus 37.83 ± 2.26 versus 36.03 ± 0.58). In contrast, both kit B and kit C performed better with low-abundant MAP levels in the artificially spiked feces, given an approximately 3 Ct difference between 1/10 MAP dilutions (Table 2). Kits B and C are thus better able to quantify the bacterial load or shedding level in feces.

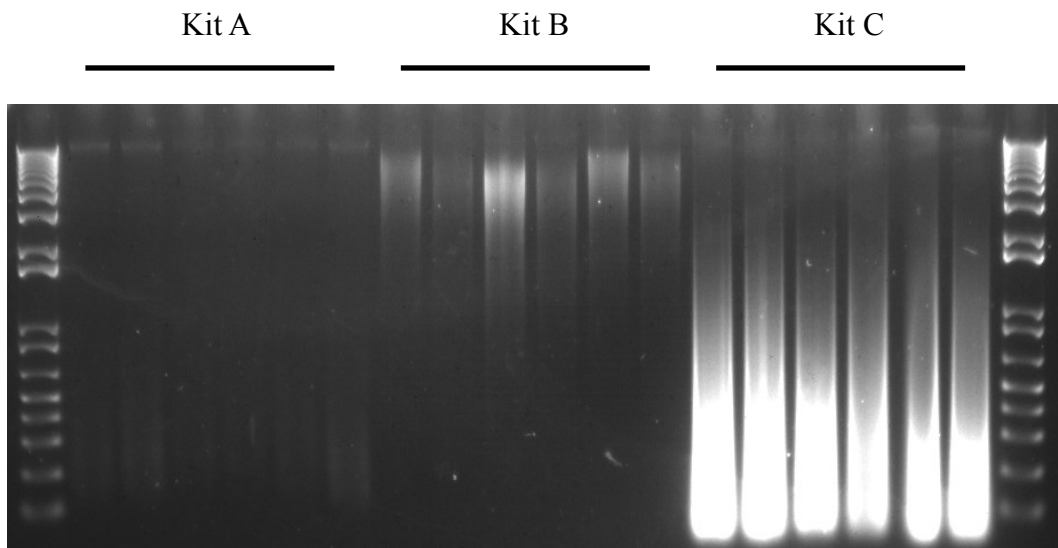


Figure S1. Integrity of DNA extracted with different commercial kits visualized on agarose gel. Fecal samples from 6 cows were processed with DNA extraction kits A, B and C and isolated DNA integrity was then compared after electrophoresis on 1% agarose gel.

In our experiments, the sensitivity of detection dropped radically when DNA samples were analyzed with qPCR system V. This system was initially designed for use with kit C and performed better with its companion kit for moderate shedders (Figure 4), as previously described (Leite et al., 2013). For high shedders, the combination of kit C with its companion system V could not achieve results as sensitive as those obtained with qPCR system T (lower Ct values). The gap in performance could be due to the specific qPCR target, given that HspX

(system V) is represented by 1 single copy per Ge, whereas ISMAP02 (system T) is found in 6 to 8 copies (Stabel and Bannantine, 2005; Kralik et al., 2011). That trend was also confirmed in naturally contaminated fecal samples. The low scores (<8/8) for positive detection in low-shedding cows reflect the probability of a low-abundant event around Ct values of 38. This phenomenon of rare-event probability is observed when the likelihood of detection decreases below 100%, in agreement with a previous report (Plain et al., 2014). It is difficult to determine whether Ct values around 38 are due to passive through, the phenomenon of MAP being ingested from contaminated feed and then being detected in the feces without causing disease (Kralik et al., 2014). However, PCR detection of positive cows was observed around Ct values of 38 corresponding to 1 Ge for non-bison strains. To date, very few studies have evaluated the impact of repetitions on the sensitivity of the PCR system. Considering the high number of low shedders, this fact suggests that repetitions and an appropriate DNA extraction kit combined with most sensitive qPCR systems should improve the detection of subclinical cows.

The identification of shedding cows is essential to prevent the spread of paratuberculosis in herds. However, it has been reported that only 38% of true-positive cows can be detected by culture in the first sampling because of low shedding (Whitlock et al., 2000b). It was quite obvious that kit B performed the best overall, detecting 7 cows out of the 9 culture-positive cows with a PCR score greater than 4/8 as well as 5 cows that tested negative at the first culture but were found positive at a later stage. Interestingly, the sensitivity of kit B might permit the detection of paratuberculosis-positive cows that are in the early subclinical stage (not advanced enough for the disease to be detectable by ELISA or fecal culture). Direct fecal qPCR represents a good alternative for the diagnosis of herds. However, choosing the right DNA extraction kit associated with a compatible specific and sensitive PCR technology is mandatory. Our results show that kit B is highly recommended over the others for DNA extraction from naturally infected fecal samples and is compatible with qPCR system T. We observed that the use of repetitions improves sensitivity, as observed elsewhere (Plain et al., 2014). Although 1 test should be adequate for confirmation that an animal with intermittent

diarrhea or other signs associated with the disease is positive, detecting low shedders with the highest sensitivity should include repetitive DNA extractions. When these recommendations are combined, the quality of diagnosis in herds should improve, and the prevention of the transmission of paratuberculosis would be more effective.

Manufacturers, Extraction Kits, and qPCR Detection System References

- A MagMAX Total Nucleic Acid Isolation Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA.
- B ZR Fecal DNA Miniprep, Zymo Research Corp., Irvine, CA, USA.
- C MAP Extraction System, Tetracore Inc., Rockville, MD, USA.
- T TaqMan MAP (Johne's) Reagents, Life Technologies, Foster City, CA, USA.
- V VetAlert Johne's Real-Time PCR, Tetracore Inc., Rockville, MD, USA.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that they had no conflict of interest regarding any aspect of this study.

2.6. ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by Agri-Food and Agriculture Canada (Project AAFC-1101). A special thank-you is given to the veterinarians and dairy producers for their valuable collaboration. We thank Émilie Constant and Catherine Thibault for their technical assistance and Dr. Olivia Labrecque of the Laboratoire d'épidémiologie animale du Québec for the MAP culture.

2.7. REFERENCES

- Ahlstrom, C., H. W. Barkema, K. Stevenson, R. N. Zadoks, R. Biek, R. Kao, H. Trewby, D. Hauptstein, D. F. Kelton, G. Fecteau, O. Labrecque, G. P. Keefe, S. L. McKenna, K. Tahlan, and J. De Buck. 2016. Genome-Wide Diversity and Phylogeography of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Canadian Dairy Cattle. *PLoS One* 11(2):e0149017.
- Amaro, A., E. Duarte, A. Amado, H. Ferronha, and A. Botelho. 2008. Comparison of three DNA extraction methods for *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Lett Appl Microbiol* 47(1):8-11.
- Arango-Sabogal, J. C., G. Côté, J. Paré, O. Labrecque, J. P. Roy, S. Buczinski, E. Doré, J. H. Fairbrother, N. Bissonnette, V. Wellemans, and G. Fecteau. 2016. Detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in tie-stall dairy herds using a standardized environmental sampling technique. *Can J Vet Res* 80(3):175.
- Beard, P. M., M. J. Daniels, D. Henderson, A. Pirie, K. Rudge, D. Buxton, S. Rhind, A. Greig, M. R. Hutchings, I. McKendrick, K. Stevenson, and J. M. Sharp. 2001. Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *Journal of clinical microbiology* 39(4):1517-1521.
- Bogli-Stuber, K., C. Kohler, G. Seitert, B. Glanemann, M. C. Antognoli, M. D. Salman, M. M. Wittenbrink, M. Wittwer, T. Wassenaar, T. Jemmi, and B. Bissig-Choisat. 2005. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss dairy cattle by real-time PCR and culture: a comparison of the two assays. *J Appl Microbiol* 99(3):587-597.
- Chi, J., J. A. VanLeeuwen, A. Weersink, and G. P. Keefe. 2002. Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum*. *Preventive veterinary medicine* 55(2):137-153.

- Chiodini, R. J., H. J. Van Kruiningen, and R. S. Merkal. 1984. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *The Cornell veterinarian* 74(3):218-262.
- Chui, L. W., R. King, P. Lu, K. Manninen, and J. Sim. 2004. Evaluation of four DNA extraction methods for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis by polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis* 48(1):39-45.
- Clark, D. L., Jr., J. J. Koziczkowski, R. P. Radcliff, R. A. Carlson, and J. L. Ellingson. 2008. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis: comparing fecal culture versus serum enzyme-linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction. *J Dairy Sci* 91(7):2620-2627.
- Clarke, C. J. 1997. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *Journal of comparative pathology* 116(3):217-261.
- Collins, M. T. 1996. Diagnosis of paratuberculosis. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 12(2):357-371.
- Collins, M. T. 2002. Interpretation of a commercial bovine paratuberculosis enzyme-linked immunosorbent assay by using likelihood ratios. *Clin Diagn Lab Immunol* 9(6):1367-1371.
- Dargatz, D. A., B. A. Byrum, L. K. Barber, R. W. Sweeney, R. H. Whitlock, W. P. Shulaw, R. H. Jacobson, and J. R. Stabel. 2001. Evaluation of a commercial ELISA for diagnosis of paratuberculosis in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 218(7):1163-1166.
- Elguezabal, N., F. Bastida, I. A. Sevilla, N. Gonzalez, E. Molina, J. M. Garrido, and R. A. Juste. 2011. Estimation of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis growth parameters: strain characterization and comparison of methods. *Appl Environ Microbiol* 77(24):8615-8624.

Ellingson, J. L., C. A. Bolin, and J. R. Stabel. 1998. Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and application to diagnosis of *paratuberculosis*. *Mol Cell Probes* 12(3):133-142.

Fecteau, M. E. and R. H. Whitlock. 2011. Treatment and chemoprophylaxis for *paratuberculosis*. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 27(3):547-557, v.

Gonda, M. G., Y. M. Chang, G. E. Shook, M. T. Collins, and B. W. Kirkpatrick. 2007. Effect of *Mycobacterium paratuberculosis* infection on production, reproduction, and health traits in US Holsteins. *Preventive veterinary medicine* 80(2-3):103-119.

Herthnek, D. and G. Bolske. 2006. New PCR systems to confirm real-time PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *BMC Microbiol* 6:87.

Janagama, H. K., K. Jeong, V. Kapur, P. Coussens, and S. Sreevatsan. 2006. Cytokine responses of bovine macrophages to diverse clinical *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains. *BMC Microbiol.* 6:10.

Kabir, S. 2004. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in feces and saliva by polymerase chain reaction: a review. *Helicobacter* 9(2):115-123.

Kennedy, D. J. and G. Benedictus. 2001. Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. *Revue scientifique et technique* 20(1):151-179.

Khare, S., L. G. Adams, J. Osterstock, A. Roussel, and L. David. 2008. Effects of shipping and storage conditions of fecal samples on viability of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 46(4):1561-1562.

Kralik, P., V. Beran, and I. Pavlik. 2012. Enumeration of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by quantitative real-time PCR, culture on solid media and optical densitometry. *BMC Res Notes* 5:114.

- Kralik, P., R. Pribylova-Dziedzinska, A. Kralova, K. Kovarcik, and I. Slana. 2014. Evidence of passive faecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a Limousin cattle herd. *Vet J* 201(1):91-94.
- Kralik, P., I. Slana, A. Kralova, V. Babak, R. H. Whitlock, and I. Pavlik. 2011. Development of a predictive model for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faeces by quantitative real time PCR. *Veterinary microbiology* 149(1-2):133-138.
- Leite, F. L., K. D. Stokes, S. Robbe-Austerman, and J. R. Stabel. 2013. Comparison of fecal DNA extraction kits for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 25(1):27-34.
- Li, L., J. P. Bannantine, Q. Zhang, A. Amonsin, B. J. May, D. Alt, N. Banerji, S. Kanjilal, and V. Kapur. 2005. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(35):12344-12349.
- McKenna, S. L., G. P. Keefe, A. Tiwari, J. VanLeeuwen, and H. W. Barkema. 2006. Johne's disease in Canada part II: disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne* 47(11):1089-1099.
- Monteiro, L., D. Bonnemaïson, A. Vekris, K. G. Petry, J. Bonnet, R. Vidal, J. Cabrita, and F. Megraud. 1997. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J Clin Microbiol* 35(4):995-998.
- Odumeru, J., A. Gao, S. Chen, M. Raymond, and L. Mutharia. 2001. Use of the bead beater for preparation of *Mycobacterium paratuberculosis* template DNA in milk. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* 65(4):201-205.
- Paolicchii, F. A., M. J. Zumarraga, A. Gioffre, P. Zamorano, C. Morsella, A. Verna, A. Cataldi, A. Alito, and M. Romano. 2003. Application of different methods for the diagnosis of

paratuberculosis in a dairy cattle herd in Argentina. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health* 50(1):20-26.

Plain, K. M., I. B. Marsh, A. M. Waldron, F. Galea, A. M. Whittington, V. F. Saunders, D. J. Begg, K. de Silva, A. C. Purdie, and R. J. Whittington. 2014. High-throughput direct fecal PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in sheep and cattle. *J Clin Microbiol* 52(3):745-757.

Radomski, N., L. Kreitmann, F. McIntosh, and M. A. Behr. 2013. The critical role of DNA extraction for detection of mycobacteria in tissues. *PLoS One* 8(10):e78749.

Raizman, E. A., L. A. Espejo, and S. J. Wells. 2011. Long-Term Survival of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in Fecal Samples Obtained from Naturally Infected Cows and Stored at -18 degrees C and -70 degrees C. *Vet Med Int* 2011:341691.

Salgado, M., J. Kruze, and M. T. Collins. 2007. Diagnosis of paratuberculosis by fecal culture and ELISA on milk and serum samples in two types of Chilean dairy goat herds. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 19(1):99-102.

Shin, S. J., J. H. Han, E. J. Manning, and M. T. Collins. 2007. Rapid and reliable method for quantification of *Mycobacterium paratuberculosis* by use of the BACTEC MGIT 960 system. *J Clin Microbiol* 45(6):1941-1948.

Stabel, J. R. 1998. Johne's disease: a hidden threat. *Journal of dairy science* 81(1):283-288.

Stabel, J. R. and J. P. Bannantine. 2005. Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in fecal samples. *Journal of clinical microbiology* 43(9):4744-4750.

Taddei, S., C. Robbi, C. Cesena, I. Rossi, E. Schiano, N. Arrigoni, G. Vicenzoni, and S. Cavirani. 2004. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in bovine fecal samples: comparison of three polymerase chain reaction-based diagnostic tests with a

conventional culture method. Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc 16(6):503-508.

Thornton, C. G. and S. Passen. 2004. Inhibition of PCR amplification by phytic acid, and treatment of bovine fecal specimens with phytase to reduce inhibition. J Microbiol Methods 59(1):43-52.

Whan, L. B., I. R. Grant, H. J. Ball, R. Scott, and M. T. Rowe. 2001. Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water. Letters in applied microbiology 33(3):227-231.

Whitlock, R. H. and A. E. Rosenberger. 1990. Fecal culture protocol for *Mycobacterium paratuberculosis*. A recommended procedure. Proceedings Annual Meeting of the United States Animal Health Association 94:280-285.

Whitlock, R. H., S. J. Wells, R. W. Sweeney, and J. Van Tiem. 2000a. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. Veterinary microbiology 77(3-4):387-398.

Whitlock, R. H., S. J. Wells, R. W. Sweeney, and J. Van Tiem. 2000b. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. Vet. Microbiol. 77(3-4):387-398.

Zhu, X., Z. J. Tu, P. M. Coussens, V. Kapur, H. Janagama, S. Naser, and S. Sreevatsan. 2008. Transcriptional analysis of diverse strains *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in primary bovine monocyte derived macrophages. Microbes Infect 10(12-13):1274-1282.

CHAPITRE 3

UTILISATION DE LA PROLIFÉRATION LYMPHOCYTAIRE COMME D'UNE ÉPREUVE DIAGNOSTIQUE POUR LA PARATUBERCULOSE BOVINE

3.1. INTRODUCTION DU CONTEXTE

Ainsi que détaillé précédemment, la paratuberculose bovine est une maladie insidieuse, prenant de l'ampleur, et dont la prévalence est très probablement sous-estimée à ce jour. A cause de son arsenal de stratégies lui permettant de se cacher efficacement du système immunitaire de ses hôtes, la présence de MAP dans les animaux est difficile à détecter. Dans l'optique de développer un nouveau système de diagnostic sensible pour cette maladie, l'étude d'une réponse immunitaire spécifique chez la vache laitière est particulièrement intéressante. Grâce aux avancées sur l'établissement de la réponse humorale après une infection à MAP, il est désormais établi qu'une réponse de type Th2 peut être détectée précocement chez des animaux infectés (Waters *et al.*, 2003). De plus, alors que le système immunitaire inné présentera une réponse inflammatoire notable suite à toutes sortes de stimulations grâce à ses différents récepteurs, le système immunitaire adaptatif ne réagira de façon fortement visible que si ses cellules mémoires sont stimulées par leur antigène spécifique. Le test ELISA repose sur ce principe, étant dirigé contre des anticorps spécifiquement produits contre un antigène donné, mais est peu sensible. Il serait donc judicieux de regarder la réponse immunitaire d'un autre point de vue. Le dosage de l'IFN- γ , qui se trouve être à l'interface des réactions immunitaire innées et adaptatives, a également été étudié comme test diagnostique. Toutefois, sa spécificité fut décrite comme faible et le test n'est pas recommandé autrement que comme support ou analyse complémentaire (Jungersen *et al.*, 2002; Kalis *et al.*, 2003; Mikkelsen *et al.*, 2011). Plus récemment des études ont amené des résultats prometteurs quant à l'amélioration de la spécificité du test après stimulation des cellules par des protéines purifiées dérivées de Johnin (aussi appelées PPDJ) (Jungersen *et al.*, 2012) mais ces résultats ne sont

pour le moment pas retrouvés en stimulant les cellules avec des antigènes plus spécifiques à MAP (Holbert *et al.*, 2015).

À défaut d'analyser la production d'IFN- γ , l'étude de la prolifération des lymphocytes suite à une stimulation par un antigène spécifique pourrait servir à identifier des marqueurs pour dénoncer une nouvelle rencontre de cet antigène par les cellules, soit mettre en évidence une reconnaissance spécifique de MAP. De précieuses informations sur la prolifération lymphocytaire d'animaux atteints de paratuberculose ont été obtenues grâce à diverses études, mais ces recherches se sont concentrées sur l'action d'un type cellulaire à la fois. Actuellement, très peu d'études se sont penchées sur l'observation du comportement des lymphocytes dans leur ensemble. Le manque dans ces analyses repose probablement sur leur complexité due au nombre restreint de réactifs disponibles sur le marché pour les animaux d'élevage. L'intérêt de ce genre d'analyses est de pouvoir analyser le comportement des cellules dans des conditions plus proches des conditions physiologiques. Les différents types cellulaires interagissant *in vivo*, il n'est pas difficile d'imaginer que leur action diffère des études *in vitro* dans lesquelles elles sont isolées des autres types. Caractériser dans le même temps le ratio de chaque type lymphocytaire dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) de vaches laitières, ainsi que leur niveau de prolifération dans le cadre de la paratuberculose, pourrait permettre de sortir des profils utiles pour des analyses diagnostiques.

Dans le laboratoire du Dre. Nathalie Bissonnette, des analyses préliminaires ont montré une réponse intéressante des PBMCs provenant de vaches atteintes de la paratuberculose suite à une stimulation par une souche de MAP (Annexe 1). En effet, une infection des cellules par la souche 39382 à une MOI de 10 ne semblait pas provoquer de prolifération cellulaire, correspondant à l'anergie décrite dans la littérature. Toutefois, la capacité de prolifération de ces cellules restait fonctionnelle car elles ont eu un fort taux de prolifération suite à une stimulation avec de la concanavaleine A (conA), un agent mitogène. L'observation la plus importante de ces analyses préliminaires reste que l'utilisation simultanée de la conA avec

MAP pour la stimulation des PBMCs de ces animaux a provoqué une prolifération à des taux bien supérieurs que lors de la stimulation avec la conA seule. L'augmentation du pourcentage de prolifération semblait démontrer un effet synergique de la conA avec MAP quant à l'activation des lymphocytes. De plus, cette synergie n'était pas observée lors de la stimulation de PBMCs de vaches saines dans les mêmes conditions, on observait même un effet d'inhibition de la prolifération. Les travaux réalisés au cours de ce projet de maîtrise sont partis de ces observations. L'objectif était dans un premier temps de confirmer cette observation puis de caractériser les types cellulaires impliqués pour mieux comprendre le phénomène, pour finalement créer une méthode de diagnostic qui serait basée sur l'observation ou non de l'effet synergique entre MAP et la conA sur la prolifération des lymphocytes des animaux. L'intérêt de ces travaux repose sur la création d'une nouvelle méthode de diagnostic précoce, sensible et spécifique.

3.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.2.1. Isolement des cellules

Les analyses furent réalisées sur les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) primaires de vaches laitières adultes de la race Holstein provenant de fermes commerciales partenaires québécoises, aux statuts d'infection à la paratuberculose connus. Les animaux furent considérés positifs pour la paratuberculose en se basant sur une culture fécale, ELISA ou PCR positifs. Le sang des vaches a été prélevé au niveau de la veine caudale des animaux, dans des tubes de sang de 10mL contenant de l'EDTA comme anticoagulant. Immédiatement après l'échantillonnage, le sang est mélangé à l'EDTA par inversion répétée du tube pour une répartition homogène et optimale de l'anticoagulant. L'isolement des PBMCs à partir du sang entier s'est ensuite déroulé dans l'heure qui a suivi le prélèvement dans un laboratoire équipé d'une hotte à flux laminaire pour fins d'asepsie. Concernant l'isolement, le protocole utilisé est basé sur un protocole recommandé et publié pour les cellules humaines (Kanof *et al.*, 2001). Le sang entier a d'abord été dilué avec du RPMI à température ambiante (TP) puis

centrifugé à 1200G sans freins pendant 25 min à 19°C afin d'obtenir un « *buffy coat* » ou couche leucocytaire. À cette étape, le sang est divisé en 3 couches, à savoir : le plasma en surface, une mince couche contenant les PBMCs, puis les érythrocytes, ou globules rouges. Le plasma a d'abord été enlevé afin d'avoir accès plus facilement à la couche de leucocytes, puis celle-ci a été isolée et diluée une nouvelle fois avec du RPMI. La solution contenant les leucocytes a ensuite été délicatement déposée sur un volume égal de Ficoll Paque Plus (GE Healthcare Life Sciences) avant d'être centrifugée à 900g sans freins pendant 35 min à 19°C. La séparation des différentes phases par gradient de densité donne alors 4 couches : le plasma, la couche de leucocytes, une couche de Ficoll et finalement les érythrocytes. Comme précédemment, le plasma a été enlevé puis la couche de PBMCs a été récupérée. Les PBMCs ont alors été rincés avec du RPMI et centrifugés à 300g pendant 8min à TP afin d'éliminer les traces de Ficoll. Finalement, les PBMCs récoltés ont été purifiés grâce à l'utilisation de Red Blood Lysis Buffer (Sigma) puis rincés de nouveau avec du RPMI. Les cellules ont ensuite été resuspendues dans du RPMI puis dénombrées à l'aide d'un appareil compteur de cellules, Countess (Life Technologies).

3.2.2. Mesure de la prolifération cellulaire

Le taux de prolifération des cellules a été analysé grâce à un marquage des cellules par du Carboxyfluorescein Diacetate Ester (Life Technologies), aussi appelé CFSE. Ce composé va marquer de façon covalente les acides aminés, notamment la lysine, à l'intérieur des cellules. La détection des cellules marquées s'effectue après l'excitation au laser alors que le fluorochrome émettra une fluorescence détectable par cytométrie de flux. À chaque division cellulaire d'une cellule marquée, le CFSE sera partagé entre ses cellules filles et de ce fait, l'intensité de fluorescence émise par les cellules filles sera équivalente à la moitié de l'intensité de fluorescence de la cellule-mère. Rapidement, après l'isolement des PBMCs, $4 \cdot 10^7$ cellules ont été récupérées dans un falcon de 15mL et centrifugées à 500g pendant 5min afin d'éliminer le surnageant. Le culot de cellules a ensuite été resuspendu dans 1mL de HBSS stérile. Le falcon de 15mL est ensuite placé à l'horizontale, tel que décrit dans un

protocole publié précédemment (Quah and Parish, 2010), puis une goutte de CFSE diluée dans du HBSS a été déposée sur la partie supérieure sèche du falcon à une concentration permettant d'avoir 1mM final. Après avoir rebouché le falcon, les cellules ont été rapidement mélangées avec le CFSE par inversion afin d'obtenir un marquage homogène. Les cellules ainsi suspendues dans un mélange de HBSS et de CFSE ont alors été placées à l'incubateur à 39°C pendant 10min. Au terme de la période d'incubation, l'ajout de RPMI contenant 5% de sérum de veau fœtal froid suivi de 2 rinçages avec cette solution arrêtent le marquage. Finalement, après le dernier rinçage, les cellules ont été resuspendues dans du RPMI complété par 10% FBS et 2mM L-glutamine puis distribuées dans des plaques 96-puits selon les plans expérimentaux suivis à une concentration de $2,5 \cdot 10^5$ cellules par puits. La lecture du niveau de prolifération s'est faite après 3 jours d'incubation par un cytomètre de flux, BD FACS Canto II (BD Biosciences) en se basant uniquement sur les lymphocytes pour la création des « fenêtres de tri » (Annexe 2). Les lectures au cytomètre ont été faites sur un minimum de 10,000 événements par échantillon et en triplicatas.

3.2.3. Culture de MAP

La souche de MAP 39382 ainsi que les souches dénommées A1-75, A1-76, A1-92, A1-124, A1-139 et 60 nous ont été gracieusement fournies par les Dr. Behr (Université McGill) et De Buck (Université de Calgary) respectivement. Les souches ont été cultivées à 37°C avec agitation dans du bouillon de culture 7H9 supplémenté avec de l'OADC (Difco Laboratories) et de la mycobactine J (Allied Monitor).

3.2.4. Stimulation des cellules

Pour les tests de prolifération, les cellules ont été stimulées avec de la conA à 1µg/mL, ou avec MAP à une multiplicité d'infection (MOI) de 10. Rapidement, avant l'infection, les mycobactéries ont été resuspendues puis laissées à décanter 1min, le temps aux plus gros agrégats de se poser. Le surnageant contenant MAP a ensuite été récupéré, les mycobactéries

ont été rincées puis resuspendues dans du milieu frais. Elles ont alors été passées dans des aiguilles de gauge 26 plusieurs fois afin de défaire les agrégats. Le décompte des mycobactéries pour l'infection s'est basé sur une lecture de la densité optique à 600 nm au spectrophotomètre (Genesys uv10, Thermo Scientific) suivant la procédure décrite précédemment (Zhu *et al.*, 2008).

3.2.5. Immunomarquage des lymphocytes

La caractérisation des différents types cellulaires impliqués dans les analyses a été réalisée grâce à un marquage des cellules par un panel d'anticorps (Tableau 2). Le protocole utilisé fut adapté d'un protocole de marquage pour cytométrie de flux disponible dans la littérature (Baumjohann and Ansel, 2013). Rapidement, après l'incubation de 3 jours, les plaques contenant les cellules ont été centrifugées à 700g 5min à 4°C afin d'éliminer le surnageant de culture, puis les cellules ont été mises à incubation sur glace dans du PBS BSA 0,5% pendant 15min afin de bloquer les récepteurs non spécifiques avant le marquage. Les cellules ont ensuite été marquées en ajoutant les anticorps primaires à des concentrations préalablement établies par titration des anticorps sur glace pendant 30min à l'obscurité. Après l'incubation avec les anticorps primaires, les cellules ont été rincées 2 fois avec du PBS BSA 0,5% avec des centrifugations de 700g 5min, puis les cellules ont été mises à incuber avec les anticorps secondaires suivant : Goat anti-mouse IgG3-PE/Cy7 (Southern Biotech), Rat anti-mouse IgM-PerCP-Cy5.5 (Biolegend) et Goat anti-mouse IgG2b APC-CY7 (Southern Biotech), à des concentrations définies ultérieurement pendant 30min dans l'obscurité. Après quoi, les cellules ont été rincées 2 fois avec du PBS BSA, puis fixées avec l'ajout de formaldéhyde 2% pendant 30min.

Tableau 5. Liste des anticorps primaires utilisés pour la caractérisation des populations cellulaires

Clone	Marqueur	isotype	Fournisseur
LT21	CD21	IgG1	Novus Biological
CC63	CD8	IgG2a	Biorad
ILA116A	CD45R0	IgG3	WSU
BAG2B	WC1-N27 epitope	IgM	WSU
GB21A	Gamma delta TCR1-N24 δ -chain	IgG2b	WSU
CC8	CD4	IgG2a	Abd Serotec

Anticorps monoclonaux produits chez la souris avec différents épitopes pour le marquage

3.2.6. Analyses statistiques

Les résultats sont présentés en moyennes des valeurs obtenues lors des expériences. Les barres d'erreur représentent l'écart-type à la moyenne. Les différences significatives entre les conditions expérimentales ont été évaluées en effectuant un ANOVA à 2 facteurs avec variances hétérogènes.

3.3. RÉSULTATS

3.3.1. Synergie potentielle entre la conA et MAP

Dans un premier temps, l'objectif pour le projet était de confirmer l'observation qui avait été faite en 2014 dans le laboratoire au niveau de la synergie potentielle entre la conA et MAP lors de la prolifération cellulaire (Annexe 1). Ainsi, des essais de prolifération sur les PBMCs provenant de vaches positives ont été réalisés après stimulation par de la conA, du MAP ou la combinaison des deux (Figure 6A).

Comme attendu, le niveau de prolifération des cellules contrôles (Ctrl) est très faible, ainsi que le niveau de prolifération en présence de la souche 39382 de MAP (3,54%). Les cellules ont cependant conservé leur capacité marquée de proliférer comme le démontre la stimulation en présence de conA (39,58%). La combinaison de la conA avec MAP a induit un niveau de prolifération de 57,75%. Ces résultats corroborent les expériences préliminaires de 2014 (Annexe 1). De plus, on observe que la combinaison des agents stimulants provoque une réponse lymphoproliférative qui a tendance à être supérieure à l'addition théorique des niveaux de prolifération induits chez les cellules par chaque agent séparément (39,50% et 3,50%). Il est donc possible que l'ajout de conA avec MAP puisse avoir un effet synergique au niveau de la prolifération des lymphocytes de vaches malades. L'augmentation du niveau de prolifération des cellules induit par l'ajout de conA à l'infection par MAP a été observée sur les cellules de vaches malades. Il était donc intéressant de vérifier si ce phénomène était dû spécifiquement au statut des animaux. C'est pourquoi la même expérience a été réalisée à nouveau, mais cette fois à partir de leucocytes provenant de vaches saines (Figure 6B).

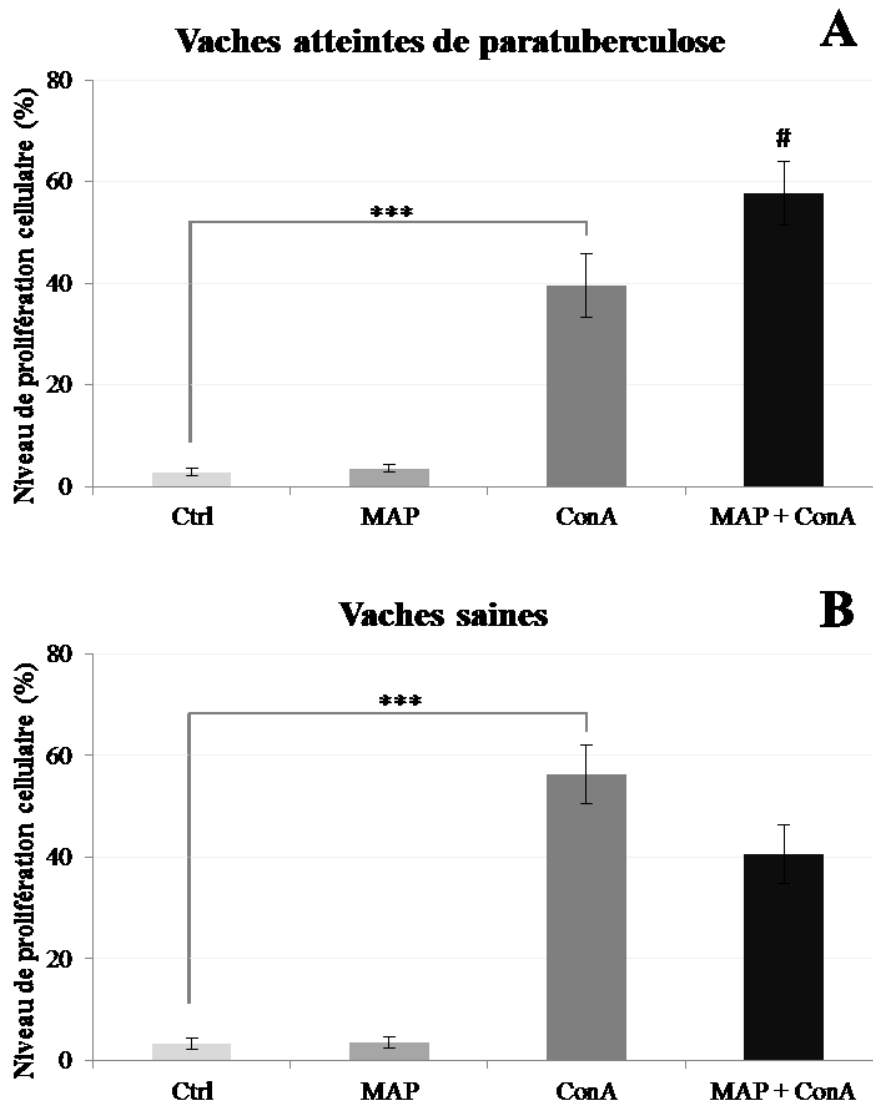


Figure 6. Réponse lymphoproliférative des PBMCs avec ou sans stimulation. Les PBMCs ont été isolées, marquées au CFSE puis mises à incubation pendant 3 jours avec soit 1µg/mL de conA, soit la souche 39382 de MAP à MOI 10, soit la combinaison des deux. A : PBMCs provenant de 3 vaches atteintes de paratuberculose ; B : PBMCs provenant de 3 vaches saines. On observe une différence significative au niveau de la prolifération des cellules entre les conditions Ctrl et ConA (***) ($P < 0.0001$) chez les vaches malades et les vaches saines. Une tendance est observable concernant l'interaction entre MAP et la conA (# = $P < 0.1$) mais seulement chez les vaches atteintes de paratuberculose.

Comme observé précédemment, la condition contrôle montre très peu de prolifération. La capacité de prolifération des cellules reste bonne, avec 56,22% de prolifération avec la conA. Comme observé avec les lymphocytes des vaches malades, l'infection avec la souche 39382 de MAP a entraîné peu voire pas de prolifération (1,50%) comparé au contrôle. Il est intéressant toutefois de noter que la combinaison de la conA et de MAP semble induire une prolifération cellulaire à un niveau moins élevé qu'avec la conA seule : on obtient 40,59% de prolifération cellulaire, ce qui est inférieur au niveau attendu si on devait obtenir un effet additif. Ces résultats suggèrent possiblement l'inhibition de la prolifération des lymphocytes de vaches saines lorsque ceux-ci sont stimulés avec la combinaison de la conA et de MAP, comparé au niveau prolifératif que l'on peut obtenir après stimulation avec la conA seule. Ainsi, ces résultats confirment l'observation qui avait été faite auparavant.

3.3.2. Caractérisation des populations cellulaires

Afin de pouvoir déterminer les types cellulaires impliqués dans le processus de prolifération des cellules lors d'une infection par MAP, un panel d'anticorps a été établi à partir des produits commerciaux disponibles pour le bovin. Le panel vise à reconnaître les différentes grandes familles de lymphocytes. Après avoir optimisé les conditions expérimentales de chacun de ses anticorps, une première analyse du marquage des PBMCs de vaches non atteintes de paratuberculose (n = 3) mis en culture pendant 3 jours avec ou sans stimulation a été réalisée afin d'obtenir un profil des populations de lymphocytes provenant d'animaux sains (Figure 7A). On observe dans la condition contrôle très peu de prolifération (4,39%). Les autres populations de cellules sont dans les valeurs décrites dans la littérature avec $14,32 \pm 1,88\%$, $23,84 \pm 7,48\%$ et $30,89 \pm 8,65\%$ des lymphocytes pour les cellules CD8+, CD4+ et CD21+ respectivement. Les populations de cellules T $\gamma\delta$, WC1+ et CD45RO+ représentent respectivement $15,42 \pm 7,35\%$, $5,72 \pm 1,75\%$ et $42,86 \pm 11,65\%$ des lymphocytes. On remarque que l'infection avec la souche 39382 de MAP ne semble pas affecter la prolifération, tel que le rapporte les ratios de cellules qui demeurent inchangés.

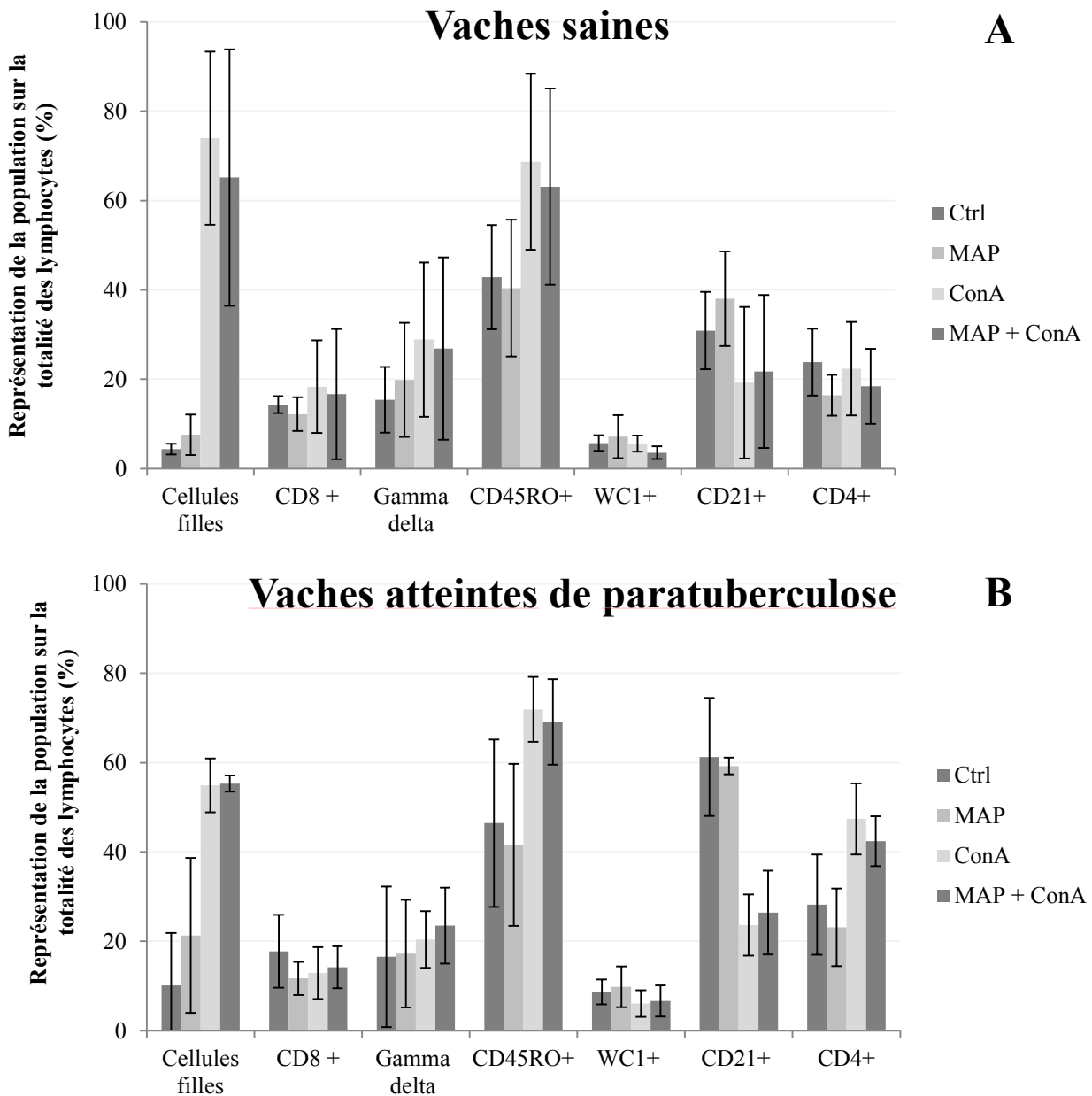


Figure 7. Caractérisation des populations lymphocytaires chez les vaches saines et infectées. Les PBMCs ont été isolés, marqués au CFSE puis mises à incubation pendant 3 jours avec soit 1µg/mL de conA, soit la souche 39382 de MAP à MOI 10, soit la combinaison des deux. Après incubation, les cellules ont été marquées avec un panel d'anticorps puis analysées au cytomètre de flux. A : PBMCs provenant de 3 vaches atteintes de paratuberculose ; B : PBMCs provenant de 3 vaches saines.

Ces résultats corroborent les observations antérieures (Figure 6). La stimulation avec la conA modifie toutefois le profil des populations. La quantité de cellules filles augmente jusqu'à représenter 73,96% des lymphocytes (Figure 7A). Le nombre de cellules T $\gamma\delta$, CD45RO+ et CD4+ semble également augmenter au détriment du pourcentage de cellules CD21+, qui passe alors à 19,23±16,84%. La combinaison de la conA et de MAP semble faire diminuer le nombre de cellules filles par rapport à la stimulation avec la conA seule (65,14%) mais autrement le profil des populations est similaire à celui observé pour la condition conA seule.

Dans le but de déterminer si les cellules de vaches atteintes de la paratuberculose présentaient des profils de populations lymphocytaires différents, la même expérience que celle décrite précédemment a été réalisée cette fois-ci sur 3 vaches positives pour la paratuberculose (Figure 7B). Au niveau de la prolifération, les cellules contrôles ont présenté un niveau basal de prolifération relativement élevé de 10,16%. Il est également intéressant de noter que les cellules stimulées avec MAP ont réagi de façon différente des analyses préliminaires, c'est-à-dire que l'on a observé 21,32% de cellules filles après infection. Au niveau des ratios de populations lymphocytaires, les cellules contrôles provenant de vaches infectées ont présenté des taux de cellules CD8+, CD4+, gamma delta, WC1+ et CD45RO+ semblables aux cellules des vaches saines, avec 17,76±8,14%, 28,21±11,24%, 16,54±15,70%, 8,69±2,78% et 46,43±18,71% respectivement. De même, le profil des populations stimulées avec la souche 39382 de MAP s'est révélé assez similaire à celui des cellules non stimulées (Ctrl). Toutefois, le niveau de cellules CD21+ présente était bien plus élevé que chez les vaches saines, représentant 61,27±13,24% de la population.

Après stimulation des cellules avec de la conA, les lymphocytes des vaches malades ont proliféré de façon importante, avec un taux de 54,88%. On n'observe toutefois aucun impact de cette prolifération au niveau des ratios des populations de cellules CD8+, Gamma delta et WC1+. Avec la stimulation à la conA, les populations de cellules CD4+ et CD45RO+ augmentent jusqu'à représenter 47,39% et 71,9% des lymphocytes. Globalement, les ratios des différents types de lymphocytes ne semblent pas différer entre les conditions conA et

MAP+conA. Il est important de noter que l'effet synergique observé au niveau de la prolifération des cellules n'est pas retrouvée, avec 55,3% de cellules filles en combinant MAP et la conA contre 54,87% de cellules filles pour la condition conA seule. Ainsi ces résultats ne semblent pas corrélés les observations faites auparavant.

3.3.3. Reprise des essais d'observation de la synergie conA/MAP

Au vu du problème de l'effet synergique de la conA avec MAP non retrouvé lors des essais de caractérisation des cellules, les essais de prolifération ont été renouvelés sur des animaux positifs pour la paratuberculose (Figure 8).

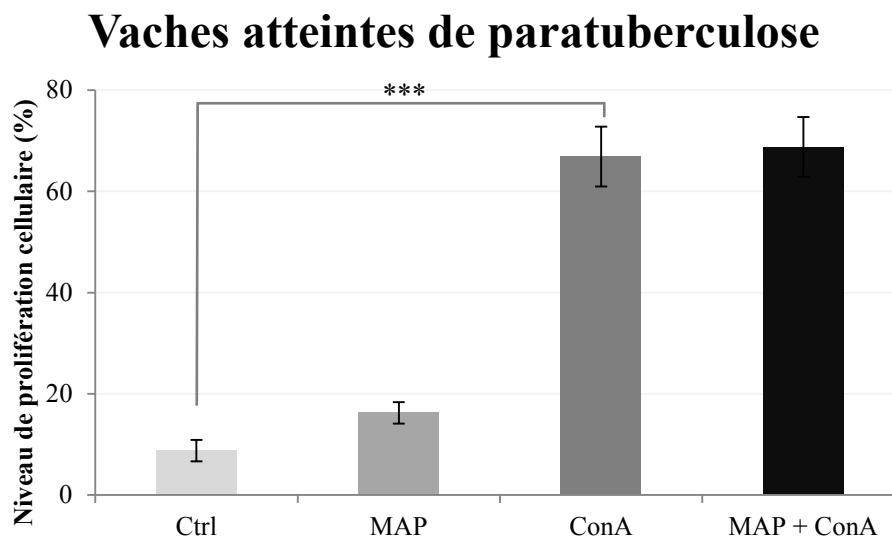


Figure 8. Réponse lymphoproliférative des PBMCs avec ou sans stimulation de vaches atteintes de paratuberculose. Les PBMCs provenant de 3 vaches positives pour la paratuberculose au diagnostic ont été isolées, marquées au CFSE puis mises à incubation pendant 3 jours avec soit 1µg/mL de conA, soit la souche 39382 de MAP à MOI 10, soit la combinaison des deux. On observe une différence significative au niveau de la prolifération entre les conditions Ctrl et ConA (***) = $P < 0.0001$).

Pour ces essais, on remarque un faible niveau de cellules filles présentes dans les conditions contrôles (8,76%) mais presque le double pour les cellules infectées avec la conA (16,24%). Les cellules de ces vaches malades présentaient un taux de prolifération de 66,87%, significativement différent des contrôles, et la combinaison de MAP et de la conA a induit un taux de prolifération de 68,75%. La combinaison des deux agents stimulants n'a donc pas entraîné d'effet synergique sur la prolifération, ni même d'effet additif car le taux de prolifération théorique dans ce cas-là aurait dû être de 83,11%.

Suite à l'observation de ces résultats qui vont à l'encontre des précédents, des tests ont été réalisés à nouveau sur des vaches atteintes de paratuberculose afin de déterminer si des facteurs tels que le lavage des souches avant l'infection ou la concentration de conA pourraient aider à reproduire l'effet synergique entre MAP et conA sur la prolifération des lymphocytes (Figure 9). Le rinçage des souches avant l'infection permettait de vérifier si l'effet de synergisme observé résultait de la présence ou non de facteurs produits par MAP. En ce qui concerne les concentrations de conA, le but était de vérifier si la diminution du taux de prolifération dans nos contrôles positifs de prolifération permettrait de mieux mettre en évidence l'effet synergique. On observe très peu de prolifération des lymphocytes dans la condition contrôle ou dans le cas des cellules infectées à MAP non rincées (Figure 9A). Après stimulation avec 1µg/mL de conA, les cellules ont présenté un fort taux de prolifération (83%). Celle-ci s'est vue fortement diminuer après une stimulation par 0,1µg/mL de conA (49%). L'ajout de MAP à la conA lors des traitements des cellules n'a pas augmenté le taux de prolifération lymphocytaire quel que soit la concentration de l'agent mitogène. Il est intéressant de constater que ces tendances se sont retrouvées également dans le cas des infections réalisées avec du MAP rincé (Figure 9B).

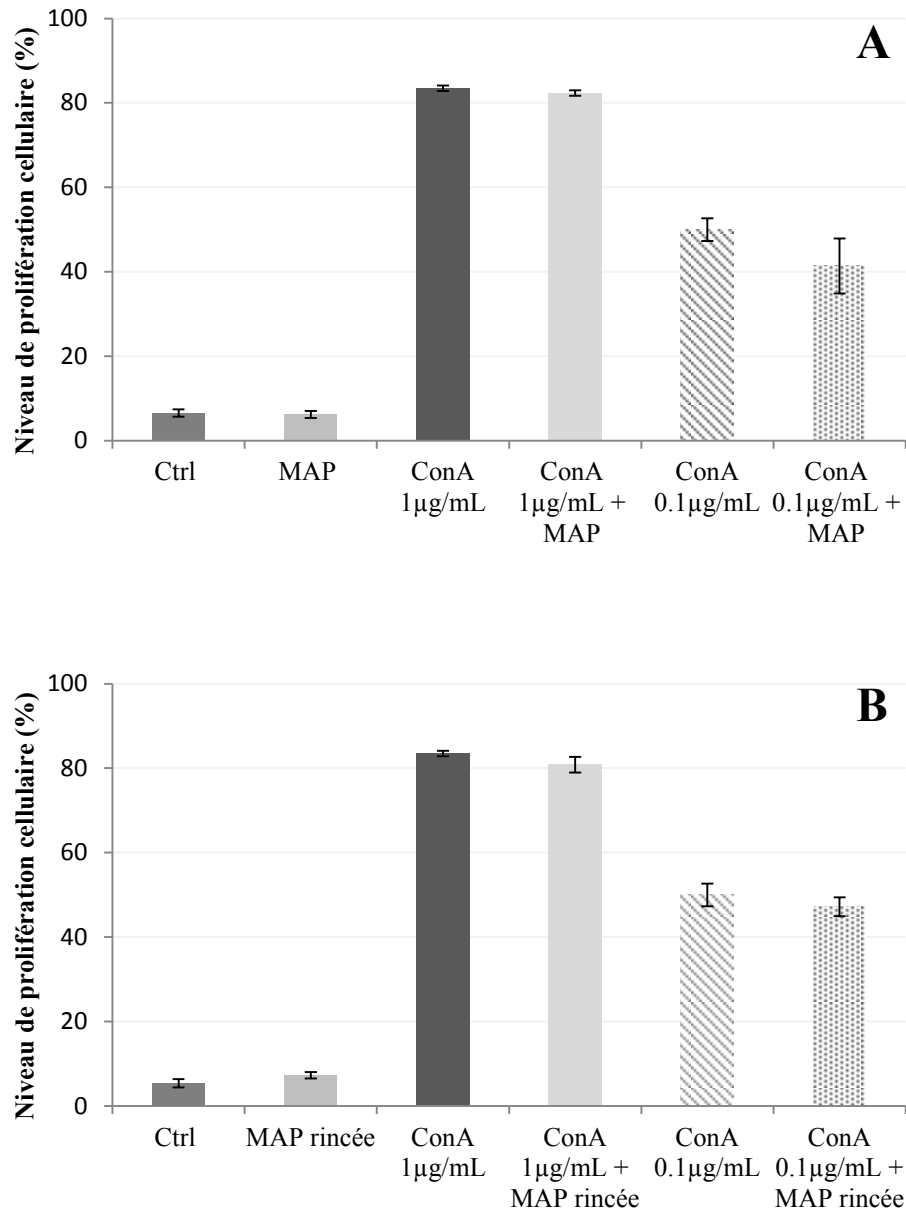


Figure 9. Essai de prolifération de PBMCs provenant de vaches atteintes de la paratuberculose dans différentes conditions de stimulation. L'analyse a été réalisée sur des PBMCs de vaches atteintes de la paratuberculose, stimulés avec de la conA aux concentrations indiquées et/ou la souche 39382 de MAP à MOI 10. A : analyses réalisées avec MAP et son bouillon de culture; B : analyses réalisées avec MAP rincé et resuspendu dans du nouveau bouillon de culture stérile.

Les nouveaux essais de prolifération utilisant la souche 39382 de MAP pour les infections ne renouvelant pas les observations faites au début du projet, l'expérience a été réalisée en testant d'autres souches à notre disposition (Figure 10). Les conditions de stimulation (MOI, concentrations de conA, nombre de cellules...) furent inchangées.

Pour ce nouvel essai, on observe peu de prolifération (6,48%) en condition contrôle, mais les cellules ont répondu à la stimulation par la conA, proliférant jusqu'à présenter 69,88% de cellules filles. Globalement, chacune des souches utilisées a induit le même profil de réponse chez les PBMCs des animaux utilisés pour l'expérience. Ainsi, on peut remarquer que l'infection des cellules par chacune des souches de MAP a entraîné un niveau de prolifération d'environ 15%. La combinaison de MAP et de la conA en comparaison a induit un niveau de prolifération d'environ 60%.

Il est important de remarquer que les derniers essais de prolifération montrent un comportement des PBMCs de vaches atteintes de paratuberculose différent de celui observé au début du projet après stimulation des cellules. En effet, l'infection par MAP n'entraînait pas de prolifération sur les premiers essais mais doublait le niveau de prolifération sur les plus récentes expériences comparé aux cellules contrôle. De plus, l'effet de synergie entre la conA et MAP n'a pas été retrouvé sur les derniers essais.

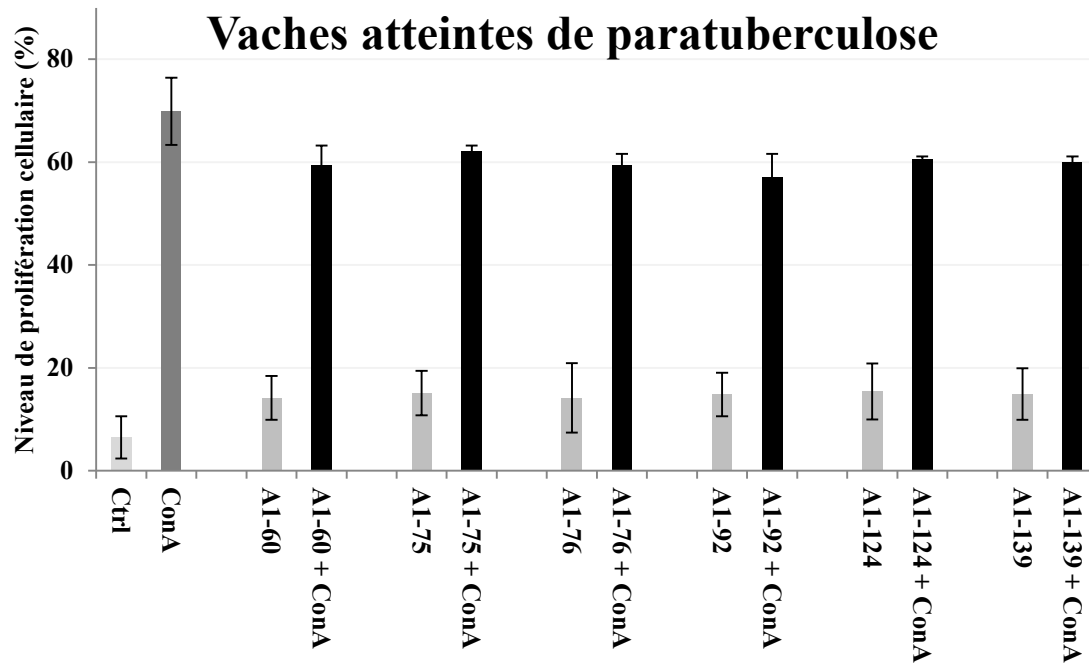


Figure 10. Réponse lymphoproliférative de PBMCs avec ou sans stimulation de vaches atteintes de paratuberculose par différentes souches de MAP + conA. Les PBMCs provenant de 3 vaches positives pour la paratuberculose au diagnostic ont été isolées, marquées au CFSE puis mises à incubation pendant 3 jours avec soit 1µg/mL de conA, soit différentes souches de MAP selon indication à MOI 10, soit la combinaison des deux.

CHAPITRE 4

DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La paratuberculose est maladie insidieuse responsable d'énormes pertes économiques au niveau mondial dans l'industrie laitière, sans compter le caractère zoonotique de MAP et les risques de contamination alimentaire. De par ses caractéristiques qui la rendent si particulière, MAP est capable d'échapper au système immunitaire de ses hôtes, compliquant ainsi sa détection par des tests immunologiques tels que les ELISA. De plus, les autres méthodes diagnostiques de référence restent grandement dépendantes de l'excrétion ou pas d'une certaine quantité de MAP au moment des échantillonnages. Ainsi, il est fort probable que la prévalence de la maladie est actuellement sous-estimée et malheureusement, les difficultés à discriminer les animaux malades n'aident en rien à la mise en place de méthodes de prévention de la transmission de la paratuberculose. Il est donc important de développer de nouvelles techniques de diagnostic afin d'avoir à disposition un éventail de méthodes pouvant confirmer efficacement le statut des vaches.

Dans cette optique, il était important d'établir au sein du laboratoire une méthode robuste permettant de détecter les animaux atteints de paratuberculose dans les fermes via l'utilisation des méthodes usuelles de dépistage, à savoir l'analyse sérologique ou l'analyse des fèces. Puisque la maladie s'établit suivant une longue phase silencieuse avant l'apparition des symptômes survenant d'abord de façon intermittente, le dépistage des animaux s'est déroulé plusieurs fois par année sur une période de près de trois ans. Plusieurs techniques ont été combinées pour le suivi des vaches : les tests ELISA, la culture mycobactérienne ainsi que la qPCR. Concernant la détection de MAP par la qPCR, plusieurs trousse commerciales sont disponibles pour la réaliser, tant au niveau de l'extraction de l'ADN génomique que de sa détection. Toutefois, leurs fonctionnements diffèrent de façon assez importante et il était important de comparer leur efficacité avant de choisir les trousse à utiliser pour le projet. Au cours de cette étude, plusieurs points ont été mis à jour. Premièrement, il apparaît que les

trousses commerciales pour l'extraction de l'ADN de MAP dans les fèces n'ont pas une efficacité équivalente. Ceci influence la détection par qPCR, qui présente des niveaux de sensibilité très disparates selon la trousse utilisée pour isoler l'ADN. Deuxièmement, il a été mis en valeur que le choix des cibles influait également beaucoup sur la détection de MAP, notamment dû au fait que les différentes cibles spécifiques ne sont pas toutes présentées au même nombre de copies dans le génome de la mycobactérie. Bien que ces deux points eurent déjà été mis en évidence dans l'étude de Leite *et al.* (Leite *et al.*, 2013), il semblait important de valider la sensibilité de chaque trousse dans nos conditions d'expérimentation. D'autre part, nos résultats furent légèrement différents que les leurs. En effet, alors que la trousse commerciale ayant présenté le maximum de sensibilité dans l'équipe de Leite s'est avérée efficace dans la détection de MAP sur des échantillons artificiellement infectés, elle fut également la moins sensible sur des échantillons de vaches naturellement infectées. Il est possible que des facteurs environnementaux influant sur la répartition ou la condition de MAP dans les fèces soient en cause dans cette observation. Ainsi, l'efficacité des différentes trousses commerciales pourrait différer selon les troupeaux ou du moins leur localisation et nos résultats pourraient être spécifiques à la région du Québec. De plus, le maximum de sensibilité trouvé dans leur étude fut obtenu en utilisant IS900 comme cible spécifique. Bien que IS900 est largement utilisé au niveau mondial, présentant l'avantage d'un grand nombre de copies dans le génome de MAP, sa spécificité est remise en cause dans d'autres analyses (Englund *et al.*, 2002; Herthnek and Bolske, 2006). C'est pourquoi nous avons favorisé la comparaison des marqueurs ISMAP02 ou HspX pour nos diagnostics. Finalement, l'étude montre bien l'importance d'avoir le plus grand nombre de répliquas possible lors des analyses, surtout pour les animaux infectés en phase sous-clinique excréant un bas nombre de MAP. En effet, avec la faible quantité d'ADN récoltable dans cette situation et compte-tenu des dilutions réalisées pendant les divers processus à passer avant la fin de l'analyse, il devient plus évident que la présence ou non de matériel génétique de MAP dans un échantillon dépend d'une loi de probabilité. Augmenter le nombre d'échantillons analysés pour chaque spécimen augmente alors les chances de ne pas passer à côté d'animaux faiblement excréteurs. Il est certain que la plupart des études diagnostiques de la paratuberculose utilisant la technique de

la qPCR ne réalisent pas un grand nombre de répliques pour des raisons économiques ou de gain de temps, mais cette mesure de précaution est d'autant plus importante si l'on prend en considération que la sensibilité de détection de MAP semble varier en fonction des souches.

Il était important de mettre en place un plan de diagnostic le plus précis possible à ce jour afin de pouvoir repérer les animaux atteints de paratuberculose pour les incorporer aux essais de prolifération. Toutefois, il n'en restait pas moins que les animaux en phase sous-clinique étaient difficiles à diagnostiquer et les animaux à un stade avancé de la maladie présents dans les fermes sont rares. En effet, les producteurs sont bien conscients des risques de contamination, et à l'arrivée des symptômes importants de la maladie de Johne, les animaux sont rapidement réformés. Ainsi, en tenant compte de la difficulté à en repérer, aux divers problèmes techniques ou logistiques, et d'autant plus que bon nombre de ces animaux se sont révélés être également atteints de leucémie bovine, il s'est avéré ardu d'obtenir des échantillons sanguins sur des animaux malades tout au long du projet. La leucémie bovine est causée par un rétrovirus, le « Bovine Leukemia Virus » (BLV). Cette maladie se caractérise par une lymphoprolifération constante des leucocytes des sujets atteints et l'apparition de sarcomes dans les formes sévères due à la production de facteurs oncogènes par le virus (Gillet *et al.*, 2016; Hidalgo and Bonilla, 1996; Trueblood *et al.*, 1998). Cette maladie modifiant le comportement des cellules de l'immunité de ses hôtes, elle a entravé le bon déroulement du projet (Annexe 3). On observe effectivement un taux basal de prolifération des lymphocytes chez les vaches atteintes de leucémie, ce qui masque tout effet de l'infection par MAP ou de synergie avec la stimulation avec la conA. De plus, la prévalence de cette maladie est très forte. En 2015, une étude a montré la présence de BLV dans 78% des troupeaux au Canada, et même dans d'autres pays la prévalence reste élevée (Nekouei *et al.*, 2015; Polat *et al.*, 2016). Il est donc relativement fréquent de rencontrer des vaches porteuses de ce virus et il a déjà été évoqué dans la littérature un possible lien entre la paratuberculose et la leucémie bovine (Coussens *et al.*, 2012). Dans nos résultats de prolifération, ces animaux masquaient les effets de prolifération dus à des stimulations des cellules. Ce n'est qu'en analysant les données au cas par cas et en demandant spécifiquement un diagnostic des

animaux suspects que l'hypothèse du BLC s'est confirmée, répondant ainsi à une nos questions sur les problèmes rencontrés.

L'objectif du projet était de mettre en place un système de diagnostic qui aurait été basé sur la prolifération accrue des lymphocytes après stimulation *in vitro* avec la conA combinée à la souche 39382 de MAP, un phénomène observé lors des premières analyses sur les PBMCs de vaches malades. En effet, si l'on compare les rapports de rendement au niveau de la prolifération cellulaire des cellules stimulées avec le cocktail conA + MAP par rapport aux cellules stimulées avec la conA seule, on observe des changements intéressants. Chez les vaches atteintes de paratuberculose, une augmentation de 1,68 fois est visible tandis que chez les vaches saines, c'est une diminution de la prolifération qui était observée, avec un rendement de 0,54 fois (Annexe 4). L'analyse statistique de cet effet apparemment synergique a uniquement révélé des tendances quant à la présence d'une interaction entre MAP et la conA chez les vaches atteintes de paratuberculose, mais il est fort probable que cette tendance aurait pu avoir une valeur réellement significative en augmentant notre population étudiée. Lors des tentatives de confirmation de ces résultats, au début du projet, des taux et profils très similaires ont été retrouvés, renforçant l'idée d'une base solide pour un test diagnostic.

Il est difficile de théoriser sur cette observation, toutefois, le manque de réponse cellulaire au niveau de la prolifération des cellules après infection avec MAP a déjà été reportée et décrite alors comme une forme d'anergie des lymphocytes (Chiodini and Davis, 1992; Coussens, 2004). Cette anergie qui se représente sous forme de « non-prolifération » après infection par MAP pourrait être due au blocage des récepteurs de type TLR2 des cellules par la mycobactérie (Souza *et al.*, 2013; Weiss *et al.*, 2008). Les mécanismes de défense de MAP pourraient donc ainsi empêcher la prolifération importante des cellules mémoires spécifiques présentes. Toutefois, la conA, parmi les différentes lectines d'origine végétale connues, a été décrite comme étant un agoniste du récepteur TLR2 (Unitt and Hornigold, 2011). Il est donc possible que la combinaison des deux agents stimulants permettrait de surpasser le potentiel inhibiteur de MAP et de favoriser la prolifération des cellules mémoires spécifiques à MAP

chez les vaches malades. Bien entendu, d'autres récepteurs pourraient être impliqués, sans oublier le rôle connu de ZAP-70 dans l'établissement de la paratuberculose. Cependant, le rôle du récepteur TLR2 est un des récepteurs les plus étudiés à ce jour concernant la paratuberculose et est de plus spécifiquement impliqué dans la reconnaissance de pathogènes intracellulaires, d'où son intérêt. Dans le cas des PBMCs provenant de vaches saines, il est possible que la baisse du niveau de prolifération observée soit due à un effet de compétition entre MAP et la conA au niveau des récepteurs, et, les cellules n'ayant jamais rencontré MAP, ne contiennent pas de cellules mémoires spécifiquement programmées pour proliférer à sa rencontre. Néanmoins, les statistiques n'ont démontré aucune interaction significative entre MAP et la conA chez les vaches saines.

Au début du projet, ce phénomène fut observé par deux expérimentateurs, mais n'a pu être reproduit près d'un an plus tard, le temps de mettre au point la technique du marquage des cellules. Il est certain que les résultats obtenus lors des marquages présentent de grandes variations qui auraient pu être atténuées en augmentant le nombre d'animaux impliqués dans l'essai. Toutefois, l'objectif était de se concentrer sur la synergie entre MAP et la conA, et au vu du prix extensif des anticorps et l'absence de synergie retrouvée, il était plus sage de reprendre des essais de prolifération sans marquage pour comprendre ce qu'il se passait. À ce niveau, plusieurs vaches malades ont été testées, sans succès pour l'observation de la synergie MAP/conA. Il était possible cependant de noter que la stimulation des cellules avec MAP seule suffisait parfois à induire un niveau relativement élevé de prolifération par rapport aux premiers essais. Ceci était également retrouvé après infection de PBMCs de vaches qualifiées saines suivant leurs résultats diagnostiques (données non montrées).

Des essais de prolifération ont également été réalisés en tentant de rincer la mycobactérie de son bouillon de culture ou en diminuant les concentrations de conA, mais sans plus de succès. En effet, la conA seule induisant des taux de prolifération élevés d'environ 60%, il paraissait difficile d'observer des niveaux de prolifération significativement plus importants dans les cas de synergie, d'où la diminution de sa concentration comme optimisation de la méthode. De

même, le rinçage des mycobactéries servait à vérifier s'il n'y avait pas un effet de facteurs relâchés dans le bouillon de culture de MAP sur les cellules lors de l'infection. Les expériences ayant été réalisées avec la souche 39382 de MAP jusque-là, les essais ont été testés avec d'autres comme alternative mais sans succès.

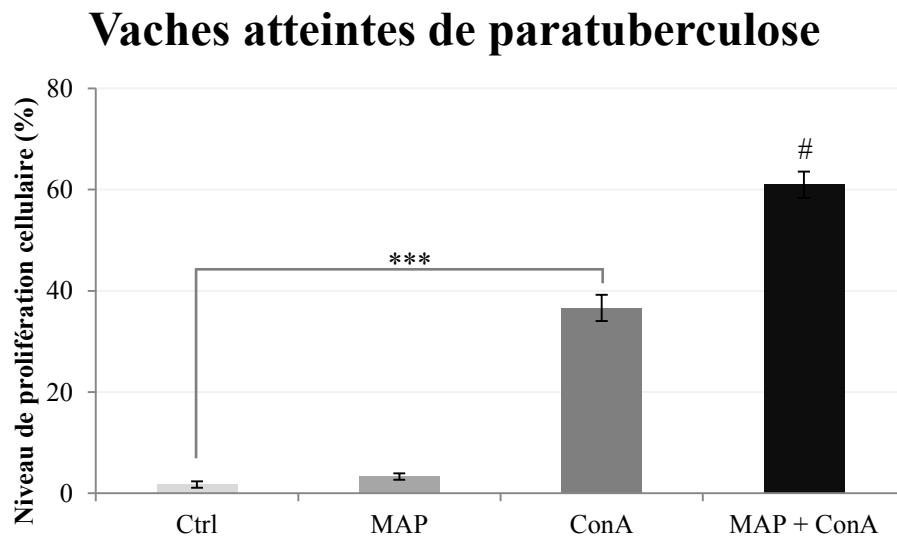
Il est possible que le soudain changement de comportement des cellules en réponse à l'infection soit dû à une mutation des souches. En effet, il a été maintes fois décrit dans la littérature un changement de comportement de MAP après sa mise en culture, notamment au niveau de sa virulence (Fernandez *et al.*, 2015; Weigoldt *et al.*, 2011). Afin d'essayer de retrouver l'effet de synergie entre MAP et la conA, un aliquot de la souche 39382 datant de quelques années a été décongelé et mis en culture. Après une croissance satisfaisante, des essais de prolifération ont été réalisés de nouveau (données non présentées) mais malheureusement sans amélioration pour l'observation de la synergie lymphoproliférative.

Au cours de ce projet, la comparaison de trousse commerciales disponibles pour le diagnostic a permis de mettre en évidence une différence au niveau de leur efficacité. De cette étude, un article a vu le jour et est aujourd'hui publié. Ces travaux pourront servir de référence afin de fournir des recommandations pour de bonnes pratiques ou le choix de kits dans le diagnostic des troupeaux. Le phénomène de synergie entre la conA et MAP au niveau de la lymphoprolifération semblait être une piste des plus intéressantes pour discriminer les animaux atteints de la paratuberculose. Cependant, certaines contraintes, notamment l'accès aux vaches positives et la présence de la leucose bovine dans les troupeaux, et des problèmes probablement d'ordre technique ont fait que ce projet ait été suspendu. Au cours de ce projet, un panel d'anticorps pour la caractérisation des lymphocytes en un essai a tout de même bien été mis en place et est disponible pour d'éventuels projets futurs. Ce panel a indirectement été validé par le pourcentage de cellules retrouvées de chaque type dans nos essais comparé à différentes revues de littératures (Ayoub and Yang, 1996; Hein and Mackay, 1991; Tanaka *et al.*, 2008). Au vu de nos résultats, il semblerait que les vaches atteintes de paratuberculose disposent de manière basale d'un plus grand pourcentage de lymphocytes B CD21+.

pourrait également représenter une piste de recherche intéressante pour discriminer les animaux à condition de pouvoir associer cet effet de façon spécifique à MAP. Finalement, malgré les difficultés rencontrées, l'étude du comportement des PBMCs des animaux malades ou sains reste toujours une voie à approfondir dans le but de mieux comprendre le mécanisme d'action de MAP et ainsi de créer de nouvelles méthodes diagnostiques ou même thérapeutiques. Cette étude a permis également de montrer qu'il est possible actuellement de caractériser de façon plus complète les types de lymphocytes chez le bovin. De même, la comparaison de l'efficacité des trousse commerciales pour le diagnostic de la paratuberculose par qPCR fécale apporte de nouvelles recommandations pour un meilleur diagnostic des troupeaux au Québec.

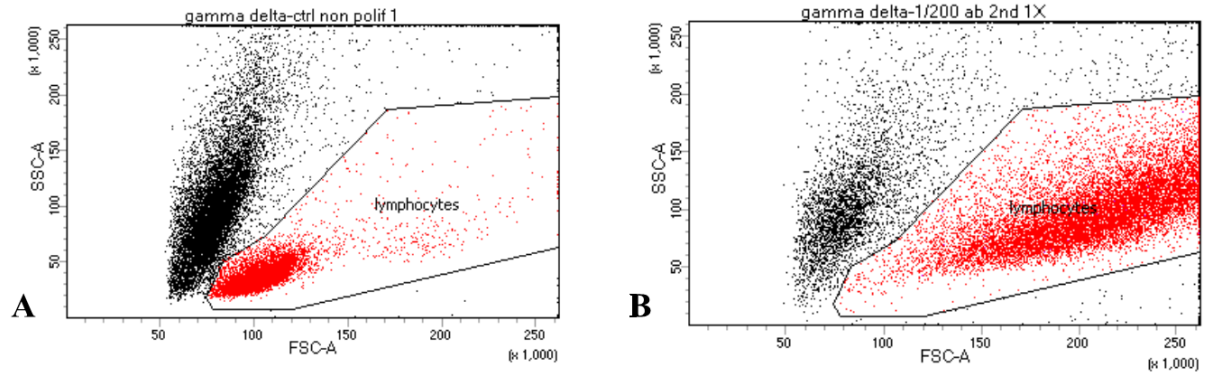
ANNEXES

Annexe 1. Résultats préliminaires réalisés en 2014 des essais de prolifération de PBMCs provenant de vaches atteintes de paratuberculose



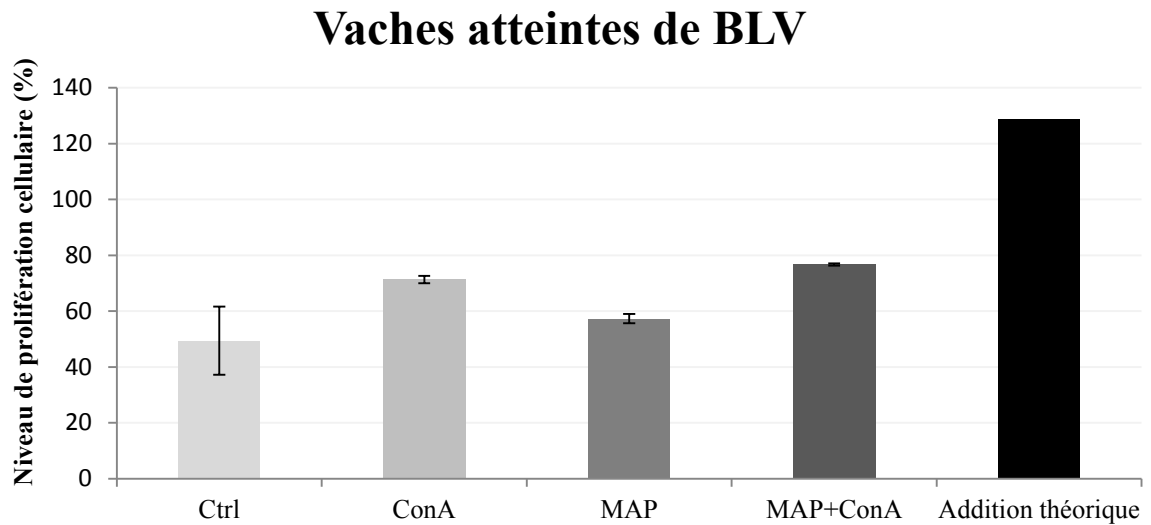
L'analyse a été réalisée sur des PBMCs de vaches atteintes de la paratuberculose, stimulés avec de la conA et/ou la souche 39382 de MAP. On observe une différence significative au niveau de la prolifération entre les conditions Ctrl et ConA (***) ainsi qu'une tendance au niveau de l'interaction entre MAP et la conA (#). Résultats produits par M. Pier-Luc Dudemaine. n=3

Annexe 2. Fenêtres de lecture utilisées pour l'analyse des lymphocytes par cytométrie de flux



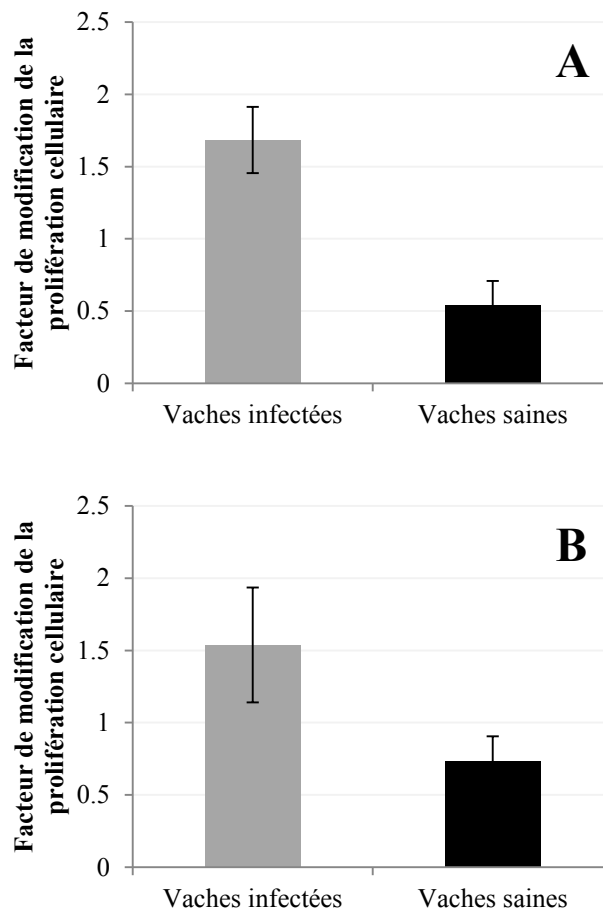
Les analyses par cytométrie ont été réalisées en utilisant les fenêtres de lectures suivantes afin de ne pas englober les débris cellulaires, cellules mortes ou autres. A : analyse de cellules sans stimulation; B : analyse des cellules après prolifération induite par la concanavaline A

Annexe 3. Essai de prolifération de PBMCs provenant de vaches atteintes de la leucémie bovine



L'analyse a été réalisée sur des PBMCs provenant de vaches atteintes de la paratuberculose et de la leucémie bovine, stimulés avec de la conA et/ou la souche 39382 de MAP. L'addition théorique représente le niveau de prolifération attendu si la stimulation des cellules avec MAP et la conA devait avoir un effet additif du niveau de prolifération occasionné par chacun des agents stimulants séparément. n=3

Annexe 4. Rapport d'augmentation de la lymphoprolifération des PBMCs stimulés avec la combinaison MAP/conA comparée aux cellules stimulées avec la conA seule



Coefficient de modification du taux de prolifération observé lors des différentes analyses. Le calcul a été effectué en divisant le taux de prolifération observé de la condition conA + MAP (barre grise) par le taux de prolifération de la condition conA (barre noire). A : résultats basés sur les analyses préliminaires au projet réalisées en 2013 ; B : résultats basés sur les analyses au début de projet pour la confirmation du phénomène observé.

BIBLIOGRAPHIE

Adams, L.B., Fukutomi, Y., and Krahenbuhl, J.L. (1993). Regulation of murine macrophage effector functions by lipoarabinomannan from mycobacterial strains with different degrees of virulence. *Infection and immunity* *61*, 4173-4181.

Adaska, J.M., and Whitlock, R.H. (2012). Low rate of detectable in utero transmission of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in a dairy herd with a low prevalence of Johne's disease. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* *24*, 153-155.

Ahlstrom, C., Barkema, H.W., Stevenson, K., Zadoks, R.N., Biek, R., Kao, R., Trewby, H., Haupstein, D., Kelton, D.F., Fecteau, G., *et al.* (2015). Limitations of variable number of tandem repeat typing identified through whole genome sequencing of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis on a national and herd level. *BMC Genomics* *16*, 161.

Ahlstrom, C., Barkema, H.W., Stevenson, K., Zadoks, R.N., Biek, R., Kao, R., Trewby, H., Haupstein, D., Kelton, D.F., Fecteau, G., *et al.* (2016). Genome-Wide Diversity and Phylogeography of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in Canadian Dairy Cattle. *PLoS One* *11*, e0149017.

Aho, A.D., McNulty, A.M., and Coussens, P.M. (2003). Enhanced expression of interleukin-1alpha and tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 in ileal tissues of cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Infection and immunity* *71*, 6479-6486.

Alexander, D.C., Guthrie, J.L., Pyskir, D., Maki, A., Kurepina, N., Kreiswirth, B.N., Chedore, P., Drews, S.J., and Jamieson, F. (2009a). *Mycobacterium tuberculosis* in Ontario, Canada: Insights from IS6110 restriction fragment length polymorphism and mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat genotyping. *J Clin Microbiol* *47*, 2651-2654.

Alexander, D.C., Turenne, C.Y., and Behr, M.A. (2009b). Insertion and deletion events that define the pathogen *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *J Bacteriol* *191*, 1018-1025.

Allen, A.J., Park, K.T., Barrington, G.M., Lahmers, K.K., Abdellrazeq, G.S., Rihan, H.M., Sreevatsan, S., Davies, C., Hamilton, M.J., and Davis, W.C. (2011). Experimental infection of a bovine model with human isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary immunology and immunopathology* *141*, 258-266.

Alzuhherri, H.M., Little, D., and Clarke, C.J. (1997). Altered intestinal macrophage phenotype in ovine paratuberculosis. *Res Vet Sci* *63*, 139-143.

Angelakis, E., Bachar, D., Henrissat, B., Armougom, F., Audoly, G., Lagier, J.C., Robert, C., and Raoult, D. (2016). Glycans affect DNA extraction and induce substantial differences in gut metagenomic studies. *Scientific reports* *6*, 26276.

Arru, G., Caggiu, E., Paulus, K., Sechi, G.P., Mameli, G., and Sechi, L.A. (2016). Is there a role for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Parkinson's disease? *Journal of neuroimmunology* *293*, 86-90.

Arsenault, R.J., Maattanen, P., Daigle, J., Potter, A., Griebel, P., and Napper, S. (2014). From mouth to macrophage: mechanisms of innate immune subversion by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary research* *45*, 54.

Ayele, W.Y., Bartos, M., Svastova, P., and Pavlik, I. (2004). Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. *Veterinary microbiology* *103*, 209-217.

Ayoub, I.A., and Yang, T.J. (1996). Age-dependent changes in peripheral blood lymphocyte subpopulations in cattle: a longitudinal study. *Developmental and comparative immunology* *20*, 353-363.

Bang, B. (1906). Chronische pseudotuberkulöse Darmentzündung beim Rinde. *Berliner Tierärztliche Wochenschrift* *50*, 759-763.

Bannantine, J.P., and Bermudez, L.E. (2013). No holes barred: invasion of the intestinal mucosa by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infection and immunity* *81*, 3960-3965.

Baquero, M.M., and Plattner, B.L. (2016). Bovine WC1(+) gammadelta T lymphocytes modify monocyte-derived macrophage responses during early *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection. *Veterinary immunology and immunopathology* 170, 65-72.

Basler, T., Brumshagen, C., Beineke, A., Goethe, R., and Baumer, W. (2013). *Mycobacterium avium* subspecies impair dendritic cell maturation. *Innate immunity* 19, 451-461.

Bassey, E.O., and Collins, M.T. (1997). Study of T-lymphocyte subsets of healthy and *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis-infected cattle. *Infection and immunity* 65, 4869-4872.

Bastida, F., and Juste, R.A. (2011). Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination. *Journal of immune based therapies and vaccines* 9, 8.

Baumjohann, D., and Ansel, K.M. (2013). Identification of T follicular helper (Tfh) cells by flow cytometry, Protocole exchange.

Begg, D.J., de Silva, K., Carter, N., Plain, K.M., Purdie, A., and Whittington, R.J. (2011). Does a th1 over th2 dominancy really exist in the early stages of *mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infections? *Immunobiology* 216, 840-846.

Bergey, D.H., Harrison, F.C., Breed, R.S., Hammer, B.W., and Huntoon, F.M. (1923). *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 374-375.

Bermudez, L.E., Petrofsky, M., Sommer, S., and Barletta, R.G. (2010). 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. *Infection and immunity* 78, 3570-3577.

Besra, G.S., and Brennan, P.J. (1997). The mycobacterial cell wall: biosynthesis of arabinogalactan and lipoarabinomannan. *Biochemical Society transactions* 25, 845-850.

Besra, G.S., Morehouse, C.B., Rittner, C.M., Waechter, C.J., and Brennan, P.J. (1997). Biosynthesis of mycobacterial lipoarabinomannan. *The Journal of biological chemistry* 272, 18460-18466.

Bhide, M.R., Mucha, R., Mikula, I., Jr., Kisova, L., Skrabana, R., Novak, M., and Mikula, I., Sr. (2009). Novel mutations in TLR genes cause hyporesponsiveness to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *BMC genetics* *10*, 21.

Biet, F., Bay, S., Thibault, V.C., Euphrasie, D., Grayon, M., Ganneau, C., Lanotte, P., Daffe, M., Gokhale, R., Etienne, G., *et al.* (2008). Lipopentapeptide induces a strong host humoral response and distinguishes *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from *M. avium* subsp. *avium*. *Vaccine* *26*, 257-268.

Biet, F., Sevilla, I.A., Cochard, T., Lefrancois, L.H., Garrido, J.M., Heron, I., Juste, R.A., McLuckie, J., Thibault, V.C., Supply, P., *et al.* (2012). Inter- and Intra-subtype genotypic differences that differentiate *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains. *BMC Microbiol* *12*, 264.

Brennan, M.J., Delogu, G., Chen, Y., Bardarov, S., Kriakov, J., Alavi, M., and Jacobs, W.R., Jr. (2001). Evidence that mycobacterial PE_PGRS proteins are cell surface constituents that influence interactions with other cells. *Infect Immun* *69*, 7326-7333.

Brennan, P.J., and Besra, G.S. (1997). Structure, function and biogenesis of the mycobacterial cell wall. *Biochemical Society transactions* *25*, 188-194.

Britton, L.E., Cassidy, J.P., O'Donovan, J., Gordon, S.V., and Markey, B. (2016). Potential application of emerging diagnostic techniques to the diagnosis of bovine Johne's disease (*paratuberculosis*). *Veterinary journal* *209*, 32-39.

Bryant, J.M., Thibault, V.C., Smith, D.G., McLuckie, J., Heron, I., Sevilla, I.A., Biet, F., Harris, S.R., Maskell, D.J., Bentley, S.D., *et al.* (2016). Phylogenomic exploration of the relationships between strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *BMC Genomics* *17*, 79.

Bull, T.J., McMinn, E.J., Sidi-Boumedine, K., Skull, A., Durkin, D., Neild, P., Rhodes, G., Pickup, R., and Hermon-Taylor, J. (2003a). Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *Journal of clinical microbiology* *41*, 2915-2923.

Bull, T.J., Sidi-Boumedine, K., McMinn, E.J., Stevenson, K., Pickup, R., and Hermon-Taylor, J. (2003b). Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) differentiate *Mycobacterium*

avium subspecies paratuberculosis from other species of the *Mycobacterium avium* complex. *Molecular and Cellular Probes* *17*, 157-164.

Burrells, C., Clarke, C.J., Colston, A., Kay, J.M., Porter, J., Little, D., and Sharp, J.M. (1998). A study of immunological responses of sheep clinically-affected with paratuberculosis (Johne's disease). The relationship of blood, mesenteric lymph node and intestinal lymphocyte responses to gross and microscopic pathology. *Veterinary immunology and immunopathology* *66*, 343-358.

Carvalho, I.A., Pietralonga, P.A., Schwarz, D.G., Faria, A.C., and Moreira, M.A. (2012). Short communication: Recovery of viable *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from retail pasteurized whole milk in Brazil. *Journal of dairy science* *95*, 6946-6948.

Castellanos, E., Romero, B., Rodriguez, S., de Juan, L., Bezos, J., Mateos, A., Dominguez, L., and Aranaz, A. (2010). Molecular characterization of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis Types II and III isolates by a combination of MIRU-VNTR loci. *Vet Microbiol* *144*, 118-126.

Chan, A.C., van Oers, N.S., Tran, A., Turka, L., Law, C.L., Ryan, J.C., Clark, E.A., and Weiss, A. (1994). Differential expression of ZAP-70 and Syk protein tyrosine kinases, and the role of this family of protein tyrosine kinases in TCR signaling. *Journal of immunology* *152*, 4758-4766.

Chi, J., VanLeeuwen, J.A., Weersink, A., and Keefe, G.P. (2002). Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum*. *Preventive veterinary medicine* *55*, 137-153.

Chiodini, R.J., and Davis, W.C. (1992). The cellular immunology of bovine paratuberculosis: the predominant response is mediated by cytotoxic gamma/delta T lymphocytes which prevent CD4+ activity. *Microbial pathogenesis* *13*, 447-463.

Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J., Merkal, R.S., Thayer, W.R., Jr., and Coutu, J.A. (1984). Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *Journal of clinical microbiology* *20*, 966-971.

Chui, L.W., King, R., Lu, P., Manninen, K., and Sim, J. (2004). Evaluation of four DNA extraction methods for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by polymerase chain reaction. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 48, 39-45.

Clark, D.L., Jr., Koziczowski, J.J., Radcliff, R.P., Carlson, R.A., and Ellingson, J.L. (2008). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: comparing fecal culture versus serum enzyme-linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction. *J Dairy Sci* 91, 2620-2627.

Clarke, C.J., and Little, D. (1996). The pathology of ovine *paratuberculosis*: gross and histological changes in the intestine and other tissues. *Journal of comparative pathology* 114, 419-437.

Collins, M.T., Wells, S.J., Petrini, K.R., Collins, J.E., Schultz, R.D., and Whitlock, R.H. (2005). Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine *paratuberculosis*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 12, 685-692.

Collins, R.A., Werling, D., Duggan, S.E., Bland, A.P., Parsons, K.R., and Howard, C.J. (1998). Gammadelta T cells present antigen to CD4+ alphabeta T cells. *Journal of leukocyte biology* 63, 707-714.

Cook, K.L., Britt, J.S., and Bolster, C.H. (2010). Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in biofilms on livestock watering trough materials. *Veterinary microbiology* 141, 103-109.

Cossu, D., Masala, S., Frau, J., Mamei, G., Marrosu, M.G., Cocco, E., and Sechi, L.A. (2014). Antigenic epitopes of MAP2694 homologous to T-cell receptor gamma-chain are highly recognized in multiple sclerosis Sardinian patients. *Mol Immunol* 57, 138-140.

Cousins, D.V., Evans, R.J., and Francis, B.R. (1995). Use of BACTEC radiometric culture method and polymerase chain reaction for the rapid screening of faeces and tissues for *Mycobacterium paratuberculosis*. *Aust Vet J* 72, 458-462.

Coussens, P.M. (2004). Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in cattle. *Infection and immunity* 72, 3089-3096.

Coussens, P.M., Colvin, C.J., Wiersma, K., Abouzied, A., and Sipkovsky, S. (2002). Gene Expression Profiling of Peripheral Blood Mononuclear Cells from Cattle Infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Infection and immunity* 70, 5494-5502.

Coussens, P.M., Sipkovsky, S., Murphy, B., Roussey, J., and Colvin, C.J. (2012). Regulatory T cells in cattle and their potential role in bovine paratuberculosis. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 35, 233-239.

Crohn, B.B., Ginzburg, L., and Oppenheimer, G.D. (1952). Regional ileitis. *The American Journal of Medicine* 13, 583-590.

Dalziel, T.K. (1989). Thomas Kennedy Dalziel 1861-1924. Chronic interstitial enteritis. *Diseases of the colon and rectum* 32, 1076-1078.

Damato, J.J., and Collins, M.T. (1990). Growth of *Mycobacterium paratuberculosis* in radiometric, Middlebrook and egg-based media. *Veterinary microbiology* 22, 31-42.

de Silva, K., Browne, S., Begg, D.J., Whittington, R.J., and Emery, D. (2013). Apoptosis of lymph node and peripheral blood cells in ovine Johne's disease. *Veterinary immunology and immunopathology* 156, 82-90.

de Silva, K., K, M.P., D, J.B., A, C.P., and R, J.W. (2015). CD4(+) T-cells, gammadelta T-cells and B-cells are associated with lack of vaccine protection in *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection. *Vaccine* 33, 149-155.

De Voss, J.J., Rutter, K., Schroeder, B.G., and Barry, C.E., 3rd (1999). Iron acquisition and metabolism by mycobacteria. *Journal of bacteriology* 181, 4443-4451.

Dennis, M.M., Antognoli, M.C., Garry, F.B., Hirst, H.L., Lombard, J.E., Gould, D.H., and Salman, M.D. (2008). Association of severity of enteric granulomatous inflammation with disseminated *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection and antemortem test results for paratuberculosis in dairy cows. *Veterinary microbiology* 131, 154-163.

Donat, K., Schlotter, K., Erhardt, G., and Brandt, H.R. (2014). Prevalence of paratuberculosis in cattle and control measures within the herd influence the performance of ELISA tests. *The Veterinary record* 174, 119.

Douarre, P.E., Cashman, W., Buckley, J., Coffey, A., and O'Mahony, J. (2011). Molecular characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using multi-locus short sequence repeat (MLSSR) and mycobacterial interspersed repetitive units-variable number tandem repeat (MIRU-VNTR) typing methods. *Vet Microbiol* *149*, 482-487.

Doucet-Populaire, F., Buriankova, K., Weiser, J., and Pernodet, J.L. (2002). Natural and acquired macrolide resistance in mycobacteria. *Current drug targets Infectious disorders* *2*, 355-370.

Dow, C.T. (2014). *M. paratuberculosis* and Parkinson's disease--is this a trigger. *Medical hypotheses* *83*, 709-712.

Dudemaine, P.L., Fecteau, G., Lessard, M., Labrecque, O., Roy, J.P., and Bissonnette, N. (2014). Increased blood-circulating interferon-gamma, interleukin-17, and osteopontin levels in bovine *paratuberculosis*. *Journal of dairy science* *97*, 3382-3393.

Eckstein, T.M., Chandrasekaran, S., Mahapatra, S., McNeil, M.R., Chatterjee, D., Rithner, C.D., Ryan, P.W., Belisle, J.T., and Inamine, J.M. (2006). A major cell wall lipopeptide of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *J Biol Chem* *281*, 5209-5215.

Ellingson, J.L., Bolin, C.A., and Stabel, J.R. (1998). Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and application to diagnosis of *paratuberculosis*. *Mol Cell Probes* *12*, 133-142.

Englund, S., Bolske, G., and Johansson, K.E. (2002). An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS microbiology letters* *209*, 267-271.

Esin, S., Shigematsu, M., Nagai, S., Eklund, A., Wigzell, H., and Grunewald, J. (1996). Different percentages of peripheral blood gamma delta + T cells in healthy individuals from different areas of the world. *Scandinavian journal of immunology* *43*, 593-596.

Fang, Z., Sampson, S.L., Warren, R.M., Gey van Pittius, N.C., and Newton-Foot, M. (2015). Iron acquisition strategies in mycobacteria. *Tuberculosis* *95*, 123-130.

Fecteau, M.E., Aceto, H.W., Bernstein, L.R., and Sweeney, R.W. (2014). Comparison of the antimicrobial activities of gallium nitrate and gallium maltolate against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in vitro. *Veterinary journal* 202, 195-197.

Fecteau, M.E., and Whitlock, R.H. (2011). Treatment and chemoprophylaxis for paratuberculosis. *The Veterinary clinics of North America Food animal practice* 27, 547-557, v.

Fecteau, M.E., Whitlock, R.H., Buergelt, C.D., and Sweeney, R.W. (2010). 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. *The Canadian veterinary journal La revue veterinaire canadienne* 51, 198-200.

Fernandez, M., Benavides, J., Sevilla, I.A., Fuertes, M., Castano, P., Delgado, L., Garcia Marin, J.F., Garrido, J.M., Ferreras, M.C., and Perez, V. (2014). Experimental infection of lambs with C and S-type strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: immunological and pathological findings. *Veterinary research* 45, 5.

Fernandez, M., Delgado, L., Sevilla, I.A., Fuertes, M., Castano, P., Royo, M., Ferreras, M.C., Benavides, J., and Perez, V. (2015). Virulence attenuation of a *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* S-type strain prepared from intestinal mucosa after bacterial culture. Evaluation in an experimental ovine model. *Research in veterinary science* 99, 180-187.

Ferwerda, G., Kullberg, B.J., de Jong, D.J., Girardin, S.E., Langenberg, D.M., van Crevel, R., Ottenhoff, T.H., Van der Meer, J.W., and Netea, M.G. (2007). *Mycobacterium paratuberculosis* is recognized by Toll-like receptors and NOD2. *J Leukocyte Biol* 82, 1011-1018.

Galiero, A., Fratini, F., Mataragka, A., Turchi, B., Nuvoloni, R., Ikonomopoulos, J., and Cerri, D. (2016). Detection of *mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cheeses from small ruminants in Tuscany. *International journal of food microbiology* 217, 195-199.

Gao, A., Mutharia, L., Chen, S., Rahn, K., and Odumeru, J. (2002). Effect of pasteurization on survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *Journal of dairy science* 85, 3198-3205.

Gillespie, S.H. (2002). Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrobial agents and chemotherapy* *46*, 267-274.

Gillet, N.A., Hamaidia, M., de Brogniez, A., Gutierrez, G., Renotte, N., Reichert, M., Trono, K., and Willems, L. (2016). Bovine Leukemia Virus Small Noncoding RNAs Are Functional Elements That Regulate Replication and Contribute to Oncogenesis In Vivo. *PLoS pathogens* *12*, e1005588.

Girardi, M. (2006). Immunosurveillance and immunoregulation by gammadelta T cells. *The Journal of investigative dermatology* *126*, 25-31.

Gonec, T., Kos, J., Nevin, E., Govender, R., Pesko, M., Tengler, J., Kushkevych, I., Stastna, V., Oravec, M., Kollar, P., *et al.* (2014). Preparation and biological properties of ring-substituted naphthalene-1-carboxanilides. *Molecules* *19*, 10386-10409.

Gonec, T., Zadrazilova, I., Nevin, E., Kauerova, T., Pesko, M., Kos, J., Oravec, M., Kollar, P., Coffey, A., O'Mahony, J., *et al.* (2015). Synthesis and Biological Evaluation of N-Alkoxyphenyl-3-hydroxynaphthalene-2-carboxanilides. *Molecules* *20*, 9767-9787.

Gonzalez, J., Geijo, M.V., Garcia-Pariente, C., Verna, A., Corpa, J.M., Reyes, L.E., Ferreras, M.C., Juste, R.A., Garcia Marin, J.F., and Perez, V. (2005). Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. *Journal of comparative pathology* *133*, 184-196.

Grant, I.R., Kirk, R.B., Hitchings, E., and Rowe, M.T. (2003). Comparative evaluation of the MGIT and BACTEC culture systems for the recovery of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis from milk. *Journal of applied microbiology* *95*, 196-201.

Green, E.P., Tizard, M.L., Moss, M.T., Thompson, J., Winterbourne, D.J., McFadden, J.J., and Hermon-Taylor, J. (1989). Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic acids research* *17*, 9063-9073.

Greenstein, R.J., Su, L., Shahidi, A., and Brown, S.T. (2007). On the action of 5-aminosalicylic acid and sulfapyridine on *M. avium* including subspecies paratuberculosis. *PloS one* *2*, e516.

Hammer, P., Walte, H.G., Matzen, S., Hensel, J., and Kiesner, C. (2013). Inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* during cooking of hamburger patties. *Journal of food protection* 76, 1194-1201.

Han, H., Wang, F., Xiao, Y., Ren, Y., Chao, Y., Guo, A., and Ye, L. (2007). Utility of mycobacterial interspersed repetitive unit typing for differentiating *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Wuhan, China. *J Med Microbiol* 56, 1219-1223.

He, J.-l., and Xie, J.-p. (2011). Advances in *Mycobacterium* siderophore-based drug discovery. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 1, 8-13.

Hedges, J.F., Lubick, K.J., and Jutila, M.A. (2005). Gamma delta T cells respond directly to pathogen-associated molecular patterns. *J Immunol* 174, 6045-6053.

Hein, W.R., and Mackay, C.R. (1991). Prominence of gamma delta T cells in the ruminant immune system. *Immunology today* 12, 30-34.

Herthnek, D., and Bolske, G. (2006). New PCR systems to confirm real-time PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *BMC microbiology* 6, 87.

Herthnek, D., Englund, S., Willemsen, P.T., and Bolske, G. (2006). Sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine semen by real-time PCR. *Journal of applied microbiology* 100, 1095-1102.

Hidalgo, G., and Bonilla, J.A. (1996). Lymphoproliferation assays in cattle naturally infected with bovine leukaemia virus (BLV) and bovine immunodeficiency-like virus (BIV). *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B Journal of veterinary medicine Series B* 43, 325-332.

Holbert, S., Branger, M., Souriau, A., Lamoureux, B., Ganneau, C., Richard, G., Cochard, T., Tholoniati, C., Bay, S., Winter, N., *et al.* (2015). Interferon gamma response to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* specific lipopentapeptide antigen L5P in cattle. *Research in veterinary science* 102, 118-121.

Johansen, T.B., Agdestein, A., Olsen, I., Nilsen, S.F., Holstad, G., and Djonne, B. (2009). Biofilm formation by *Mycobacterium avium* isolates originating from humans, swine and birds. *BMC microbiology* 9, 159.

Johne, H.J., and Frothingham, J. (1895). Ein eigentümlicher Fall von Tuberculose beim Rind. *Deutsche Zeitschrift für Tiermedizin und Vergleichende Pathologie* 21, 438-454.

Jungersen, G., Huda, A., Hansen, J.J., and Lind, P. (2002). Interpretation of the gamma interferon test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 9, 453-460.

Jungersen, G., Mikkelsen, H., and Grell, S.N. (2012). Use of the johnin PPD interferon-gamma assay in control of bovine paratuberculosis. *Veterinary immunology and immunopathology* 148, 48-54.

Jutila, M.A., Holderness, J., Graff, J.C., and Hedges, J.F. (2008). Antigen-independent priming: a transitional response of bovine gamma delta T-cells to infection. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases* 9, 47-57.

Kabara, E., and Coussens, P.M. (2012). Infection of Primary Bovine Macrophages with *Mycobacterium avium* Subspecies paratuberculosis Suppresses Host Cell Apoptosis. *Frontiers in microbiology* 3, 215.

Kalis, C.H., Collins, M.T., Hesselink, J.W., and Barkema, H.W. (2003). Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay. *Veterinary microbiology* 97, 73-86.

Kanof, M.E., Smith, P.D., and Zola, H. (2001). Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. *Current protocols in immunology / edited by John E Coligan [et al] Chapter 7, Unit 7 1.*

Khare, S., Nunes, J.S., Figueiredo, J.F., Lawhon, S.D., Rossetti, C.A., Gull, T., Rice-Ficht, A.C., and Adams, L.G. (2009). Early phase morphological lesions and transcriptional responses of bovine ileum infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Veterinary pathology* 46, 717-728.

Kirkwood, C.D., Wagner, J., Boniface, K., Vaughan, J., Michalski, W.P., Catto-Smith, A.G., Cameron, D.J., and Bishop, R.F. (2009). *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in children with early-onset Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases* 15, 1643-1655.

Koets, A., Rutten, V., Hoek, A., van Mil, F., Muller, K., Bakker, D., Gruys, E., and van Eden, W. (2002). Progressive bovine paratuberculosis is associated with local loss of CD4(+) T cells, increased frequency of gamma delta T cells, and related changes in T-cell function. *Infection and immunity* 70, 3856-3864.

Krishnan, M.Y., Manning, E.J., and Collins, M.T. (2009). Comparison of three methods for susceptibility testing of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis to 11 antimicrobial drugs. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 64, 310-316.

Kuentner, J.T., Chamberlin, W., Naser, S.A., Collins, M.T., Dow, C.T., Aitken, J.M., Weg, S., Telega, G., John, K., Haas, D., *et al.* (2015). Resolution of Crohn's disease and complex regional pain syndrome following treatment of paratuberculosis. *World journal of gastroenterology* 21, 4048-4062.

Kumari, S., Curado, S., Mayya, V., and Dustin, M.L. (2014). T cell antigen receptor activation and actin cytoskeleton remodeling. *Biochimica et biophysica acta* 1838, 546-556.

Kupfer, H., Monks, C.R., and Kupfer, A. (1994). Small splenic B cells that bind to antigen-specific T helper (Th) cells and face the site of cytokine production in the Th cells selectively proliferate: immunofluorescence microscopic studies of Th-B antigen-presenting cell interactions. *The Journal of experimental medicine* 179, 1507-1515.

Kurade, N.P., and Tripathi, B.N. (2008). Lymphoproliferative response and its relationship with histological lesions in experimental ovine paratuberculosis and its diagnostic implications. *Veterinary research communications* 32, 107-119.

Lambrecht, R.S., and Collins, M.T. (1992). *Mycobacterium paratuberculosis*. Factors that influence mycobactin dependence. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 15, 239-246.

Larsen, A.B., Merkal, R.S., and Cutlip, R.C. (1975). Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *American journal of veterinary research* 36, 255-257.

Le Floch, A., and Huse, M. (2015). Molecular mechanisms and functional implications of polarized actin remodeling at the T cell immunological synapse. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72, 537-556.

Leite, F.L., Eslabao, L.B., Pesch, B., Bannantine, J.P., Reinhardt, T.A., and Stabel, J.R. (2015). ZAP-70, CTLA-4 and proximal T cell receptor signaling in cows infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Veterinary immunology and immunopathology* 167, 15-21.

Leite, F.L., Stokes, K.D., Robbe-Austerman, S., and Stabel, J.R. (2013). Comparison of fecal DNA extraction kits for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis by polymerase chain reaction. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 25, 27-34.

Li, L., Bannantine, J.P., Zhang, Q., Amonsin, A., May, B.J., Alt, D., Banerji, N., Kanjilal, S., and Kapur, V. (2005). The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 12344-12349.

Lim, T.S., Goh, J.K., Mortellaro, A., Lim, C.T., Hammerling, G.J., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2012). CD80 and CD86 differentially regulate mechanical interactions of T-cells with antigen-presenting dendritic cells and B-cells. *PloS one* 7, e45185.

Lin, W., Suo, Y., Deng, Y., Fan, Z., Zheng, Y., Wei, X., and Chu, Y. (2015). Morphological change of CD4(+) T cell during contact with DC modulates T-cell activation by accumulation of F-actin in the immunology synapse. *BMC immunology* 16, 49.

Liverani, E., Scaioli, E., Cardamone, C., Dal Monte, P., and Belluzzi, A. (2014). *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in the etiology of Crohn's disease, cause or epiphenomenon? *World journal of gastroenterology* 20, 13060-13070.

Magombedze, G., Eda, S., and Ganusov, V.V. (2014). Competition for antigen between Th1 and Th2 responses determines the timing of the immune response switch during *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection in ruminants. *PLoS computational biology* 10, e1003414.

Magombedze, G., Ngonghala, C.N., and Lanzas, C. (2013). Evaluation [corrected] of the "Iceberg Phenomenon" in Johne's disease through mathematical modelling. *PloS one* 8, e76636.

Maiti, D., Bhattacharyya, A., and Basu, J. (2001). Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* promotes macrophage survival by phosphorylating Bad through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *The Journal of biological chemistry* 276, 329-333.

McAloon, C.G., Doherty, M.L., Donlon, J., Lorenz, I., Meade, J., O'Grady, L., and Whyte, P. (2016). Microbiological contamination of colostrum on Irish dairy farms. *The Veterinary record* 178, 474.

McCoy, K.D., and Le Gros, G. (1999). The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. *Immunology and cell biology* 77, 1-10.

McKenna, S.L., Keefe, G.P., Tiwari, A., VanLeeuwen, J., and Barkema, H.W. (2006). Johne's disease in Canada part II: disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers. *The Canadian veterinary journal La revue veterinaire canadienne* 47, 1089-1099.

Merkal, R.S., and Curran, B.J. (1974). Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Applied microbiology* 28, 276-279.

Merkal, R.S., Larsen, A.B., and Booth, G.D. (1975). Analysis of the effect of inapparent bovine paratuberculosis. *American journal of veterinary research* 36, 837-838.

Merkal, R.S., and McCullough, W.G. (1982). A new mycobactin, mycobactin J, from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Current Microbiology* 7, 333-335.

Meyer, K.F. (1913). The specific paratuberculosis enteritis of cattle in America. *Journal of Medical Research* 29, 147-191.

Mikkelsen, H., Aagaard, C., Nielsen, S.S., and Jungersen, G. (2011). Novel antigens for detection of cell mediated immune responses to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle. *Veterinary immunology and immunopathology* 143, 46-54.

- Mikkelsen, H., Jungersen, G., and Nielsen, S.S. (2009). Association between milk antibody and interferon-gamma responses in cattle from *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infected herds. *Veterinary immunology and immunopathology* 127, 235-241.
- Mobius, P., Hotzel, H., Rassbach, A., and Kohler, H. (2008). Comparison of 13 single-round and nested PCR assays targeting IS900, ISMav2, f57 and locus 255 for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Vet Microbiol* 126, 324-333.
- Momotani, E., Whipple, D.L., Thiermann, A.B., and Cheville, N.F. (1988). Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Veterinary pathology* 25, 131-137.
- Monteiro, L., Bonnemaison, D., Vekris, A., Petry, K.G., Bonnet, J., Vidal, R., Cabrita, J., and Megraud, F. (1997). Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *Journal of clinical microbiology* 35, 995-998.
- Moreno, C., Mehlert, A., and Lamb, J. (1988). The inhibitory effects of mycobacterial lipoarabinomannan and polysaccharides upon polyclonal and monoclonal human T cell proliferation. *Clinical and experimental immunology* 74, 206-210.
- Mortier, R.A., Barkema, H.W., Bystrom, J.M., Illanes, O., Orsel, K., Wolf, R., Atkins, G., and De Buck, J. (2013). Evaluation of age-dependent susceptibility in calves infected with two doses of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis using pathology and tissue culture. *Vet Res* 44, 94.
- Motiwala, A.S., Amonsin, A., Strother, M., Manning, E.J., Kapur, V., and Sreevatsan, S. (2004). Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis isolates recovered from wild animal species. *Journal of clinical microbiology* 42, 1703-1712.
- Mutharia, L.M., Klassen, M.D., Fairles, J., Barbut, S., and Gill, C.O. (2010). *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in muscle, lymphatic and organ tissues from cows with advanced Johne's disease. *International journal of food microbiology* 136, 340-344.
- Naser, S.A., Ghobrial, G., Romero, C., and Valentine, J.F. (2004). Culture of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet* 364, 1039-1044.

Naser, S.A., Schwartz, D., and Shafran, I. (2000). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis from breast milk of Crohn's disease patients. *The American journal of gastroenterology* 95, 1094-1095.

Naser, S.A., Thanigachalam, S., Dow, C.T., and Collins, M.T. (2013). Exploring the role of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus: a pilot study. *Gut pathogens* 5, 14.

Nekouei, O., VanLeeuwen, J., Sanchez, J., Kelton, D., Tiwari, A., and Keefe, G. (2015). Herd-level risk factors for infection with bovine leukemia virus in Canadian dairy herds. *Preventive veterinary medicine* 119, 105-113.

Nielsen, S.S., and Toft, N. (2008). Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques. *Vet Microbiol* 129, 217-235.

Norcross, M.A. (1984). A synaptic basis for T-lymphocyte activation. *Annales d'immunologie* 135D, 113-134.

Nordlund, K.V., Goodger, W.J., Pelletier, J., and Collins, M.T. (1996). Associations between subclinical paratuberculosis and milk production, milk components, and somatic cell counts in dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 208, 1872-1876.

O'Brien, R., Mackintosh, C.G., Bakker, D., Kopečna, M., Pavlik, I., and Griffin, J.F. (2006). Immunological and molecular characterization of susceptibility in relationship to bacterial strain differences in *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in the red deer (*Cervus elaphus*). *Infection and immunity* 74, 3530-3537.

Okagawa, T., Konnai, S., Nishimori, A., Ikebuchi, R., Mizorogi, S., Nagata, R., Kawaji, S., Tanaka, S., Kagawa, Y., Murata, S., *et al.* (2015). Bovine immunoinhibitory receptors contribute to the suppression of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis-specific T-cell responses. *Infect Immun*.

Okuni, J.B., Reinacher, M., Loukopoulos, P., and Ojok, L. (2012). Prevalence and spectrum of Johne's disease lesions in cattle slaughtered at two abattoirs in Kampala, Uganda. *Trop Anim Health Prod*.

Overduin, P., Schouls, L., Roholl, P., van der Zanden, A., Mahmmod, N., Herrewegh, A., and van Soolingen, D. (2004). Use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Clin Microbiol* *42*, 5022-5028.

Pang, L., Tian, X., Pan, W., and Xie, J. (2013). Structure and function of mycobacterium glycopeptidolipids from comparative genomics perspective. *J Cell Biochem* *114*, 1705-1713.

Paratuberculosis, I.C.o. (2016). 13th International Congress on Paratuberculosis. Paper presented at: International Congress on Paratuberculosis (Nantes, France).

Pickup, R.W., Rhodes, G., Arnott, S., Sidi-Boumedine, K., Bull, T.J., Weightman, A., Hurley, M., and Hermon-Taylor, J. (2005). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the catchment area and water of the River Taff in South Wales, United Kingdom, and its potential relationship to clustering of Crohn's disease cases in the city of Cardiff. *Applied and environmental microbiology* *71*, 2130-2139.

Pinedo, P.J., Buergelt, C.D., Donovan, G.A., Melendez, P., Morel, L., Wu, R., Langae, T.Y., and Rae, D.O. (2009). Association between CARD15/NOD2 gene polymorphisms and paratuberculosis infection in cattle. *Vet Microbiol* *134*, 346-352.

Plattner, B.L., Chiang, Y.W., Roth, J.A., Platt, R., Huffman, E., Zylstra, J., and Hostetter, J.M. (2011). Direct inoculation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* into ileocecal Peyer's patches results in colonization of the intestine in a calf model. *Veterinary pathology* *48*, 584-592.

Plattner, B.L., Huffman, E., Jones, D.E., and Hostetter, J.M. (2014). T lymphocyte responses during early enteric *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cattle. *Veterinary immunology and immunopathology* *157*, 12-19.

Plattner, B.L., Huffman, E.L., and Hostetter, J.M. (2013). Gamma-delta T-cell responses during subcutaneous *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* challenge in sensitized or naive calves using matrix biopolymers. *Veterinary pathology* *50*, 630-637.

Polat, M., Takeshima, S.N., Hosomichi, K., Kim, J., Miyasaka, T., Yamada, K., Arainga, M., Murakami, T., Matsumoto, Y., de la Barra Diaz, V., *et al.* (2016). A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. *Retrovirology* *13*, 4.

Pollock, J.M., and Welsh, M.D. (2002). The WC1(+) gammadelta T-cell population in cattle: a possible role in resistance to intracellular infection. *Veterinary immunology and immunopathology* 89, 105-114.

Poupart, P., Coene, M., Van Heuverswyn, H., and Cocito, C. (1993). Preparation of a specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnosis of Johne's disease. *Journal of clinical microbiology* 31, 1601-1605.

Quah, B.J., and Parish, C.R. (2010). The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation. *Journal of visualized experiments. J Vis Exp.* 2010; (44): 2259.

Qureshi, O.S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E.M., Baker, J., Jeffery, L.E., Kaur, S., Briggs, Z., *et al.* (2011). Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Sciences* 332, 600-603.

Rani, P.S., Sechi, L.A., and Ahmed, N. (2010). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as a trigger of type-1 diabetes: destination Sardinia, or beyond? *Gut pathogens* 2, 1.

Rhodes, G., Richardson, H., Hermon-Taylor, J., Weightman, A., Higham, A., and Pickup, R. (2014). *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis*: Human Exposure through Environmental and Domestic Aerosols. *Pathogens* 3, 577-595.

Roach, T.I., Barton, C.H., Chatterjee, D., and Blackwell, J.M. (1993). Macrophage activation: lipoarabinomannan from avirulent and virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* differentially induces the early genes *c-fos*, *KC*, *JE*, and tumor necrosis factor- α . *Journal of immunology* 150, 1886-1896.

Rogers, A.N., VanBuren, D.G., Hedblom, E., Tilahun, M.E., Telfer, J.C., and Baldwin, C.L. (2005a). Function of ruminant gammadelta T cells is defined by WC1.1 or WC1.2 isoform expression. *Veterinary immunology and immunopathology* 108, 211-217.

Rogers, A.N., Vanburen, D.G., Hedblom, E.E., Tilahun, M.E., Telfer, J.C., and Baldwin, C.L. (2005b). Gammadelta T cell function varies with the expressed WC1 coreceptor. *Journal of immunology* 174, 3386-3393.

Rosseels, V., and Huygen, K. (2008). Vaccination against paratuberculosis. Expert review of vaccines 7, 817-832.

Rosu, V., Ahmed, N., Paccagnini, D., Pacifico, A., Zanetti, S., and Sechi, L.A. (2008). Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis is not associated with type-2 diabetes mellitus. Annals of clinical microbiology and antimicrobials 7, 9.

Rowe, M.T., and Grant, I.R. (2006). Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis and its potential survival tactics. Lett Appl Microbiol 42, 305-311.

Ruiz-Larranaga, O., Garrido, J.M., Iriando, M., Manzano, C., Molina, E., Koets, A.P., Rutten, V.P., Juste, R.A., and Estonba, A. (2010). Genetic association between bovine NOD2 polymorphisms and infection by Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Holstein-Friesian cattle. Anim Genet.

Rumsey, J., Valentine, J.F., and Naser, S.A. (2006). Inhibition of phagosome maturation and survival of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in polymorphonuclear leukocytes from Crohn's disease patients. Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research 12, BR130-139.

Salgado, M., Alfaro, M., Salazar, F., Badilla, X., Troncoso, E., Zambrano, A., González, M., Mitchell, R.M., and Collins, M.T. (2015). Application of cattle slurry containing Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) to grassland soil and its effect on the relationship between MAP and free-living amoeba. Veterinary microbiology 175, 26-34.

Savi, R., Ricchi, M., Cammi, G., Garbarino, C., Leo, S., Pongolini, S., and Arrigoni, N. (2015). Survey on the presence of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in ground beef from an industrial meat plant. Veterinary microbiology 177, 403-408.

Schlesinger, L.S. (1998). Mycobacterium tuberculosis and the complement system. Trends in microbiology 6, 47-49; discussion 49-50.

Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., and Johne, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. J Appl Microbiol 113, 1014-1026.

Sechi, L.A., Paccagnini, D., Salza, S., Pacifico, A., Ahmed, N., and Zanetti, S. (2008a). *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis bacteremia in type 1 diabetes mellitus: an infectious trigger? *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 46, 148-149.

Sechi, L.A., Rosu, V., Pacifico, A., Fadda, G., Ahmed, N., and Zanetti, S. (2008b). Humoral immune responses of type 1 diabetes patients to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis lend support to the infectious trigger hypothesis. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 15, 320-326.

Secott, T.E., Lin, T.L., and Wu, C.C. (2001). Fibronectin attachment protein homologue mediates fibronectin binding by *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Infection and immunity* 69, 2075-2082.

Secott, T.E., Lin, T.L., and Wu, C.C. (2004). *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis fibronectin attachment protein facilitates M-cell targeting and invasion through a fibronectin bridge with host integrins. *Infection and immunity* 72, 3724-3732.

Semret, M., Turenne, C.Y., de Haas, P., Collins, D.M., and Behr, M.A. (2006). Differentiating host-associated variants of *Mycobacterium avium* by PCR for detection of large sequence polymorphisms. *J Clin Microbiol* 44, 881-887.

Shin, S.J., Lee, B.S., Koh, W.J., Manning, E.J., Anklam, K., Sreevatsan, S., Lambrecht, R.S., and Collins, M.T. (2010). Efficient differentiation of *Mycobacterium avium* complex species and subspecies by use of five-target multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 48, 4057-4062.

Sigur-Dardottir, O.G., Press, C.M., and Evensen, O. (2001). Uptake of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis through the distal small intestinal mucosa in goats: an ultrastructural study. *Veterinary pathology* 38, 184-189.

Sigurdardottir, O.G., Bakke-McKellep, A.M., Djonne, B., and Evensen, O. (2005). *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. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 28, 223-230.

Sigurethardottir, O.G., Valheim, M., and Press, C.M. (2004). Establishment of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in the intestine of ruminants. *Advanced drug delivery reviews* 56, 819-834.

Simoes, L.C., Azevedo, N., Pacheco, A., Keevil, C.W., and Vieira, M.J. (2006). Drinking water biofilm assessment of total and culturable bacteria under different operating conditions. *Biofouling* 22, 91-99.

Sleasman, J.W., Aleixo, L.F., Morton, A., Skoda-Smith, S., and Goodenow, M.M. (1996). CD4+ memory T cells are the predominant population of HIV-1-infected lymphocytes in neonates and children. *Aids* 10, 1477-1484.

Sohal, J.S., Arsenault, J., Labrecque, O., Fairbrother, J.H., Roy, J.P., Fecteau, G., and L'Homme, Y. (2014). Genetic structure of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis population in Quebec cattle herds revealed by using a combination of multi-locus genomic analysis. *J Clin Microbiol.* 52: 2764–2775.

Sohal, J.S., Singh, S.V., Subodh, S., Sheoran, N., Narayanasamy, K., Singh, P.K., Singh, A.V., and Maitra, A. (2009). *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis diagnosis and geno-typing: genomic insights. *Microbiol Res* 164, 330-337.

Sommer, S., Pudrith, C.B., Colvin, C.J., and Coussens, P.M. (2009). *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis suppresses expression of IL-12p40 and iNOS genes induced by signalling through CD40 in bovine monocyte-derived macrophages. *Veterinary immunology and immunopathology* 128, 44-52.

Souza, C., Davis, W.C., Eckstein, T.M., Sreevatsan, S., and Weiss, D.J. (2013). Mannosylated lipoarabinomannans from *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis alters the inflammatory response by bovine macrophages and suppresses killing of *Mycobacterium avium* subsp. avium organisms. *PloS one* 8, e75924.

St-Jean, G., and Jernigan, A.D. (1991). Treatment of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in ruminants. *The Veterinary clinics of North America Food animal practice* 7, 793-804.

St Jean, G. (1996). Treatment of clinical paratuberculosis in cattle. *The Veterinary clinics of North America Food animal practice* 12, 417-430.

Stabel, J.R., and Bannantine, J.P. (2005). Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in fecal samples. *Journal of clinical microbiology* *43*, 4744-4750.

Strommenger, B., Stevenson, K., and Gerlach, G.F. (2001). Isolation and diagnostic potential of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *FEMS microbiology letters* *196*, 31-37.

Subharat, S., Shu, D., Wedlock, D.N., Price-Carter, M., de Lisle, G.W., Luo, D., Collins, D.M., and Buddle, B.M. (2012). Immune responses associated with progression and control of infection in calves experimentally challenged with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Veterinary immunology and immunopathology* *149*, 225-236.

Swain, S.L., McKenzie, D.T., Dutton, R.W., Tonkonogy, S.L., and English, M. (1988). The role of IL4 and IL5: characterization of a distinct helper T cell subset that makes IL4 and IL5 (Th2) and requires priming before induction of lymphokine secretion. *Immunological reviews* *102*, 77-105.

Sweeney, R.W. (1996). Transmission of paratuberculosis. *The Veterinary clinics of North America Food animal practice* *12*, 305-312.

Sweeney, R.W., Collins, M.T., Koets, A.P., McGuirk, S.M., and Roussel, A.J. (2012). Paratuberculosis (Johne's disease) in cattle and other susceptible species. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* *26*, 1239-1250.

Tanaka, S., Miyazawa, K., Kuwano, A., Watanabe, K., Ohwada, S., Aso, H., Nishida, S., and Yamaguchi, T. (2008). Age-related changes in leukocytes and T cell subsets in peripheral blood of Japanese Black cattle. *Animal Science Journal* *79*, 368-374.

Thirunavukkarasu, S., Plain, K.M., Eckstein, T.M., de Silva, K., and Whittington, R.J. (2013). Cellular and humoral immunogenicity of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis specific lipopeptide antigens. *Research in veterinary science* *95*, 123-129.

Thorel, M.F., Krichevsky, M., and Levy-Frebault, V.V. (1990). 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. *International journal of systematic bacteriology* 40, 254-260.

Thornton, C.G., and Passen, S. (2004). Inhibition of PCR amplification by phytic acid, and treatment of bovine fecal specimens with phytase to reduce inhibition. *Journal of microbiological methods* 59, 43-52.

Tolar, P., and Spillane, K.M. (2014). Force generation in B-cell synapses: mechanisms coupling B-cell receptor binding to antigen internalization and affinity discrimination. *Advances in immunology* 123, 69-100.

Trueblood, E.S., Brown, W.C., Palmer, G.H., Davis, W.C., Stone, D.M., and McElwain, T.F. (1998). B-lymphocyte proliferation during bovine leukemia virus-induced persistent lymphocytosis is enhanced by T-lymphocyte-derived interleukin-2. *Journal of virology* 72, 3169-3177.

Tseng, S.Y., Waite, J.C., Liu, M., Vardhana, S., and Dustin, M.L. (2008). T cell-dendritic cell immunological synapses contain TCR-dependent CD28-CD80 clusters that recruit protein kinase C theta. *Journal of immunology* 181, 4852-4863.

Tuci, A., Tonon, F., Castellani, L., Sartini, A., Roda, G., Marocchi, M., Caponi, A., Munarini, A., Rosati, G., Ugolini, G., *et al.* (2011). Fecal detection of *Mycobacterium avium* paratuberculosis using the IS900 DNA sequence in Crohn's disease and ulcerative colitis patients and healthy subjects. *Digestive diseases and sciences* 56, 2957-2962.

Turenne, C.Y., Collins, D.M., Alexander, D.C., and Behr, M.A. (2008). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* subsp. *avium* are independently evolved pathogenic clones of a much broader group of *M. avium* organisms. *Journal of bacteriology* 190, 2479-2487.

Twort, F.W., and Ingram, G.L.Y. (1912). A Method for Isolating and Cultivating the *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis*, *Johne*, and some Experiments on the Preparation of a Diagnostic Vaccine for Pseudo-tuberculous Enteritis of Bovines. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 84, 517-542.

Unitt, J., and Hornigold, D. (2011). Plant lectins are novel Toll-like receptor agonists. *Biochemical pharmacology* 81, 1324-1328.

van Hulzen, K.J., Heuven, H.C., Nielen, M., Hoeboer, J., Santema, W.J., and Koets, A.P. (2011). Different *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* MIRU-VNTR patterns coexist within cattle herds. *Vet Microbiol* *148*, 419-424.

van Oers, N.S., Killeen, N., and Weiss, A. (1994). ZAP-70 is constitutively associated with tyrosine-phosphorylated TCR zeta in murine thymocytes and lymph node T cells. *Immunity* *1*, 675-685.

Verdier, J., Deroche, L., Allez, M., Loy, C., Biet, F., Bodier, C.C., Bay, S., Ganneau, C., Matysiak-Budnik, T., Reytrat, J.M., *et al.* (2013). Specific IgG response against *Mycobacterium avium paratuberculosis* in children and adults with Crohn's disease. *PLoS one* *8*, e62780.

Waddell, L.A., Rajic, A., Stark, K.D., and Mc, E.S. (2015). The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: a systematic review and meta-analyses of the evidence. *Epidemiology and infection* *143*, 3135-3157.

Waddell, L.A., Rajic, A., Stark, K.D., and McEwen, S.A. (2016). The potential Public Health Impact of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: Global Opinion Survey of Topic Specialists. *Zoonoses and public health* *63*, 212-222.

Wang, T.T., Dabbas, B., Laperriere, D., Bitton, A.J., Soualhia, H., Tavera-Mendoza, L.E., Dionne, S., Servant, M.J., Bitton, A., Seidman, E.G., *et al.* (2010). Direct and indirect induction by 1,25-dihydroxyvitamin D3 of the NOD2/CARD15-defensin beta2 innate immune pathway defective in Crohn disease. *The Journal of biological chemistry* *285*, 2227-2231.

Waters, W.R., Miller, J.M., Palmer, M.V., Stabel, J.R., Jones, D.E., Koistinen, K.A., Steadham, E.M., Hamilton, M.J., Davis, W.C., and Bannantine, J.P. (2003). Early induction of humoral and cellular immune responses during experimental *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of calves. *Infection and immunity* *71*, 5130-5138.

Weigoldt, M., Meens, J., Doll, K., Fritsch, I., Mobius, P., Goethe, R., and Gerlach, G.F. (2011). Differential proteome analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* grown in vitro and isolated from cases of clinical Johne's disease. *Microbiology* *157*, 557-565.

Weiss, D.J., Evanson, O.A., de Souza, C., and Abrahamsen, M.S. (2005). A critical role of interleukin-10 in the response of bovine macrophages to infection by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Am J Vet Res* 66, 721-726.

Weiss, D.J., Evanson, O.A., and Souza, C.D. (2006). Mucosal immune response in cattle with subclinical Johne's disease. *Veterinary pathology* 43, 127-135.

Weiss, D.J., Souza, C.D., Evanson, O.A., Sanders, M., and Rutherford, M. (2008). Bovine monocyte TLR2 receptors differentially regulate the intracellular fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Journal of leukocyte biology* 83, 48-55.

Wells, S.J., Collins, M.T., Faaberg, K.S., Wees, C., Tavoranpanich, S., Petrini, K.R., Collins, J.E., Cernicchiaro, N., and Whitlock, R.H. (2006). Evaluation of a rapid fecal PCR test for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cattle. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 13, 1125-1130.

Welsh, M.D., Kennedy, H.E., Smyth, A.J., Girvin, R.M., Andersen, P., and Pollock, J.M. (2002). Responses of bovine WC1(+) gammadelta T cells to protein and nonprotein antigens of *Mycobacterium bovis*. *Infection and immunity* 70, 6114-6120.

Wesch, D., Peters, C., Oberg, H.H., Pietschmann, K., and Kabelitz, D. (2011). Modulation of gammadelta T cell responses by TLR ligands. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68, 2357-2370.

Whan, L.B., Grant, I.R., Ball, H.J., Scott, R., and Rowe, M.T. (2001). Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water. *Letters in applied microbiology* 33, 227-231.

Whipple, D.L., Callihan, D.R., and Jarnagin, J.L. (1991). Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 3, 368-373.

Whitlock, R.H., and Buergelt, C. (1996). Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *The Veterinary clinics of North America Food animal practice* 12, 345-356.

Whittington, R.J., Hope, A.F., Marshall, D.J., Taragel, C.A., and Marsh, I. (2000). Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. *J Clin Microbiol* 38, 3240-3248.

Whittington, R.J., Marsh, I., Turner, M.J., McAllister, S., Choy, E., Eamens, G.J., Marshall, D.J., and Ottaway, S. (1998). Rapid detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in clinical samples from ruminants and in spiked environmental samples by modified BACTEC 12B radiometric culture and direct confirmation by IS900 PCR. *J Clin Microbiol* 36, 701-707.

Whittington, R.J., Marsh, I.B., and Reddacliff, L.A. (2005). Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment. *Applied and environmental microbiology* 71, 5304-5308.

Whittington, R.J., Marsh, I.B., Saunders, V., Grant, I.R., Juste, R., Sevilla, I.A., Manning, E.J., and Whitlock, R.H. (2011). Culture phenotypes of genomically and geographically diverse *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from different hosts. *Journal of clinical microbiology* 49, 1822-1830.

Whittington, R.J., Marshall, D.J., Nicholls, P.J., Marsh, I.B., and Reddacliff, L.A. (2004). Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Applied and environmental microbiology* 70, 2989-3004.

Whittington, R.J., and Windsor, P.A. (2009). In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis. *Veterinary journal* 179, 60-69.

Wilson, D.J., Rossiter, C., Han, H.R., and Sears, P.M. (1993). Association of *Mycobacterium paratuberculosis* infection with reduced mastitis, but with decreased milk production and increased cull rate in clinically normal dairy cows. *American journal of veterinary research* 54, 1851-1857.

Wu, C.W., Livesey, M., Schmoller, S.K., Manning, E.J., Steinberg, H., Davis, W.C., Hamilton, M.J., and Talaat, A.M. (2007). Invasion and persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* during early stages of Johne's disease in calves. *Infection and immunity* 75, 2110-2119.

Wu, Y., Wu, W., Wong, W.M., Ward, E., Thrasher, A.J., Goldblatt, D., Osman, M., Digard, P., Canaday, D.H., and Gustafsson, K. (2009). Human gamma delta T cells: a lymphoid lineage cell capable of professional phagocytosis. *Journal of immunology* *183*, 5622-5629.

Yuseff, M.I., Pierobon, P., Reversat, A., and Lennon-Dumenil, A.M. (2013). How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity. *Nature reviews Immunology* *13*, 475-486.

Zhu, X., Tu, Z.J., Coussens, P.M., Kapur, V., Janagama, H., Naser, S., and Sreevatsan, S. (2008). Transcriptional analysis of diverse strains *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in primary bovine monocyte derived macrophages. *Microbes and infection / Institut Pasteur* *10*, 1274-1282.

Zurbrick, B.G., and Czuprynski, C.J. (1987). Ingestion and intracellular growth of *Mycobacterium paratuberculosis* within bovine blood monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infection and immunity* *55*, 1588-1593.

