

## TABLE DES MATIERES

Liste des figures .....	
Liste des tableaux .....	
Liste des annexes .....	
Liste des abréviations.....	
Introduction générale.....	
<b>I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>I.1 EPIDEMIOLOGIE DE LA PARATUBERCULOSE</b>	<b>6</b>
<b>I.1.1 Étiologie.....</b>	<b>6</b>
<b>I.1.1.1 Analyse taxonomique et phylogénétique.....</b>	<b>7</b>
<b>I.1.1.2 Tropisme d'espèce de MAP.....</b>	<b>9</b>
<b>I.1.1.3 Culture, caractères biochimiques.....</b>	<b>10</b>
<b>I.1.1.4 Survie et résistance de MAP dans l'environnement.....</b>	<b>11</b>
<b>I.1.2 Distribution de la maladie.....</b>	<b>13</b>
<b>I.1.3 Impact économique.....</b>	<b>14</b>
<b>I.1.4 Voies de contamination et matières virulentes.....</b>	<b>16</b>
<b>I.1.5 Prophylaxie médicale (vaccination).....</b>	<b>18</b>
<b>I.1.6 La paratuberculose et maladie de Crohn (Menace zoonotique).....</b>	<b>19</b>
<b>I.2 ASPECTS ANATOMOPATHOLOGIQUES DE LA PARATUBERCULOSE</b>	<b>20</b>
<b>I.2.1 Système lymphoïde du tube digestif.....</b>	<b>20</b>
<b>I.2.1.1 Système lymphoïde du tube digestif des ruminants (GALT) .....</b>	<b>21</b>
<b>I.2.1.1.1 Épithélium associé au follicule (EAF).....</b>	<b>22</b>
<b>I.2.1.1.2 Cellules M.....</b>	<b>23</b>
<b>I.2.2 Pathogénie de la paratuberculose.....</b>	<b>24</b>
<b>I.2.2.1 Mécanismes de l'infection.....</b>	<b>25</b>
<b>I.2.2.1.1 Translocation de MAP de la lumière intestinale à la muqueuse</b>	<b>25</b>
<b>I.2.2.1.2 Prise de MAP par les cellules M.....</b>	<b>29</b>
<b>I.2.2.1.3 Phagocytose de MAP par des macrophages.....</b>	<b>30</b>
<b>I.2.3 Aspects lésionnels de la paratuberculose.....</b>	<b>36</b>
<b>I.2.3.1 Emplacement des lésions pendant les stades de la Ptb.....</b>	<b>37</b>
<b>I.2.3.2 Classification des lésions histologiques (grading).....</b>	<b>43</b>
<b>I.3 DIAGNOSTIC DE LA PARATUBERCULOSE</b>	<b>45</b>
<b>I.3.1 Diagnostic clinique.....</b>	<b>45</b>
<b>I.3.2 Diagnostic nécropsique.....</b>	<b>45</b>
<b>I.3.3 Diagnostic précoce.....</b>	<b>45</b>
<b>I.3.3.1 Profils de réaction immunitaire.....</b>	<b>45</b>
<b>I.3.3.2 Dépistage précoce de l'infection de MAP.....</b>	<b>48</b>
<b>I.3.3.3 Marqueurs précoces de l'infection de MAP.....</b>	<b>49</b>
<b>I.3.4 Méthodes de diagnostic de la paratuberculose.....</b>	<b>51</b>
<b>I.3.4.1 Méthodes directes.....</b>	<b>53</b>
<b>I.3.4.1.1 Culture .....</b>	<b>53</b>
<b>I.3.4.1.2 PCR (Amplification en Chaîne par Polymérase).....</b>	<b>55</b>
<b>I.3.4.1.3 Coloration de Ziehl-Neelsen.....</b>	<b>56</b>
<b>I.3.4.2 Méthodes indirectes.....</b>	<b>57</b>
<b>I.3.4.2.1 Méthode immuno-enzymatique (ELISA).....</b>	<b>58</b>
<b>I.3.4.2.2 Diagnostic Anatomopathologique.....</b>	<b>59</b>

I.3.4.2.2.1 Lésions macroscopiques.....	59
I.3.4.2.2.2 Lésions microscopiques.....	59
I.3.4.2.3 Immunohistochimie (IHC) .....	61
I.3.5 Profils diagnostiques dans les bovins cliniques contre subcliniques.....	63
I.3.6 Concordance des tests diagnostiques.....	63
II. Matériels et Méthodes.....	67
II.1 Animaux et prélèvements.....	67
II.2 Examen histopathologique.....	68
II.2.1 .....	Protocol 68
histopathologique.....	68
II.2.2 Critères d'évaluation pour les lésions histopathologiques.....	69
II.3 Technique de coloration immunohistochimique.....	69
II.4           Méthode                           immuno-enzymatique                           (ELISA)	73
.....	
II.4.1 Collecte des échantillons de sérum.....	73
II.4.2                   Technique                           d'analyse                           par	73
ELISA.....	
III. Résultats et Discussion.....	76
IV. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	96
V. ANNEXES.....	

**Abstract:** Paratuberculosis (Ptb), caused by *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (Map), is a chronic enteritis that affects many ruminants and other wild animals worldwide. Although the prevalence of infection is unknown in nearly all countries, many studies report that paratuberculosis is the greatest economic problem in animal health. Here we report the occurrence of paratuberculosis in herds of cattle in the Tiaret region of Algeria, using different diagnostic procedures. Tiaret and Sougueur abattoirs were being selected representing the main parts of the province. Four hundred intestines were examined from apparently healthy cattle that were slaughtered at Tiaret city (300), and Sougueur (100) slaughterhouses. Occurrence of subclinical paratuberculosis in cattle was 54%, 51%, 8%, and 7.5% using histopathology, IHC, ELISA and ZN techniques, respectively. Histopathology is reported to be a better diagnostic tool mainly when complemented with immunohistochemistry.

**Keywords:** Paratuberculosis, Bovine, Enteritis, Immunohistochemistry, Histopathology, ELISA, *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*, Ziehl-Neelsen, Occurrence, Tiaret.

**Résumé :** La paratuberculosis (Ptb), provoqué par *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), est une entérite chronique qui affecte beaucoup de ruminants et d'autres animaux sauvages dans le monde entier. Bien que la prévalence de l'infection soit inconnue dans presque tous les pays, beaucoup d'études indiquent que la paratuberculose est le plus grand problème économique pour la santé animale. Ici nous rapportons l'occurrence de la paratuberculose dans les troupeaux de bovins dans la région de Tiaret (Algérie), utilisant différents tests diagnostiques. Les abattoirs de Tiaret et de Sougueur ont été choisis représentant les parties principales de la wilaya. Quatre cents intestins de bovins apparemment sains qui ont été abattus dans les abattoirs de Tiaret (300), et de Sougueur (100). L'occurrence de la paratuberculose subclinique dans les bovins était 54%, 51%, 8%, et 7.5% utilisant les techniques d'histopathologie, IHC, ELISA et ZN, respectivement. On rapporte que l'histopathologie est un meilleur moyen de diagnostic principalement une fois complétée avec l'immunohistochimie.

**Mots-clés:** Paratuberculose, Bovin, Entérite, Immunohistochimie, Histopathologie, ELISA, *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*, Ziehl-Neelsen, Occurrence, Tiaret

**الملخص:** مرض نظير السل (PTB) الذي تسببه البكتيريا *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) هو التهاب الأمعاء المزمن الذي يصيب الحيوانات المجترة والعديد من الحيوانات البرية الأخرى في جميع أنحاء العالم. على الرغم من أن معدل انتشار العدوى غير معروف في جميع البلدان تقريبا، تفيد العديد من الدراسات أن نظير السل هو أكبر مشكلة اقتصادية في مجال الصحة الحيوانية. نحن نوضح في هذه الدراسة وقوع نظير السل في قطاع الأبقار بولاية تيارت (الجزائر)، وذلك باستخدام تقنيات مختلفة للتشخيص. تم إختيار مسالخ تيارت والسوقر كونها تمثل أجزاء معتبرة من الولاية. تم فحص أربع مائة عينة أمعاء من أبقار تبدو صحية والتي ذبحت في مسالخ مدينة تيارت (300)، والسوقر (100). حدوث نظير السل تحت السريري في الأبقار بنسبة 54٪، 51٪، 8٪، و 7.5٪ باستخدام التشريح المرضي (histopathologie)، IHC، ELISA، وتقنيات ZN على التوالي. وإتضح أن التشريح المرضي يمثل أفضل طريقة تشخيصية بشكل رئيسي عندما تستكمل بتقنية أخرى مناعية.

**كلمات المفتاح:** نظير السل، الأبقار، إلتهاب الأمعاء، المناعية، التشريح، ELISA، *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis*. نظير السل، حدوث، تيارت.

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b>	<b>Différentes voies de transmission de la paratuberculose bovine</b>	<b>17</b>
<b>Figure 2.</b>	<b>Evolution des deux composantes de la réponse immunitaire et de l'excrétion. (Chastel, 2008b).</b>	<b>47</b>
<b>Figure 3.</b>	<b>Evidence de la paratuberculose (subcliniques) dans un cheptel avec un cas clinique (partie émergée de l'iceberg).</b>	<b>53</b>
<b>Figure 4.</b>	<b>Image satellite de la zone d'étude (Tiaret).</b>	<b>67</b>
<b>Figure 5.</b>	<b>Différents tests de diagnostic de la paratuberculose (prélèvement, histopathologie, IHC et Ziehl-Neelsen).</b>	<b>72</b>
<b>Figure 6.</b>	<b>Schéma démonstratif des différentes étapes de la technique de coloration immunohistochimique.</b>	<b>73</b>
<b>Figure 7.</b>	<b>Matériel (lecteur de microplaque et micropipettes) et réactifs de l'analyse ELISA.</b>	<b>74</b>
<b>Figure 8.</b>	<b>Plissement (corrugation) de la muqueuse intestinale (iléum).</b>	<b>76</b>
<b>Figure 9.</b>	<b>Représentation graphique de la répartition des cas de Ptb subclinique par histopathologie, IHC et la technique d'ELISA. Tiaret</b>	<b>78</b>
<b>Figure 10.</b>	<b>Représentation graphique de la répartition des cas de Ptb subclinique par grade de lésion de l'iléum dans les deux zones d'étude.</b>	<b>79</b>
<b>Figure 11.</b>	<b>Iléum ; bovin. agrégats de cellules épithélioïdes dans la partie basale de la muqueuse. H&amp;E. 40x</b>	<b>79</b>
<b>Figure 12.</b>	<b>GLM ; bovin. Microgranulome avec des couches périphériques (nids) de cellules épithélioïdes. H&amp;E. 40x.</b>	<b>80</b>
<b>Figure 13.</b>	<b>Iléum ; bovin. Cellule géante multinucléée isolée dans la muqueuse de l'intestin. H&amp;E. 40x</b>	<b>80</b>
<b>Figure 14.</b>	<b>Iléum ; bovin. Cellule géante multinucléée isolée entourée par des cellules épithélioïdes. H&amp;E. 40x</b>	<b>81</b>

<b>Figure 15.</b>	<b>Iléum ; bovin. Quelques cellules épithélioïdes associées à une infiltration par des éosinophiles (petites flèches noires). H&amp;E. 40x.</b>	<b>81</b>
<b>Figure 16.</b>	<b>Iléum ; bovin. Hyperplasie lymphoïdes des PPs vers la surface de la muqueuse (entre les villosités). H&amp;E. 40x</b>	<b>82</b>
<b>Figure 17.</b>	<b>GLM ; bovin. Signal MAP-positif d'intensité. IHC. 40x.</b>	<b>84</b>
<b>Figure 18.</b>	<b>Intestin ; bovin. Plusieurs bacilles acido-résistants surtout à l'extérieure des macrophages. ZN. 100 X</b>	<b>85</b>
<b>Figure 19.</b>	<b>GLM ; bovin. Plusieurs bacilles acido-résistants surtout à l'extérieure des macrophages. ZN. 100 X</b>	<b>85</b>
<b>Figure 20.</b>	<b>Iléum ; bovin. Épaississement de la muqueuse intestinale suite à une forte infiltration par des macrophages et des cellules épithélioïdes. H&amp;E. 10x.</b>	<b>86</b>
<b>Figure 21.</b>	<b>Iléum ; bovin. Épaississement de la muqueuse intestinale suite à une forte infiltration par des macrophages et des cellules épithélioïdes. H&amp;E. 10x.</b>	<b>86</b>
<b>Figure 22.</b>	<b>Iléum ; bovin. Réaction granulomateuse avec de larges zones pâles formées d'agrégations de cellules épithélioïdes. H&amp;E. 10x</b>	<b>87</b>
<b>Figure 23.</b>	<b>Iléum ; bovin. Zone pâle de la réaction granulomateuse formées principalement d'agrégats de cellules épithélioïdes. H&amp;E. 40x</b>	<b>87</b>
<b>Figure 24.</b>	<b>Iléum ; bovin. Signal MAP-positif de faible intensité dans la région basale de la muqueuse. IHC. 40x</b>	<b>88</b>
<b>Figure 25.</b>	<b>Iléum ; bovin. Signal MAP-positif d'intensité modérée dans la région basale de la muqueuse. IHC. 40x</b>	<b>90</b>
<b>Figure 26.</b>	<b>GLM ; bovin. Infiltration massive du sinus paracortical ; notez l'absence du sinus. H&amp;E. 10x</b>	<b>90</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b>	<b>Critères d'évaluation et de classification (en grade) des lésions histopathologiques trouvés dans l'iléum et la valvule iléocæcale des bovins</b>	<b>77</b>
<b>Tableau 2.</b>	<b>Distribution des cas de Ptb subclinique dans 400 bovins utilisant des examens histopathologiques, IHC et la technique d'ELISA. Tiaret, 2011-2012</b>	<b>78</b>
<b>Tableau 3.</b>	<b>Distribution de 400 iléums et ganglions lymphatiques mésentériques (GLMs) de bovins examinés par l'histopathologie et l'immunohistochimie, Tiaret, 2011-2012</b>	<b>83</b>
<b>Tableau.4.</b>	<b>Distribution en grades des cas positifs de paratuberculose chez les bovins par examen histopathologique de l'intestin (iléum), Tiaret, 2011-2012</b>	<b>84</b>
<b>Tableau.5.</b>	<b>Distribution de l'intensité du signal positif des cas positifs de la maladie de Johne dans les bovins par examen immunohistochimique de l'intestin (iléum), Tiaret, 2011-2012</b>	<b>89</b>
<b>Tableau.6.</b>	<b>Distribution de l'intensité du signal positif des cas positifs de la maladie de Johne dans les bovins par examen immunohistochimique des GLMs, Tiaret, 2011-2012</b>	<b>89</b>

## Liste des annexes

<b>Annexe 1.</b>	<b>Caractéristiques et qualités des principaux tests ELISA disponibles</b>	<b>114</b>
<b>Annexe 2.</b>	<b>Protocole d'immunohistochimie M. Paratuberculosis polyclonal de Lapin. (Judy Stabel et Allyn Lambertz).</b>	<b>115</b>
<b>Annexe 3.</b>	<b>ANNEXE 3. Méthode de préparation d'une solution de formaline tamponnée 10%.</b>	<b>118</b>

## Liste des abréviations

<b>ACP</b>	Amplification en Chaîne par Polymérase (PCR en anglais)
<b>Ab-ELISA</b>	Absorbed Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<b>BAAR</b>	Bactéries Acido-Alcool-Résistantes
<b>BCG</b>	Bacillus Calmette-Guérin
<b>CGMN</b>	Cellules géantes multinucléées
<b>CMH II</b>	Complexe Majeur d'Histocompatibilité II
<b>CR3</b>	Récepteur de complément 3
<b>EAF</b>	Épithélium associé au follicule
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<b>FC</b>	Fixation du complément
<b>FFIP</b>	Fixés au formol et inclus dans la paraffine
<b>GALT</b>	Système lymphoïde du tube digestif
<b>GL</b>	Globule leucocyte
<b>GLM</b>	Ganglions lymphatique mésentérique
<b>IHC</b>	Immunohistochimie
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interféron-gamma
<b>Maa</b>	<i>Mycobacterium avium subsp. avium</i>
<b>MAC</b>	Complexe <i>Mycobacterium avium-intracellulare</i>
<b>MAP</b>	<i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i>
<b>MC</b>	Maladie de Crohn
<b>MJ</b>	Maladie de Johne
<b>PBS</b>	Solution saline tamponnée au phosphate
<b>PLF</b>	Protéines Liant la Fibronectine
<b>PPJs</b>	Plaques de Peyer jéjunales
<b>PPs</b>	Plaques de Peyer
<b>PTB</b>	Paratuberculose
<b>SAB</b>	Sérum-albumine bovin
<b>SOD</b>	Superoxyde dismutase
<b>TB</b>	Tuberculose
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Facteur onconécrosant-alpha

<b>VIC</b>	Valvule iléo-caecale
<b>VICPP</b>	Plaques de Peyer de la Valvule iléo-caecale
<b>ZN</b>	Ziehl-Neelsen

## INTRODUCTION GENERALE :

La Paratuberculose (PTB) ou maladie de Johne (MJ) est caractérisée par une entérite chronique incurable et lentement progressive dans les bovins. Elle est due à l'infection de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) : une bactérie de croissance lente, acido-résistant, et dépendante de la mycobactine qui cause l'épaississement de la paroi intestinale et une diminution de l'absorption (Dreier et al., 2006; Momotani et al., 2012). La maladie se produit dans le monde entier et représente un problème économique énorme pour l'industrie de production animale (Cristian et al., 2015).

Les animaux deviennent infectés avec *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* très tôt en tant que jeunes veaux, via la voie oro-fécale et peuvent rester subcliniquement infectés pour une longue durée, ils deviennent des excréteurs des bactéries avant la progression au stade final d'infection (Stabel et al., 2002).

Bien que la prévalence de l'infection soit inconnue dans beaucoup de pays, il y a de nombreuses études indiquant que la paratuberculose est un plus grand problème économique dans la santé animale (Stabel, 1998; Raizman et al., 2009).

Le diagnostic des cas subcliniques de paratuberculose est un problème reconnu, soit sur le terrain ou en post mortem (Kurade et al., 2004). En outre, on a observé que le diagnostic de la paratuberculose subclinique est plus difficile par l'histopathologie car les lésions peuvent être subtiles et les organismes peuvent être rares (Buergelt et Ginn, 2000) et parce que plusieurs facteurs affectent la sensibilité de ce test, y compris la distribution multifocale des petits granulomes, qui peuvent empêcher l'identification histopathologique (Martinson et al., 2008). L'excrétion des MAP viables dans les matières fécales des animaux apparemment sains comme dans le cas d'infection subclinique ou "pass-through", (Manning et al., 2003) reste d'une grande importance pour des aspects épidémiologiques et de santé publique comme source cachée de l'infection et joue un rôle très important comme menace pour l'homme et les animaux en raison de la haute résistance et persistance de MAP dans les résidus pendant longtemps (Chiodini et al., 1984a; Stabel, 1997a).

Les tests préférés pour le diagnostic de la maladie de Johne sont divisés en deux catégories importantes : (I) méthodes de détection de l'agent pathogène ; (II) méthodes de

détection d'anticorps sériques spécifiques/immunité à médiation cellulaire. Les tests de détection de l'agent pathogène incluent la culture bactérienne, les sondes génétiques et l'examen histologique du tissu cible concernés à l'intestin grêle et aux ganglions lymphatiques mésentériques associés. Les tests sérologiques préférés incluent Absorbed Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Absorbed ELISA) (Buergelt et Ginn, 2000). L'Office international des Epizooties (OIE) a rapporté que le test ELISA est le test le plus sensible et le plus spécifique pour des anticorps sériques contre *M. Paratuberculosis*. Sa sensibilité est comparable à celle du test de fixation du complément (FC) dans les cas cliniques, mais est plus élevée que celle du test de FC dans des porteurs subcliniques. La spécificité de l'ELISA est augmentée par l'absorption de *Mycobacterium phlei* (*M. phlei*) des sérums (OIE, 2003). La détection des anticorps contre MAP par ELISA est un outil important dans beaucoup de programmes de prophylaxie régionaux et nationaux pour la paratuberculose.

Des programmes efficaces de prophylaxie et d'éradication de la maladie de Johne peuvent être réalisés seulement par la combinaison de plusieurs techniques (Coetsier et al., 1998). Nombreuses procédures indirectes explorant les titres d'immunoglobuline ou l'immunité cellulaire des vaches infectées sont maintenant disponibles (Colgrove et al., 1989; Collins et al., 1991; Bech-Nielsen et al., 1992; Billman- Jacobe et al., 1992). Cependant, l'identification directe de MAP dans les fèces ou dans des échantillons de biopsie est inexacte. L'examen microscopique utilisant la coloration de Ziehl-Neelsen (ZN) donne beaucoup de faux positifs parce que le test ne distingue pas entre les différentes espèces mycobactériennes (Ris et al., 1988; Thoresen et al., 1994). La culture de l'organisme est un procédé lent et harassant en raison de la longue période d'incubation (36 h ou plus, selon des conditions de culture) de MAP (Merkal et Curran, 1974; Lambrecht et al., 1988; Ove et al., 1994). Bien qu'on rapporte que la culture fécale radiométrique soit plus rapide et plus sensible que la culture fécale conventionnelle, elle exige un équipement sophistiqué et l'utilisation des radio-isotopes (Collins et al., 1990). L'amplification et la détection des séquences spécifiques (IS900) s'est avérée hautement sensibles (Green et al., 1989a; Collins et al., 1990; Van der Giessen et al., 1992).

Le but de la présente étude était d'étudier l'occurrence de la paratuberculose dans les cheptels bovins de la région de Tiaret, et de comparer les différentes méthodes diagnostiques (de laboratoire) permettant de mettre en évidence l'infection.

## **I- SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## INTRODUCTION

En Algérie, l'élevage revêt une importance économique, sociale et culturelle. Le cheptel y est très important et varié. Les statistiques de la direction des services agricoles donnent une moyenne de 1 604 425 millions de têtes de bovins de l'année 2000 jusqu'à 2009 sans compter les autres espèces animales. L'élevage bovin assure d'une part, une bonne partie de l'alimentation humaine par la production laitière et la production de la viande rouge et d'autre part, il constitue une source de rentabilité pour les producteurs et les agriculteurs.

Le cheptel bovin est passé de 508200 têtes durant la période 1969-1970 à 69400 têtes entre 1983-1985, ce qui se traduit par un taux moyen de croissance annuel d'environ 6 % (Yakhlef, 1989). Cependant, une diminution du cheptel bovin est enregistrée entre 1990 et 1995 passant respectivement de 1392770 à 1267410 têtes à cause des accidents climatiques (Sécheresse entre autres) qu'a connu le pays durant cette période (Ferrah, 2005), et les abattages effectués suite aux différentes maladies contagieuses (Cherfaoui, 2003). La période (1995-2004) se caractérise par une progression de 27% qui s'explique par les importations des vaches laitières (Ministère de l'Agriculture et le développement rural, 2006).

Le cheptel bovin est constitué de trois races de vaches laitières :

1. Les races laitières hautement productives qui sont importées principalement des pays d'Europe sont : la Montbéliarde et la Holstein.
2. La race locale qui est peu productive se rencontrant surtout dans les régions montagneuses, prisée essentiellement pour sa rusticité. La principale race bovine locale est la race brune de l'Atlas qui est subdivisée en quatre races secondaires :
  - a. la Guelmoise à pelage gris foncé vivant en zone forestière ;
  - b. la Cheurfa à robe blanchâtre que l'on rencontre en zone pré-forestière ;
  - c. la Chélifienne à pelage fauve ;
  - d. la Sétifienne à pelage noirâtre adaptée à des conditions plus rustiques.
3. La race améliorée est issue d'un croisement entre la race locale et la race importée (Feliachi, 2003).

Les races locales et améliorées représentent 80 % des effectifs. Ce type de bovin est détenu essentiellement par les éleveurs privés qui contrôlent plus de 90 % du cheptel. Les fermes d'Etat, dont les effectifs sont constitués de vaches laitières à haut rendement, n'en contrôlent qu'une très faible part (moins de 10 %). Néanmoins, ces effectifs constituent 50 % de la production de lait cru au niveau national (Amellal, 2000).

Les races bovines améliorées sont représentées par : la Frisonne Hollandaise Pie Noire très bonne laitière, elle est très répandue dans les régions littorales et constitue 66 % de l'effectif des races améliorées ; la Frisonne française Pie Noire, également très répandue et bonne laitière ; la Pie Rouge de l'Est et la Pie Rouge Montbéliarde dont l'effectif est plus réduit (Nedjraoui, 2003).

Les principales pathologies qui touchent les bovins sont la brucellose, la tuberculose, la fièvre aphteuse et d'autres infestations parasitaires. L'évolution de la brucellose bovine a connu une certaine amélioration. Le taux d'infection moyen est passé de 0,89 % en 2003 à 0,70 % en 2004. Le dépistage a permis de toucher 98 626 bovins, et de détecter 748 cas positifs répartis sur 499 foyers. Le taux d'infection moyen de tuberculose bovine enregistré montre une certaine stabilité, soit un taux de 0,33 % contre 0,39 % notifié au cours de l'année 2003.

## I.1 EPIDEMIOLOGIE DE LA PARATUBERCULOSE.

### I.1.1 Etiologie :

La paratuberculose (PTB) ou maladie de Johne (MJ) est caractérisée par une entérite chronique intraitable et lentement progressive dans les bovins. Elle est due à l'infection de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) : une bactérie de croissance lente, acido-résistante, et dépendante de la mycobactine qui cause l'épaississement de la paroi intestinale et une diminution de l'absorption (Dreier et al., 2006). La maladie se produit dans le monde entier et représente un problème économique énorme pour l'industrie de production animale (Cristian et al., 2015).

Les bactéries non-tuberculeuses du complexe *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC) causent plus généralement une maladie entérique chez les animaux (Thorel et al., 1997). Les importants membres de ce groupe sont *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), l'agent pathogène de la maladie de Johne chez les ruminants qui a été également isolée des patients atteints de maladie de Crohn (Paola et al., 2013), et *M. avium* subsp. *avium* (Maa). Maa est un pathogène principal dans les oiseaux sauvages et domestiques ; les mammifères sont cependant sporadiquement affectés (Thorel et al., 2001). Chez l'homme, des bactéries ont été isolées chez des personnes en bonne santé (Kaufmann, 2001), mais la maladie clinique peut se développer avec une immunosuppression (Imperiale et al., 2012). Les MAC sont largement distribués dans l'environnement et ont été isolés dans le sol, l'eau usée, les réservoirs d'eau, l'eau municipale, les aérosols, les protozoaires, les litières profondes, la végétation tropicale fraîche, les animaux, et les humains (Franck et al., 2005). Typiquement, les infections de MAC sont caractérisées par des lésions entériques granulomateuses et la lymphadénite intestinale, mais une affection systémique peut également se produire. Des lésions granulomateuses dans l'intestin du bovin adulte sont typiquement provoquées par MAP (paratuberculosis), mais cette maladie n'est pas habituellement produite chez les veaux (Clarke, 1997). Les lésions induites par Maa chez les veaux ont été principalement rapportées dans des infections expérimentales et sont un diagnostic différentiel peu commun de l'entérite dans les veaux de boucherie (Waters et al., 2004). En raison de la similitude des lésions entériques induites par MTBC, la différenciation des lésions entériques

mycobactériennes peu communes chez les animaux exige l'identification de l'agent causal (Goepfert et al., 2014).

### **I.1.1.1 Analyse taxonomique et phylogénétique :**

L'espèce mycobactérienne *M. avium* est actuellement subdivisée en trois sous-espèces, *M. avium* subsp. *avium* (*M. avium*), *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, et *M. avium* subsp. *Silvaticum* (*M. silvaticum*). La désignation de sous-espèce de *M. paratuberculosis* basée sur des études d'hybridation ADN-ADN (Yoshimura et Graham, 1988; Saxegaard et al., 1988) et l'analyse de taxonomie numérique (Thorel et Krichevsky, 1990). Bien que généralement groupé avec *M. avium* dans le complexe *Mycobacterium avium-intracellulare*, *M. intracellulare* est une espèce génétiquement distincte (Saito et al., 1989). À l'échelle de sous-espèce, *M. paratuberculosis* peut être différencié phénotypiquement de *M. avium* et *M. silvaticum* par sa dépendance à la mycobactine (Thorel et Krichevsky, 1990) et génotypiquement par la présence des copies multiples d'un élément d'insertion, IS900 (Green et al., 1989b).

L'analyse des gènes d'ARNr (ADNr) des mycobactéries a eu comme conséquence la division de ce genre en deux groupes séparés. Ceux qui correspondent aux mycobactéries traditionnelles à croissance rapide, représentées par les isolats environnementaux non pathogènes, et les mycobactéries à croissance lente, contenant la plupart des agents pathogènes manifestes (Stahl et Urbance, 1990) (Harris et Barletta, 2001b).

Les mycobactéries représentent un groupe d'organismes hautement réussis qui s'étendent des saprophytes libres à ceux qui ont adapté une pleine dépendance d'un hôte vivant (Ventura et al., 2007; Hett et Rubin, 2008). Pendant leur cycle de vie, les espèces mycobactériennes peuvent rencontrer un certain nombre de stress comprenant la privation nutritive, l'hypoxie, le pH acide, et même la concurrence avec d'autres organismes pour les ressources limitées et l'occupation d'une place spécifique, telle que le sol et l'eau (Gumber et al., 2009).

Afin de survivre dans de telles conditions défavorables, les mycobactéries ont développé des mécanismes pour réaliser une dormance, une latence et une persistance (zu Bentrup et Russell, 2001; Cardona, 2009). Tandis que plusieurs études ont étudié la persistance des mycobactéries, la définition demeure lâchement expliquée et les mécanismes qui mènent à et soutiennent cet état de non-réplication sont mal connus. Une étude récente de Ghosh et al., 2009 a énoncé la formation

des endospores dans des cultures de deux mois de *M. marinum* et de *M. bovis*, qui peuvent servir de méthode sans précédent utilisée par des mycobactéries pour résister aux conditions difficiles (Ghosh et al., 2009). Le concept de la sporulation dans les mycobactéries continue à susciter la polémique et conteste nos perceptions courantes des facettes impliquées dans la persistance mycobactérienne. Les études complémentaires menées par Traag et al., 2010 ne pourraient pas reproduire la formation d'endospore en 4 semaines à, des cultures liquides de 8.5 mois de *M. marinum* qui ont remis en cause la pureté des cultures employées dans la caractérisation d'ultrastructure par Ghosh et autres (Traag et al., 2010) (Elise et al., 2012).

Les Mycobactéries sont aérobies, catalase positive et sont considérés Gram-positives. Leur caractéristique principale est qu'ils sont acido-alcoolo-résistant dus à leur paroi cellulaire cireuse. La paroi cellulaire comprend une couche hydrophobe de mycolates et une couche peptidoglycane liées par un polysaccharide, arabinogalactane. Elles sont des bâtonnets droits ou légèrement incurvés, parfois branché, non motile et non sporulant. Toutes les espèces peuvent former des filaments qui sont régulièrement fragmentés.

La plupart des espèces sont trouvées dans le sol, l'eau, les animaux et les humains et certains sont des parasites obligatoires, par exemple, *M. tuberculosis* et *M. leprae* (Laukkanen et al., 2000). Les membres du genre *Mycobacterium* sont, en moyenne 0.2-0.6 µm de largeur et 1.0-10 µm de longueur avec *M. paratuberculosis* étant plus petit à 0.5 µm de largeur et 1-2 de longueur. *M. paratuberculosis* est un organisme fastidieux et a contrecarré la plupart des tentatives d'isolement *in vitro* pendant le dernier siècle (Chiodini, 1989). L'ajout de la mycobactine aux milieux a mené à une croissance plus rapide et à plus d'isolats de *M. paratuberculosis* sur des milieux de laboratoire. L'addition de la mycobactine a également distingué des isolats de *M. paratuberculosis* et de *M. avium* car le dernier est indépendant de la mycobactine (Barclay et al., 1985) ; (Chiodini et al., 1984b). Les mycobactines sont des siderophores produits par des mycobactéries dans des conditions limite de fer, avec la plupart des espèces des mycobactéries produisant plus de cinq types de mycobactines (Barclay et Ratledge, 1983). Les isolats de *M. avium* négatifs de mycobactine existent cependant et ceux-ci diffèrent de *M. paratuberculosis* dans la virulence entre d'autres propriétés. En outre, même la dépendance à la mycobactine de *M. paratuberculosis* peut disparaître après plusieurs passages *in vitro* et peut être absente des isolats obtenus à partir des moutons sur certains milieux (Adúriz et al., 1995). Par conséquent on ne peut pas toujours compter sur ce phénotype général pour identifier *M. paratuberculosis*. La Mycobactine produite par *M. paratuberculosis* s'appelle mycobactine J et

diffère structurellement des mycobactines de *M. avium* et de *M. intracellulare* (Barclay et al., 1985).

Même avec l'addition de mycobactine, le long temps de doublement a rendu la culture difficile à partir des bovins et d'autres animaux avec une sensibilité globale prévue de 50%-70% en cultivant des fèces bovines (Stabel, 1997a; Collins et al., 2006). Chez l'homme, la culture de *M. paratuberculosis* n'est pas habituellement vue comme une méthode de dépistage viable car elle prend un bon moment et a un faible indice de réussite (Chiodini, 1989).

Les anciennes tentatives pour distinguer *M. paratuberculosis* utilisant des techniques de la biologie moléculaire ont été de nouveau confondues par la similitude génétique de *M. paratuberculosis* aux autres sous-espèces du complexe de *M. avium*. Ce complexe inclut *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* et *M. avium* subsp. *silvaticum* (Thorel et Krichevsky, 1990) avec *M. paratuberculosis* et *M. avium* partageant une similitude de 97% de leurs génomes respectifs et 100% du gène 16S ARNr (Bannantine et al., 2003; Verlainne et al., 2011).

#### **I.1.1.2 Tropisme d'espèce de MAP :**

MAP est classiquement décrite comme agent pathogène des ruminants avec une gamme d'hôtes qui inclut des bovins, des moutons, des chèvres, et des cerfs (Whittington et Sergeant, 2001; Anderson et al., 2007). Cependant, MAP a été également isolée dans un certain nombre d'espèces sauvages comprenant les blaireaux, les coyotes, les corneilles, les chats, les opossums, les lapins et les rats laveurs (Münster et al., 2013). Tandis que la priorité des recherches de MAP est généralement des bovins, la capacité de cet agent pathogène d'infecter des espèces sauvages soulève des inquiétudes que ces espèces pourraient agir en tant que réservoirs de la maladie qui permettent la transmission de MAP aux troupeaux sains. Réciproquement, il y a également une menace de transmission de la maladie des troupeaux domestiques infectés par MAP à la vie sauvage environnante (Ryan et al., 2014).

Les hôtes naturels pour la MAP sont les ruminants sauvages et domestiqués, y compris des bovins, des moutons, des chèvres, le cervidé, et des camélidés. La faune sauvage non-ruminant, telle que le renard, belette, corneille, rat, mulot sylvestre, lapin, lièvres, et blaireau, se sont également avérées pour héberger MAP (Tiwari et al., 2006).

En 1826, D'Aroval (Cottreau, 1970) rapporta une forme particulière d'entérite associée à une diarrhée chronique chez les bovins ; puis en 1881, Hansen et Nielsen notèrent, sur des bovins morts à la suite de diarrhée chronique, un épaississement de la muqueuse intestinale qui n'avait jamais été décrit jusqu'alors.

C'est en 1895, que deux scientifiques allemands, Johne et Frothingham firent une description clinique et nécropsique de la maladie ; ils isolèrent un bacille acido-alcool résistant à la coloration de Ziehl-Nielsen, à partir de bovins atteints de diarrhée cachectisante. Cette diarrhée chronique était associée à une inflammation granulomateuse de l'iléon. Le bacille fut tout d'abord nommé *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis* Johne.

Malgré plusieurs tentatives de culture, Bang en 1905 ne parvient pas à reproduire la tuberculose en inoculant le bacille issu de bovin en phase de diarrhée cachectisante à des animaux de laboratoire : il parle alors de « paratuberculose ».

En 1910, il prépare une tuberculine aviaire qui, injectée à des bovins malades, provoque une réaction identique à la tuberculine bovine chez des bovins tuberculeux. Cette même année, Trowt a vérifié le postulat de Koch en cultivant *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en laboratoire, en reproduisant la maladie et en infectant du bovin expérimentalement.

Par, la suite, les nomenclatures choisies seront *Mycobacterium johnei*, puis *Mycobacterium paratuberculosis*; la plus récente et actuellement en cours est *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, en 1990 (Chastel, 2008a).

### **I.1.1.3 Culture, caractères biochimiques :**

La culture est le test de référence pour la détection d'agent pathogène chez les animaux vivants, qui est plus sensible que les sérodiagnostics indirects et pourrait permettre une détection plus précoce des bovins infectés (Slana et al., 2008). Les systèmes de culture liquides fournissent une détection plus rapide et plus sensible de MAP comparée aux cultures solides traditionnelles (Whittington, 2009) ; cependant, les coûts élevés d'automation et les risques radioactifs liés à ces systèmes ont poussés les chercheurs pour développer des cultures liquides modifiées peu coûteuses basées sur Middlebrook et d'une performance comparable (Pozzato et al., 2011; Whittington et al., 2013; Ahmad et al., 2015).

La culture fécale est le test le plus fiable pour la détection individuelle des animaux excréteurs un à deux ans avant l'apparition des symptômes. Cependant la détection de l'infection pendant le stade préclinique est compliquée, car la bactérie ne se multiplie pas rapidement (elle est difficile à retrouver dans les fèces). Il s'agit du test le plus spécifique pour reconnaître la maladie dans un troupeau. En règle générale, on considère que ce test permet de repérer les animaux infectés une à trois années avant l'apparition des signes cliniques (diarrhée ou amaigrissement). Il convient donc de la répéter annuellement (voire tous les six mois) dans le cadre d'une surveillance des élevages infectés. Rechercher MAP dans l'environnement représente une méthode moins coûteuse et plus aisée à pratiquer à la ferme que les prélèvements individuels sur le cheptel (Berghaus et al., 2006). Si les résultats de cette recherche dans l'environnement sont comparés à ceux obtenus à partir de prélèvements chez les animaux, cette approche permet de détecter 38 élevages sur les 50 (soit 76 %) identifiés par culture fécale individuelle et 61 élevages sur les 80 (soit 76 %) identifiés par le test ELISA (Lombard et al., 2006). Ce type de recherche semble surtout intéressant pour détecter les fermes très infectées (Aly et al., 2009; Smith et al., 2011; Brugère-Picoux, 2012).

*M. paratuberculosis* appartient au groupe des mycobactéries à croissance lente, incolores ou non chromogènes. *M. paratuberculosis* se distingue des autres souches de son groupe par sa dépendance à l'égard du facteur de croissance constitué par la mycobactine. Cette dernière est un composé liposoluble contenu dans la paroi bactérienne favorisant le transfert actif du fer. Elle est produite par la plupart des mycobactéries, mais MAP ne la produit pas ou pas assez *in vitro*. Ainsi cette dépendance en mycobactine a longtemps été considérée comme un critère d'identification de MAP en culture.

Cependant ce critère n'est pas absolu puisque ce même caractère a pu également être observé au sein du groupe avium. La croissance de *M. paratuberculosis* est longue et difficile : il faut environ 8 à 12 semaines, voire 16 semaines avant de pouvoir observer de petites colonies fermes et souvent blanches. Cette lenteur de développement rend la culture de *M. paratuberculosis* sensible aux agents contaminants opportunistes dont la croissance est beaucoup plus rapide. L'ajout de décontaminants (chlorure de benzalconium ou d'hexadécyl-pyridinium) est donc indispensable. Ainsi *M. paratuberculosis* est cultivée sur un milieu d'Herrold, complété en mycobactine et décontaminants (le jaune d'œuf contenu dans ce milieu permettant de neutraliser le pouvoir bactéricide des décontaminants) (Grange, 1988).

### **I.1.1.4 Survie et résistance de MAP dans l'environnement :**

On savait depuis longtemps que MAP pouvait survivre plus d'une année dans l'environnement. Les rayons du soleil ou les rayons ultraviolets permettent de diminuer, de façon importante, cette survie qui est au contraire augmentée dans les zones de pâturage restant à l'ombre et ce, jusqu'à 55 semaines (Whittington et al., 2004). Il est vraisemblable que l'humidité et le froid interviennent aussi dans cette survie. La contamination de l'environnement, en corrélation avec l'excrétion fécale des vaches, est actuellement considérée comme la source primordiale de l'infection du cheptel laitier (Smith et al., 2011). Pour expliquer la survie de certaines bactéries telles que *Mycobacterium avium* dans l'environnement en l'absence de mycobactine, il a été suggéré que ces mycobactéries soient ingérées par des protozoaires bactériovores telles que *Acanthamoeba castellanii* (Cirillo et al., 1997). Le processus de survie résulterait d'une interaction entre l'agent pathogène et le protozoaire, similaire à celle observée chez l'hôte dans les macrophages infectés, renforçant même, comme dans le cas de *Legionella pneumophila*, le pouvoir pathogène de la bactérie. Cette hypothèse a été confirmée pour MAP: deux protozoaires couramment rencontrés dans le sol, *A. castellanii* et *A. polyphaga*, permettent non seulement sa survie et sa réplication mais aussi une plus forte résistance au chlore (Mura et al., 2006; Whan et al., 2006). Ainsi MAP survivrait dans l'environnement en formant des biofilms sur des surfaces humides. Plus récemment, on a aussi isolé MAP à partir d'amibes présentes sur des terrains non utilisés pour le pâturage et n'ayant pas reçu de lisier, dans l'environnement d'une ferme britannique où des cas de paratuberculose avaient été diagnostiqués (White et al., 2010). Cette observation montre la complexité des facteurs étiologiques intervenant dans la contamination de l'environnement, dont l'apport de MAP par des animaux réservoirs sauvages et sa survie dans les amibes.

La contamination de l'environnement a été estimée à partir des années 2000 (Raizman et al., 2004): pour 80% des troupeaux infectés par MAP, au moins une culture a été trouvée positive à partir de prélèvements de leur environnement, ce qui n'a été observé que pour 7% des troupeaux non infectés témoins. Les zones les plus contaminées sont les couloirs (77%), les lisiers (68%), par comparaison avec la zone de vèlage (21%), la stalle d'une vache malade (18%), l'eau de ruissellement (6%) ou l'enclos des veaux sevrés (3%). Lors de l'emploi des lisiers pour la fabrication de biogaz, MAP survit pendant deux mois dans le fermenteur (et l'on peut détecter l'ADN de MAP pendant plus d'une année) (Slana et al. 2011). On peut aussi

retrouver MAP dans les poussières au sein des fermes infectées, suggérant une contamination possible par aérosol (Eisenberg et al., 2010).

La contamination par l'épandage de lisier sur les sols agricoles est souvent évoquée pour expliquer la persistance de MAP dans les fermes infectées. Une étude expérimentale a démontré que MAP tend à rester sur le sol mais peut se propager lentement à travers les sols (la plus grande rapidité de déplacement est observée dans les sols sableux) et se retrouver ainsi présent dans les eaux de ruissellement et les sédiments après de fortes pluies (Salgado et al., 2011; Brugère-Picoux, 2012).

Un autre grand problème de MAP est représenté par sa capacité de survivre pendant une longue période dans un milieu contaminé. En effet, on l'a démontré que MAP peut survivre à jusqu'à 55 semaines dans un environnement sec entièrement ombragé et à jusqu'à 24 semaines sur l'herbe qui a germé sur des matières fécales infectées (Whittington et al., 2004). En raison de sa survie et dormance durables, MAP a pu être facilement présente dans l'environnement tel que le sol ou l'eau représentant un problème pour la propagation de la maladie. D'ailleurs, la résistance aux procédés de pasteurisation et sa présence putative dans le lait pour la consommation humaine ont pu contribuer à la transmission de MAP aux humains. Pour ces raisons, on le considère une bactérie zoonotique présumptive et un concause du début de la maladie de Crohn humaine (Grant et al., 2002; Bannantine et al., 2014).

### **I.1.2 Distribution de la maladie :**

L'épidémiologie et la pathogénie de la maladie de Johne sont mieux comprises dans les bovins, et on assume qu'elles sont similaires chez les moutons et les chèvres (Clarke, 1997; Brown et al., 2007).

L'infection a été décrite dans la plupart des systèmes de production intensifs de bovins autour du monde (Kennedy et Nielsen, 2007; Guicharnaud, 2009). La proportion de troupeaux infectés indiqués par différentes études varie de 10 à 70% et la prévalence estimée des animaux infectés est généralement inférieure de 5% (NcNab et al., 1991; Collins et al., 1994; Thorne et Hardin, 1997) (Boelaert et al., 2000; Gasteiner et al., 2000; Muskens et al., 2000; Pak et al., 2003; Schaik et al., 2003). Une étude récente de la prévalence de la paratuberculose en Europe signale que la prévalence au niveau des animaux est environ 20% (évaluation basée sur différentes études

utilisant différents tests diagnostique), ou un minimum de 3 à 7% si basé sur des méthodes détectant MAP directement ou basé sur l'occurrence des lésions anatomopathologiques des tissus (Nielsen et Toft, 2009). Une autre étude visant l'estimation de la prévalence réelle (prévalence d'animaux infectés, prévalence du troupeau et prévalence dans le troupeau) de la paratuberculose dans des troupeaux de vaches laitières dans le monde tout en examinant la fiabilité des résultats signale que la véritable prévalence individuelle peut être très élevée, particulièrement en Amérique.

En Europe, cette prévalence individuelle corrigée demeure à un niveau moyen, excepté la Suède et la Norvège où elle est basse (presque zéro dans les cheptels laitiers). Au niveau du troupeau, la prévalence corrigée est encore élevée dans un grand nombre de pays en Amérique tandis qu'elle est variable en Europe. Il y a peu de données sur la distribution des évaluations de prévalence dans le troupeau. Il s'avère que la prévalence dans le troupeau est en moyenne basse (1-30%) mais peut atteindre des valeurs élevées dans quelques troupeaux (60% et plus). Globalement, des évaluations de la prévalence sont probablement sous-estimées comme sensibilité et la spécificité des tests diagnostique utilisés sont basses et élevée, respectivement, pour les niveaux de la prévalence étudiés. La prévalence de troupeau, le manque de sensibilité est en particulier compensé par le test répété de tous les animaux (Marcé, 2010).

Des études très limitées sur la MJ ont été entreprises dans le Moyen-Orient et les pays du nord Afrique. La maladie de Johne a été rapporté dans les bovins en Egypte, chez les moutons au Maroc et en Arabie Saoudite et chez les petits ruminants en Jordanie (Benazzi et al., 1995a; Mahmoud et al., 2002; Salem et al., 2005; Hailat et al., 2010). En Jordanie, nous avons effectué une étude sur les bovins apparent sains, utilisant diverses techniques diagnostiques et nous avons trouvé une forte prévalence (Nabil et al., 2011).

### **I.1.3 Impact économique :**

Cette infection peut causer des pertes économiques significatives dans les bovins principalement liés à une production laitière réduite et une réforme prématuré (Raizman et al., 2009), une valeur diminuée à l'abattage (Kudahl et Nielsen, 2009), et éventuellement la mort (Kudahl et al., 2007). D'autres pertes économiques résultant de la présence de la paratuberculose dans des troupeaux de bovins incluent une diminution de l'efficacité alimentaire, des teneurs diminués en graisse et en protéines dans le lait, une fertilité diminuée, et une incidence accrue des mammites (Nielsen et Toft, 2011).

Dans le monde entier, la paratuberculose est d'une importance économique pour les producteurs de laitiers. Dans les troupeaux affectés, les pertes économiques résultent de la production laitière réduite, de la mortalité ou de la réforme précoce, et la diminution de la valeur d'abattage des vaches cliniquement affectées (Benedictus et al., 1987; Johnson-Ifearulundu et Kaneene, 1997; Lombard et al., 2005). En plus (bien qu'il n'y a aucune évidence encore claire), la contribution possible de MAP dans la maladie de Crohn chez l'homme est encore à l'étude. Des humains pourraient être exposés à MAP par l'intermédiaire de plusieurs voies telles que des produits laitiers et à base de viande, ou par contamination de l'eau (Eltholth et al., 2009). D'une manière ou d'une autre, l'image saine de l'industrie laitière pourrait être menacée par la paratuberculose. Tous ces paramètres augmentent la nécessité de programmes de contrôle efficaces et économiquement attrayants contre la paratuberculose.

La paratuberculose peut avoir des effets consistants à l'échelle de la ferme, la région et le pays. Une perte économique presque de 95€ par vache est rapportée pour les troupeaux positifs comparés aux troupeaux négatifs dus à la productivité réduite ; cette perte peut aller jusqu'à 190€ par vache quand la prévalence des animaux cliniquement affecté est supérieure de 10% dans les troupeaux positifs (Ott et al., 1999). D'autres études ont indiqué des pertes moyennes par vache aux fermes infectées par un variant de 33€ à plus de 67€ en Hollande (Groenendaal et Galligan, 1999), 32€ au Canada (Ashwani et al., 2008), 7€ pour des vaches de la parité 1, 122€ pour des vaches de la parité 2, et 221€ pour les vaches de la parité 3 aux Etats-Unis (Wilson et al., 1995). Les évaluations globales de la perte économique varient considérablement selon la production et les systèmes d'évaluation. À l'échelle national, une perte de 21€ à 25€ par vache ou 190 à 234 millions d'euro par an a été rapportée pour l'industrie laitière des Etats-Unis (Ott et al., 1999), 0.58 million d'€ pour les provinces maritimes canadiennes (Junwook et al., 2002; Shawn et al., 2006), 40 million d'€ pour les Hollandes (Kennedy et Benedictus, 2001), 8 million d'€ pour la Nouvelle Zélande et autour de 2.3 million d'€ pour l'Australie (Kennedy et Benedictus, 2001). Il est probable que ces évaluations soient sous-estimées car il est difficile d'estimer les coûts directs de l'infection subclinique quand les tests diagnostiques disponibles ont une sensibilité très basse. Il est également difficile d'estimer des coûts non apparents indirects tels que la perte de potentiel génétique par réforme précoce et des restrictions commerciales (Kennedy et Benedictus, 2001).

La maladie se produit dans le monde entier et représente un problème économique énorme pour l'industrie de production animale (Manning et Collins, 2001). Puisque le mécanisme de la maladie affecte l'efficacité de l'absorption nutritive, la consommation d'alimentation

demeure normale, quoique l'état corporel des bovins infectés se dégrade au fur et à mesure que la maladie progresse, ayant pour résultat une perte substantielle de poids. La perte de poids des bovins infectés ne représente pas la seule cause de la perte économique. La production laitière réduite des cheptels laitiers, la production abaissée des veaux dans les cheptels laitiers et à viande, et les coûts vétérinaires et médicaux relatifs accrus sont tous des facteurs importants (Nordlund et al., 1996). On l'a estimé qu'aux Etats-Unis MAP est présente dans 68% d'exploitations laitières, avec une prévalence moyenne dans le troupeau de JD évaluée pour être à 22%. On a estimé que la perte financière annuelle dans l'industrie laitière des USA provoquée par JD est proche de \$220 millions (Ashutosh et al., 2012; Cristian et al., 2015).

#### **I.1.4 Voies de contamination et matières virulentes :**

Les matières virulentes sont essentiellement constituées par les matières fécales, qui contiennent de  $10^2$  à  $10^{10}$  UFC/g de fèces, selon le stade évolutif de la maladie chez les ruminants. Le bacille (MAP) a pu être également isolé dans le colostrum et dans le lait. Il faut souligner que le rôle épidémiologique des sécrétions mammaires est particulièrement important dans la mesure où elles sont distribuées de manière répétée aux jeunes animaux qui sont les plus réceptifs.

L'aérosolisation de mycobactéries à partir de la surface de l'eau (et à partir de microbulles d'air présentes dans l'eau) est parfaitement décrit (Joseph, 2003).

En effet, à cause de la forte teneur lipidique (60%) de la membrane cellulaire constituée d'une double couche, MAP possède des propriétés hydrophobes ; de ce fait, les bacilles se trouveraient concentrés au sein des bulles d'air présentes dans les colonnes d'eau, mais également au sein des aérosols qui se forment à l'interface air/eau.

Les germes présents dans les aérosols contaminés (et vraisemblablement contaminants) pourraient ainsi couvrir de grandes distances grâce au vent : ils permettraient ainsi une contamination soit par voie respiratoire, soit par voie digestive une fois déposés sur les pâtures, puis après ingestion par les espèces sensibles (Whittington et Marsh, 2005).

De plus, bien que cela soit sujet à controverses, l'inhalation de ces aérosols a été suggérée comme une possible voie de contamination par MAP tant pour les animaux que pour les humains (Corner et al., 2004; Pickup et al., 2005), notamment par analogie avec *Mycobacterium bovis* chez les bovins.

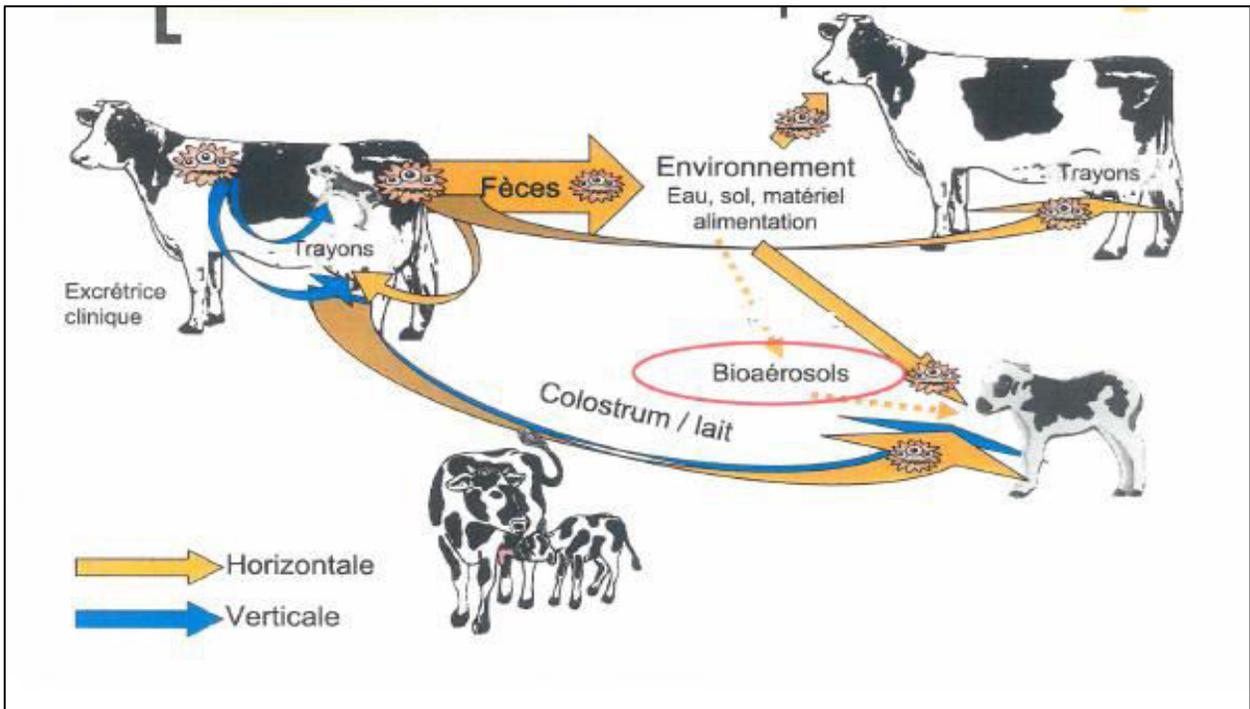
MAP a déjà été détecté dans le sperme d'un taureau (Ayele et al., 2004), en l'absence d'excrétion fécale ; la paratuberculose peut donc potentiellement être transmise par voie sexuelle. MAP a également pu être isolé à partir des testicules d'un taureau de 6 ans qui était en phase clinique avancée (Glawischnig et al., 2004). Alors que l'isolement de MAP a été possible à partir du tissu testiculaire après 8 semaines de culture, aucune lésion macroscopique n'a été observée (toutefois, ce résultat positif pourrait possiblement être dû à une phase de bactériémie au moment de l'abattage).

Différentes études ont mis en évidence l'existence d'une excrétion du bacille paratuberculeux dans le sperme, même en l'absence d'excrétion fécale. Cependant la dose infectieuse est probablement insuffisante pour infecter la femelle saillie ou inséminée par voie génitale. Le transfert embryonnaire a également été évoqué parmi les facteurs de risque de transmission de la paratuberculose (Chastel, 2008b).

La question d'un risque de transmission par voie sexuelle reste donc posée, de même que la gestion de cette possibilité dans le cadre de l'insémination artificielle. Cependant, la majorité des auteurs s'accordent à penser que non seulement la dose infectieuse est probablement insuffisante pour infecter la femelle saillie ou inséminée, mais en plus que la voie de contamination est inadéquate pour permettre l'infection (Chastel, 2008b).

L'infection *in utero*, à travers la barrière placentaire, a fait l'objet de nombreuses études (Seitz et al., 1989; Sweeney et al., 1992). Dans l'espèce bovine, la transmission transplacentaire surviendrait chez 40% à 50% des femelles au cours de la paratuberculose clinique, et chez 8-10% des femelles au stade subclinique de la maladie.

Etant donné que la placentation chez l'espèce bovine est syndesmochorial, la muqueuse utérine est le seul tissu maternel qui subit une érosion au moment de la nidation, et il n'existe donc qu'un faible contact entre le sang maternel et le sang fœtal. Il est estimé qu'une transmission transplacentaire pourrait se produire chez les vaches dont le niveau d'excrétion est au minimum de 3000 germes/g. Cependant en pratique, en raison des variations de l'excrétion, cette relation est difficile à établir (Chastel, 2008b).



**Figure 1. Différentes voies de transmission de la paratuberculose bovine.**

### **I.1.5 Prophylaxie médicale (vaccination) :**

Actuellement il y a un vaccin autorisé pour la maladie de Johne aux Etats-Unis (Elisabeth, 2011). Mycopar (Boehringer, Ingelheim, Ridgefield, CT, Etats-Unis) est un vaccin bactériel de *Mycobacterium avium* atténué par la chaleur mélangé à un adjuvant huileux. D'autres préparations vaccinales disponibles internationalement, Gudair (Zoetis, Inc.) et Silirum (Pfizer), sont composés de la souche 316F de MAP inactivée par la chaleur (pour l'usage dans la paratuberculose ovine) et d'une souche de MAP tuée par la chaleur (pour l'usage dans la paratuberculose bovine), respectivement (Reddacliff et al., 2006; Stringer et al., 2013). Tous les vaccins autorisés réduisent l'excrétion fécale de MAP mais ne produisent pas une protection contre l'infection initiale et une immunité stérilisante chez les ruminants (Chiodini, 1993; Reddacliff et al., 2006; Rosseels et Huygen, 2008; Hüttner et al., 2011). En outre, ces préparations vaccinales ont fréquemment comme conséquence des granulomes et/ou des lésions au site d'injection aussi bien que des réactions d'anticorps qui ont une réaction croisée avec d'autres mycobactéries pathogènes, et ne différencient pas sûrement les animaux vaccinés de ceux infectés, créant des difficultés dans la détection de la maladie (Mackintosh et al., 2005;

Eppleston et Windsor, 2007; Stabel et al., 2011; Thomsen et al., 2012; Hines et al., 2014). En raison des conséquences indésirables de la vaccination, qui inclut des réactions au site d'injection et l'inférence avec des diagnostics de de la tuberculose (TB), les Etats-Unis limitent Mycopar aux troupeaux qui ont une prévalence élevée de MAP ou à ceux qui ont des ressources limitées (financières, service, etc.) pour réaliser les normes du programme de la lutte contre la maladie de Johne (Elise et al., 2014).

En dépit du risque de séquelles potentielles d'immunisation, plusieurs études indiquent que la vaccination est un composant nécessaire pour la prévention de la maladie de Johne (Körmendy, 1994; Lu et al., 2013). Dans un modèle de simulation stochastique d'infection et de vaccination de MAP, Lu et autres ont prouvé que la vaccination efficace des animaux a réduit la prévalence de MAP à 0.44 et à 0.19 à une période de suivi de 5 et 10 ans, respectivement (Lu et al., 2013). Il est important de noter que les auteurs ont également conclu qu'une petite possibilité (<0.15) de persistance de MAP dû à une transmission verticale existe (Lu et al., 2013). Par conséquent, il est probable que l'éradication de la maladie de Johne doit entourer la vaccination dans le cadre d'un programme de gestion bien défini qui inclut des pratiques de gestion standard pour la détection rapide, l'hygiène, la séparation des nouveau-nés des adultes, et la réforme des animaux infectés (Ferrouillet et al., 2009; Espejo et al., 2012).

### **I.1.6 La paratuberculose et maladie de Crohn (Menace zoonotique) :**

La maladie de Johne montre quelques analogies histopathologiques avec la maladie de Crohn (MC), une maladie inflammatoire chronique de l'intestin humain d'une étiologie non encore définie, et MAP semble être liée à l'étiologie de la MC en tant qu'un agent causal ou un des facteurs d'un syndrome multi-étiologique (Atreya et al., 2014). Cette association a réveillé un grand intérêt scientifique depuis les années 80, quand (Chiodini et al., 1984b) ont isolé MAP et son ADN des tissus biologiques dans des patients atteints de la MC. Basé sur ces observations, le lien entre MAP et la MC a été largement étudié par des méthodes directes et indirectes pour la détection de MAP (Chiodini et al., 2012). Au Brésil, la présence de l'ADN de MAP et la viabilité de MAP dans le lait cru et pasteurisé vendu au détail (Carvalho et al., 2012) et le fromage artisanal de coalho (Carvalho et al., 2012) a été prouvé, suggérant que des organismes vivants pourraient être transmis à des humains par l'ingestion des produits contaminés.

Une préoccupation permanente a également été le lien zoonotique potentiel entre la paratuberculose et les maladies inflammatoires intestinales humaines, y compris la maladie de

Crohn. Si MAP serait finalement confirmé comme agent pathogène zoonotique, on s'attend à ce que la confiance du public dans les produits de l'industrie laitière du bovin et potentiellement les petites ruminants diminue très probablement. Avec l'augmentation de la certitude d'un rôle de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* dans la maladie de Crohn, des efforts pour diminuer ou enlever l'organisme de la chaîne alimentaire humaine devrait être encouragé (Windsor, 2015).

L'aspect économique/coûts, aussi bien que des considérations relatives à la protection et à la santé des animaux, sont suffisants pour définir la MJ comme priorité pour l'industrie des bovins. Cependant, la maladie a pris encore une plus grande importance avec l'implication possible de MAP comme agent causal ou facteur de contribution dans la maladie de Crohn (Hermon-Taylor, 2009). En l'absence d'une évidence définitive concernant la contribution de MAP dans la maladie de Crohn, l'atténuation du risque de transmission de MAP des bovins aux humains peut être une action de précaution importante. La réduction de la transmission de MAP dans les bovins aurait non seulement un impact positif significatif sur la perception publique, réduisant la transmission de MAP dans les bovins aurait des avantages économiques directs aux éleveurs de bovins. Seuls, les aspects de santé et de bien-être des animaux de JD sont d'importance suffisante pour justifier le développement et la mise en œuvre d'un programme de vaccination qui pourrait empêcher la transmission de MAP. Historiquement, la vaccination a été un outil extrêmement efficace pour le contrôle des maladies infectieuses chez l'homme et les animaux. Malheureusement les efforts de développer un vaccin efficace pour MAP ont eu un succès limité (Rosseels et Huygen, 2008). Tandis que le vaccin initial de BCG développé au début des années 1900 est encore utilisé, l'utilité fonctionnelle de ce vaccin est en grande partie limitée pour réduire l'excrétion de MAP par les animaux infectés (Jude et al., 2003). Mycopar<sup>®</sup> (souche 18), un vaccin inactivé entier de MAP a montré seulement une protection contre la maladie clinique, mais pas l'infection, aggravant potentiellement le problème des porteurs asymptomatiques (Jude et al., 2003). Le succès limité des approches traditionnelles de mise au point de vaccin pour la MJ indique qu'une plus grande compréhension des mécanismes de virulence de MAP est exigée afin d'adopter une approche plus stratégique à la conception vaccinale. Spécifiquement, nous proposons que la compréhension des mécanismes par lesquels MAP renverse les réactions immunitaires de l'hôte forme la base pour développer et évaluer un vaccin efficace (Ryan et al., 2014).

## **I.2 ASPECTS ANATOMOPATHOLOGIQUES DE LA PARATUBERCULOSE :**

## **I.2.1 Système lymphoïde du tube digestif :**

Le système lymphoïde du tube digestif de l'intestin grêle inclut le tissu lymphoïde organisé de la paroi intestinale, les plaques de Peyer (PPs), et les infiltrats diffus de lymphocytes dans les muqueuses et les ganglions lymphatiques drainants l'intestin. Les PPs des ruminants sont divisés en deux grands types, à savoir (1) les plaques de Peyer jéjunales (PPJs), qui sont des agrégats multiples et discrets trouvés dans le jéjunum, et (2) la plaque de Peyer iléale, qui consiste d'un agrégat simple, grand, continu qui s'étend de la valvule iléo-caecale (VIC), antérieur dans l'iléum, et sur un mètre dans les parties distales du jéjunum (Reynolds et Morris, 1983). Dans les ruminants, les PPJs jouent un rôle majeur dans l'immunité muqueuse et persistent durant toute la vie de l'animal. La plaque de Peyer iléale, dont le rôle principal est la génération des lymphocytes B, subit une involution pendant les premiers 12±18 mois de la vie (Reynolds et Morris, 1983; Griebel et Hein, 1996). Une étude récente de l'iléum de jeunes agneaux a prouvé que le tissu lymphoïde dans la VIC (VICPP) était morphologiquement différent du tissu lymphoïde situé un peu plus antérieure dans l'iléum (Corpa et al., 2001). D'ailleurs, on a rapporté que le VICPP persiste dans les moutons adultes (Perez et al., 1996). Les PPs sont une voie importante d'entrée pour l'agent causal de la paratuberculose, MAP.

### **I.2.1.1 Système lymphoïde du tube digestif des ruminants (GALT) :**

Le tractus intestinal a un système immunitaire local bien développé, qui, ainsi que les ganglions lymphatiques mésentériques de drainages, comporte la plus grande masse de tissu lymphoïde dans le corps. Collectivement, cette partie du système immunitaire de l'hôte s'appelle le système lymphoïde du tube digestif ou le GALT (Neutra et al., 1996; Mowat et Viney, 1997). Chez les ruminants, le tissu lymphoïde de l'intestin grêle se compose d'agrégats des follicules lymphoïdes, les plaques de Peyer. Celles-ci incluent les plaques de Peyer du jéjunum (PPs jéjunales) et la plaque de Peyer simple et continue dans l'iléum (PP iléale) (Parsons et al., 1989; Landsverk et al., 1991). Les PP iléale prolongent environ un mètre dans le jéjunum terminal, et comporte environ 80-90% de la masse totale du tissu des PP (Parsons et al., 1991; Griebel et Hein, 1996). Le gros intestin contient les plaques lymphoïdes et les follicules lymphoïdes solitaires. Les plaques sont situées à l'orifice iléocæcal, dans le côlon proximal et dans le rectum terminal. Les follicules lymphoïdes solitaires sont trouvées autour et entre les plaques (Liebler et

al., 1988b; Aleksandersen et al., 1990). Près du tissu lymphoïde organisé, le GALT a également des composants effecteurs composés de nombreux lymphocytes trouvés dans l'épithélium et dans le tissu conjonctif (Mowat et Viney, 1997).

La morphologie, la composition et la fonction du tissu lymphoïde de l'intestin des animaux ont beaucoup de caractéristiques communes, mais montrent également quelques différences (Parsons et al., 1989; Landsverk et al., 1991; Mutwiri et al., 1999). Les PPs de l'intestin grêle sont des agrégats organisés de follicules lymphoïdes individuels encapsulés encerclés par un réseau complexe des sinus lymphatiques. Ce réseau lymphatique est relié aux vaisseaux chylifères dans les villosités et les branches des sinus entourant les cryptes assurant les follicules baignés dans la lymphe vidangeant la surface d'absorption intestinale (Reynolds et Morris, 1983; Lowden et Heath, 1992; Griebel et Hein, 1996). Les follicules des PP de la sous-muqueuse sont séparés par des quantités variables de tissu lymphoïde, appelées les zones interfolliculaires. Les PPs se développent pendant la période prénatale, et tandis que les PPs jéjunales et le tissu lymphoïde du gros intestin persistent durant toute la vie, la PP iléale atteint sa taille maximale peu après la naissance, avant que l'involution commence, laissant seulement des restes isolés de follicule chez les adultes (Reynolds et Morris, 1983; Landsverk et al., 1991; Griebel et Hein, 1996). À la naissance, les follicules des PP jéjunales et iléales contiennent principalement des cellules B IgM+. Quelques semaines après la naissance, la composition lymphoïde des follicules des PP jéjunales devient plus hétérogène, avec un mélange des cellules B IgM+, des plasmocytes et des lymphocytes T, principalement des cellules T CD4+. Les PPs jéjunales ont de grandes zones interfolliculaires riches en cellule T tandis que la PP iléale possède des follicules lymphoïdes très condensés avec des zones interfolliculaires à cellule T limités (Larsen et Landsverk, 1986; Parsons et al., 1989; Aleksandersen et al., 1990; Griebel et Hein, 1996; Corpa et al., 2001). La PP iléale chez les ruminants montre des caractéristiques d'un organe lymphoïde primaire et secondaire (Renström et al., 1995). Tandis que le thymus est responsable de la production des cellules T, la PP iléale produit l'immense majorité de cellules B chez les ruminants et à cet égard, sa fonction est équivalente à celle de la Brousse de Fabricius (Reynolds et Morris, 1983; Landsverk et al., 1991; Griebel et Hein, 1996; Mutwiri et al., 1999). Contrairement au tissu lymphoïde persistant dans l'intestin grêle et le gros intestin, la PP iléale ne s'hypertrophie pas et ne développe pas des centres germinatifs typiques en réponse à une stimulation antigénique (Parsons et al., 1989). Les études dans les chèvres et les moutons ont démontré des similitudes entre le tissu lymphoïde de la PP iléale continu situés dans la valvule

iléocœcale à celle des PPs jéjunales parce qu'il persiste à l'âge adulte et a une morphologie et une composition cellulaire similaires aux PPs jéjunales (Corpa et al., 2001; Valheim et al., 2002). Le tissu lymphoïde du gros intestin ressemble les PPs jéjunales à la fois en composition de cellules et fonction (Liebler et al., 1988b; Liebler et al., 1988a; Parsons et al., 1989; Aleksandersen et al., 1990; Paar et al., 1992). Histologiquement, le tissu lymphoïde du gros intestin des bovins se compose de deux types morphologiques, les complexes lympho-glandulaires situés dans les sous-muqueuses, et les nodules lymphoïdes du chorion, trouvés dans les tissu conjonctif de la muqueuse (Liebler et al., 1988b).

#### **I.2.1.1.1 Épithélium associé au follicule (EAF)**

Les follicules lymphoïdes de l'intestin grêle et du gros intestin se prolonge à la lumière intestinale en tant que structures en forme de dôme composées de tissu lymphatique diffus qui est riche en lymphocytes, macrophages et cellules dendritiques (Parsons et al., 1989; Corpa et al., 2001; Valheim et al., 2002). Les dômes sont couverts par un épithélium modifié, l'épithélium associé au follicule (EAF). L'EAF contient des cellules épithéliales spécialisées, qui peuvent être entremêlées entre les cellules épithéliales d'absorption (Liebler et al., 1988a; Aleksandersen et al., 1990; Parsons et al., 1991). Ces cellules spécialisées, les cellules M, sont importantes dans la prise et le transport du matériel de la lumière intestinale au tissu sous-jacent (Paar et al., 1992; Frost et al., 1997; Clark et al., 1998). L'EAF ne contient pas des cellules caliciformes de sorte que la couche de mucus protégeant l'épithélium d'absorption des villosités soit absente dans ces zones, augmentant l'accessibilité et la vulnérabilité de l'EAF aux organismes pathogènes (Landsverk, 1987; Liebler et al., 1988a). Il y a une différence morphologique, mais pas fonctionnelle claire dans l'EAF qui couvre les PPs jéjunales et la PP iléale des ruminants. Considérant que les cellules M sont mélangées avec les cellules épithéliales d'absorption dans les PPs jéjunales, la PP iléale a une population plus homogène de cellules épithéliales, lesquelles sont similaires mais morphologiquement distinctes des cellules M dans le jéjunum (Landsverk, 1981; Landsverk, 1987; Parsons et al., 1991). Une zone transitoire dans la PP iléale proximale a été montrée dans les veaux, avec quelques dômes couverts par une population cellulaire homogène, alors que d'autres étaient couvertes de EAF similaire à l'EAF dans le jéjunum. Ces zones de tissu lymphoïde ont semblé persister dans les bovins adultes (Parsons et al., 1991). L'EAF des dômes dans le gros intestin est également exempt de cellules caliciformes et contient des cellules similaires aux cellules M de l'intestin grêle (Liebler et al., 1988a; Aleksandersen et al., 1990; Parsons et al., 1991). Tandis que Parson et autres (Parsons et al., 1991) décrivait une

population homogène des cellules M dans l'EAF du côlon similaire à l'EAF de la PP iléale, Liebler et autres (Liebler et al., 1988a) ont observés des cellules épithéliales d'absorption mélangées avec des cellules M dans cet emplacement. En outre, Liebler et autres (Liebler et al., 1988a) ont décrit des cellules qui étaient ultrastructuralement intermédiaires entre les cellules M et les cellules épithéliales d'absorption. Les cellules M dans l'EAF de l'intestin grêle et du gros intestin peuvent prendre et transporter l'antigène au tissu lymphoïde sous-jacent (Ackermann et al., 1988; Paar et al., 1992; Liebler et al., 1995; Vazquez-Torres et Fang, 2000).

#### **I.2.1.1.2 Cellules M :**

Les cellules M agissent comme cellules de prélèvement d'antigène, et ont été montrées pour internaliser et transporter plusieurs agents pathogènes sans dégradation, y compris les espèces de mycobactérie (Fujimura, 1986; Ackermann et al., 1988; Hathaway et Kraehenbuhl, 2000; Sigurdardóttir et al., 2001). Les cellules M ont une invagination, ou une poche, dans leur cytoplasme contenant les leucocytes mononucléaires comprenant des lymphocytes, des macrophages, des cellules dendritiques, et des polynucléaires neutrophiles (Landsverk, 1981; Owen, 1999; Neutra et al., 2001). Les cellules M sont ancrées aux cellules voisines par des jonctions serrées et des desmosomes. Ces cellules épithéliales spécialisé se reposent sur une lame basale qui est poreuse, permettant un passage plus facile des leucocytes dans et hors de ces poches mais également faisant les cellules M prédisposés à des lésions et au détachement (Pappo et al., 1988; Regoli et al., 1994). Les cellules M contiennent beaucoup de mitochondries, vésicules de transport, et un système microvésiculaire bien développé. Elles ont peu de lysosomes, et même une expression du complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH II) sur leur surface a été démontré, il est peu probable qu'ils fonctionnent comme cellules présentatrices d'antigènes. Le matériel englouti, donc, est très probablement transporté intact au tissu lymphoïde immunocompétent sous-épithélial sous-jacent (Landsverk, 1981; Fujimura, 1986; Liebler et al., 1988a; Mowat et Viney, 1997; Owen, 1999). Deux théories sur l'ontogénèse des cellules M existent qui peuvent ne pas être mutuellement exclusive. Une théorie est que les cellules épithéliales d'absorption matures recouvrant les PPs se différencient en cellules M en présence des cellules immunitaires (Kernéis et al., 1997). Cette théorie est soutenue par la migration rapide des lymphocytes et l'apparition *in vivo* des cellules M lors de contact avec des micro-organismes (Borghesi et al., 1996). L'autre théorie propose que les cellules M dérivent directement des cellules souche indifférenciées dans les cryptes se trouvant entre les follicules lymphoïdes et les villosités (Gebert et Posselt, 1997; Gebert et al., 1999).

## **I.2.2 Pathogénie de la paratuberculose :**

L'infection à MAP résulte la plupart du temps d'exposition par voie oro-fécale, avec l'entrée par le tractus intestinal puis au système lymphatique, où il réside dans les cellules M recouvrant les plaques de Peyer dans l'iléum. L'exposition par voie oro-fécale peut se produire comme décrit ci-dessous.

- L'ingestion de matière fécale d'un animal infecté, en particulier sur le trayon d'une mère infectée, plus l'exposition au pâturage, l'eau, les suppléments contaminés par du fumier ou le foin contaminé avec la matière fécale des animaux adultes infectés (Peter et Richard, 2010).
- Boire du colostrum ou du lait contaminé, du fait que MAP est également excrété dans le colostrum et le lait des bovins (Peter et Richard, 2010) ou des moutons/chèvres (C et al., 2004; Nebbia et al., 2006).

L'infection prénatale a été également bien décrite, avec une prévalence dans les vaches avec la maladie subclinique ou clinique estimée à 9% (intervalles de confiance de 95% : 6-14%) ou 39% (intervalles de confiance de 5% : 20-60%), respectivement (Richard et Peter, 2009). Dans une étude de 142 brebis en fin de gestation et de leurs fœtus de deux troupeaux fortement infectées, chacune des cinq brebis avec la maladie clinique avait des fœtus infectés, mais seulement une de 54 brebis avec la maladie subclinique a eu un fœtus infecté, ayant pour résultat <1% (intervalles de confiance de 95% : 0-5%) de tous les fœtus diagnostiqués en tant qu'infectés (C et al., 2004). Il y a peu d'information sur les conséquences de l'infection prénatale et si de tels animaux progressent plus rapidement à la maladie clinique, commencent l'excrétion de MAP plus précocement, ou sont approprié pour la gestion de la maladie. Cependant, puisque l'infection in utero peut se produire fréquemment chez les moutons avec une paratuberculose clinique, la réforme immédiate des femelles reproductrices actives avec des signes cliniques est fortement conseillé pour contrôler ce risque (C et al., 2004; Richard et Peter, 2009; Windsor, 2014). La réforme des cas cliniques est également d'importance pour contrôler la contamination de l'environnement avec l'agent causal pendant que les moutons avec une paratuberculose clinique excrètent des nombres importants de l'organisme dans leurs fèces, estimé à  $10^8$  organismes  $g^{-1}$  de fèces (Reddacliff et al., 2006). C'est une préoccupation des programmes de contrôle de la maladie puisque MAP peut persister dans l'environnement, survivant potentiellement pendant environ une

année, bien que ceci dépend d'une chaîne de facteurs environnementaux, en particulier l'ombre (Whittington et al., 2004; Whittington et Marsh, 2005). En Australie, la stratégie initiale de contrôle de la paratuberculose était la régulation et la quarantaine des propriétés infectées, avec décharge du nombre des animaux des propriétés infectées de moutons du début d'un été à la fin du suivant préconisé. Ce programme a échoué, très probablement en raison des difficultés d'identifier un lot de substitution propre, en dépit du développement précoce d'un système d'assurance de marché pour encourager les éleveurs à examiner et fournir régulièrement l'évidence de leur probable statut non infecté ou à faible risque (Windsor, 2014; Windsor, 2015).

### **I.2.2.1 Mécanismes de l'infection :**

#### **I.2.2.1.1 Translocation de MAP de la lumière intestinale à la muqueuse :**

Après l'ingestion orale de MAP, les bactéries doivent adhérer à et passer la barrière épithéliale de la paroi intestinale. Après avoir franchi la couche épithéliale de l'intestin, les bactéries entrent ensuite dans les macrophages, qui sont les cellules cibles pour l'organisme (Clarke, 1997; Peter et Ralph, 1999). Peu d'études sur le passage des bactéries à travers la paroi intestinale ont été réalisées. Deux articles décrivent des expériences où une suspension bactérienne a été injectée dans les boucles intestinales des veaux (Momotani et al., 1988) et des chevreaux (Sigur-Dardóttir et al., 2001), respectivement, et un troisième article décrit une étude sur la prise des bactéries dans l'intestin des agneaux donnés une suspension bactérienne per os (Garcia Marin et al., 1992).

Dans les études des veaux et des chevreaux, la suspension de MAP a été injectée dans des boucles isolées de l'iléum. Dans l'étude de veau, les boucles ont été inoculées avec des bactéries vivantes et tuées par la chaleur pendant 5-20 h. Quelques boucles ont reçues des bactéries vivantes avec un sérum de bovin anti-MAP supplémentaire à l'inoculum. L'examen au microscopique photonique a montré des bactéries acido-alcool-résistantes (BAAR) dans les macrophages du dôme sous-épithélial de 5 et 20 h post-inoculation, et dans des follicules des PPs à 20 h post-inoculation. L'examen au microscope électronique a montré des bactéries rares et isolées dans les cellules M 20 h post-inoculation. Des bactéries ont été également observées dans les macrophages intraépithéliaux et sous-épithéliaux. La prise des bactéries vivantes et tuées par la chaleur dans les zones de dôme était également efficace, et l'ajout du sérum de bovin anti-MAP à l'inoculum a augmenté la prise (Momotani et al., 1988). Les auteurs ont impliqué que MAP a

été prise dans l'EAF par le même mécanisme que celui employé par les particules inertes puisque les bactéries vivantes et tuées par la chaleur ont traversé le revêtement de la muqueuse des dômes. Cette constatation pour MAP est en contraste avec des études de *Vibrio cholerae* prouvant que les bactéries ont été prises par les cellules M seulement si vivantes.

Dans l'étude de chèvre, des temps beaucoup plus courts d'incubation de 30 et 60 mn ont été employés. Dans des sections colorées par Ziehl-Neelsen, quelques bactéries ont été observées dans l'EAF, dans le cytoplasme des cellules M et dans les cellules mononucléaires intraépithéliales. Des bactéries ont été également détectées sous-épithélial dans les dômes, dans les zones interfolliculaires dans les sous-muqueuses, et de temps en temps dans le chorion des villosités à côté des dômes, mais pas dans les follicules des PPs. Ultrastructuralement, des bactéries ont été vues dans les cellules M et dans des poches des cellules M. Dans les poches des cellules M les bactéries ont été observées librement mais étaient la plupart du temps attachées aux cellules. Dans les dômes, les zones interfolliculaires, et dans quelques villosités à côté des dômes, les bactéries étaient libres et dans les phagocytes mononucléaires (Sigur-Dardóttir et al., 2001). Contrairement à l'étude chez les veaux, une bactérie libre occasionnelle a été vue entre les cellules M dans l'EAF dans le dôme iléale des chevreaux, et la prise des bactéries par des cellules M était rapide, détecté après incubation de 30 mn. Dans les deux études, des bactéries ont été observées dans le chorion des villosités à côté des follicules, libres et/ou dans les phagocytes mononucléaires. Puisque les bactéries n'ont pas été notées dans d'épithélium de revêtement des villosités ou dans les cellules intraépithéliales dans cette région dans aucune étude, on a émis l'hypothèse que la présence des bactéries était due à la migration des macrophages chargés de bactéries des zones de dôme ou le transport dans la lymphe par l'intermédiaire du réseau des lymphatiques ramifiés qui existe entre ces deux zones (Momotani et al., 1988; Sigur-Dardóttir et al., 2001).

En dépit d'une certaine divergence dans les résultats des études de la prise chez les veaux et les chèvres, qui en partie pourraient être dues aux différences dans le temps d'incubation, les principales constatations sont similaires parce que les cellules de l'EAF de la PP iléale, et les cellules M en particulier, sont une porte d'entrée pour MAP. La démonstration de la prise des bactéries dans les cellules M peut être difficile dans la petite taille de l'échantillon que le matériel pour microscope électronique représente. Le protocole de prélèvement plutôt que n'importe quel retard dans l'activité phagocytaire de ces cellules peut donc expliquer pourquoi, dans l'étude des veaux, les bactéries n'ont pas été détectées dans les cellules M après incubation de 5 h mais

seulement après l'incubation de 20 h. La détection des bactéries dans les macrophages sous-épithéliaux après l'incubation de 5 h indique que les bactéries avaient déjà franchi la barrière épithéliale à ce point de temps très précoce. Il convient de noter que la prise des salmonelles par les cellules exprimant CD18 qui prolongent les processus à travers l'épithélium d'absorption pour la prise des bactéries dans la lumière intestinale a été récemment décrite (Vazquez-Torres et al., 1999).

Après la prise, les bactéries ont été décrites comme associées exclusivement aux cellules, qui diffère des observations avec MAP où des bactéries peuvent être trouvées libres. Néanmoins, la participation des processus sans médiation des cellules M dans la prise précoce de MAP devrait être étudiée, de même que devrait le rôle potentiel de l'EAF couvrant les PPs jéjunales ou le tissu lymphoïde du gros intestin pour l'entrée de MAP dans les muqueuses intestinales des ruminants. Les auteurs de l'étude dans les agneaux sont venus à une conclusion similaire, à savoir que l'EAF tapissant les dômes de la PP iléale était le lieu d'exploitation principal pour la prise bactérienne (Garcia Marin et al., 1992). Dans cette étude, les agneaux ont été donnés une culture bactérienne suspendue dans le lait et ensuite euthanasiés après 12 h à 14 jours d'incubation. Indépendamment des échantillons provenant de la PP iléale, les échantillons provenant des PPs jéjunales et de la valvule iléocœcale ont été examinés par microscopie photonique après la coloration du tissu pour détecter des BAAR (méthode de Ziehl-Neelsen), et par immunohistochimie utilisant des anticorps polyclonaux contre MAP. Tandis qu'aucune BAAR n'était détecté à aucun moment, l'immunohistochimie a montré un marquage dans l'EAF de la PP iléale dès 12 h après l'infection, avec le marquage maximum vu à 7 jours après l'infection. L'immunomarquage a été également noté dans les cellules sous-épithéliales dans les dômes et dans l'épithélium absorbant tapissant les villosités à côté des dômes 3 jours après l'infection. Un marquage occasionnel a été observé dans les PPs jéjunales isolées à tout moment, presque exclusivement dans les PPs jéjunales distales, et dans la valvule iléocœcale à 7 jours après l'infection. L'absence des BAAR mais un immunomarquage positif pour les antigènes mycobactériens a été interprétée pour être due à la présence de mycobactéries dégradées et des formes L pendant la première étape de l'infection. Ces observations ont été encore suggérées pour indiquer que la plupart des mycobactéries prises par les cellules M sont déjà dégradées ou seront dégradé une fois elles entrent dans les cellules. Des résultats similaires ont été décrits dans l'expérience des boucles des veaux, où des structures bactériennes dégénérées ont été décrites dans les cellules M et dans les macrophages (Momotani et al., 1988). Le rôle de la dégradation de la bactérie par des cellules M est incertain. Les

cellules M n'ont peu ou aucun lysosomes et sont censées pour transporter un matériel intact de la lumière intestinale aux cellules sous-épithéliales sous-jacentes (Fujimura et Owen, 1996; Mowat et Viney, 1997; Owen, 1999).

Ces résultats dans les agneaux diffèrent des résultats dans une étude préliminaire dans les chevreaux qui ont été donnés une suspension de lait MAP pendant 2 jours avant d'être euthanasié (Sigurðardóttir, données non publiées). L'examen immunohistochimique des sections de tissu de l'intestin, qui s'est étendu du jéjunum proximal et d'une manière distale au côlon proximal, n'a pas montré d'immunomarquage avec des anticorps polyclonaux contre MAP. Les BAAR dans les sections colorées par Ziehl-Neelsen ont été démontrés dans la lumière de l'intestin grêle et du gros intestin, parfois près de la surface des dômes et de temps en temps au-dessus de l'épithélium absorbant des villosités à côté des dômes. Des bactéries n'ont pas été sans équivoque démontrées dans épithéliale de revêtement des muqueuses, mais étaient présentes dans le chorion juste sous l'épithélium de la valvule iléocœcale d'une chèvre et libres dans le sinus médullaire du ganglion lymphatique ileocaecal du même animal. Des bactéries ont été seulement isolées dans l'iléum et le côlon de l'un des deux chevreaux infectés (Sigurðardóttir, données non publiées). Les raisons pour lesquelles ces aspects de l'étude préliminaire dans les chèvres diffèrent des résultats dans les agneaux sont incertaines, mais la démonstration des bactéries par la coloration de ZN ou par l'examen bactériologique est rarement réalisée dans les premiers jours suivant l'infection expérimentale (Begara-McGorum et al., 1998; Beard et al., 2000). Néanmoins, il y a un accord avec d'autres études chez les veaux et les chèvres que les cellules M de l'EAF sont importantes pour la prise de MAP de l'intestin.

#### **I.2.2.1.2 Prise de MAP par les cellules M :**

Les mécanismes de l'adhérence bactérienne à et de l'intériorisation dans les cellules M sont en grande partie inconnus, mais une liaison au récepteur spécifique ne semble pas être une condition préalable à la prise de toutes les particules par les cellules M puisque les substances inertes telles que des particules de latex et la ferritine entrent dans la paroi intestinale par ces cellules de prélèvement d'antigène (Landsverk, 1988; Paar et al., 1992; Liebler et al., 1995; Fujimura et Owen, 1996). Les cellules M semblent, cependant, être les cellules cibles pour quelques micro-organismes, probablement en visant les récepteurs spécifiques des cellules M (Clark et al., 1998; Hathaway et Kraehenbuhl, 2000). Ces dernières années, le rôle de la fibronectine dans la pathogénie des infections mycobactériennes, y compris la prise par des cellules épithéliales, a été

étudié (Schorey et al., 1995; Schorey et al., 1996). La fibronectine a des fonctions structurales et adhésives, et est trouvée sous une forme soluble dans le plasma, et sous une forme fibreuse insoluble dans la matrice extracellulaire et sur des surfaces de cellules. La fibronectine a une séquence tripeptide (Arg-Glyc-Asp, ou RGD) qui se lie aux intégrines. Les intégrines c'est une famille de molécules d'adhérence transmembranaire, cellule-cellule et matrice-cellules trouvés sur presque toutes les cellules des vertébrées, qui activent également des voies de signalisation intracellulaires. Une molécule d'intégrine se compose de deux sous-unités appelées  $\alpha$  et  $\beta$ ;  $\alpha 5 \beta 1$  est un exemple d'un récepteur de fibronectine (Van Nhieu et al., 1996). Un motif de RGD a été également trouvé dans une protéine invasine bactérienne qui lie des intégrines. L'interaction de RGD-intégrine contrôle l'activité de liaison d'autres intégrines telles que le récepteur de complément 3 (CR3) (Finlay et Cossart, 1997). Plusieurs études ont prouvé que les espèces de mycobactérie peuvent lier la fibronectine par les protéines liant la fibronectine (PLF) qui sont une famille des molécules liant la fibronectine, y compris le complexe BCG85 et la protéine similaire aux intégrines (Schorey et al., 1995; Schorey et al., 1996; Middleton et al., 2000). Valentin-Weigand et autres ont démontré que MAP lie la fibronectine. Leurs résultats ont suggéré la présence d'un seul type de récepteur de fibronectine sur la bactérie et la nature protéique probable des composants d'adhérences (Peter et Ralph, 1999). Secott et autres [66.67] ont récemment publiés deux articles au sujet de la fibronectine liant par MAP. Les résultats ont indiqué que la liaison de la fibronectine soluble par MAP a été atténuée par un homologue de PLF à PLF-A dans MAP. Cette protéine liant la fibronectine dans MAP, PLF-P, s'est avérée pour avoir un emplacement en subsurface dans la bactérie, contrairement à l'emplacement extérieur de PLF-A dans *M. a. avium* et de PLF dans d'autres espèces mycobactériennes. En outre, le traitement préparatoire de la bactérie avec un tampon acide a augmenté l'adhérence de fibronectine considérablement (Secott et al., 2001). Cette dernière conclusion suggère que quand les bactéries traversent le canal gastro-intestinal avec son environnement de pH variable, les bactéries deviennent activées pour lier la fibronectine présente dans les sécrétions biliaires dans le duodénum. Quand les bactéries liées à la fibronectine atteignent l'intestin grêle distal, elles adhèrent à des intégrines sur des cellules M. Les cellules M ont une densité d'intégrines, y compris les intégrines h1, sur leurs surfaces apicales contrairement aux cellules épithéliales d'absorption des villosités, qui limitent l'expression d'intégrine sur leurs surfaces baso-latérales. Cette différence peut expliquer la prise préférentielle par des cellules M plutôt que par l'épithélium absorbant (Marra et Isberg, 1997; Clark et al., 1998; Secott et al., 2001). Dans leur

deuxième publication, Secott et autres (Secott et al., 2002) ont étudié l'adhérence et l'ingestion du MAP dans deux types de cultures cellulaires, à savoir T-24, qui sont des cellules du carcinome de la vessie humains, et Caco-2, qui sont les cellules d'adénocarcinome d'intestin humain. Ces chercheurs ont étudié l'effet d'opsonisation de la bactérie avec la fibronectine soluble et si la bactérie pourrait adhérer et envahir les cellules d'une façon fibronectine-indépendante. Les résultats ont indiqué que la fibronectine PLF-P attachée dans les bactéries, qui ont à leur tour augmenté l'adhérence et l'intériorisation dans les cultures cellulaires. Les résultats impliquent également que l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  peut servir de récepteur à MAP opsonisée avec la fibronectine. Une façon d'adhérence fibronectine-indépendante aux cellules, cependant, a été également indiquée de leurs résultats (Secott et al., 2002). Bien que *M. a. avium*, comme avec d'autres mycobactéries, possède PLF et adhère la fibronectine, les études récentes ont prouvé que cette bactérie entre dans la paroi intestinale principalement par les cellules épithéliales d'absorption et pas les cellules M (Sangari et al., 2001).

#### **I.2.2.1.3 Phagocytose de MAP par des macrophages :**

Après traversée de la couche épithéliale des muqueuses intestinales, les bactéries MAP phagocytosés par les macrophages sous-épithéliaux où elles peuvent éviter le mécanisme bactéricide de la cellule et même proliférer, ou soient dégradées et présentées aux lymphocytes T (Momotani et al., 1988; Stabel, 2000; Coussens, 2001). La bataille entre l'hôte et le micro-organisme implique une interaction complexe entre les macrophages et les lymphocytes, menant à une cascade de sécrétion de cytokine, de recrutement des cellules à l'emplacement de l'infection, d'activation des cellules, et de prolifération cellulaire. Dans l'infection mycobactérienne, l'immunité humorale et à médiation cellulaire sont appelés, bien que la dernière soit plus importante pour l'immunité protectrice. Une forte réponse humorale et une réaction immunitaire à médiation cellulaire décroissante se développent quand la maladie progresse du stade subclinique au stade clinique. La sous-population des cellules CD4+, CD8+ et  $\gamma$ -T sont vraisemblablement les types de cellules principales impliqués dans l'immunité protectrice ; ces cellules produisent les cytokines qui activent des macrophages pour tuer les mycobactéries ingérées ou pour causer l'expansion d'autres populations de cellule T qui peuvent contenir l'infection (Stabel, 2000; Coussens, 2001).

Les macrophages possèdent une série de récepteurs à la surface de la cellule qui identifient et lient des ligands sur le micro-organisme opsonisé et non-opsonisé, facilitant la phagocytose.

Les récepteurs sur les macrophages qui sont considérés importants pour l'entrée des mycobactéries incluent les récepteurs du complément CR1, CR3 et CR4, les récepteurs d'immunoglobuline (FcR), le récepteur de mannose, le récepteur de liaison de lipopolysaccharide CD14, récepteurs de transferrine, les récepteurs scavenger, et le récepteur de la protéine tensio-active A (Astarie-Dequeker et al., 1999; Jeffrey et Andrea, 2003). CR3 semble être un récepteur pour l'attachement du MAP aux macrophages (Cheville et al., 2001). L'adhérence du MAP aux macrophages de souris a été inhibée par l'incubation avec des anticorps monoclonaux contre le récepteur d'intégrine CR3 et en ajoutant la séquence de tripeptide RGD, qui est le site d'adhérence sur des bactéries aux intégrines (Finlay et Cossart, 1997; Cheville et al., 2001).

Le destin ultime des micro-organismes dépend du mécanisme de la phagocytose par lequel elles entrent la cellule (Pieters, 2001; Jeffrey et Andrea, 2003). En se liant aux récepteurs spécifiques et en envahissant de ce fait activement des phagocytes, les bactéries, y compris des mycobactéries, peuvent dévier les mécanismes microbicides des macrophages (Gordon et Andrew, 1996; Astarie-Dequeker et al., 1999; Sangari et al., 2001; Jeffrey et Andrea, 2003). En se liant par exemple au récepteur de complément CR3, les mycobactéries évitent de déclencher l'éclat de l'oxygène (Sangari et al., 2001). Une fois à l'intérieur des macrophages, les micro-organismes résident dans les phagosomes, qui subit une maturation et s'acidifier progressivement. Le procédé de maturation des phagosomes implique une série de fusions et de fissions des vésicules des endosomes précoces et tardifs, et l'interaction avec le trans Golgi et le réticulum endoplasmique rugueux (Amal et Michele, 2002; Hostetter et al., 2003). Ce processus de fusion et de fission, avec le partage des protéines de membrane et du contenu liminal, mène aux changements progressifs dans la composition de la membrane et des teneurs des phagosomes en développement. L'étape finale est la fusion des phagosomes avec les endosomes tardifs et les lysosomes formant les organelles digestives, des phagolysosomes qui ont la capacité de dégrader la paroi cellulaire et les protéines bactériennes, et parfois de tuer les organismes (Amal et Michele, 2002; Otilia et al., 2002). La phagocytose mène également à l'assemblage du complexe de NADPH-oxydase sur la membrane phagosomale qui catalyse la production d'une série de composés bactéricides dérivés de l'oxygène hautement toxique, y compris le superoxyde et l'oxyde nitrique (Finlay et Cossart, 1997; Amal et Michele, 2002).

***Influence de l'activation de macrophage sur les résultats de la phagocytose :***

Les études d'ultrastructure des lésions de paratuberculose chez les ruminants ont montré des bactéries lysées et morphologiquement intactes dans des phagosomes et les phagolysosomes des macrophages (Paliwal et Rehbinder, 1981; Bendixen et al., 1981). Des bactéries en division ont été trouvées dans les phagosomes (Bendixen et al., 1981) et libre dans le cytoplasme des macrophages (Paliwal et Rehbinder, 1981). Des macrophages contenant beaucoup de bactéries qui manifestent des altérations dégénératives. Ces résultats d'ultrastructure indiquent que bien que les macrophages puissent détruire MAP, pas tous les macrophages ne le font. Les études *in vitro* récentes examinant l'interaction de MAP avec des monocytes ou des macrophages d'origine de souris et bovins indiquent que le destin des bactéries est influencé par l'état d'activation de la cellule phagocytaire. Bien que les macrophages aient un arsenal chimique efficace qui peut tuer et digérer des micro-organismes, MAP peut persister et proliférer dans ces cellules (Bendixen et al., 1981; Zurbrick et Czuprynski, 1987). L'activation des macrophages est essentielle en rendant ces cellules plus habiles pour faire face à la bactérie ingérée. La cytokine interféron-gamma (IFN- $\gamma$ ), qui est principalement sécrété par les cellules T CD4+, est considéré pour être le facteur d'activation de macrophage le plus important (Stabel, 2000; Coussens, 2001). Les macrophages activés sécrètent à leur tour plusieurs cytokines comprenant l'interleukine 1 (IL-1), l'IL-6, l'IL-12 et le facteur onconécrosant-alpha (TNF- $\alpha$ ), qui activent les cellules T, les cellules B et les macrophages, et induisent la production de cytokines. Les macrophages activés présentent également des antigènes avec des molécules MHC aux lymphocytes T. Les antigènes associés aux molécules de MHC classe II sont présentées aux cellules CD4+ T-helper tandis que les antigènes liés aux molécules de MHC classe I sont présentés aux cellules CD8+ T-cytotoxiques (Stabel, 2000; Coussens, 2001). La sous-population Th1 des cellules T CD4+ produisent des cytokines telles que l'IL-2, TNF- $\beta$  et IFN- $\gamma$  qui dirigent la fonction immunitaire à médiation cellulaire. La sous-population Th2 des cellules T CD4+ d'une part sécrète les cytokines telles que l'IL-4 et les IL-10, qui induisent l'immunité humorale. La réponse des cellule T est dominée par des cellules T CD4+ dans lésions tuberculoïdes observés au premier stade de l'infection mycobactérienne tandis que les cellules T CD8+ ont prédominé dans les lésions lépromateuses vues dans les stades avancés de l'infection, ainsi que la réponse régulée par Th2 (Stabel, 2000; Coussens, 2001).

Les études *in vitro* prouvent que les monocytes et les macrophages non-stimulés phagocytent avidement des bactéries de MAP en présence du sérum (Zurbrick et Czuprynski, 1987; Zhao et al., 1999). Après la phagocytose, la plupart des études prouvent qu'après une

première étape de prolifération il y ait un déclin progressif dans les nombres bactériens de quelques jours à 1 semaine après l'infection (Stabel, 1995; Zhao et al., 1997; Weiss et al., 2002; Bannantine et Stabel, 2002). Dans une étude des monocytes dérivés des bovins infectés et non infectés, peu de différence a été vue dans le nombre total de bactéries viables, bien que les monocytes des bovins infectés ont phagocytosés et tués plus aisément les organismes (Zhao et al., 1999). L'effet bactéricide des macrophages s'est avéré dépendant de la dose dans une étude (Bannantine et Stabel, 2002). Dans les cultures cellulaires de macrophage murin J774 fortement infectées, les bactéries n'ont pas été dégradées et semblées pour induire l'apoptose des cellules infectées (Bannantine et Stabel, 2002). Allen et autres ont démontré une fréquence accrue d'apoptose dans les monocytes de sang bovin après incubation de 6 h tandis qu'une plus longue incubation jusqu'à 48 h seulement a légèrement augmenté la fréquence de l'apoptose, indiquant l'apoptose pour être un mécanisme de défense précoce par la cellule infectée. La bactérie, cependant, n'a pas induit l'apoptose dans une variété de cellule de macrophage bovin (Allen et al., 2001). L'apoptose est un mécanisme considéré être employé par la cellule hôte pour tuer ou empêcher des bactéries. Des souches plus virulentes des mycobactéries ont été montrées pour éviter entraînant l'apoptose des cellules hôtes (Allen et al., 2001). Dans les cultures cellulaires J774 non-stimulées et les cultures cellulaires J774 incubées avec le sérum d'une vache infectée par la paratuberculose (Mark et al., 2001), les bactéries MAP ont persisté dans les phagosomes (Mark et al., 2001). Même après une période prolongée de 15 jours, Kuehnel et autres n'ont pas trouvé l'évidence ultrastructure de la désintégration des bactéries MAP vivantes ou tuées dans la culture de macrophage de souris (Mark et al., 2001).

Les effets de l'activation sur la phagocytose et la capacité microbicide de cultures cellulaires de monocytes et de macrophage ont été également étudiés. Des cultures cellulaires ont été incubées avec des cytokines comprenant IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF) et TNF- $\alpha$ , et avec le composant LPS de la paroi cellulaire bactérienne. Le traitement préparatoire des cultures cellulaires J774 avec TNF- $\alpha$  (Stabel, 1995) ou des monocytes bovins avec IFN brut, recombinant-IFN- $\alpha_1$  (r-IFN- $\alpha_1$ ), r-IFN- $\gamma$  ou GM-CSF brut n'a eu aucun effet significatif sur la phagocytose des bactéries (Zurbrick et al., 1988; Zhao et al., 1997). Les effets de d'IFN brut et de r-IFN- $\alpha_1$  seuls ou en combinaison avec r-GM-PPC (Zurbrick et al., 1988) étaient d'empêcher la croissance intracellulaire de MAP dans les monocytes bovins mais pas dans les macrophages bovins. Considérant qu'une inhibition significative de la croissance intracellulaire des bactéries a été démontrée si des cultures

cellulaires de monocyte bovin ont été traitées préalablement et sans interruption incubées avec IFN brut, r-IFN- $\alpha_1$  ou GM-CSF (Zurbrick et al., 1988), le même laboratoire a rapporté aucune (Zurbrick et al., 1988) ou seulement une légère (Zhao et al., 1997) augmentation de la destruction bactérienne quand ces cultures cellulaires ont été traitées avec le r-IFN- $\gamma$ . L'effet de stimulation léger du r-IFN- $\gamma$  sur la destruction bactérienne s'est avéré dépendant de la dose (Zhao et al., 1997). Weiss et autres (Weiss et al., 2002) n'ont démontré aucun changement de viabilité bactérienne dans les macrophages bovins infectés stimulés avec IFN- $\gamma$ . L'IFN- $\gamma$  en combinaison avec des LPS mènent, cependant, à survie intracellulaire diminuée des bactéries MAP dans les macrophages de souris (Hostetter et al., 2002). Dans l'étude de Zurbrick et autres, les cultures cellulaires ont été également incubées avec les surnageants bruts de culture de cellules mononucléaires MAP-immunisés, qui ont augmenté la croissance intracellulaire des bactéries. Le facteur ou les facteurs dans les surnageants responsables de cet effet n'a pas été identifié (Zurbrick et al., 1988). L'effet de l'activation r-TNF- $\alpha$  des cellules J774 infectées par MAP a varié avec le niveau de la cytokine et la durée de l'infection (Stabel, 1995). Les résultats ont indiqué un double rôle pour TNF- $\alpha$  selon l'étape de l'infection, puisque la cytokine pourrait augmenter et réduire l'activité mycobactéricide et mycobactériostatique du macrophage. L'incubation des macrophages bovins avec MAP et des lymphocytes amorcés à des autologues n'a pas changé la capacité microbicide de la cellule (Weiss et al., 2002).

Les effets et la production des radicaux oxydants dans les cultures cellulaires infectées, activées ou non activées de MAP ont été adressés. L'infection à MAP des monocytes ou des macrophages J774 bovins incubés avec IFN n'a pas stimulé la production du superoxyde (Zurbrick et al., 1988; Weiss et al., 2002) et bien que l'oxyde nitrique ait été produit dans les cultures cellulaires infectées par des bactéries stimulées (r-IFN- $\gamma$  et/ou LPS) (Zhao et al., 1997; Weiss et al., 2002) et non-stimulées (Weiss et al., 2002), la quantité était insuffisante pour tuer les bactéries ingérées (Zhao et al., 1997; Weiss et al., 2002). Ces résultats argueraient du fait que l'activité mycobactéricide est réalisée par des moyens autres que les composés oxydants. Les bactéries produisent des enzymes telles que la superoxyde dismutase (SOD), qui peut inactiver les formes réactives de l'oxygène les protégeant de ce fait contre le stress oxydant. La SOD a été identifiée dans différentes espèces mycobactériennes, et elle est sécrétée par MAP (Xiaofei et al., 2001), expliquant probablement le manque de superoxyde dans les cultures cellulaires stimulées et infectées.

***Effet de l'infection à MAP sur les macrophages :***

Il y a plusieurs mécanismes par lesquels les mycobactéries peuvent manipuler des macrophages pour survivre dans ces cellules hôtes. Comme précédemment mentionné, les mycobactéries peuvent éviter le déclenchement l'éclat respiratoire en utilisant certains récepteurs cellulaires tels que CR3, et les souches hautement virulentes de la bactérie évitent l'induction de l'apoptose. En empêchant la maturation et l'acidification des phagosomes, les bactéries gênent un mécanisme bactéricide important, et en changeant le mode de la production de cytokines et l'expression de MHC et des molécules de costimulation, les mycobactéries interfèrent les processus inflammatoires et immunitaires (Stabel, 2000; Coussens, 2001). La nature des mécanismes de survie de MAP dans des phagosomes a été étudiée dans des cellules J774. Ces études prouvent que les phagosomes contenant les MAP vivantes ne mûrissent pas et ne deviennent pas acidifiés, tandis que les bactéries tuées résident dans les phagosomes et les phagolysosomes acidifiés (Cheville et al., 2001; Mark et al., 2001). La présence des premiers et derniers marqueurs endosomaux TfRs et Lamp-1, respectivement, a été accédée dans les phagosomes contenant des MAP vivantes ou mortes (Cheville et al., 2001; Hostetter et al., 2002; Hostetter et al., 2003). Les résultats ont démontré un pourcentage sensiblement plus élevé de la colocalisation des MAP tuées avec le dernier marqueur endosomal Lamp-1 (Cheville et al., 2001; Hostetter et al., 2002; Hostetter et al., 2003) et de la colocalisation sensiblement plus élevée du premier marqueur endosomal TfRs avec les MAP vivantes (Hostetter et al., 2003). Quand des cultures cellulaires ont été activées avec le r-IFN- $\gamma$  et les LPS, la colocalisation des bactéries vivantes avec le marqueur acidotrophique LTR et avec Lamp-1 était augmentée tandis qu'aucun effet d'activation n'a été vu sur la colocalisation des bactéries tuées avec ces marqueurs. L'activation a également causé une survie bactérienne diminuée dans ces cellules (Mark et al., 2001). Kuehnel et autres [93] ont également étudié les différents marqueurs de la maturation phagosomale dans les cultures cellulaires incubées avec des bactéries vivantes comparées à des bactéries tuées. Les phagosomes contenant les bactéries MAP vivantes ont été sensiblement réduits dans leur capacité d'acquérir quelques marqueurs pour la voie d'endocytose tel Lamp-2, mais également des particules de taille différente d'or et la calcine de fluorochrome, qui est un marqueur pour la fusion de phagosome-lysosome (Mark et al., 2001). Le contraire aux résultats du groupe précédent, acquisition du dernier marqueur endosomal Lamp-1 était similaire dans les phagosomes contenant les bactéries vivantes et mortes (Mark et al., 2001). Plusieurs études ont examiné la capacité des cellules phagocytaires de libérer des cytokines en réponse aux bactéries entières ou aux composants de la paroi cellulaire bactérienne. L'incubation des monocytes bovins

et la lignée cellulaire de macrophage murin RAW 264.7 avec les composants de la paroi cellulaire mycobactérienne liporabinomannane (LAM) et muramyl dipeptide (MDP), et avec le MAP ou LPS ont induit la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1, IL-6 et TNF- $\alpha$  (Adams et Czuprynski, 1994; Olöf et al., 2004).

### **I.2.3 Aspects lésionnels de la paratuberculose :**

Une fois infectés, les animaux peuvent passer par 4 stades principaux de la maladie. Ceux-ci sont classés comme suit : 1) stade d'infection silencieuse, 2) stade de la maladie subclinique, 3) stade de la maladie clinique, et 4) stade de la maladie clinique avancée (Whitlock et Buergelt, 1996b). La susceptibilité à l'infection est plus élevée chez les veaux moins de 30 jours d'âge ; cependant, la maladie clinique n'est pas habituellement évidente dans les bovins jusqu'à 2-5 ans, et seulement 10-15% d'animaux infectés développent des signes cliniques de la maladie (Shannon et al., 2008).

Les lésions pathologiques macroscopiques généralement décrites dans les bovins incluent un épaissement de la muqueuse (corrugation), principalement dans l'intestin grêle distal ; des vaisseaux lymphatiques mésentériques et de la séreuse dilatés ; et hypertrophie des ganglions lymphatiques mésentériques. D'autres lésions moins fréquentes incluent l'alopécie, et une calcification endocardique et aortique (Clarke, 1997; Shannon et al., 2008).

Dans une étude de la prévalence de la paratuberculose ovine effectuée dans les abattoirs du sud d'Inde, VinodhKumar et ses collègues ont observé des lésions associées à la paratuberculose dans l'intestin et les ganglions lymphatiques. Les lésions macroscopiques consistaient d'un épaisissement et plissements (corrugation) de la muqueuse intestinale, des vaisseaux lymphatiques en corde et une lymphadénopathie ; amaigrissement et œdème de carcasse, ascite et hydropéricarde ; œdème intermandibulaires et atrophie et stéatonécrose (Obli Rajendran et al., 2012).

Une réserve doit être émise quant à la valeur des observations macroscopiques, puisqu'elles n'apparaissent que très tardivement dans l'évolution clinique de la paratuberculose, mais surtout que l'intensité des symptômes n'est pas bien corrélée avec les lésions qui sont observées lors de l'autopsie (Chastel, 2008b).

### **I.2.3.1 Emplacement des lésions pendant les stades de la paratuberculose :**

Comme avec d'autres infections mycobactériennes, MAP est une infection des macrophages, mais avec une affinité pour le tube intestinal (Clarke, 1997; Gebert et Posselt, 1997). L'infection naturelle est principalement per os, avec des bactéries gagnant l'accès direct aux muqueuses intestinales. Des lésions histopathologiques de la paratuberculose subclinique ont été décrites dans les ruminants naturellement infectés, mais les descriptions principales dérivent de diverses études expérimentales. Des lésions inflammatoires sont dispersées dans tout le tube intestinal, mais sont principalement situées dans le GALT. Des lésions peuvent être trouvées dans le chorion des villosités, mais ensuite habituellement à proximité du tissu lymphoïde des PPs (Begara-McGorum et al., 1998; Sigurdardottir et al., 1999; Valheim et al., 2002). Chez les moutons expérimentalement infectés par MAP, des lésions ont été trouvées dès le 18<sup>ème</sup> jour après l'infection, se composant d'agrégats de macrophages, de polynucléaires neutrophiles et de lymphocytes.

L'inflammation était principalement dans les follicules lymphoïdes des PPs dans le jéjunum et l'iléum, mais était également présente dans les zones interfolliculaires (Begara-McGorum et al., 1998). Dans une autre expérience avec des moutons vaccinés et non vaccinés, des lésions ont été trouvées dans les mêmes localisations durant toute la durée de douze mois de l'expérience. Les zones dans la paroi intestinale éloignées du GALT sont devenues affectées seulement quand les lésions dans le GALT sont devenues confluentes et étendues (Nisbet et al., 1962). L'infection expérimentale chez les bovins a donné des résultats comparables aux résultats chez les moutons, mais en plus des lésions précoces liées au tissu lymphoïde, des lésions inflammatoires ont été trouvées dans les villosités (Payne et Rankin, 1961; Gilmour et al., 1965). Cette constatation a été également décrite dans les bovins naturellement infectés ayant des lésions de paratuberculose légère à modérée (Buergelt et al., 1978). Les lésions ont pu être démontrées d'un mois et jusqu'à 14 mois après l'infection chez les veaux expérimentalement infectés, avec des lésions précoces dans les muqueuses de l'intestin grêle et les ganglions lymphatiques régionaux. Les lésions ont consisté au début en quelques MNGC isolées, mais ensuite de plus petits amas de macrophages et de MNGC étaient présents dans les PPs, et dans le chorion au sommet des villosités (Payne et Rankin, 1961; Gilmour et al., 1965). Une étude récente de virulence d'un isolat de lapin de MAP a donné des résultats similaires (Beard et al., 2001). L'inoculation des veaux avec cet isolat a induit une inflammation granulomateuse 6 mois après inoculation, principalement dans le chorion

et le tissu lymphoïde sous-jacent de la valvule iléocœcale et de son ganglion lymphatique de drainage (Beard et al., 2001). Ces résultats chez les moutons et les bovins ont été mis en parallèle par des résultats dans les chèvres expérimentalement infectées (Sigurdardottir et al., 1999). Les lésions histopathologiques de la paratuberculose ont été démontrées dans le jéjunum, l'iléum et dans un ganglion lymphatique jéjunal en 4, 6 et 9 mois après l'infection des chevreaux, respectivement. Les lésions ont été situées dans les zones interfolliculaires riches en cellules T du GALT. Quelques lésions étaient devenues plus étendues, impliquant un ou plusieurs follicules lymphoïdes. Indépendamment de ces lésions dans le GALT, il y avait également des amas dispersés de macrophages ou des MNGC isolées dans le chorion sus-jacent (Sigurdardottir et al., 1999). Dans une autre étude terminée 2 ans après l'infection expérimentale des chèvres, des lésions ont été principalement associées aux zones interfolliculaires riches en cellule T du tissu lymphoïde organisé du mi-jéjunum, de l'iléum distal et de la valvule iléocœcale (Valheim et al., 2002). L'infection expérimentale des chèvres avec une mycobactérie isolée de patients atteints de MC a induit une inflammation granulomateuse en 3 mois après l'infection. Les lésions ont été situées dans l'intestin grêle, principalement l'iléum, dans les zones interfolliculaires des PPs et dans le chorion des villosités adjacentes. Dans les lésions avancées, l'inflammation est devenue confluyente et il y avait ulcération des muqueuses, une caractéristique de la maladie de Crohn mais pas de la paratuberculose (Van Kruiningen et al., 1986). Une observation commune à ces études de pathogénie de la paratuberculose dans un certain nombre d'espèces est que les lésions sont associées au GALT, en particulier dans les stades précoces de l'infection. Cette association peut être le résultat des propriétés fonctionnelles spéciales de GALT et des mécanismes de l'infection utilisés par MAP pour exploiter l'immunobiologie de l'intestin de mammifère (Clarke, 1997; Olöf et al., 2004).

Les lésions caractéristiques de la paratuberculose sont des infiltrats granulomateux dans l'intestin et les ganglions lymphatiques régionaux (Clarke, 1997). Les différences dans leur extension et destruction des tissus associée, composition des cellules épithélioïdes, cellules géantes multinucléées (CGMN) et des lymphocytes de même que le nombre de mycobactéries présentes ont été rapportés dans des animaux infectés naturellement et expérimentalement basé sur les coupes de paraffine colorées par la technique d'hématoxyline et éosine (HE) - (Clarke et Little, 1996; Corpa et al., 2000; Kurade et al., 2004; Lybeck et al., 2013). Des lésions circonscrites de cellules épithélioïdes avec peu de MAP entourée par des lymphocytes se sont appelées tuberculoïde, des infiltrats diffus de cellules épithélioïdes avec beaucoup de MAP en

tant que lépromateuse (Clarke et Little, 1996; Pérez et al., 1996; Clarke, 1997; Krüger et al., 2015).

Dans une étude effectuée par Holstad chez des bovins naturellement infecté avec MAP, l'examen histopathologique a montré des lésions compatibles avec la paratuberculose chez 4 animaux. Il y avait une inflammation granulomateuse avec des BAAR dans l'intestin et les ganglions lymphatiques jéjunaux chez l'animal le plus âgé et dans l'intestin grêle distal des 3 autres animaux affecté. Les lésions plus sévères ont été trouvées dans le jéjunum et l'iléum de la vache la plus âgée. Ces lésions ont été caractérisées par des foyers inflammatoires granulomateux nodulaires, multiples, non-encapsulés dans les sous-muqueuses, la musculuse et dans la séreuse. Beaucoup de vaisseaux lymphatiques ont été entourés par les cellules inflammatoires, qui ont été dominées par des macrophages volumineux, souvent mousseux. Il y avait des nombres modérés de CGMN et de quelques leucocytes éosinophiles. Dans le chorion, il y avait des nombres modérés de macrophages et de CGMN. Ces cellules étaient souvent présentes comme cellules entre les cryptes et particulièrement dans le chorion des villosités. Il y avait des CGMN, soit séparées ou dans de petits amas, dans le cortex des ganglions lymphatiques jéjunaux. Des bacilles acido-résistants ont été détectés dans les CGMN et les macrophages dans des sections d'intestin et de ganglions lymphatiques colorées par ZN. Les lésions chez les 3 autres animaux positifs étaient très modérées et composés de petits foyers inflammatoires dispersés, principalement dans le chorion des villosités. Ces lésions ont contenu des CGMN, isolément ou quelques-unes ensemble, et/ou des petits amas de grands macrophages. Dans certaines de ces lésions, quelques bacilles acido-résistants ont été détectés dans des sections colorées par ZN. Deux animaux ont eu des lésions dans le jéjunum, tandis que 1 a eu des lésions dans l'iléum et dans la valvule iléocæcale. De petits foyers inflammatoires occasionnels, consistant d'un ou quelques CGMN et de quelques macrophages, ont été vus dans la paroi intestinale de 19 animaux. Ces lésions ont été trouvées principalement dans les muqueuses du jéjunum et de la valvule iléocæcale. Dans plus de la moitié de ces lésions, les cellules inflammatoires ont contenu un pigment ou des corps étrangers tels qu'une matière végétale et des coccidies (Holstad et al., 2005).

Les lésions macroscopiques et histologiques de la paratuberculose restent fondamentalement confinées à l'intestin, aux ganglions lymphatiques mésentériques et iléocæcaux (Schaaf et Beerwerth, 1960). Bien que MAP ait été cultivé d'une série d'autres organes, les lésions microscopiques ont été trouvées seulement dans le foie. Les lésions de la paratuberculose dans le tube intestinal et les ganglions lymphatiques associés ont été classées

utilisant comme modèle l'échelle morphologique de la lèpre proposée par Ridéey et Jopling (RIDÉEY et Jopling, 1966).

Ils ont noté qu'il y avait des corrugations de la muqueuse de l'intestin grêle distal et des vaisseaux lymphatiques mésentérique et sous-séreux proéminents chez certaines vaches. D'autres vaches ont présenté des ganglions lymphatiques mésentériques et iléocæcaux hypertrophiés.

Les lésions histologiques compatibles avec ceux de la paratuberculose ont été évaluées comme légères, modérées et marquées. Chez les vaches avec des lésions légères (Classe I), des cellules géantes de Langhans individuel ont été détectées habituellement dans le chorion des villosités intestinales, ou dispersées dans la zone paracorticale des ganglions mésentériques. Il était difficile d'identifier des macrophages épithélioïdes spécifiques.

Les vaches avec les lésions histologiques modérées (Classe 2) ont présenté plusieurs petits amas de macrophages ou plusieurs cellules géantes de Langhans isolées ou tous les deux dans le chorion des villosités intestinales, dans la sous-muqueuse intestinale, dans le sinus sous-capsulaire, ou dans la zone paracorticale des ganglions mésentériques régionaux. De petits agrégats de macrophages peuvent être observés dans le foie.

Plusieurs macrophages et cellules géante infiltrent le chorion de la sous-muqueuse de divers segments de l'intestin grêle chez les vaches avec des lésions avancées (Classe 3). Ces macrophages et cellules géantes se trouvent également dans le stroma de la tunique musculuse et dans la séreuse. Ils remplissent les vaisseaux lymphatiques de la sous-muqueuse, sous-séreuse et mésentérique et ont partiellement fermés la lumière. Un nombre considérable de macrophages, cellules géantes et lymphocytes peuvent entourer ces vaisseaux lymphatiques.

Les villosités intestinales sont courtes et tordues. Les cryptes sont dilatées et remplies de neutrophiles et de substances mucoïde. Les vaisseaux chylifères des villosités sont gonflés en raison de la dilatation et certains peuvent contenir quelques cellules inflammatoires. Quelques vaisseaux chylifères rompus et fistulés dans la lumière intestinale ont été observés. Les plaques de Peyer sont entourées par des cellules inflammatoires, mais habituellement ne sont pas infiltrées par ces cellules. La sous-muqueuse est élargie soit par l'infiltration des cellules inflammatoires ou transsudat. Quelquefois, les cellules ganglionnaires myentériques du plexus de Meissner sont entourées ou infiltrées par quelques leucocytes.

Trois types de macrophages ont pu être distingués morphologiquement. Des infiltrats inflammatoires granulomateux se sont composés de macrophages ovoïdes et fusiformes, et arrangés en formations syncytiales dans la muqueuse intestinale de même que les ganglions mésentériques. Elles sont aussi chargées avec des bacilles acido-résistants. D'autres macrophages sont polygonaux avec un cytoplasme proéminent, mousseux ou vacuolé. En dernier lieu, ce sont les macrophages forment des cellules épithélioïdes bien développées avec un cytoplasme très éosinophile, des limites cellulaires distinctes, un noyau ovale hypochromatique, excentrique, et plusieurs nucléoles de différentes tailles.

Buergelt (Buergelt et al., 1978) a rapporté que le duodénum était exempt des infiltrations granulomateuses chez toutes les vaches. De même, tous les autres organes examinés, y compris les tissus fœtaux, étaient exempts de l'évidence histologique de la paratuberculose. Les granulomes hépatiques se sont également produits plus fréquemment dans des cas subcliniques de la paratuberculose.

On l'a montré que la moitié des bovins avaient des lésions macroscopiques de la paratuberculose. C'étaient un épaissement de la muqueuse de l'intestin grêle distal et une dilatation des vaisseaux lymphatiques sous-séreux et mésentériques. L'hypertrophie des ganglions lymphatiques mésentériques, la cachexie et l'alopécie étaient des résultats moins fréquents.

Histologiquement, les réponses inflammatoires granulomateuses dans les tissus intestinaux et mésentériques associés étaient de légères à avancées. Les réponses inflammatoires ne se sont pas propagées au-delà de la valvule iléocœcale dans la plupart des bovins. Des segments du gros intestin ont été infiltrés seulement dans quelques vaches. Ceci peut être important en essayant de diagnostiquer la paratuberculose à l'aide d'un raclage rectal ou biopsie rectale. Les possibilités de confirmer un diagnostic clinique de la maladie de Johne avec cette méthode sont considérées très faibles.

Plusieurs granulomes paratuberculeux se sont composés de macrophages aussi bien que de cellules géantes, le rapport fluctuant d'un animal à l'autre. Beaucoup de bovins ont présenté des macrophages ou des cellules géantes comme cellule dominante dactylographient. Les cellules géantes étaient fréquemment le seul type cellulaire dans les faibles lésions de la paratuberculose. Dans ces cas, il n'était pas habituellement possible de démontrer les bacilles acido-résistants avec les colorations spéciales.

Dans les cas plus sévères, les cellules géante ont phagocyté les bacilles acido-résistants, mais à un moindre degré que les macrophages adjacents. Là où les macrophages étaient le type cellulaire dominant, ils ont tendu à avoir beaucoup de bacilles.

Beaucoup de bovins ont montré des macrophages qui ont variés dans la taille et la forme ou qui sont uniformes et différenciées qui ressemblent les cellules épithéliales. L'index bactérien pour les deux types de cellules était être approximativement le même. Quelques bovins ont montré des macrophages histiocytaires prolongés, disposés dans des faisceaux ou des spirales qui ont eu un nombre comparativement plus élevé de bacilles acido-résistants.

Quand les lésions histologiques de la paratuberculose ont été comparées à celles de la lèpre, les ganglions lymphatiques mésentériques sévèrement affectés ont semblé similaires à ceux de la lèpre lépromateuse (Turk et Waters, 1971). La zone paracorticale entière a été remplacée par des macrophages et des cellules géantes, épargnant les follicules lymphoïdes. Il y avait diverses formes cytologiques, d'un macrophage histiocytaire à une cellule épithélioïde. Les cellules géantes étaient nombreuses. L'identification des variations de la réponse granulomateuse dans le tube intestinal des bovins paratuberculeux était moins efficace que dans la peau d'autres avec la lèpre, chez lesquels il est plus facile d'évaluer les lésions nodulaires.

Des éosinophiles, des plasmocytes et des lymphocytes ont été mélangés à des nombres variables. La formation des cellules épithélioïdes était reconnaissable dans d'autres exemples. Au contraire de la lèpre tuberculoïde, plusieurs cellules épithélioïdes ont pu être montrées d'avoir ingérer nombreux bacilles acido-résistants. Similaire à leur aspect dans la lèpre lépromateuse, les macrophages dans quelques bovins avec la paratuberculose étaient indifférenciés. Ils sont également remplis de bacilles acido-résistants.

La cellule épithélioïde a été décrite comme l'étape finale des macrophages stimulés et phagocytaires (Papadimitriou et Spector, 1971). Ces macrophages sont dérivés des monocytes de la circulation d'origine médullaire. Les macrophages se transforment en cellules épithélioïdes quand ils deviennent immobilisés au site de l'inflammation. Les cellules épithélioïdes sont actives dans la phagocytose, la dégradation des substances ingérées et la destruction des agents. Elles ont des fonctions sécrétrices aussi (Buergelt et al., 1978).

Les CGMN résultent de la fusion des macrophages mûres. Les cellules géantes formées au début sont du type de corps étrangers et se transforment plus tard en type de Langhans (Adams, 1976).

Le globule leucocyte (GL) est considéré un mastocyte qui est en cours de décharger son contenu en amines pharmacologiquement actifs. Des GL ont été détectés dans beaucoup de cas avec des signes cliniques de la maladie de Johne et en absence de l'infestation avec des helminthes. Leur association étroite avec les cellules ganglionnaires myentériques peut être une évidence morphologique d'un mécanisme immunologique par lequel la diarrhée s'effectue. On lui a suggéré que la diarrhée dans la première étape de la maladie de Johne soit causée par l'hypersensibilité immédiate (Merkal et al., 1970). Elle s'effectue par des histamines libérées des mastocytes et est sensible aux antihistaminiques. L'histologie de la paratuberculose n'a pas différé entre les races. La nécrose, la caséification et l'ulcération qui se produisent dans la tuberculose étaient toujours absentes. Cette observation peut être utile en distinguant la paratuberculose de la tuberculose chez les bovins. À de rares exceptions, la minéralisation intestinale et cardiovasculaire étaient également absente, cette dernière soit contrairement à la forte incidence rapportée de l'artériosclérose dans les bovin avec la maladie de Johne (Buergelt et al., 1978).

### **I.2.3.2 Classification des lésions histologiques (grading) :**

Dans une étude d'infection expérimentale d'agneaux, Kurade a montré que les lésions histologiques ont été classifiées dans quatre grades sur la base de l'emplacement des lésions granulomateuses dans différentes régions et couches de l'intestin, leur association avec les tissus lymphoïdes intestinaux (plaques de Peyer), mode et distribution des lésions, types d'infiltration cellulaire, et présence de BAAR. Les lésions trouvées exclusivement dans les PP iléales ou iléocœcales, ou les deux, se composant de microgranulomes dispersés dans des zones folliculaires et interfolliculaires, ont été classés comme lésions de grade 1 (plus légère/plus précoce). Les microgranulomes sont composés principalement de grands macrophages avec une occasionnelle infiltration par des neutrophiles. Les changements muqueux ont été limités à une augmentation modérée du nombre de cellules lymphoïdes, plasmocytes, et de macrophages, par rapport aux témoins non infectés. Peu ou pas de BAAR n'ont été démontrés dans quelques microgranulomes des lésions de grade 1. Les lésions du grade 2 étaient ceux avec de petits granulomes focaux trouvés également dans les muqueuses liées aux PP. Les zones de villosités et de crypte ont été infiltrées par un nombre modéré de lymphocytes, macrophages, et de quelques plasmocytes.

Quelques BAAR ont pu être démontrés dans les lésions du grade 2. Les lésions du grade 3 se sont composées de multiples granulomes de tailles variables et les lésions granulomateuses de temps en temps diffuses dans les PP et les muqueuses jéjunales et iléales associées ou non aux PPs. La muqueuse a été diffusément infiltrée avec les cellules lymphoïdes. Les lésions du grade 3 ont montré peu à beaucoup de BAAR. Les lésions du grade 4 (les plus graves) ont été caractérisées par une entérite granulomateuse diffuse comportant de grandes couches de macrophages et de cellules épithélioïdes, chargée avec nombreux BAAR dans les chorions du jéjunum et de l'iléum et les zones des cryptes. L'infiltration de cellules lymphoïdes était moins importante. Les lésions dans les PP étaient beaucoup plus étendues que ceux du grade 3 (Kurade et al., 2004).

Dans une étude d'infection menée chez des veaux de boucherie, les lésions microscopiques ont été évaluées en tant que non affectés (-), léger (+), modérément (++), ou sévèrement (+++) affectés comme précédemment décrit [11]. Le nombre de bacilles acido-résistants a été classé en - (aucun BAAR), + (1-5 BAAR/champs de 10 400x), ++ (6-50 BAAR/champs de 10 400x), et +++ (>50 BAAR/champs de 10 400x) (Goepfert et al., 2014).

Dans une autre étude d'infection expérimentale de chèvres menée par Valheim et ses co-rechercheurs, le nombre de lésions a été classifié comme : -, - aucunes lésions ; +, peu de lésions ; ++, un nombre modéré de lésions ; +++, beaucoup discrets aux lésions confluentes. Les lésions histopathologiques, ont montré une similitude considérable dans les différents segments intestinaux, qui ont consisté principalement en des infiltrats de cellules inflammatoires nodulaire ou diffus non encapsulés. Les infiltrats ont été dominés par de grands macrophages avec des noyaux ovales ou allongés et un cytoplasme abondant légèrement coloré sans membranes cellulaires distinctes, et des agrégats de lymphocytes. On a également observé des CGMN dispersées (Valheim et al., 2002).

## **I.3 DIAGNOSTIC DE LA PARATUBERCULOSE**

### **I.3.1 Diagnostic clinique :**

La paratuberculose peut-être suspectée chez les bovins, ovins ou caprins, et cela quel que soit le type d'élevage. La maladie apparaît le plus de manière sporadique, mais peut encore se présenter sous forme enzootique.

L'incidence de la forme clinique est maximale chez les jeunes adultes, après la première mise-bas, voire la seconde. Toutefois, il arrive que des bovins déclarent la forme clinique après l'âge de 10 ans.

Tout ruminant domestique adulte présentant une diarrhée incoercible, avec le plus souvent une conservation de l'appétit, associée à un amaigrissement progressif, devra être considéré comme suspect de paratuberculose. Signalons toutefois la rareté de la diarrhée chez les ovins, chez qui l'amaigrissement est le signe majeur (Chastel, 2008b).

### **I.3.2 Diagnostic nécropsique :**

Il repose sur l'observation de lésions intestinales et ganglionnaires, ainsi que sur la présence d'une hydrocachexie dans la plupart des cas.

Une réserve doit être émise quant à la valeur des observations macroscopiques, puisqu'elles n'apparaissent que très tardivement dans l'évolution clinique de la paratuberculose, mais surtout que l'intensité des symptômes n'est pas bien corrélée avec les lésions qui sont observées lors de l'autopsie.

Il apparaît donc clairement que le recours à un examen de laboratoire est nécessaire pour obtenir un diagnostic de certitude, et permettre un dépistage efficace de la paratuberculose (Chastel, 2008b).

### **I.3.3 Diagnostic précoce :**

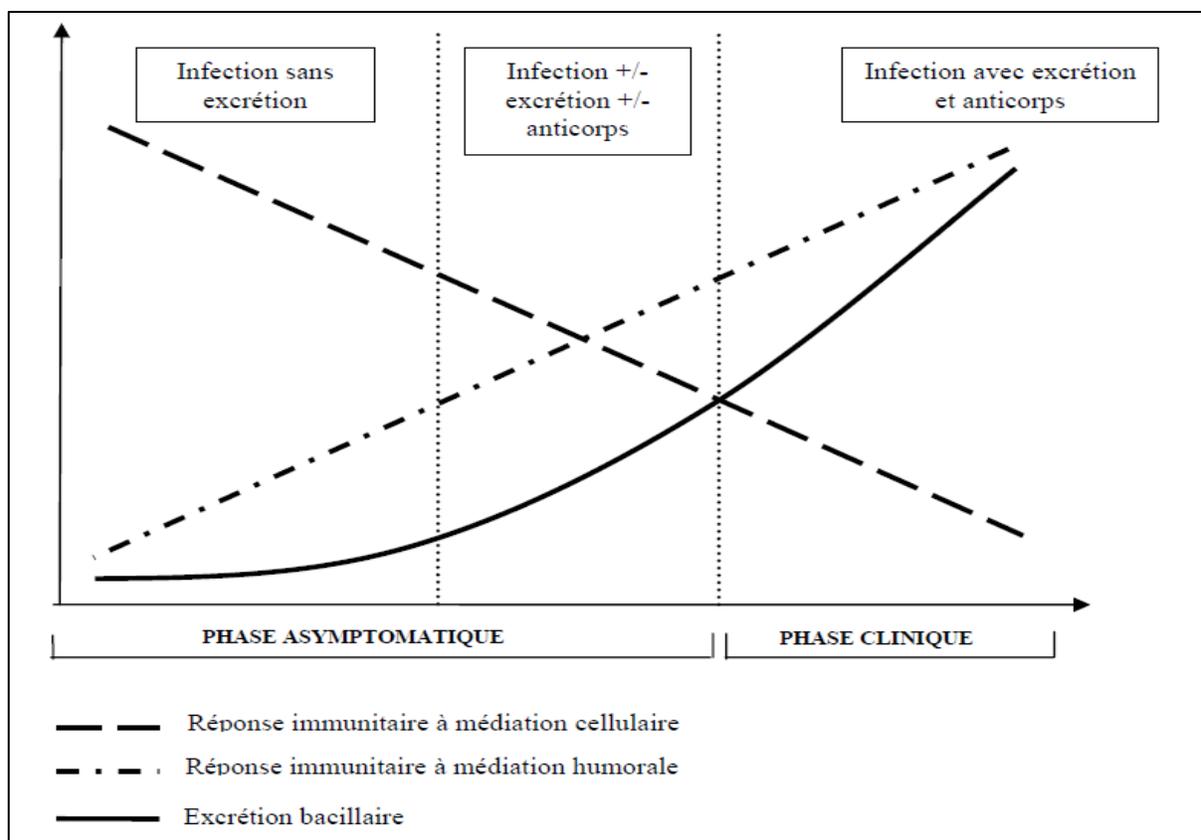
#### **I.3.3.1 Profils de réaction immunitaire :**

On a observé trois types distincts de profils de réaction immunitaire précédemment décrits chez les moutons (Begg et al., 2011) chez 30 veaux inoculés avec une forte ou faible dose de MAP et à 2 semaines 3, 6, 9, ou 12 mois d'âge (Mortier et al., 2014c). Le premier profil a été caractérisé par une augmentation initiale d'IFN- $\gamma$ , suivie d'un passage de la réponse vers une réaction immunitaire humorale et puis la perte de la réponse immunitaire cellulaire, a été décrite comme « profil de passage classique». Dans le deuxième profil «IFN- $\gamma$ /anticorps combinés», les réactions d'IFN- $\gamma$  et des anticorps augmentent simultanément. Le troisième profil, « IFN- $\gamma$  seulement», a été caractérisé par une réponse IFN- $\gamma$  non suivie d'une réaction des anticorps au cours de la période de suivi (Begg et al., 2011). On a observé ce profil chez la plupart des veaux. Ces profils de réaction immunitaire n'ont pas dépendu de l'âge ou du groupe de dose et n'ont pas été associés au grade des lésions macroscopiques, ou au nombre de tissus positifs par culture de MAP à l'autopsie. Deuxièmement, « le profil de passage classique» assumé (Stabel, 2006; Begg et al., 2011) était moins commun que prévu. Par conséquent, une perspective alternative vers des réactions immunitaires après infection par MAP a été exigée. Le passage d'une réaction immunitaire cellulaire à une réaction humorale a été bien documentée (Stabel, 2006), mais peut ne pas être précis et une réaction des anticorps peut commencer indépendamment de la réponse immunitaire cellulaire pendant la maladie (Coussens, 2004). Les profils de réaction immunitaire ont tendu à être liés au grade des lésions histologiques et à l'excrétion fécale ; cependant, trop peu d'animaux ont été inclus dans les catégories pour tirer des conclusions fermes. Peut-être le déclin d'IFN- $\gamma$  observé chez les veaux avec le profil « de passage classique» plutôt que la présence des anticorps a déterminé la fréquence de l'excrétion chez les veaux infectés par MAP.

De même, chez les humains avec la MC, MAP a été détectée dans des témoins sains et des patients atteints de MC, mais les témoins sains ont eu une réponse immunitaire cellulaire forte contre les antigènes spécifiques à MAP contrairement aux patients atteints de MC (Juste et al., 2008). Compatible aux bovins infectés avec MAP, ces patients atteints de MC ont eu des réactions d'anticorps fortes qui n'étaient apparemment pas capables de contrôler une infection intracellulaire (Stabel, 2006; Juste et al., 2008). Dans les moutons, les animaux multibacillaires ont eu une capacité diminuée de produire l'IFN- $\gamma$  (Begg et al., 2011), confirmant encore le rôle de la MAP pour supprimer des réponses immunitaires cellulaires (Ryan et al., 2014). Les mêmes principes peuvent être employés pour expliquer pourquoi les vaches subcliniques ont eu une réponse immunitaire cellulaire spécifique à MAP forte, tandis que les vaches cliniques et non infectées n'ont pas fait. En conséquence, la réponse immunitaire cellulaire garde l'infection de

MAP sous contrôle et dès que la réponse cellulaire sera perturbée, MAP prolifère et la maladie progresse (Stabel, 2006), indépendamment de la présence ou de l'absence des anticorps à MAP.

La cause sous-jacente de l'excrétion fécale est inconnue (Whittington et Sergeant, 2001). On lui a suggéré qu'une migration des macrophages infectés à la lumière ayant pour résultat l'excrétion (Sweeney, 1996; Raizman et al., 2007) ou les MAP extracellulaires produites par l'éclatement des macrophages a causé l'excrétion de MAP dans les matières fécales (Magombedze et al., 2014) ; cependant, aucune de ces théories n'a été prouvée. Il est remarquable que ces hypothèses lient une réponse immunitaire cellulaire à l'excrétion fécale ; donc, la compréhension de cette interaction de l'excrétion et de la réponse immunitaire cellulaire peut améliorer le diagnostic précoce de l'infection à MAP. En effet, l'excrétion a semblé se produire 'autour' du pic d'IFN- $\gamma$  ; dans l'étude par Mortier et autres (Rienske et al., 2014) 53% de veaux ont excrété au cours de la période d'observation. La majorité a commencé à excréter 1-3.25 mois avant le pic d'IFN- $\gamma$ , tandis que 25% des veaux ont commencé à excréter au même moment du pic d'IFN- $\gamma$  et 19% ont commencé à excréter peu de temps après ce pic d'IFN- $\gamma$ . Peut-être l'excrétion et la réponse immunitaire cellulaire sont plus étroitement liées dans la pathogénie de l'infection de MAP que l'excrétion était à la production des anticorps.



**Figure 2. Evolution des deux composantes de la réponse immunitaire et de l'excrétion.  
(Chastel, 2008b).**

Dans ce contexte, il est important de noter que l'étendue de l'influence directe de MAP sur les réactions immunitaires à médiation cellulaire, et l'équilibre entre la suppression de réponse immunitaire à médiation cellulaire par MAP et la protection contre MAP par la réponse immunitaire à médiation cellulaire dans tous les stades de l'infection n'est pas actuellement connue (Mortier et al., 2015).

**I.3.3.2 Dépistage précoce de l'infection de MAP :**

En examinant un troupeau pour la MJ, on lui conseille généralement d'examiner des bovins âgés de plus de 36 mois (Collins, 2011), en supposant que les veaux acquièrent l'infection de MAP à un jeune âge et passent par un stade de porteur et puis le stade subclinique pendant lesquels les tests diagnostique ont une faible sensibilité (Whitlock et Buergelt, 1996a; Nielsen et Toft, 2008). En conséquence, les jeunes ne sont pas typiquement inclus dans le dépistage de troupeau et l'élimination précoce ou les réactions immunitaires humorales peuvent être omis. L'analyse de libération d'IFN- $\gamma$  a été suggérée comme test diagnostique le plus prometteur pour le diagnostic précoce, car il a détecté la réponse immunitaire cellulaire initiale (Stabel, 1996). Inopinément, chez des veaux inoculés à 2 semaines, 3, 6, 9, ou 12 mois d'âge avec une faible ou forte dose de MAP, l'excrétion fécale a été détectée dans 61% des veaux inoculés au cours de la période de suivi et étaient le premier test à devenir positif à partir de 2 semaines après inoculation, suivi d'une réponse d'IFN- $\gamma$  qui fait un pic 4 mois après inoculation chez tous les veaux (Mortier et al., 2014c). Puisque le test de libération d'IFN- $\gamma$  indique seulement l'exposition à MAP, une fois utilisée à la ferme il ne peut pas distinguer les animaux infectés et exposés (Jungersen et al., 2011). Par conséquent, il est moins valable comme test de dépistage de troupeau. La réaction des anticorps a différé entre les veaux, avec moins de la moitié des veaux ont testés positif et certains ayant une réponse transitoire (Mortier et al., 2014a). Ces réponses transitoires pourraient avoir expliqué quelques résultats d'ELISA pendant le dépistage de troupeau classés comme "faux positifs" quand le même veau a ensuite donné un résultat négatif. En outre, ces réponses transitoires ont également indiqué qu'un test d'anticorps commercial était capable de détecter des anticorps de MAP (lorsqu'ils sont présents). Les titres d'anticorps ont semblé augmenter et diminuer avec le temps, peut-être en raison d'un équilibre de fluctuation dans le système

immunitaire (Stabel, 1996), augmentant ou supprimant une réaction immunitaire humorale. Des anticorps ont été détectés dans 42% des veaux inoculés jusqu'à 1 an (Mortier et al., 2014a), tandis que l'analyse de libération d'IFN- $\gamma$  a montré une réponse immunitaire cellulaire dans 100% de ces veaux (Mortier et al., 2014c), bien que l'excrétion fécale a été détecté dans 61% (Rienske et al., 2014). En particulier, l'excrétion fécale a fait un pic entre 1 et 6 mois après inoculation, comme le décrit (Mitchell et al., 2012) (Subharat et al., 2012). De façon générale, la probabilité de détecter un animal infecté par MAP dans les stades précoces de l'infection était la plus élevée dans les 6 mois après l'infection, avec la culture fécale étant le premier test à devenir positif. L'excrétion fécale dans le groupe des jeunes était également confirmé à la ferme, avec la proportion la plus élevée de veaux excréteurs avant 6 mois d'âge, en corrélation avec les observations expérimentales par Mortier et autres (2014b). Précédemment d'autres études sur le terrain ont identifié l'excrétion de MAP dans le groupe des jeunes dans des exploitations laitières infectées (Antognoli et al., 2007; Bolton et al., 2011). Après ce premier pic, un équilibre entre les composantes cellulaires et humorales a été établi et les diagnostics sont restés la plupart du temps négatifs, pour devenir probablement encore positifs dans les stades avancés de MJ (Whitlock et Buergelt, 1996a; Coussens, 2004). Malheureusement, les intervalles de suivi pendant les épreuves d'infection n'étaient pas typiquement assez longs pour indiquer si les bovins infectés ont en effet répondu positif avant et après une période de résultat négatif. Cependant, il s'est avéré que la combinaison des tests diagnostique pourrait être utile en examinant peu de temps après l'infection, comme le suggère (McDonald et al., 1999). Puisque les bovin < 36 mois typiquement ne sont pas inclus dans le dépistage de troupeau (Collins, 2011), la positivité du groupe des jeunes en général sur les diagnostics mentionnés pourrait avoir été négligé. Quoique le moment précis de l'infection soit inconnu sur le terrain, il devrait prendre en compte que non seulement les nouveau-nés mais également des veaux plus âgés (jusqu'à 1 an) sont sensibles à l'infection et peuvent donner un résultat positif peu de temps après l'infection. Bien que le test diagnostique précoce doive toujours d'être validé à la ferme, peut-être quand dépister un troupeau pour la MJ, l'examen du groupe des jeunes avec une combinaison d'ELISA et de culture fécale complèterait les bovins de > 36 mois d'âge.

### **I.3.3.3 Marqueurs précoces de l'infection de MAP :**

Le début relativement en retard de l'excrétion fécale et la production retardée des anticorps pendant le cours naturel de l'infection de MAP et la faible fiabilité du diagnostic de l'infection de

MAP dans les stades précoces après infection (Whitlock et Buergelt, 1996a), a mené à des efforts considérables pour identifier des biomarqueurs précoces de l'infection. De tels biomarqueurs candidats ont été identifiés dans divers modèles, s'étendant des modèles d'infection *in vitro* dans des macrophages dérivés des souris (Cha et al., 2013), de cerf commun (Dobson et al., 2013; Marfell et al., 2013) et de bovin (MacHugh et al., 2012), aux infections naturelles chez les moutons (Gillan et al., 2010; Plain et al., 2010; Smeed et al., 2010; Zhong et al., 2011) et les bovins (Skovgaard et al., 2006; Badi et al., 2010; You et al., 2012; Khalifeh et Stabel, 2013) Tibia et autres, 2015). Bien qu'il y ait peu de modèles d'infection expérimentale dans les bovins (Seth et al., 2009; Stabel et al., 2011; Purdie et al., 2012; Shin et al., 2015), ils fournissent une occasion de déterminer longitudinalement des biomarqueurs à des moments spécifiques après l'infection.

Des transcriptomique et protéomiques ont été employés pour étudier l'expression des gènes et des protéines afin d'identifier des biomarqueurs. De ces études dans des infections naturelles et expérimentales, on a proposé plusieurs biomarqueurs putatifs (Skovgaard et al., 2006; Seth et al., 2009; Zhong et al., 2011; You et al., 2012). En plus, des marqueurs de cellule immunitaire et des médiateurs immunitaires ont été profilés avec la cytométrie en flux et les diverses analyses immunologiques dans le cadre expérimental (Stabel et al., 2011) ou infection naturelle de MAP (Badi et al., 2010; Gillan et al., 2010; Khalifeh et Stabel, 2013). Plusieurs études ont été réalisées pour identifier des marqueurs indicatifs d'une infection de MAP dans l'essai d'infection expérimentale par Mortier et autres (2013). Des biomarqueurs ont été identifiés des profils différentiels d'expression du gène et des changements de la concentration sérique de petits métabolites. Une différence dans le sang périphérique dans des profils d'expression du gène a été notée entre les veaux inoculés et non inoculés dès 3 mois après infection, avec une réduction de l'apoptose et du passage des lymphocytes des veaux inoculés (David et al., 2014). Ces résultats étaient compatibles avec l'interférence précoce de MAP avec la réaction immunitaire et la présence des marqueurs d'une infection de MAP à cette étape de l'infection. Plus de biomarqueurs ont été également identifiés aux stades avancés de l'infection expérimentale (David et al., 2014). L'activation de la migration et mouvement des leucocytes et les lymphocytes, l'inhibition de la phagocytose et l'inhibition de la présentation des antigènes et de la phagocytose de macrophage se sont produits à 6 et 9 mois après inoculation. Une étude longitudinale a démontré que le niveau d'expression des gènes particuliers tels que le peptide bêta-défensine-9 des neutrophiles, CD46 ou le gène intracellulaire de la présentation des antigènes BOLA/MHC-1 ont été associés à l'infection par MAP (David et al., 2014). Une approche métabolomique était également réussie

dans la différenciation entre les veaux inoculés et non inoculés dans la même étude (De Buck et al., 2014). Des différences dans les concentrations d'acétone, de citrate, de glycérol et d'isobutyrate ont suggéré des manques d'énergie et ont augmenté le métabolisme des graisses dans les bovins infectés, tandis que les changements associés à l'infection de l'urée et de plusieurs acides aminés ont impliqué une augmentation de renouvellement des protéines. En outre, basé sur le profilage immunitaire, les cytokines immunorégulateurs IL-10, TGF- $\beta$  et le facteur de transcription Foxp3 sont régulés dès le 1 mois après inoculation. Plus tard, une forte réponse Th1 a été détectée avec une production robuste d'IFN- $\gamma$  commençant à 2 mois et durant jusqu'à 6 mois après inoculation, avec des réponses de cellules T plus prononcées chez les veaux à forte dose. De ces recherches sur les bovins infectés expérimentalement, on l'a conclu que les approches métabolomique, transcriptomique et des profils de cellules et médiateurs immunitaires a eu un grand potentiel d'identifier des biomarqueurs pour détecter l'infection de MAP. Cependant, ces candidats doivent maintenant être validés dans de grandes études sur le terrain pour déterminer leur mérite pour améliorer la détection de la maladie. L'influence de l'âge de l'hôte, le régime, les infections concourantes et la spécificité de ces marqueurs en comparaison avec d'autres infections gastro-intestinales ou chroniques doivent être déterminés. À cet égard, le suivi longitudinal doit identifier la stabilité et la régularité de ces marqueurs à la maladie indiquée.

### **I.3.4 Méthodes de diagnostic de la paratuberculose :**

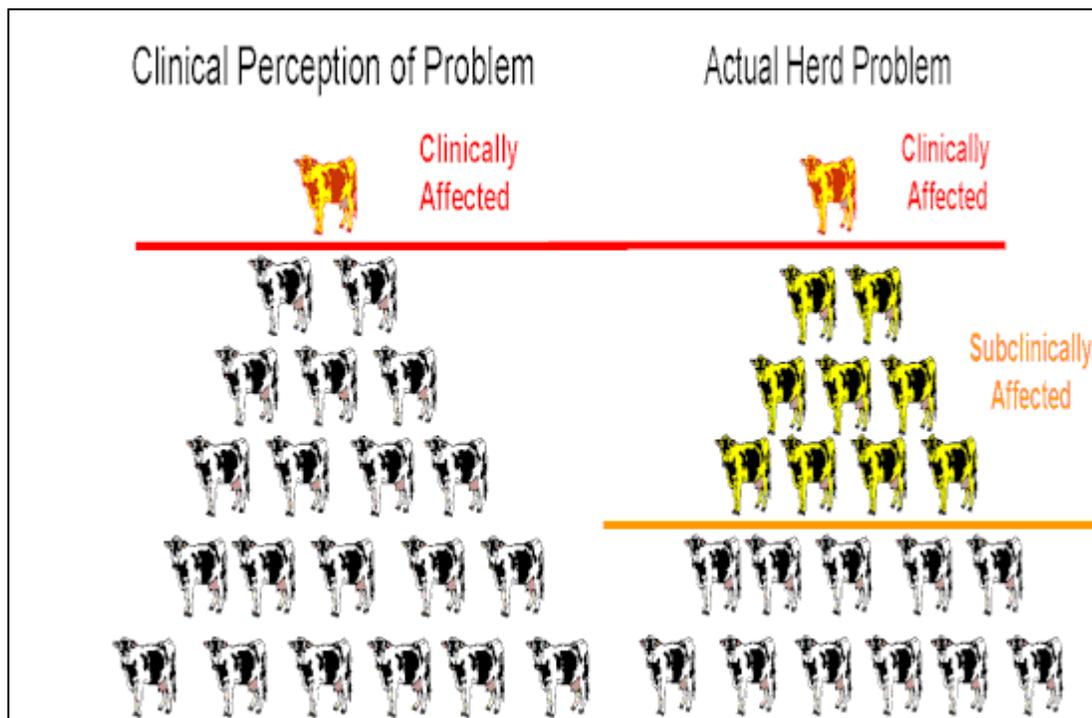
Le diagnostic de la paratuberculose est divisé en deux parties - le diagnostic de la maladie clinique et la détection de l'infection subclinique - et ce dernier est essentiel pour le contrôle de la maladie à l'échelle de la ferme, national ou international. Dans les bovins, les cas cliniques peuvent être diagnostiqués sans difficulté parce que la diarrhée chronique chez les animaux adultes est indicative de la maladie. Dans le laboratoire, un diagnostic peut être fait en isolant l'agent pathogène à partir des matières fécales ou d'un tissu après l'autopsie, par l'étude histologique des lésions, et des analyses d'amplification en chaîne par polymérase (ACP). En employant la méthode de coloration de Ziehl-Neelsen (ZN), des bactéries acido-alcoolo résistantes sont observées dans des frottis fécaux et dans les segments terminaux de l'intestin grêle, cependant, l'ELISA sur des échantillons de sérum a été référé en tant que supérieur à ZN pour confirmer le diagnostic présumé de la paratuberculose clinique dans les bovin (Weber et autres, 2009). Des cas subcliniques peuvent être diagnostiqués en isolant les bactéries des fèces,

des tests sérologiques, ou des tests d'allergie (Lilenbaum et al., 2007). Hendrick et autres (Hendrick et al., 2005) a constaté que l'ELISA sur des échantillons de sérum et de lait peuvent être des méthodes potentiellement utiles et pratiques en détectant le paratuberculose subclinique dans des cheptels laitiers d'allaitement, avec des sensibilités de 73.6% et de 61.1%, et des spécificités de 87.5% et de 94.7%, respectivement, a comparé à la culture fécale.

Un obstacle important dans la lutte contre cette maladie est la difficulté d'identifier les animaux infectés, particulièrement ceux au stade subclinique (Sigurdardottir et al., 1999; Olsen et al., 2002). Pour chaque vache avec une MJ avancée dans une ferme, on estime que 15-25 autres dans cette ferme sont infectés, avec moins de 30% de ces dernières détectables par les tests de diagnostic (Whitlock et Buergelt, 1996a). Comme récemment révisé, (Collins et al., 2006; Tiwari et al., 2006) plusieurs tests pour le diagnostic de l'infection à MAP existent, et ils peuvent être largement classifiés dans 2 catégories : ceux qui détectent les réactions immunitaires spécifiques humorales/à médiation cellulaire et ceux qui détectent l'agent bactérien. Les tests sérologiques pour la MJ incluent la méthode ELISA, l'épreuve d'immunodiffusion sur gel d'agar, et le test de fixation de complément. Ce sont les tests les plus couramment employés pour le diagnostic présumé de la MJ ; cependant, aucun de ces tests n'est particulièrement sensible en comparaison avec la culture fécale, particulièrement pour la détection des animaux subcliniques faibles excréteurs (Olsen et al., 2002; Tiwari et al., 2006). La culture fécale ou tissulaire pour la détection de l'organisme est considérés le « test de référence » pour le diagnostic de MAP, cependant, l'organisme est fastidieux et de croissance lente, et la culture bactériologique peut prendre aussi peu que 4-8 semaines ou jusqu'à 16 semaines, selon la méthode de culture (Motiwala et al., 2005). La détection de MAP peut être également accomplie par l'examen histologique en même temps que la coloration de ZN des tissus cibles, de l'immunohistochimie (IHC), et l'ACP. Ces tests sont beaucoup plus rapides que la culture et peuvent être facilement appliqués aux tissus fixés au formol et inclus dans la paraffine (FFIP), qui sont facilement disponibles aux pathologistes. Les sensibilités de ces tests varient considérablement, avec plusieurs rapports soutenant une meilleure performance de chacun de ces tests comparés aux autres et comparé à la culture tissulaire/ fécale (Shannon et al., 2008).

Le diagnostic des cas subcliniques de paratuberculose est toujours un problème (González et al., 2005). En raison des variations importantes dans la progression de la maladie et les réponses immunologiques à l'infection à MAP, une combinaison de deux méthodes ou plus a été suggérée. On rapporte que le test de stimulation de lymphocyte, une corrélation *in vitro* de

l'immunité à médiation cellulaire, est sensible pour la détection des stades précoces de l'infection paratuberculeuse dans les bovins (Naser et al., 2004; Buergelt et al., 2006) et le mouton.



**Figure 3. Evidence de la paratuberculose (subcliniques) dans un cheptel avec un cas clinique (partie émergée de l'iceberg).**

### **I.3.4.1 Méthodes directes :**

#### **I.3.4.1.1 Culture :**

La culture est le test de référence (Gold Standard) pour la détection d'agent pathogène chez les animaux vivants, qui est plus sensible que les sérodiagnostics indirects et pourrait permettre une détection plus précoce des bovins infectés (Slana et al., 2008). Les systèmes de culture liquides fournissent une détection plus rapide et plus sensible de MAP comparée aux cultures solides traditionnelles (Whittington, 2009) ; cependant, les coûts élevés d'automation et les risques radioactifs liés à ces systèmes ont poussés les chercheurs pour développer des cultures liquides modifiées peu coûteuses basées sur Middlebrook et d'une performance comparable (Pozzato et al., 2011; Whittington et al., 2013; Ahmad et al., 2015).

La culture fécale est le test le plus fiable pour la détection individuelle des animaux excréteurs un à deux ans avant l'apparition des symptômes. Cependant la détection de l'infection

pendant le stade préclinique est compliquée, car la bactérie ne se multiplie pas rapidement (elle est difficile à retrouver dans les fèces). Il s'agit du test le plus spécifique pour reconnaître la maladie dans un troupeau. En règle générale, on considère que ce test permet de repérer les animaux infectés une à trois années avant l'apparition des signes cliniques (diarrhée ou amaigrissement). Il convient donc de la répéter annuellement (voire tous les six mois) dans le cadre d'une surveillance des élevages infectés. Rechercher MAP dans l'environnement représente une méthode moins coûteuse et plus aisée à pratiquer à la ferme que les prélèvements individuels sur le cheptel (Berghaus et al., 2006). Si les résultats de cette recherche dans l'environnement sont comparés à ceux obtenus à partir de prélèvements chez les animaux, cette approche permet de détecter 38 élevages sur les 50 (soit 76 %) identifiés par culture fécale individuelle et 61 élevages sur les 80 (soit 76 %) identifiés par le test ELISA (Lombard et al., 2006). Ce type de recherche semble surtout intéressant pour détecter les fermes très infectées (Aly et al., 2009; Smith et al., 2011; Brugère-Picoux, 2012).

Une étape essentielle de la coproculture est la décontamination de l'inoculum dans lequel des mycètes, des bactéries accompagnants et d'autres composants contaminants sont éliminés avant l'incubation (Pavlik et al., 2000).

Dans l'étude de Huda et Jensen, la sensibilité mesurée pour la culture à partir d'échantillons tissulaires chez des bovins en phase clinique est de 100% (Huda et Jensen, 2003a). Néanmoins, l'étude n'incluant que 16 bovins, dont six seulement atteints de paratuberculose, les résultats doivent être considérés avec précaution.

Cette méthode apparaîtrait néanmoins plus sensible qu'une coproculture standard, et plus sensible également que l'histopathologie.

*M. a. paratuberculosis* appartient au groupe des mycobactéries à croissance lente, incolores ou non chromogènes. *M. a. paratuberculosis* se distingue des autres souches de son groupe par sa dépendance à l'égard du facteur de croissance constitué par la mycobactine. Cette dernière est un composé liposoluble contenu dans la paroi bactérienne favorisant le transfert actif du fer. Elle est produite par la plupart des mycobactéries, mais MAP ne la produit pas ou pas assez *in vitro*. Ainsi cette dépendance en mycobactine a longtemps été considérée comme un critère d'identification de MAP en culture.

Cependant ce critère n'est pas absolu puisque ce même caractère a pu également être observé au sein du groupe avium. La croissance de MAP est longue et difficile : il faut

environ 8 à 12 semaines, voire 16 semaines avant de pouvoir observer de petites colonies fermes et souvent blanches. Cette lenteur de développement rend la culture de MAP sensible aux agents contaminants opportunistes dont la croissance est beaucoup plus rapide. L'ajout de décontaminants (chlorure de benzalconium ou d'hexadécyl-piridinium) est donc indispensable. Ainsi *M. paratuberculosis* est cultivée sur un milieu d'Herrold, complété en mycobactine et décontaminants (le jaune d'œuf contenu dans ce milieu permettant de neutraliser le pouvoir bactéricide des décontaminants) (Grange, 1988).

Les cultures positives sont le plus souvent confirmées par une coloration de Ziehl-Neelsen et/ou par PCR. La quantification (donnée semi-quantitative) de l'excrétion fécale est également réalisée dans certains laboratoires. Elle permet habituellement de définir des niveaux d'excrétion (faible, moyenne, et forte excrétion fécale).

Cette information permet d'évaluer le risque de transmission par la voie fécale, et par les autres voies (lait, colostrum et placenta).

#### **I.3.4.1.2 PCR (Amplification en Chaîne par Polymérase)**

La technique de PCR (Polymerase Chain Reaction), avec pour cibles des séquences d'insertion (IS900, F57...) assure une détection du bacille paratuberculeux en 48 heures. Bien que plus coûteuse, elle permet de reconnaître les souches réfractaires à la mise en culture (souches ovines) et d'obtenir une réponse plus rapide pour l'identification des germes dans les fèces, le lait, le sang ou d'autres tissus. L'intermittence de l'excrétion fécale impose une limite à l'emploi des techniques de PCR, comme d'ailleurs à celle de la culture bactériologique. Une seconde limite est liée à la grande hétérogénéité matricielle du prélèvement, les bacilles étant regroupés en amas dans les fèces. Enfin, à la différence de la culture, les techniques de PCR peuvent détecter des bactéries non viables. Qu'elles soient quantitatives ou qualitatives, leur sensibilité est plus élevée que celle de la culture (Verlaine et al., 2011) et deux améliorations ont permis d'augmenter la sensibilité de ces techniques :

- On applique la technique de PCR après un processus d'enrichissement spécifique du prélèvement. Ce test permet de détecter 6,7 fois plus d'animaux porteurs de MAP et se révèle cinq fois plus sensible que la technique ELISA. Ainsi, on peut détecter plus précocement les animaux infectés excréteurs (à partir de l'âge de 16 mois) et utiliser des mélanges de fèces mais sa sensibilité permet aussi de détecter MAP en simple transit alimentaire (faux positifs) ;

- Un nouveau procédé d'extraction, combiné à un nouveau test PCR, en utilisant six g de fèces au lieu d'un gramme, est plus sensible que le test classique. Lors de deux essais réalisés en double sur 94 prélèvements, le test classique a décelé 30 à 32 prélèvements positifs et le test amélioré, 47 à 49 prélèvements, soit 20 bovins positifs de plus. Parmi ces 20 bovins, 12 sont séropositifs et un, douteux. L'un est de statut sérologique indéterminé et six sont séronégatifs : ces sept derniers animaux faisaient partie d'un cheptel où au moins un bovin avait été détecté positif par PCR, lors des deux mois de l'essai. L'augmentation de la sensibilité de ces tests a pour conséquence une augmentation des animaux positifs et la conséquence en est un plus grand nombre de cheptels à assainir. Elle peut aussi remettre en cause les programmes de qualifications Acersa vis-à-vis de la paratuberculose en fonction des tests utilisés. La technique de PCR peut être aussi utilisée pour la mise en évidence de MAP dans le lait et une étude récente témoigne de l'intérêt de la technique de PCR niché permettant une détection précoce de MAP dans le liquide lymphatique dans la mamelle: sur 51 prélèvements, MAP était présent chez 66,7% des vaches atteintes de paratuberculose clinique, chez 42,8% des vaches asymptomatiques testées positives ou douteuses par le test sérologique ELISA et 38,7% des vaches ELISA négatives (Khol et al., 2012; Brugère-Picoux, 2012).

#### **I.3.4.1.3 Coloration de Ziehl-Neelsen :**

La coloration de Ziehl-Neelsen est une méthode bactérioscopie utilisée dans les laboratoires. Cette technique repose sur la résistance à la décoloration par l'acide et l'alcool des germes mycobactériens après coloration à la fuschine. Cette technique peut être faite soit à partir de matières fécales soit à partir des tissus FFIP (valvule iléocæcale ou nœuds lymphatiques). Le résultat obtenu est uniquement qualitatif. La limite de détection du germe dans un prélèvement est de  $10^6$  germes/g. Les germes sont répartis en amas (Sanchez, 1998).

Bien que le test est rapide, très simple et peu coûteux ; il présente un manque de sensibilité avec un taux de faux négatifs jusqu'à 75%. La sensibilité dépend du prélèvement avec une concentration de germes diminuée en cas de diarrhée profuse, et donc le taux de faux négatifs augmente. De plus les excréteurs asymptomatiques ont un taux d'excrétion inférieur à la limite de détection et ne sont donc pas détectés. La sensibilité du test est meilleure lorsqu'il est pratiqué sur un animal aux stades cliniques, puisque le taux d'excrétion est bien supérieur (Coetsier et al., 1998). Le test manque également de spécificité car il ne peut pas distinguer entre les différents types de mycobactéries présents dans le prélèvement (Coetsier et al., 1998).

Aussi bien, la technique de ZN démontre des BAAR intracytoplasmiques dans les macrophages ou des CGMN et colore seulement des bactéries avec une paroi cellulaire intacte ; donc, l'absence des bactéries acido-résistantes peut être en raison de la dégradation des bactéries, de la rareté des bactéries dans les lésions, ou de la présence des formes déficientes en paroi cellulaire de MAP (Shannon et al., 2008; Goepfert et al., 2014).

Un diagnostic histopathologique de confirmation de l'infection avec MAP a exigé la démonstration de deux BAAR ou plus compatibles avec MAP dans des amas des cellules inflammatoires granulomateuses. L'absence de BAAR dans les lésions inflammatoires granulomateuses a été confirmée par inspection d'au moins une section additionnelle colorée par ZN par tissu (Huda et Jensen, 2003a).

Le degré de positivité par les méthodes de ZN et d'IHC a été classé par catégorie comme suit : (0) négatifs ; 1-3 points de positivité isolés (BAAR par coloration de ZN ou granules brunâtres par la méthode d'IHC) observés dans la section ; (+) léger positif ; (++) modérément positif ; (+++) hautement positif (Kheirandish et al., 2009).

Dans une étude menée chez des veaux, le nombre de bacilles acido-résistants a été classé en – (aucun BAAR), + (1-5 BAAR/champs de 10 400x), ++ (6-50 BAAR/champs de 10 400x), et +++ (>50 BAAR/champs de 10 400x) (Goepfert et al., 2014).

#### **I.3.4.2 Méthodes indirectes :**

Les difficultés rencontrées pour chacune d'entre elles sont nombreuses. On observe une modification des réponses immunologiques au cours de l'évolution de la maladie : immunité de type cellulaire au début, évoluant vers un stade d'anergie en fin d'évolution et apparition progressive d'une immunité de type humoral. Par ailleurs, l'infection ne donne pas toujours la maladie. La réaction immunologique à médiation humorale n'étant pas protectrice, elle peut, selon la sensibilité des méthodes employées, précéder ou confirmer la maladie clinique.

Un diagnostic réussi de la paratuberculose dépend de l'utilisation de la mesure appropriée de réaction immunitaire au moment opportun pour détecter l'infection (Colgrove et al., 1989). Les sérodiagnostics offrent une détection rapide d'anticorps de MAP dans des cas cliniques ; cependant, ces tests ont divers niveaux de sensibilité et de spécificité, en particulier dans l'infection subclinique (Sweeney, 1996; Boelaert et al., 2000). La technologie de la méthode ELISA basée sur l'absorption de sérum avec *Mycobacterium phlei* pour augmenter la spécificité

du test est employée couramment dans les bovins en raison de son faible coût et les résultats rapidement disponibles (Collins et Sockett, 1993; Dehkordi et al., 2009).

#### **I.3.4.2.1 Méthode immuno-enzymatique (ELISA) :**

La plus utilisée, s'est révélée la technique la plus sensible mais sa sensibilité dépend du stade de la maladie (Nielsen et Toft, 2008). Ce test doit être réservé aux vaches adultes. Sa sensibilité pour détecter les animaux infectés est faible (5 à 30%) mais elle augmente avec l'âge. On ne peut pas détecter des animaux récemment infectés quand la maladie commence à s'installer dans l'élevage. La spécificité du test est généralement supérieure à 95% (Nielsen, 2010).

Il existe plusieurs tests ELISA sur le marché. Dans le cas des élevages caprins, il importe d'éviter les réactions croisées avec *Corynebacterium pseudotuberculosis*, agent de la lymphadénite caséuse (Brugère-Picoux, 2012).

Les anticorps n'étant détectés au plus tôt que 10 à 17 mois après l'infection, il n'est pas conseillé de réaliser cette analyse sur des animaux ayant moins de 15 à 18 mois (utilisée à partir de 24 mois en pratique). En fonction du test ELISA utilisé, divers antigènes de MAP sont fixés sur les parois du puits d'une microplaque en polystyrène.

Possédant une sensibilité et une spécificité supérieures aux deux autres techniques sérologiques disponibles (test de Fixation du Complément et test d'Immunodiffusion en gélose), la sérologie ELISA les a peu à peu supplantées.

L'un des principaux inconvénients de cette méthode est lié à l'apparition tardive de la réponse anticorps ; elle ne permet donc pas le dépistage précoce des animaux infectés. En contrepartie, cette technique a comme avantage d'être disponible dans de nombreux laboratoires d'analyse, de permettre l'obtention de résultats dans des délais faibles, et un coût d'analyse modéré.

En conséquence de l'absence de données sur les caractéristiques des tests chez les ovins (et les caprins), les données obtenues dans l'espèce bovine sont généralement extrapolées aux deux autres espèces, en attendant une évaluation ultérieure. Devant la multiplicité des tests

sérologiques ELISA disponibles sur le marché, en fonction des pays, certains auteurs ont cherché à comparer les caractéristiques et les qualités de chacun d'entre eux (Chastel, 2008b).

La méthode d'ELISA absorbée (Ab-ELISA) qui est considérée sensible et spécifique pour les cas cliniques dans les bovins a été moins intensivement évaluée dans la paratuberculose ovine (Kurade et al., 2004).

### **I.3.4.2.2 Diagnostic Anatomopathologique :**

#### **I.3.4.2.2.1 Lésions macroscopiques :**

Les lésions pathologiques macroscopiques généralement décrites dans les bovins incluent un épaissement de la muqueuse (corrugation), principalement dans l'intestin grêle distal ; des vaisseaux lymphatiques mésentériques et de la séreuse dilatés ; et hypertrophie des ganglions lymphatiques mésentériques. D'autres lésions moins fréquentes incluent l'alopécie, et une calcification endocardique et aortique (Clarke, 1997; Shannon et al., 2008).

Dans une étude de la prévalence de la paratuberculose ovine effectuée dans les abattoirs du sud d'Inde, VinodhKumar et ses collègues ont observé des lésions associées à la paratuberculose dans l'intestin et les ganglions lymphatiques. Les lésions macroscopiques consistaient d'un épaissement et plissements (corrugation) de la muqueuse intestinale, des vaisseaux lymphatiques en corde et une lymphadénopathie ; amaigrissement et œdème de carcasse, ascite et hydropéricarde ; œdème intermandibulaires et atrophie et stéatonecrose (Obli Rajendran et al., 2012).

Une réserve doit être émise quant à la valeur des observations macroscopiques, puisqu'elles n'apparaissent que très tardivement dans l'évolution clinique de la paratuberculose, mais surtout que l'intensité des symptômes n'est pas bien corrélée avec les lésions qui sont observées lors de l'autopsie (Chastel, 2008b).

#### **I.3.4.2.2.2 Lésions microscopiques :**

Les lésions caractéristiques de la paratuberculose sont des infiltrats granulomateux dans l'intestin et les ganglions lymphatiques régionaux (Clarke, 1997). Les différences dans leur extension et destruction des tissus associée, composition des cellules épithélioïdes, cellules

géantes multinucléées (CGMN) et des lymphocytes de même que le nombre de mycobactéries présentes ont été rapportés dans des animaux infectés naturellement et expérimentalement basé sur les coupes de paraffine colorées par la technique d'hématoxyline et éosine (HE) - (Clarke et Little, 1996; Corpa et al., 2000; Kurade et al., 2004; Lybeck et al., 2013). Des lésions circonscrites de cellules épithélioïdes avec peu de MAP entourée par des lymphocytes se sont appelées tuberculoïde, des infiltrats diffus de cellules épithélioïdes avec beaucoup de MAP en tant que lépromateuse (Clarke et Little, 1996; Pérez et al., 1996; Clarke, 1997; Krüger et al., 2015).

Les lésions macroscopiques et histologiques de la paratuberculose restent fondamentalement confinées à l'intestin, aux ganglions lymphatiques mésentériques et iléocæcaux (Schaaf et Beerwerth, 1960). Bien que MAP ait été cultivé d'une série d'autres organes, les lésions microscopiques ont été trouvées seulement dans le foie. Les lésions de la paratuberculose dans le tube intestinal et les ganglions lymphatiques associés ont été classées utilisant comme modèle l'échelle morphologique de la lèpre proposée par Ridéey et Jopling (RIDÉEY et Jopling, 1966).

Les lésions histologiques compatibles avec ceux de la paratuberculose ont été évaluées comme légères, modérées et marquées. Chez les vaches avec des lésions légères (Classe I), des cellules géantes de Langhans individuel ont été détectées habituellement dans le chorion des villosités intestinales, ou dispersées dans la zone paracorticale des ganglions mésentériques. Il était difficile d'identifier des macrophages épithélioïdes spécifiques.

Les vaches avec les lésions histologiques modérées (Classe 2) ont présenté plusieurs petits amas de macrophages ou plusieurs cellules géantes de Langhans isolées ou tous les deux dans le chorion des villosités intestinales, dans la sous-muqueuse intestinale, dans le sinus sous-capsulaire, ou dans la zone paracorticale des ganglions mésentériques régionaux. De petits agrégats de macrophages peuvent être observés dans le foie.

Plusieurs macrophages et cellules géante infiltrent le chorion de la sous-muqueuse de divers segments de l'intestin grêle chez les vaches avec des lésions avancées (Classe 3). Ces macrophages et cellules géantes se trouvent également dans le stroma de la tunique musculuse et dans la séreuse. Ils remplissent les vaisseaux lymphatiques de la sous-muqueuse, sous-séreuse et mésentérique et ont partiellement fermés la lumière. Un nombre considérable de macrophages, cellules géantes et lymphocytes peuvent entourer ces vaisseaux lymphatiques.

Les villosités intestinales sont courtes et tordues. Les cryptes sont dilatées et remplies de neutrophiles et de substances mucoïde. Les vaisseaux chylifères des villosités sont gonflés en raison de la dilatation et certains peuvent contenir quelques cellules inflammatoires. Quelques vaisseaux chylifères rompus et fistulés dans la lumière intestinale ont été observés. Les plaques de Peyer sont entourées par des cellules inflammatoires, mais habituellement ne sont pas infiltrées par ces cellules. La sous-muqueuse est élargie soit par l'infiltration des cellules inflammatoires ou transsudat. Quelquefois, les cellules ganglionnaires myentériques du plexus de Meissner sont entourées ou infiltrées par quelques leucocytes.

Histologiquement, les réponses inflammatoires granulomateuses dans les tissus intestinaux et mésentériques associés étaient de légères à avancées. Les réponses inflammatoires ne se sont pas propagées au-delà de la valvule iléocœcale dans la plupart des bovins. Des segments du gros intestin ont été infiltrés seulement dans quelques vaches. Ceci peut être important en essayant de diagnostiquer la paratuberculose à l'aide d'un raclage rectal ou biopsie rectale. Les possibilités de confirmer un diagnostic clinique de la maladie de Johne avec cette méthode sont considérées très faibles.

Beaucoup de bovins ont montré des macrophages qui ont variés dans la taille et la forme ou qui sont uniformes et différenciées qui ressemblent les cellules épithéliales. L'index bactérien pour les deux types de cellules était être approximativement le même. Quelques bovins ont montré des macrophages histiocytaires prolongés, disposés dans des faisceaux ou des spirales qui ont eu un nombre comparativement plus élevé de bacilles acido-résistants.

Dans une étude d'infection menée chez des veaux de boucherie, les lésions microscopiques ont été évaluées en tant que non affectés (-), léger (+), modérément (++), ou sévèrement (+++) affectés comme précédemment décrit. Le nombre de bacilles acido-résistants a été classé en - (aucun BAAR), + (1-5 BAAR/champs de 10 400x), ++ (6-50 BAAR/champs de 10 400x), et +++ (>50 BAAR/champs de 10 400x) (Goepfert et al., 2014).

Dans une autre étude d'infection expérimentale de chèvres menée par Valhein et ses co-rechercheurs, le nombre de lésions a été classifié comme : À, - aucunes lésions ; +, peu de lésions ; ++, un nombre modéré de lésions ; +++, beaucoup discrets aux lésions confluentes. Les lésions histopathologiques, ont montré une similitude considérable dans les différents segments intestinaux, qui ont consisté principalement en des infiltrats de cellules inflammatoires nodulaire ou diffus non encapsulés. Les infiltrats ont été dominés par de grands macrophages avec des

noyaux ovales ou allongés et un cytoplasme abondant légèrement coloré sans membranes cellulaires distinctes, et des agrégats de lymphocytes. On a également observé des CGMN dispersées (Valheim et al., 2002).

#### **I.3.4.2.3 Immunohistochimie (IHC) :**

La détection de MAP peut être encore effectuée par l'IHC de même que l'examen histologique, la coloration de ZN et l'ACP. L'IHC est plus rapide que la culture et peut être aisément appliquée aux tissus FFIP (Shannon et al., 2008).

L'occurrence de la maladie était élevée utilisant l'histopathologie et IHC, cependant, une faible occurrence a été détectée utilisant ZN et l'ELISA (Hailat et al., 2012). De tels résultats probablement contradictoires sont dû en grande partie du fait que la méthode de ZN détecte seulement les organismes intacts, tandis que les techniques d'immunohistochimie identifient en outre les antigènes mycobactériens libres, les fragments de cellules, et les microorganismes changés avec des parois cellulaires altérées (Coetsier et al., 1998). L'avantage principal de l'IHC est la visualisation simultanée de l'antigène et des changements pathologiques. La technique est également appropriée pour l'identification des agents à culture difficile ou des agents qui ont besoin d'une longue durée d'incubation pour l'identification. L'IHC a été décrite pour l'identification de MAP in situ dans des échantillons de tissus de chèvres et de bovins inclus dans la paraffine (Thoresen et al., 1994). Dans les cas de changements post mortem, les coupes histologiques peuvent contenir des bactéries mortes, qui peuvent plus être cultivées mais sont facilement détectées au moyen d'IHC. Bien que plus laborieuse et longue, l'IHC soit un supplément valable dans le diagnostic d'une maladie insidieuse et chronique telle que la paratuberculose.

On l'a constaté que l'examen histopathologique et la technique d'IHC ont fourni une preuve d'infection dans plus de chèvres qu'a fait la culture bactériologique (Thoresen et al., 1994; Sigurdardottir et al., 1999). Dans les bovins, l'IHC a été montrée pour donner des résultats aussi bien identiques que la culture tissulaire pour le diagnostic de la MJ (Huda et Jensen, 2003b). Quant à la coloration de ZN, la basse sensibilité d'IHC relativement à culture peut être en raison de la nature multifocale des lésions et parce que la même section du tissu ne peut pas être employée pour la culture et la microscopie. Une autre cause potentielle des résultats faussement négatifs en utilisant l'IHC est l'altération antigénique en raison de la fixation avec le formol (Ramos-Vara, 2005). Idéalement, les tissus à employer dans l'IHC devraient être traités après un

maximum de 24 heures de fixation dans le formol (Plante et al., 1996). D'autres potentiels problèmes additionnels produits en utilisant l'IHC incluent un rapport signal/bruit réduit en raison de la présence de macrophages chargés de mélanine et d'hémosidérine dans le ganglion lymphatique et les plaques de Peyer, (Ramos-Vara, 2005) et en raison de la présence des macrophages de « débris », qui sont fréquemment décrites dans ces tissus (Buergelt et Ginn, 2000; González et al., 2005).

Le degré de positivité par les méthodes de ZN et d'IHC a été classé par catégorie comme suit : (0) négatifs ; 1-3 points de positivité isolés (BAAR par coloration de ZN ou granules brunâtres par la méthode d'IHC) observés dans la section ; (+) léger positif ; (++) modérément positif ; (+++) hautement positif (Kheirandish et al., 2009).

### **I.3.5 Profils diagnostiques dans les bovins cliniques contre subcliniques :**

Les infections expérimentales mènent occasionnellement aux signes cliniques chez les moutons, les chèvres et les cerfs, bien qu'elles aient été rarement rapportées dans les bovins ; révisé et récapitulé dans (Murray et al., 2007; Douglas et Richard, 2008; Peter et Richard, 2010). Récemment, 2 bœufs de 16 mois d'âge inoculés ont développé les signes cliniques de la MJ particulièrement tôt après l'inoculation avec une forte dose de MAP (Mortier et al., 2015). Quoique les signes cliniques sont inattendus à cet âge, la diarrhée due à MJ pourrait être sous-déclarée dans le groupe des jeunes, parce que d'autres diagnostics différentiels (par exemple parasites) sont suspectés avant que la MJ soit considérée (Mortier et al., 2014a). Les profils diagnostiques ont clairement différé entre les veaux cliniques et asymptomatiques inoculés à 2 semaines d'âge avec une forte dose de MAP : les veaux cliniques étaient constamment positifs par ELISA et culture fécale longtemps avant l'apparition des signes cliniques, tandis que les veaux asymptomatiques ont eu un mode d'excrétion intermittent et des profils variables d'ELISA (Mortier et al., 2015). Dans les bovins naturellement infectés, la positivité du sérum par ELISA était souvent négative lorsque elle est mesurée seulement une fois (Weber et al., 2009). Pour cette raison, il est suggéré pour progresser vers des essais plus fréquents des vaches par ELISA dans un scénario de suivi longitudinal (Eisenberg et al., 2015). La contradiction de différents résultats diagnostiques est remarquable dans le cas des bovins cliniquement malades. Chez les moutons expérimentalement infectés, le début précoce de la maladie clinique a été souvent précédé par une réaction d'IFN- $\gamma$  et réaction des anticorps supérieures à la moyenne (Begg et al., 2005). Dans une autre étude, la combinaison d'une excrétion fécale précoce élevée et une réaction d'IFN-  $\gamma$

inférieur à la moyenne ont prévu une infection de progression rapide chez les moutons (de Silva et al., 2013), avec la réaction des anticorps devenant positive seulement quand les moutons avaient des signes cliniques (de Silva et autres, 2013). Après l'infection expérimentale, les moutons constamment excréteurs ont développé la maladie clinique en l'absence d'une réaction des anticorps (Stewart et al., 2004), similaires aux moutons naturellement infectés (Hope et al., 2000; Whittington et Sergeant, 2001).

### **I.3.6 Concordance des tests diagnostiques :**

La concordance des tests diagnostiques parmi tous les tests diagnostique disponibles (analyse de libération d'IFN-  $\gamma$ , ELISA anticorps, culture fécale, PCR fécal, lésions macroscopiques, culture tissulaire et histopathologie) dans un échantillon de population est sous-évaluée pour la paratuberculose. Il est, cependant, important de savoir comment les tests diagnostique sont reliés les uns aux autres pour maximiser leur applicabilité. Généralement de multiples tests basés sur le même principe d'essai ont été comparés, comme la comparaison de multiples ELISAs (Collins et al., 2005; McKenna et al., 2005) (Fry et al., 2008; Costanzo et al., 2012; Khol et al., 2012) ou culture fécale contre PCR directe sur des fèces (Fang et al., 2002; Soumya et al., 2009; Logar et al., 2012). La justification est qu'on s'attend à ce que les tests diagnostique soient positifs à divers intervalles après l'infection de MAP. Cependant, généralement la sensibilité de l'ELISA aussi bien que la culture fécale a augmenté avec la progression de la maladie (Nielsen et Toft, 2008). Néanmoins, la détection des anticorps n'a pas semblé être un bon indicateur du statut bactériologique (excrétion/culture tissulaire positive) et la concordance entre l'ELISA, la culture fécale et le PCR direct était basse (McNab et al., 1991; Huda et Jensen, 2003b; Pinedo et al., 2008). Cette faible concordance de test a été attribuée à la pathogénie, parce que l'excrétion fécale et la production d'anticorps ne se sont pas nécessairement produites simultanément. Par conséquent, il reste impératif de déterminer le début de la positivité de ces diagnostics pour optimiser la détection des bovins infectés.

Malheureusement, il y a couramment aucun test de référence parfait pour détecter l'infection de MAP. On lui a suggéré que l'échantillonnage de plusieurs tissus augmente le taux de détection des veaux infectés, particulièrement une fois combiné avec l'histopathologie (Whitlock et Buergelt, 1996a). Les résultats histopathologiques et la culture tissulaire peuvent avoir une concordance élevée (80%), quoique les valeurs de kappa étaient basses (<0.2), indiquant seulement un léger accord entre les lésions macroscopiques et histologiques et la culture de MAP

à partir des tissus (Mortier et al., 2014b). Dans l'expérience de provocation par Mortier et autres (Mortier et al., 2014b), une faible proportion de sites de tissus étaient positifs à la culture ; donc, plusieurs tissus étaient nécessaires pour identifier un veau infecté. Naturellement, un effet de chance doit être tenu compte, car les échantillons représentent une partie limitée d'un grand organe avec une distribution non uniforme de lésions. En plus, seulement 56% des veaux inoculés par MAP étaient positifs après culture tissulaire. Par conséquent, la culture tissulaire était moins sensible autre que généralement reconnue (McKenna et al., 2005), quoiqu'elle était compatible avec quelques études (McDonald et al., 1999). Un test positif de libération d'IFN- $\gamma$  peut seulement indiquer l'exposition à MAP (Jungersen et al., 2011; Mortier et al., 2014b), puisque seulement approximativement 70% de veaux avec une réponse positive d'IFN- $\gamma$  ont eu des lésions nécropsique ou des cultures tissulaires positives. Réciproquement, les veaux avec  $\geq 1$  échantillon positif par ELISA n'ont pas eu une chance plus élevée ou inférieure que les veaux négatifs par ELISA d'être positifs pour les lésions macroscopiques, histologiques ou par culture tissulaire (Mortier et al., 2014a). La distribution des catégories de culture tissulaire et des grades des lésions macroscopiques n'était pas différente entre les veaux excréteurs et non-excréteurs. Cependant, fréquemment les veaux excréteurs ont eu des lésions macroscopiques et histologiques plus sévères, et plus de sites tissulaires positifs à la culture (Rienske et al., 2014). Il y avait une bonne concordance globale (84%) entre la sérologie et les résultats de culture fécale pour chaque échantillon testé des veaux inoculés à 2 semaines 3, 6, 9, ou 12 mois d'âge avec soit une faible ou forte dose de MAP (Mortier et al., 2014a; Mortier et al., 2014b). Cependant, la proportion d'accord positif entre la culture fécale et l'ELISA était 36% et la proportion d'accord négatif était 91%, signifiant que l'accord global entre ces deux tests a été principalement provoqué par un accord des résultats négatifs du test. C'était également dû à une spécificité relativement élevée d'ELISA et de la culture fécale contrairement à une faible sensibilité des deux tests. Une valeur de kappa de 0.27 a indiqué un accord équitable entre la sérologie et la culture fécale, mais il était remarquable que cet accord ait été très probable une surestimation, encore en raison de l'accord négatif de 91%.

## **II. MATÉRIELS ET MÉTHODES**

## II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

### II.1 Animaux et prélèvements

Au cours d'une période d'un an, 400 fragments d'intestin de bovins apparemment sains qui ont été abattus dans les abattoirs de Tiaret (300), et de Sougueur (100) en Algérie (35° 23 ' 0 " N, 1° 20 ' 0 " E) ont été examinés. La province de Tiaret est divisée en 14 daïras avec Sougueur étant la plus importante après Tiaret (chef-lieu de wilaya). L'âge des animaux s'est étendu de 18 mois à 9 ans. Des échantillons ont été collectés de l'iléum et de la valvule iléocæcale de tous les animaux en se référant tout particulièrement aux segments épais.



**Figure 4. Image satellite de la zone d'étude (Tiaret).**

Les lieux de collecte des échantillons ont été choisis selon la distribution des bovins dans la région de Tiaret. Des races locales et mixtes de bovins ont été représentées. Un total de 400 échantillons d'intestin ont été examinés et n'importe quel épaissement de la muqueuse a été rapporté dans la fiche de l'examen macroscopique. Tous les animaux proviennent de zones avec aucune recherche étant menée au sujet de la MJ et aucun programme préexistant pour observer, contenir et régler la maladie.

L'examen macroscopique de 400 échantillons d'intestins a été réalisé pour avoir un aperçu de toutes les parties de l'intestin grêle et les échantillons ont été ouverts utilisant des ciseaux pour l'observation de n'importe quelle lésion de la muqueuse. Selon l'aspect macroscopique de l'intestin grêle, le gros intestin a été soumis à un examen macroscopique. Des échantillons ont été rassemblés de l'iléum, de la valvule iléocœcale et les ganglions lymphatiques correspondants. Les échantillons ont été traités par lavage à l'eau distillée puis découpés en fragments de petite taille (épaisseur de 4mm-1cm), fixés dans le formol tamponné 10% pendant 24 heures, et soumis à un examen histopathologique habituel et une coloration immunohistochimique spéciale et de Ziehl-Neelsen.

## **II.2 Examen histopathologique**

Tous les échantillons découpés ont été traités pour l'examen histopathologique habituel après coloration à l'Hématoxyline-Eosine (H&E). La coloration de Ziehl-Neelsen pour les bactéries acido-résistantes a été réalisée directement sur 160 sections choisies de tissu.

### **II.2.1 Protocole histopathologique :**

Les spécimens ont été lavés à l'eau du robinet pour éliminer l'excès d'acide picrique, puis une déshydratation des tissus a été obtenue par passage dans une série de bains d'alcool (éthanol) aux gradients ascendants : 70°, 96° et 100° avec une durée de 7 h, 17 h et 4 h respectivement. Les échantillons ont été ensuite clarifiés par passage dans deux bains de chloroforme (1<sup>er</sup> bain : 50% chloroforme + 50% alcool pendant 4 h, 2<sup>ème</sup> bain : chloroforme pur pendant 4 h). Cette clarification consiste en un remplacement du déshydratant par une substance miscible avec la paraffine ce qui rend les échantillons plus transparents.

Les spécimens ont été mis dans des cassettes pour être imprégnés à chaud par une paraffine de routine (dont le point de fusion est de l'ordre de 54 à 56 °C), ensuite, la paraffine a été coulée au quart dans des moules en acier inoxydable chauffés à 60 °C et les fragments de tissus y ont été déposés. Après solidification de la paraffine, les blocs formés ont été congelés à -20 °C pour être réduits en coupe microscopiques d'épaisseur de 5 µm grâce à un microtome. Les coupes ont été ensuite étalées dans un bain marie d'histologie (à 50 °C) puis collées sur des lames grâce à l'albumine et séchées à 60 °C pendant 1 h pour éliminer la paraffine, puis on a procédé à la coloration par les étapes suivantes :

- Déparaffinage par passage dans deux bains de xylène de 15 minutes chacun ;
- Réhydratation par passage dans deux bains d'alcool absolu de 5 minute chacun puis dans un bain d'alcool à 70% pendant 5 minutes ;
- Coloration avec l'hématoxyline pendant 25 minutes ;
- Rinçage dans l'eau du robinet pendant 15 minutes ;
- Réduction de la coloration (du cytoplasme) par trempage rapide (1-2 secondes) dans l'acide chlorhydrique à 1% ;
- Lavage rapide à l'eau pour éliminer l'excès d'acide ;
- Coloration à l'éosine pendant 15 minutes ;
- Lavage à l'eau pour éliminer l'excès de colorant ;
- Déshydratation dans l'alcool à 70° pendant 10 minutes puis dans l'alcool absolu pendant 3 minutes ;

- Séchage des lames dans du papier buvard ;
- Clarification dans le xylène pendant 15 minutes ;
- Montage des lamelles à l'aide du baume de Canada en prenant soin de dégager les bulles d'air ;
- Séchage des lames à 60 °C pendant une nuit.

## **II.2.2 Critères d'évaluation pour les lésions histopathologiques**

Les sections colorées à l'H&E ont été observées sous différents grossissements (objectives de 4x, 10x, et 40x) et les lésions observées ont été classées selon l'infiltration cellulaire. Le tissu a été considéré positif quand une infiltration de macrophages normaux ou de cellules épithélioïdes est évidente dans le chorion de la villosité et entre les cryptes avec l'implication de la PP dans laquelle un microgranulome de cellules pâles (macrophages) est présent. L'évaluation de la lésion tissulaire a été effectuée comme expliqué dans une étude précédente (Hailat et al., 2012) et montrée dans le tableau 1.

## **II.3 Technique de coloration immunohistochimique :**

Des coupes de tissus (3 µm) ont été placées sur des lames de verre, qui avaient été traitées préalablement avec l'adhésif de section de tissu vectabond (DAKO A/S. Glostrup, Danemark). Les échantillons de tissus, des blocs de tissu inclus en paraffine, ont été coupés en 2 ou 3 µm étendu sur des lames microscopiques enduites de vectabond, séchés à l'air, et ensuite chauffés à 55°C pendant 2 heures.

Les coupes de tissu déparaffinées en xylène et ont été hydratées par une immersion successive des lames dans des concentrations décroissantes d'éthanol (100%, 95%, et 70%) pour 1 mn chacune ensuite lavées dans l'eau distillée pendant 5 mn. Après avoir été lavées dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS), les coupes de tissu ont été immergées dans une solution tampon au citrate (pH=6), 10 mM, avec une récupération d'antigène effectuée par stérilisation des coupes de tissu à l'autoclave à 120°C à une pression de 15 psi pour environ 15 mn (Express, Italie). L'inactivation des peroxydases endogènes a été réalisée par l'immersion des lames dans une solution de peroxyde d'hydrogène-méthanol de 15% pendant 30 min. L'adhérence non spécifique des protéines aux coupes de tissu a été bloquée utilisant sérum-albumine bovin (SAB) 1% (Sigma Chemical Co., MO 63178) et incubée pendant deux heures. La solution a été

drainée des lames, et l'antisérum polyclonal de MAP, produit chez le lapin, dilué 1:500 dans PBS, a été appliqué pendant 2 h comme décrit par (Hailat et al., 2012). L'immunoglobuline universelle biotinylée anti-chèvre, anti-lapin, et anti-souris (DAKO A/S, Glostrup, Danemark) diluée à 1:20 a été appliquée en tant qu'anticorps secondaire, et les lames ont été incubées pendant 15 min. Après lavage, les peroxydases du complexe streptavidine-biotine étaient appliquées, et incubé sur la coupe de tissu pour 15 min (DAKO, A/S, et Glostrup, Danemark). Les lames ont été rincées et ont été exposées au chromogène 3, 3 diaminobenzidine-4HCL (DAKO) 1 mg/ml dans le PBS complétées avec du peroxyde d'hydrogène (10 µl de peroxyde d'hydrogène 4% pour 2 ml de DAB), et incubé à la température ambiante pendant 3-5 min. Les lames ont été rincées avec l'eau distillée pour 5 min suivie d'une contre-coloration dans l'hématoxyline pendant 2 ou 3 minutes et immersion dans l'eau de bleuissage en 30 secondes. Les lames ont été déshydratés dans des concentrations croissantes d'alcool (70%, 95%, et 100%) 1 min chacune et clarifiées dans le xylène (trois passages 1 min chacun) et monté utilisant le DPX pour une observation ultérieure.

Les lames ont été observées sous microscope photonique à  $\times 4$ ,  $\times 10$ , et  $\times 40$ . Les sections ont été considérées positives en fonction de l'observation de couleur (signaux MAP-positifs) qu'est une indication d'une réaction antigène-anticorps, et manifestées par une coloration brune intra-cytoplasmique ou extracellulaire dans différentes zones de la coupe de tissu colorée. En plus, l'intensité de la réaction était considérée avec seulement un fort signal de coloration brune a été enregistré en tant que réaction positive et une ensuite une classification a été faite selon les critères suivants décrits par (Hailat et al., 2012).

Les résultats ont été enregistrés en comptant le nombre de cellules avec signal positif à  $10\times$ , par conséquent, à partir d'une réaction de cellules enregistrée comme positive : 1-10 comme + (léger), la réaction de 10 mais moins de 50% des cellules comme ++ (modéré), la réaction dans 50% des cellules ou plus dans une coupe de tissu a été évaluée comme +++ (fort). Si les critères ci-dessus étaient trouvés dans au moins un champ, on l'a considéré positif. Au moins une lame de chaque section de tissu des iléums prélevés de chaque animal a été examinée. Dans certains cas, plus de coupes ont été prises de chaque préparation de tissu. L'examen d'immunohistochimie a été réalisé sur des tissus d'iléums et des ganglions lymphatiques mésentériques associés.

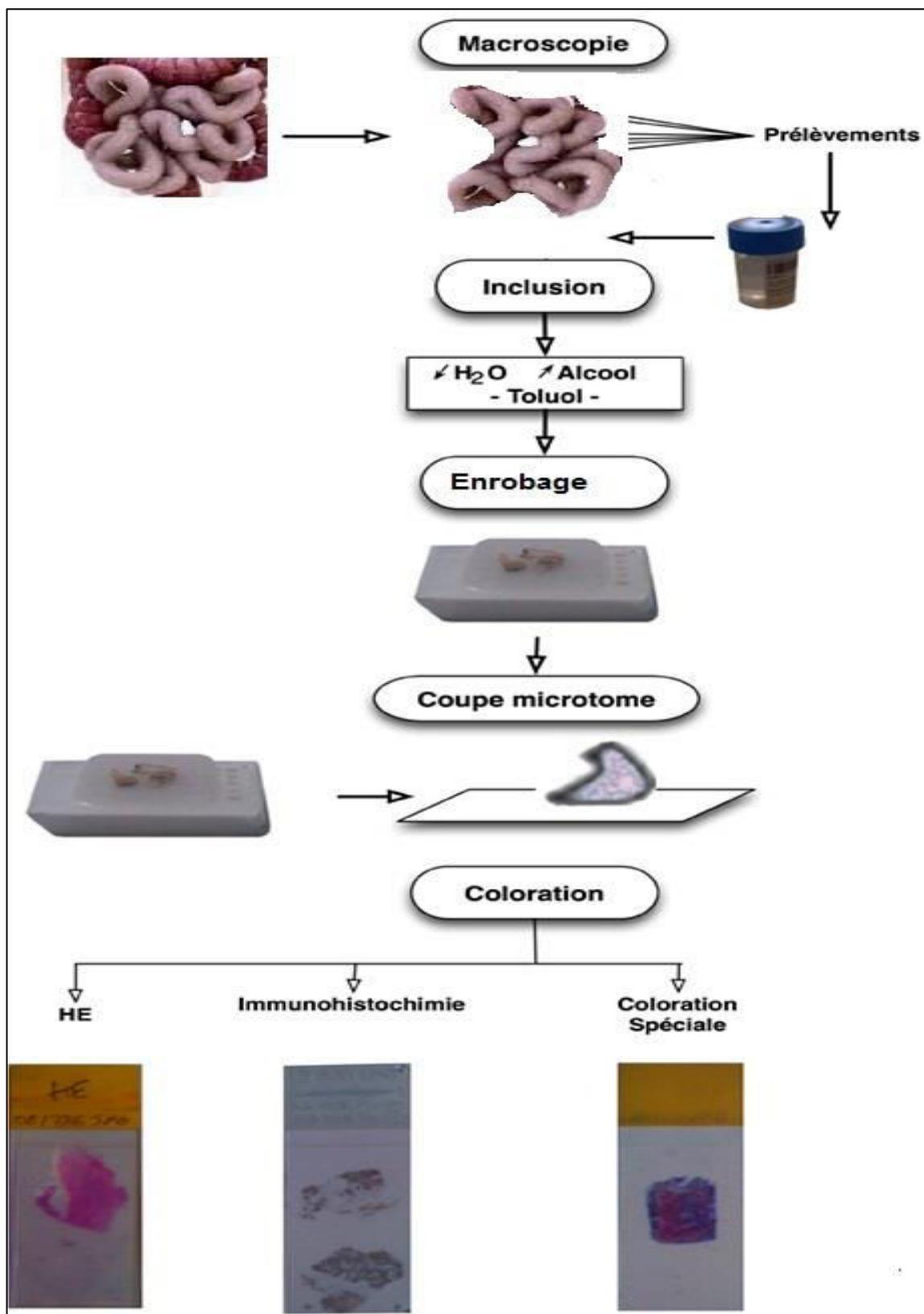
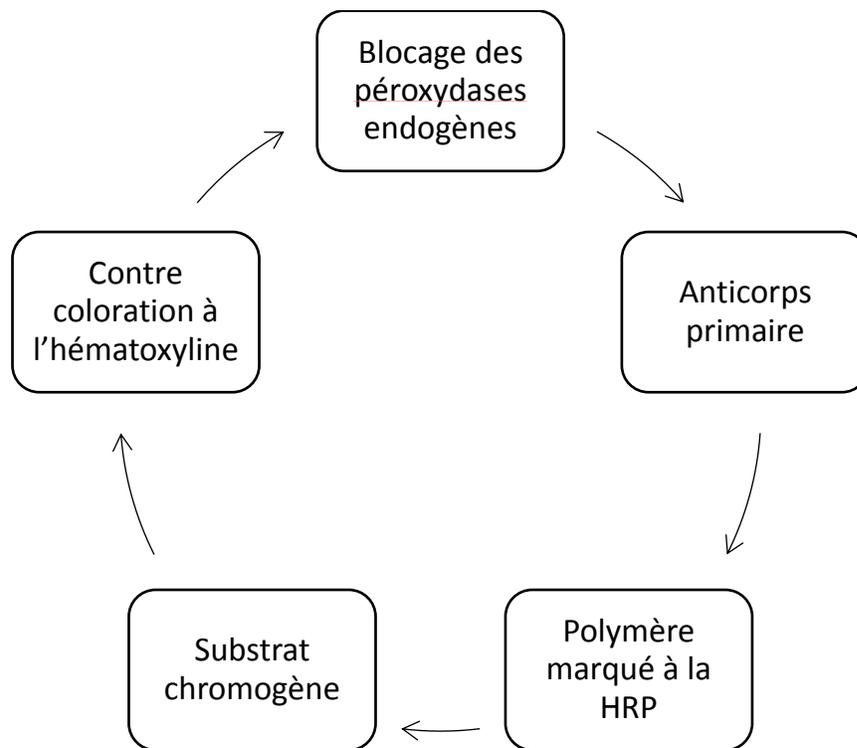


Figure 5. Différents tests de diagnostic de la paratuberculose (prélèvement, histopathologie, IHC et Ziehl-Neelsen).



**Figure 6. Schéma démonstratif des différentes étapes de la technique de coloration immunohistochimique.**

## **II.4 Méthode immuno-enzymatique (ELISA).**

### **II.4.1 Collecte des échantillons de sérum :**

De même que les prélèvements de tissus (les mêmes animaux), des échantillons de sang de 300 vaches ont été rassemblés en parallèle aux prélèvements de tissu de l'abattoir de Tiaret seulement. Les échantillons de sang ont été centrifugés et des échantillons de sérum ont été stockés dans le congélateur jusqu'à l'utilisation dans l'analyse ELISA.

### **II.4.2 Technique d'analyse par ELISA :**

Des échantillons de sérum congelés ont été soumis à une analyse par la méthode ELISA absorbée par *Mycobacterium phlei* (*M. phlei*) (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Etats-Unis). Ce test mesure les anticorps sériques de MAP, utilisant une étape d'absorption pour éliminer les anticorps non spécifiques. La spécificité dans ce test a été augmentée par pré-absorption.

L'ELISA absorbé combine la sensibilité de l'ELISA avec la spécificité additionnelle d'une étape d'absorption. Les sérums à être testés sont dilués avec du tampon contenant un antigène de

*M. phlei* soluble avant d'être testés dans un ELISA indirect. Ce procédé élimine les réactions croisées des anticorps non spécifiques. Dans les premières versions, le sérum était absorbé avec *M. phlei* entier, qui était éliminé par centrifugation préalablement l'épreuve.

Une plaque de microtitrage a été développée dans laquelle l'antigène de *M. Paratuberculosis* tapisse les 96 puits de la plaque. Les échantillons sont dilués dans un diluant contenant *M. phlei* pour éliminer les réactions croisées. Pendant l'incubation des échantillons dilués dans les puits sensibilisés, les anticorps spécifiques de *M. Paratuberculosis* forment un complexe avec les antigènes qui tapissent les parois. Après lavage le matériel non fixé est éliminé des puits, l'immunoglobuline anti-bovin marquée la peroxydase de raifort (HPRO) est ajoutée. Les réactions avec les immunoglobulines lient l'antigène la phase solide. Le taux de conversion du substrat est proportionnel la quantité d'immunoglobuline fixée. La couleur consécutive, mesurée (450 nm) avec un spectrophotomètre est proportionnelle la quantité d'anticorps présent dans le sérum testé.

La lecture des microplaques a été effectuée avec un lecteur de microplaques automatisé ELISA (EL x 800 Universal Microplate Reader, Bio-Tek. Instruments, Inc.) à 450 nm. Dans chaque microplaque de 96 puits, 92 échantillons de sérum ont été examinés dans des puits isolés.



**Figure 7. Matériel (lecteur de microplaque et micropipettes) et réactifs de l'analyse ELISA.**

Rapport-Gratuit.com

### **III. RÉSULTATS ET DISCUSSION**

### III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Sur 400 animaux utilisés dans cette étude (plage d'âge de 3 à 9 ans), trente-deux entre 4 et 6 ans ont montré un mauvais état corporel avec un amaigrissement évident dans certains cas. L'examen macroscopique des 400 intestins grêles a montré un plissement (corrugation) de la muqueuse et une paroi plusieurs fois plus épaisse avec des ganglions lymphatiques régionaux hypertrophiés et parfois congestionnés dans 8 (2%) vaches.



**Figure 8. Plissement (corrugation) de la muqueuse intestinale (iléum).**

La distribution de la MJ dans les bovins subcliniques apparemment sains dans la région de Tiaret utilisant les examens histopathologiques, l'IHC et l'ELISA est récapitulée dans le tableau 02. Sur 400 prélèvements de tissu examinés (iléum), 216 (54%) ont montré des lésions microscopiques compatibles avec la MJ. Ceci est principalement représenté par la présence des macrophages, des macrophages épithélioïdes, de microgranulomes et des réactions granulomateuses (Figure 11 et 12) dans l'intestin et les ganglions lymphatiques, respectivement. Parfois, des cellules géantes multinucléées et une infestation parasitaire avec des infiltrats éosinophiles ont été également observées (Figures 13, 14 et 15). Dans certains cas, les villosités ont subi différents changements morphologiques tels que le raccourcissement, l'aplatissement et la fusion. On a également observé une proéminente hyperplasie et une prolifération lymphoïde vers la surface de la muqueuse (Figure 16). En outre, sur 400 échantillons d'intestin examinés,

204 (51%) étaient positifs par l'analyse d'immunohistochimie (Figure 17). L'analyse statistique des résultats n'a montré aucune différence significative entre les examens d'histopathologie et d'immunohistochimie. En outre, il n'y avait aucune différence significative dans l'occurrence de la maladie entre les régions de Tiaret et de Sougueur utilisant les ces deux tests diagnostique.

Quand des coupes de tissu ont été colorées avec la technique de ZN, 12 (7.5%) sur 160 échantillons d'intestin examinés étaient positifs présentant des bâtonnets rouges intracellulaires et extracellulaires, dispersées ou en amas (Figure 18 et 19) dans l'intestin et les ganglions lymphatiques mésentériques (GLMs), respectivement.

Sur 300 sérums de bovins ; tous de l'abattoir de Tiaret, 24 (8%) échantillons étaient positifs utilisant la technique ELISA et appartenant plus probablement aux vaches maigres (tableau 2). Tous les échantillons positifs étaient de l'abattoir de Tiaret où l'âge des bovins abattus était supérieur à 3 ans.

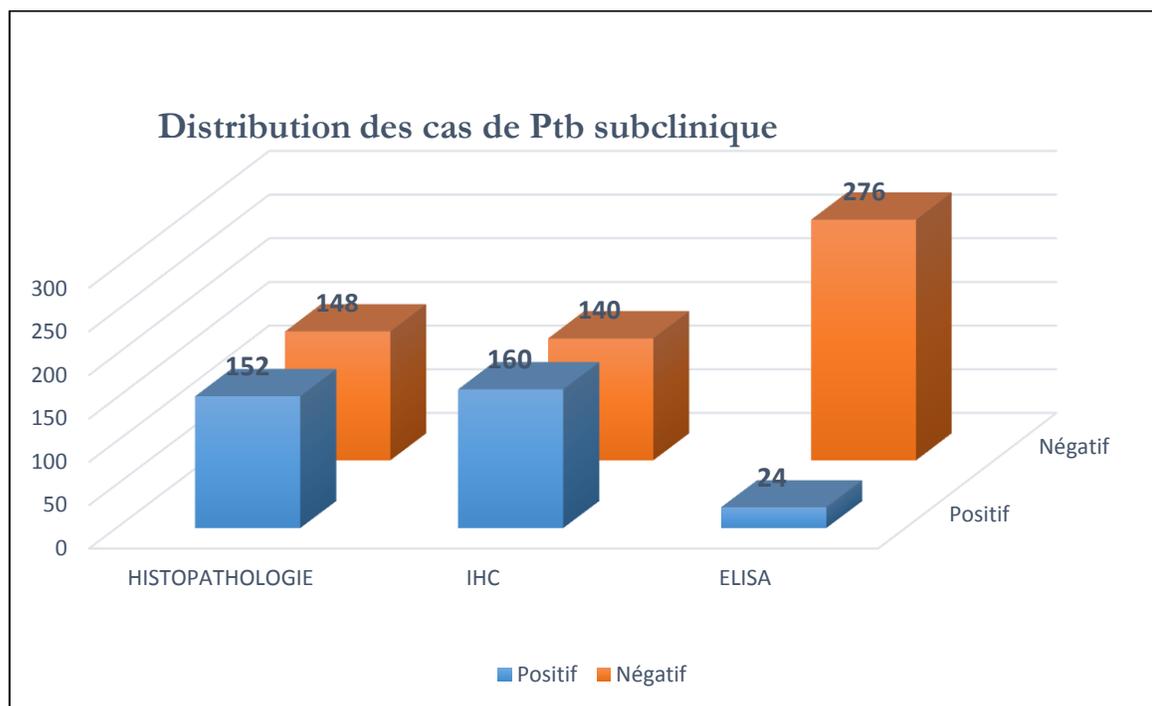
**Tableau 1 : Critères d'évaluation et de classification (en grade) des lésions histopathologiques trouvés dans l'iléum et la valvule iléocœcale des bovins.**

<b>Caractéristiques histopathologiques</b>	<b>Grade</b>
Absence ou très peu de macrophages et lymphocytes sans épaissement apparent de la muqueuse intestinale	<b>Négatif</b>
Beaucoup de lymphocytes avec quelques macrophages sans cellules épithélioïdes.	<b>+1</b>
En plus des critères précédents, nous pouvons voir beaucoup de macrophages avec un nombre accru de lymphocytes et de quelques macrophages épithélioïdes dispersés.	<b>+2</b>
En plus des critères du grade précédent, on peut observer un nombre élevé de macrophages épithélioïdes en amas ou dispersés.	<b>+3</b>
Présence des cellules géantes multinucléées avec ou sans macrophages épithélioïdes associé à la formation de granulome	<b>Spécial (Sp)</b>

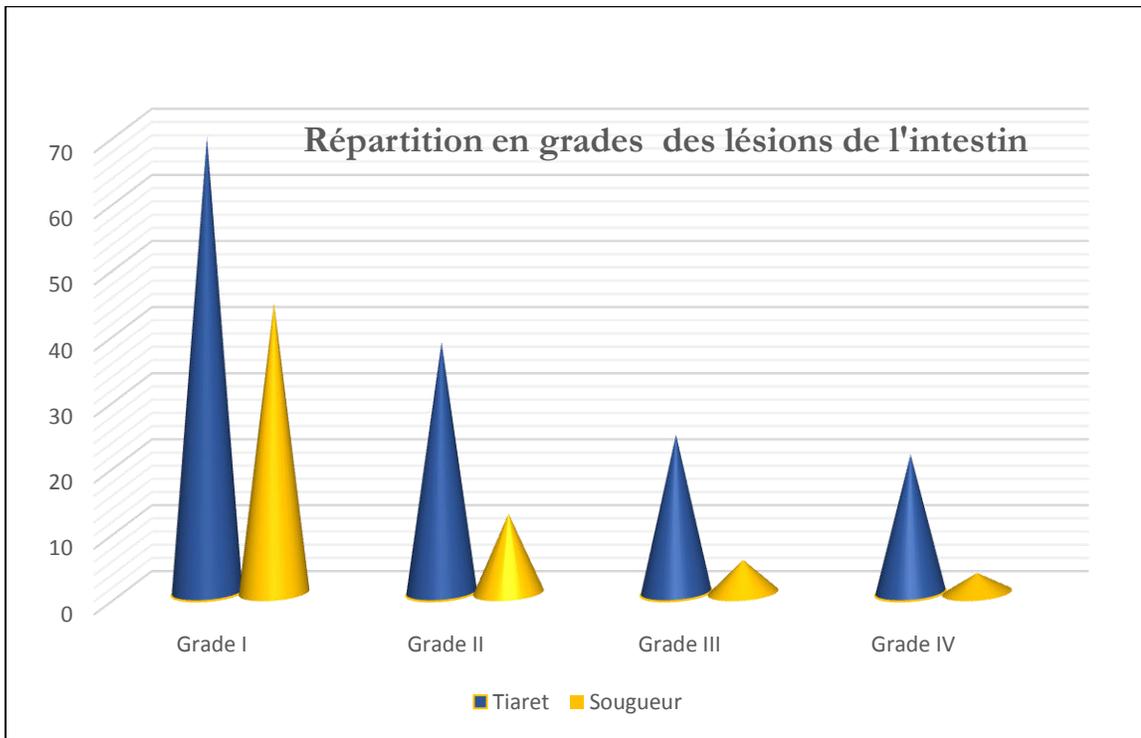
**Tableau 2. Distribution des cas de Ptb subclinique dans 400 bovins utilisant des examens histopathologiques, IHC et la technique d'ELISA. Tiaret, 2011-2012.**

Région	Histopathologie		tochimie		ELISA	
	Positif (%)	Négatif (%)	Positif (%)	Négatif (%)	Positif (%)	Négatif (%)
Tiaret	152 (51%)	148 (49%)	160 (53%)	140 (47%)	24 (8%)	276 (92%)
Sougueur	64 (64%)	36 (36%)	44 (44%)	56 (56%)	Na	Na
<b>Total</b>	216 (54%)	184 (46%)	204 (51%)	196 (49%)	24 (8%)	276 (92%)

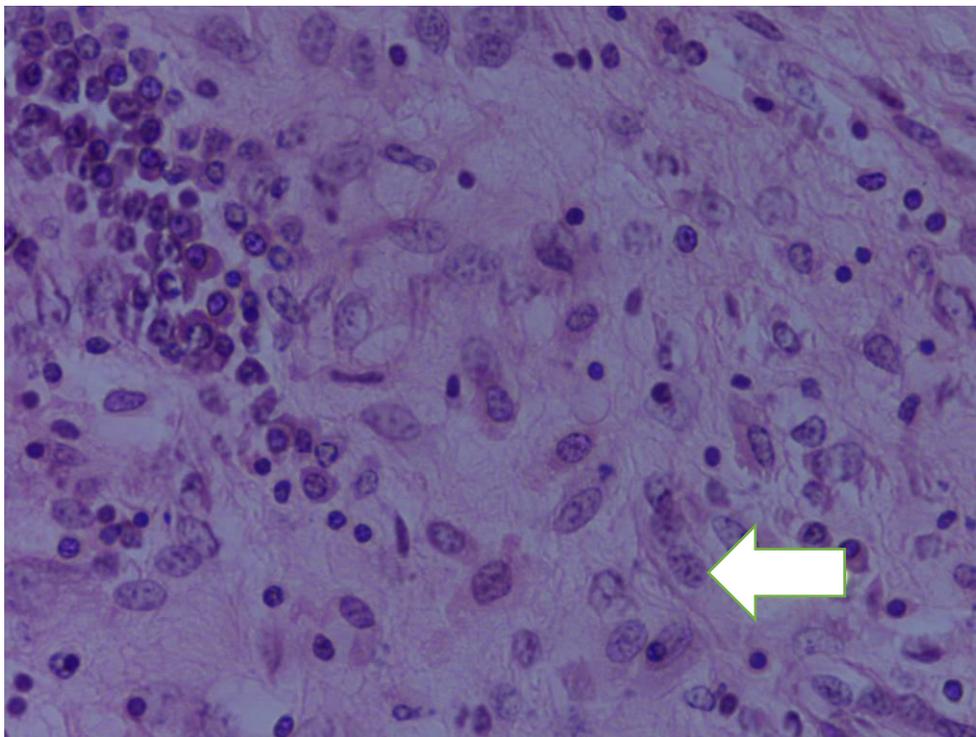
NA= Non Applicable



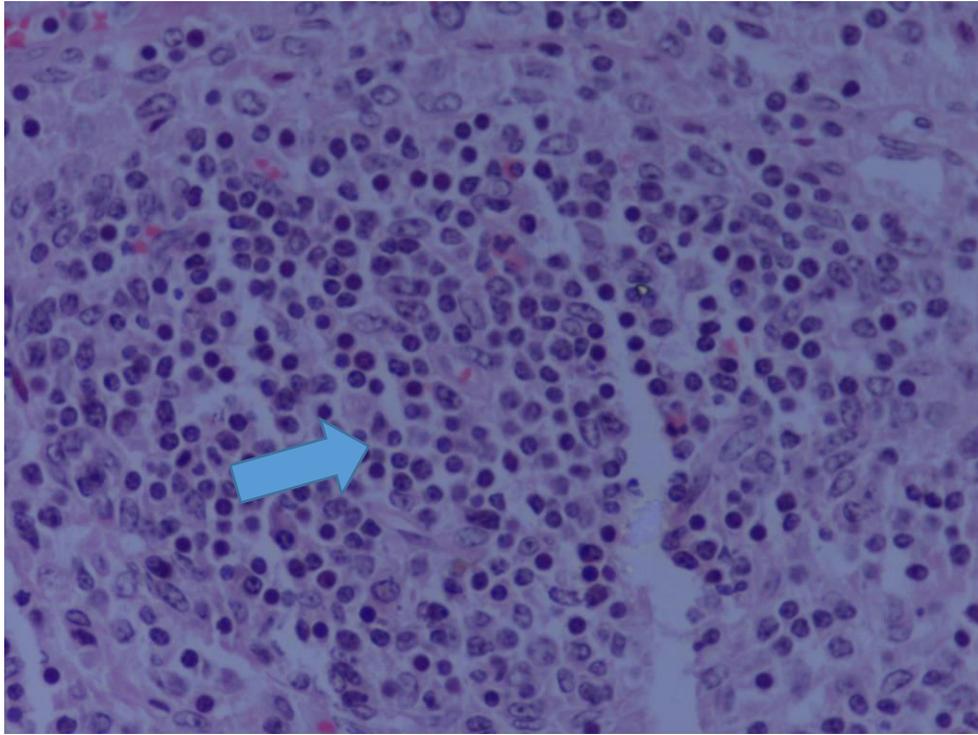
**Figure 9. Représentation graphique de la répartition des cas de Ptb subclinique par histopathologie, IHC et la technique d'ELISA. Tiaret.**



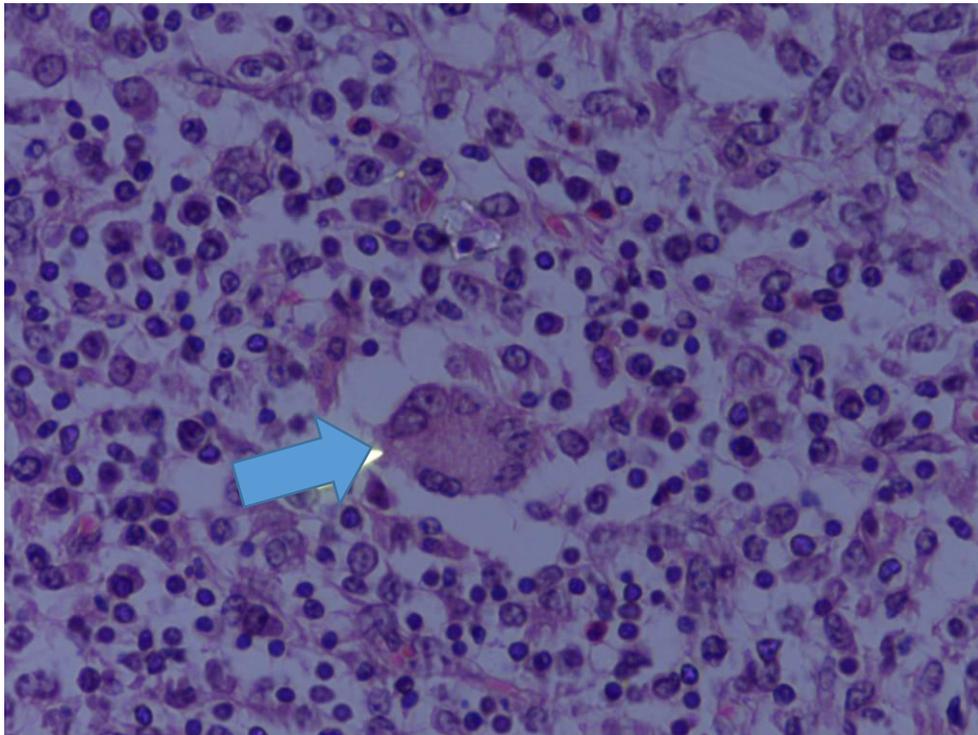
**Figure 10. Représentation graphique de la répartition des cas de Ptb subclinique par grade de lésion de l'iléum dans les deux zones d'étude.**



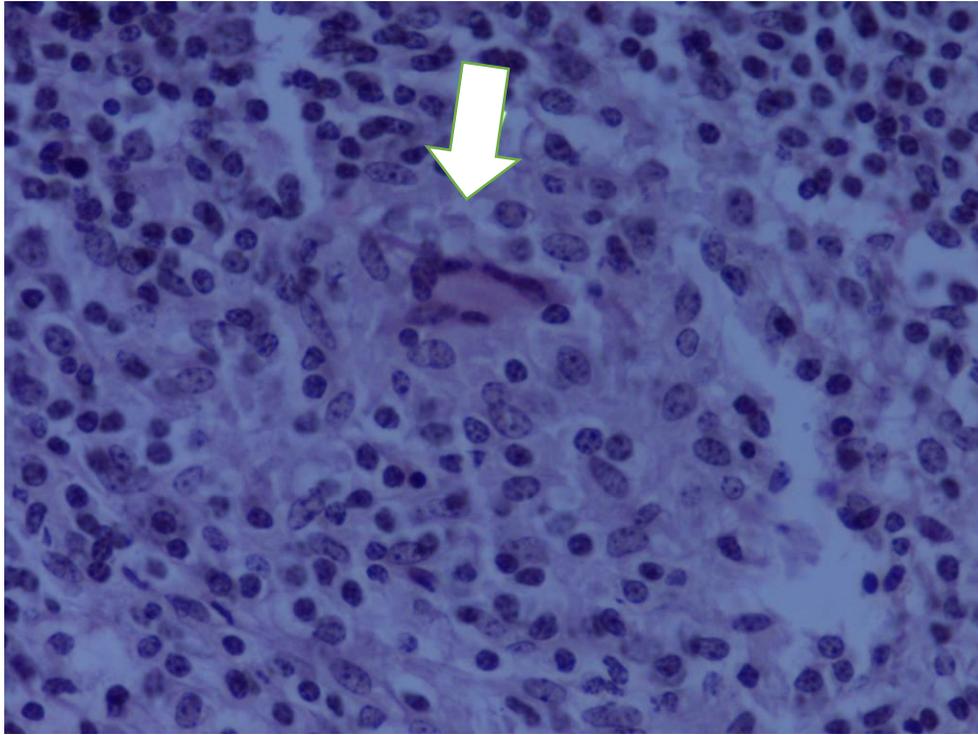
**Figure 11. Iléum ; bovin. agrégats de cellules épithélioïdes dans la partie basale de la muqueuse. H&E. 40x.**



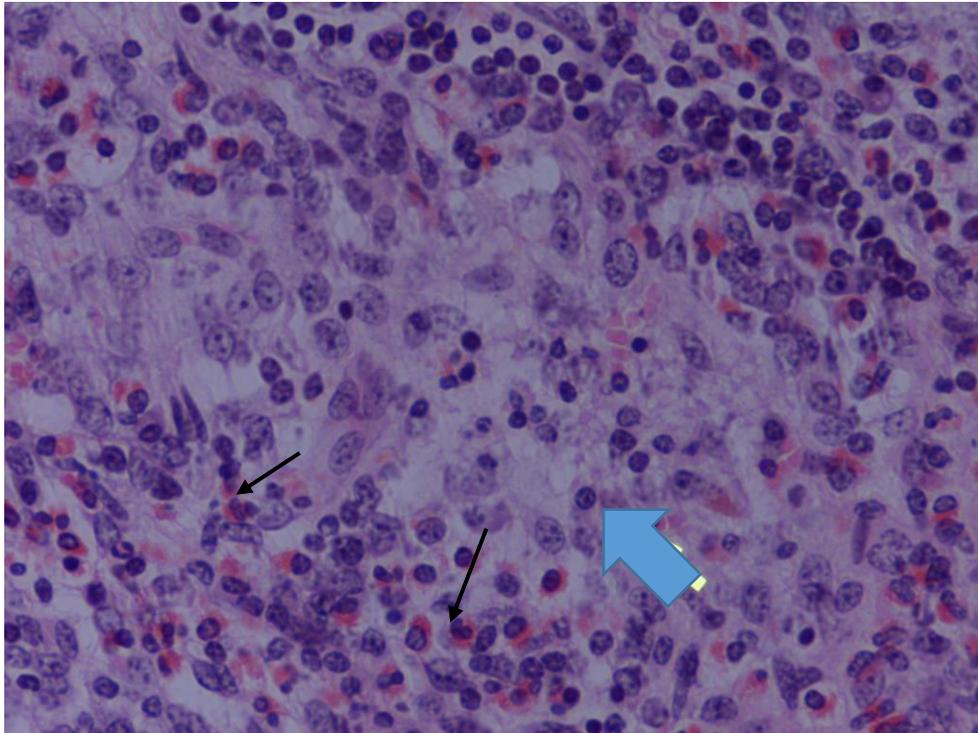
**Figure 12. GLM ; bovin. Microgranulome avec des couches périphériques (nids) de cellules épithélioïdes. H&E. 40x.**



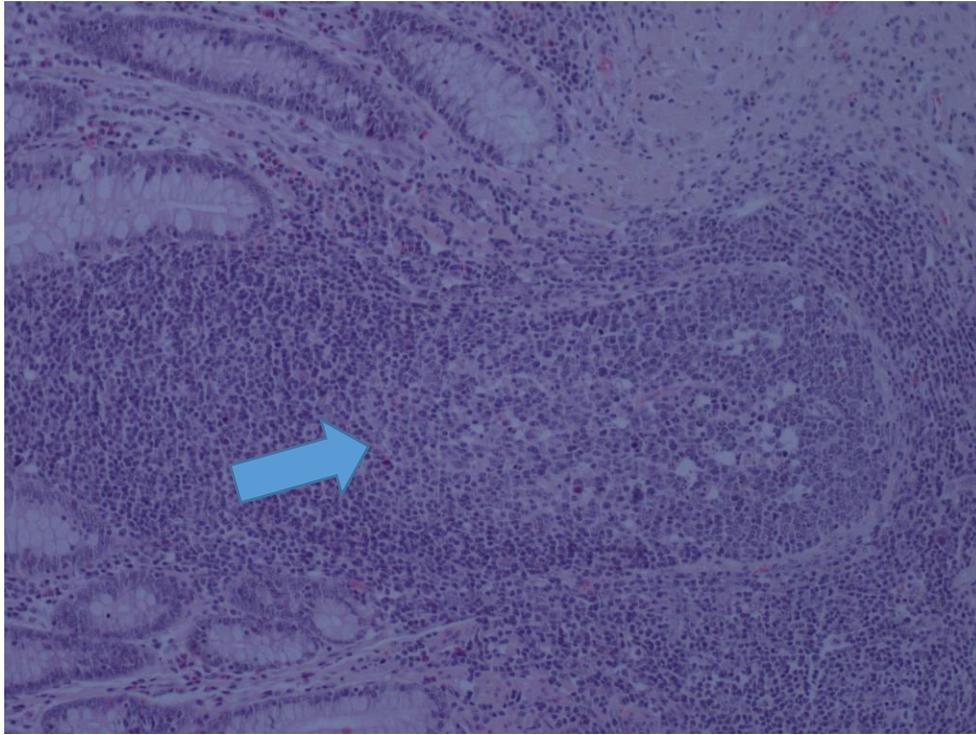
**Figure 13. Iléum ; bovin. Cellule géante multinucléée isolée dans la muqueuse de l'intestin. H&E. 40x**



**Figure 14. Iléum ; bovin. Cellule géante multinucléée isolée entourée par des cellules épithélioïdes. H&E. 40x**



**Figure 15. Iléum ; bovin. Quelques cellules épithélioïdes associées à une infiltration par des éosinophiles (petites flèches noires). H&E. 40x.**



**Figure 16. Iléum ; bovin. Hyperplasie lymphoïdes des PPs vers la surface de la muqueuse (entre les villosités). H&E. 40x.**

Des ganglions lymphatiques mésentériques ont été également examinés par les techniques d'histopathologie, d'IHC et de ZN (tableau 3) pour mieux comprendre la pathogénie de la maladie chez les bovins. Les résultats obtenus des ganglions lymphatiques mésentériques correspondants ont montrés que sur 400 échantillons examinés par histopathologie, 88 (22%) ont présentées des réactions granulomateuses, des macrophages épithélioïdes avec parfois la présence des cellules géantes, alors que 196 (49%) sur 400 ganglions lymphatiques examinés étaient positifs utilisant la technique d'immunohistochimie. L'histopathologie et l'IHC s'avèrent significativement différentes par analyse statistique des résultats des GLMs (tableau 3). Cependant, seulement 10 échantillons (6%) sur 160 coupes histologiques de ganglions lymphatiques ont montré une réaction positive par coloration de ZN. En revanche, aucune différence significative n'a été trouvée entre les deux tests pour les échantillons d'intestin examinés (tableaux 2 et 3).

**Tableau 3. Distribution de 400 iléums et ganglions lymphatiques mésentériques (GLMs) de bovins examinés par l'histopathologie et l'immunohistochimie, Tiaret, 2011-2012.**

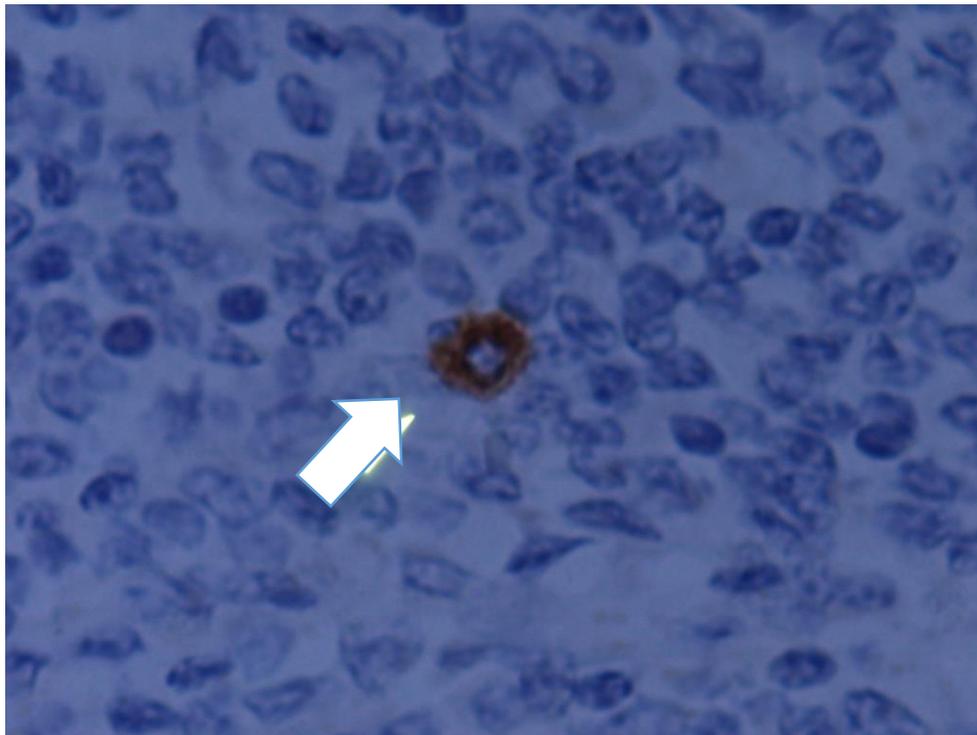
Echantillon de tissu	Histopathologie			Immunohistochimie		
	Échantillons totaux	Échantillons positifs	(%) de positif	Échantillons totaux	Échantillons positifs	(%) de positif
Iléum	400	216	<b>54%</b>	400	204	<b>51%</b>
GLMs	400	88	<b>22%</b>	400	196	<b>49%</b>

Pour une profonde compréhension du processus de la maladie chez les vaches apparemment saines, les résultats histopathologiques ont été classés dans quatre groupes d'évaluation (grades) selon multiples critères précédemment déterminés (tableau 1). Ces critères ont inclus la quantité et le type d'infiltration cellulaire, présence des macrophages épithélioïdes, des cellules géantes multinucléées et la réaction granulomateuse dans des emplacements spécifiques de l'iléum et a les ganglions lymphatiques associés. L'épaississement de la muqueuse intestinale était variable avec une population hétérogène de cellules inflammatoires spécifiquement les lymphocytes, les macrophages, des macrophages épithélioïdes et les cellules géantes multinucléées (Figure 20).

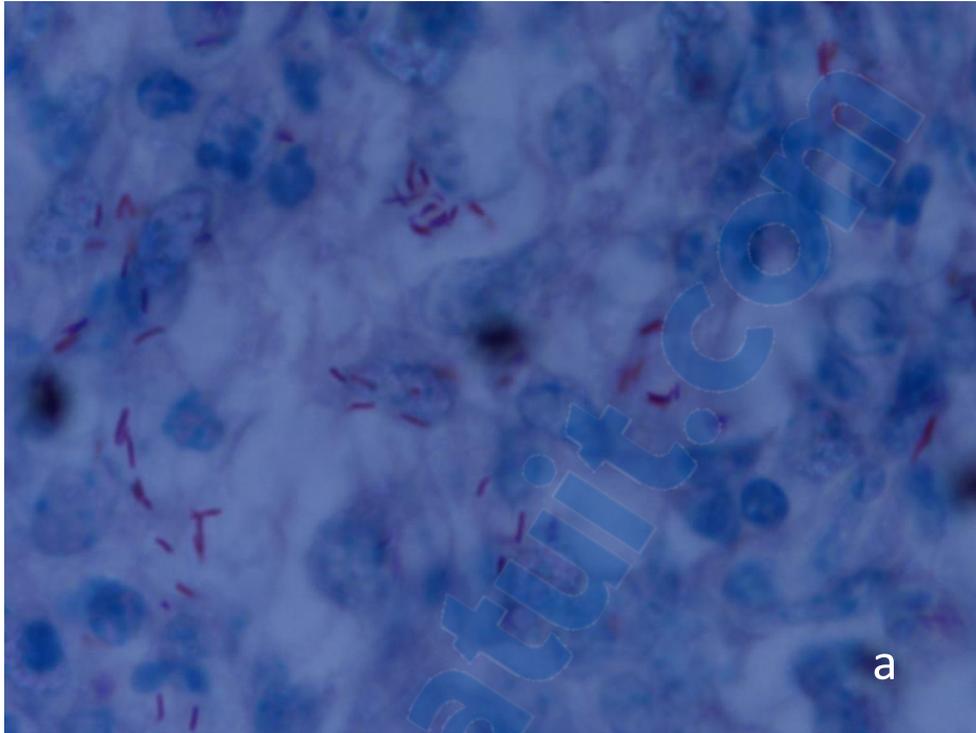
Dans le grade I, 113 (28%) sur 400, ont montré une infiltration par nombreux lymphocytes, peu de macrophages et aucuns macrophages épithélioïdes dans le chorion et/ou entre et considéré comme cas suspectés. D'autre part, quelques vaches 24 (6%) ont montrés des critères compatibles avec le grade IV, présentant une population cellulaire de réaction granulomateuse avec quelques macrophages épithélioïdes arrangés en groupes ou isolément. Cinquante (13%) et vingt-neuf vaches (7%) étaient dans les grades II et III respectivement (tableau 4). Dans certains cas, des macrophages épithélioïdes ont été observés ont condensées en amas qui forment de larges zones pâles dans la muqueuse (Figures 22 et 23).

**Table.4. Distribution en grades des cas positifs de paratuberculose chez les bovins par examen histopathologique de l'intestin (iléum), Tiaret, 2011-2012.**

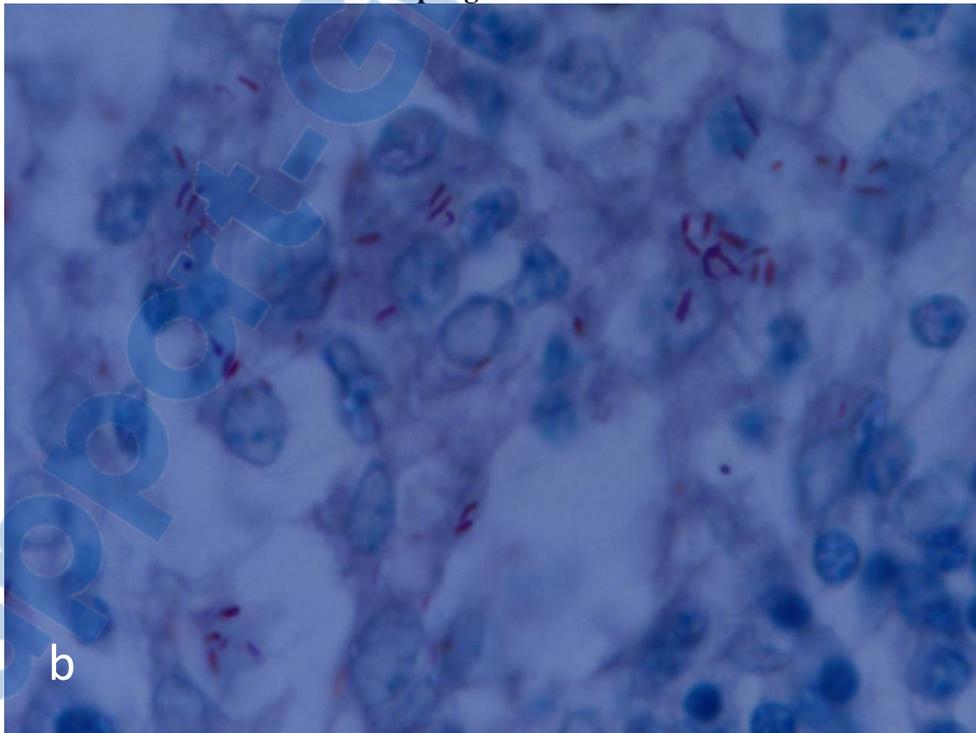
Région	Nombre total	Positif				Total
		Grade I (%)	Grade II (%)	Grade III (%)	Grade IV (%)	
Tiaret	300	69 (46%)	38 (25%)	24 (15%)	21 (14%)	152 (51%)
Sougueur	100	44 (44%)	12 (12%)	5 (5%)	3 (3%)	64 (64%)
<b>Total</b>	<b>400</b>	<b>113 (28%)</b>	<b>50 (13%)</b>	<b>29 (7%)</b>	<b>24 (6%)</b>	<b>216 (54%)</b>



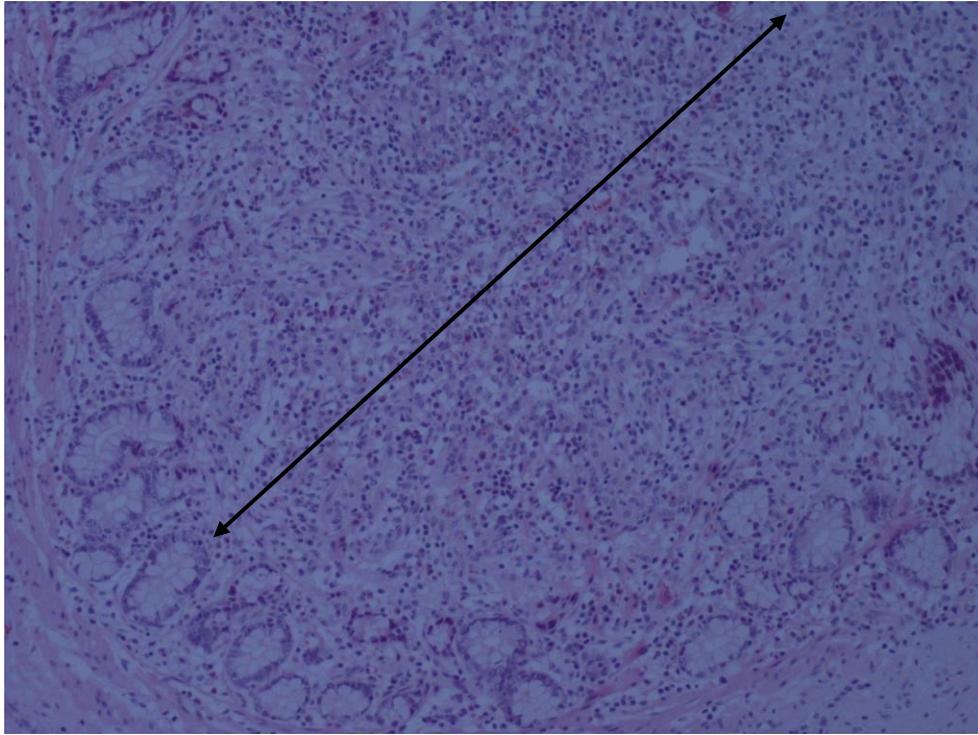
**Figure 17. GLM ; bovin. Signal MAP-positif d'intensité. IHC. 40x.**



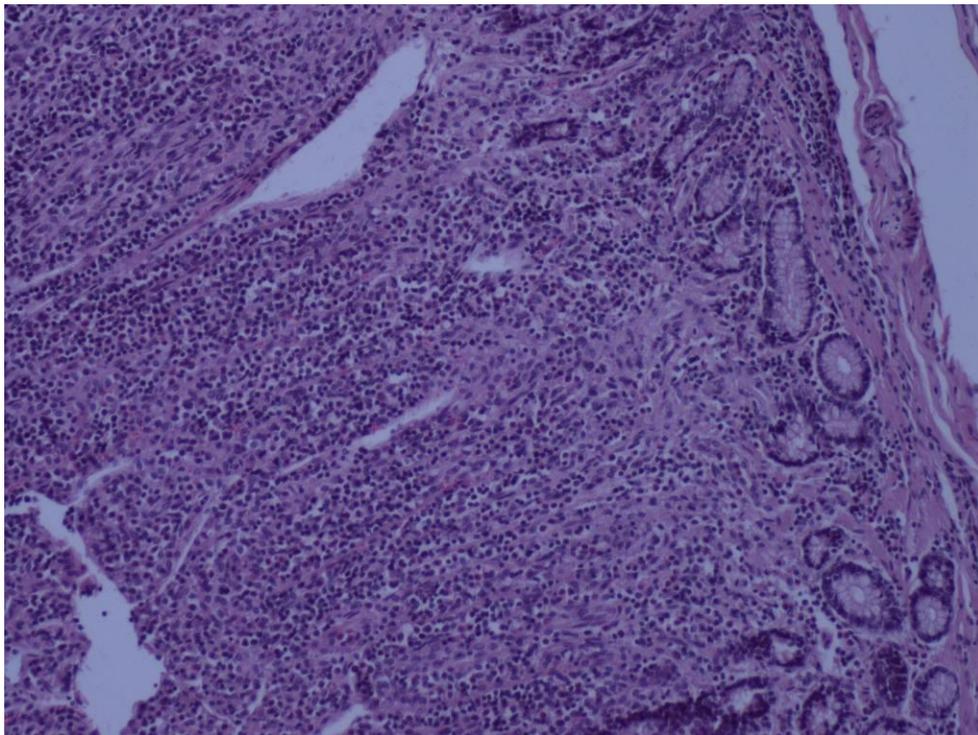
**Figure 18. Intestin ; bovin. Plusieurs bacilles acido-résistants surtout à l'extérieur des macrophages. ZN. 100 X.**



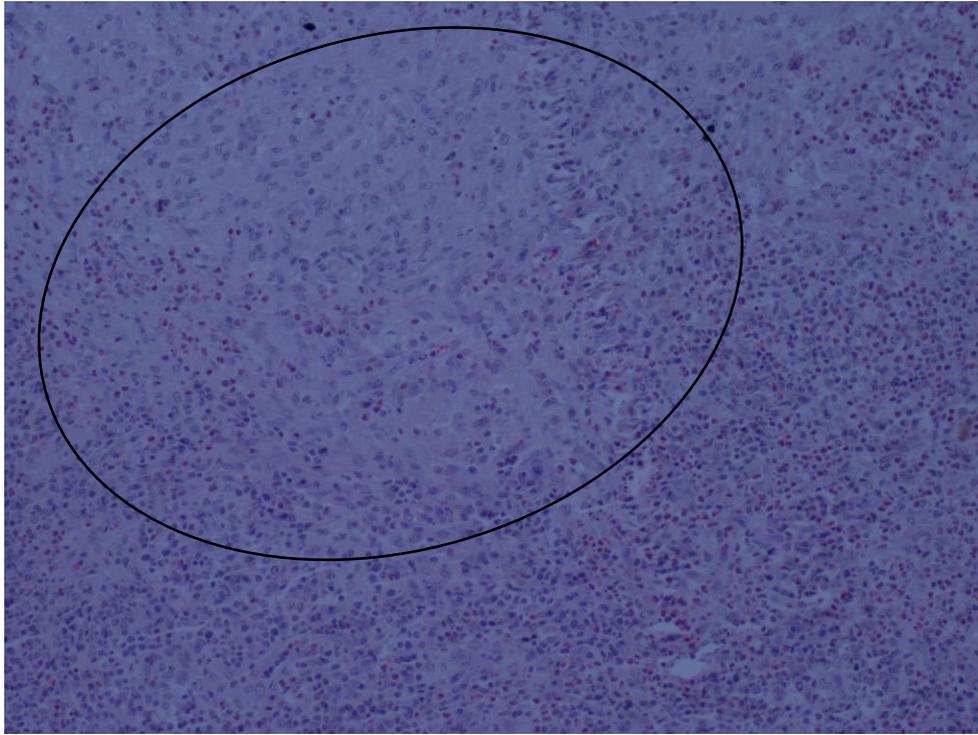
**Figure 19. GLM ; bovin. Plusieurs bacilles acido-résistants surtout à l'extérieur des macrophages. ZN. 100 X.**



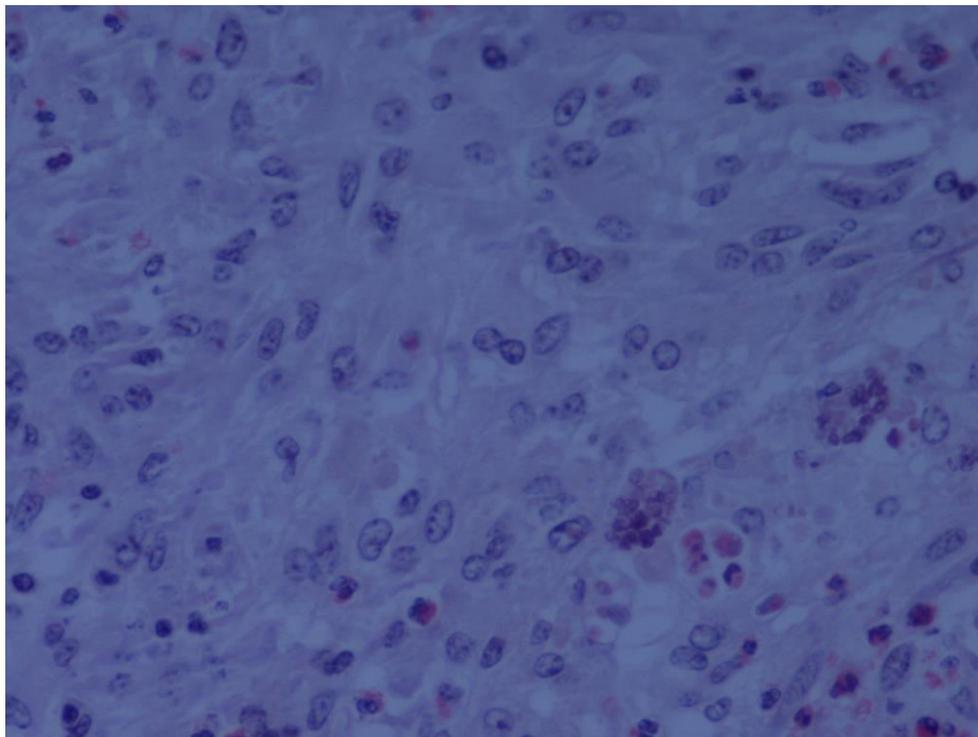
**Figure 20. Iléum ; bovin. Épaississement de la muqueuse intestinale suite à une forte infiltration par des macrophages et des cellules épithélioïdes. H&E. 10x.**



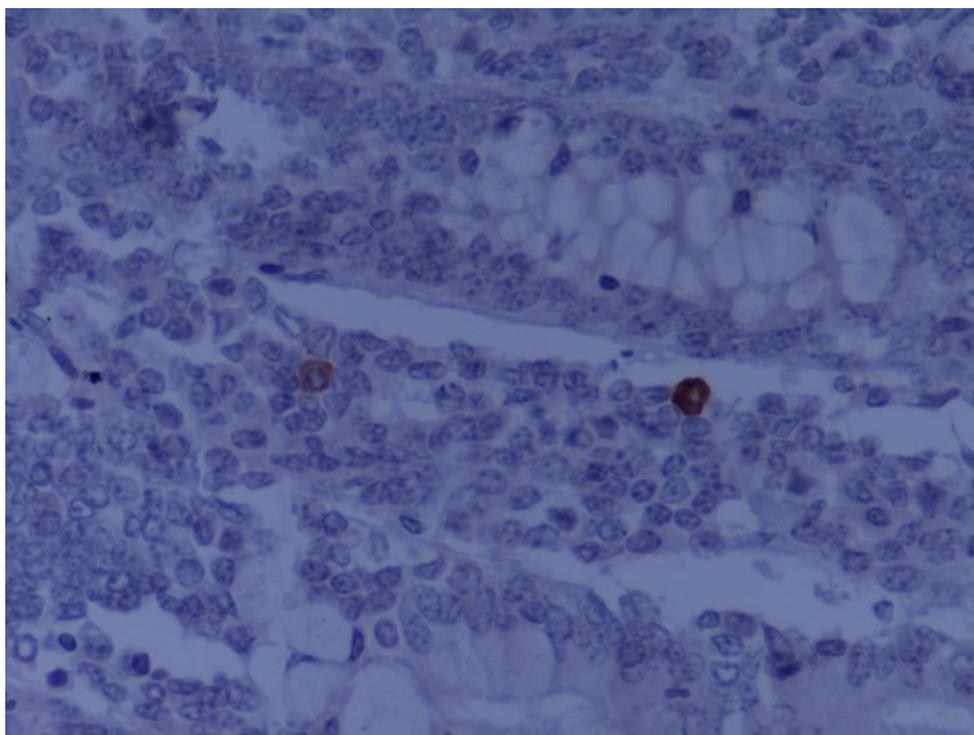
**Figure 21. Iléum ; bovin. Épaississement de la muqueuse intestinale suite à une forte infiltration par des macrophages et des cellules épithélioïdes. H&E. 10x.**



**Figure 22. Iléum ; bovin. Réaction granulomateuse avec de larges zones pâles formées d'agrégations de cellules épithélioïdes. H&E. 10x**



**Figure 23. Iléum ; bovin. Zone pâle de la réaction granulomateuse formées principalement d'agrégats de cellules épithélioïdes. H&E. 40x.**



**Figure 24. Iléum ; bovin. Signal MAP-positif de faible intensité dans la région basale de la muqueuse. IHC. 40x.**

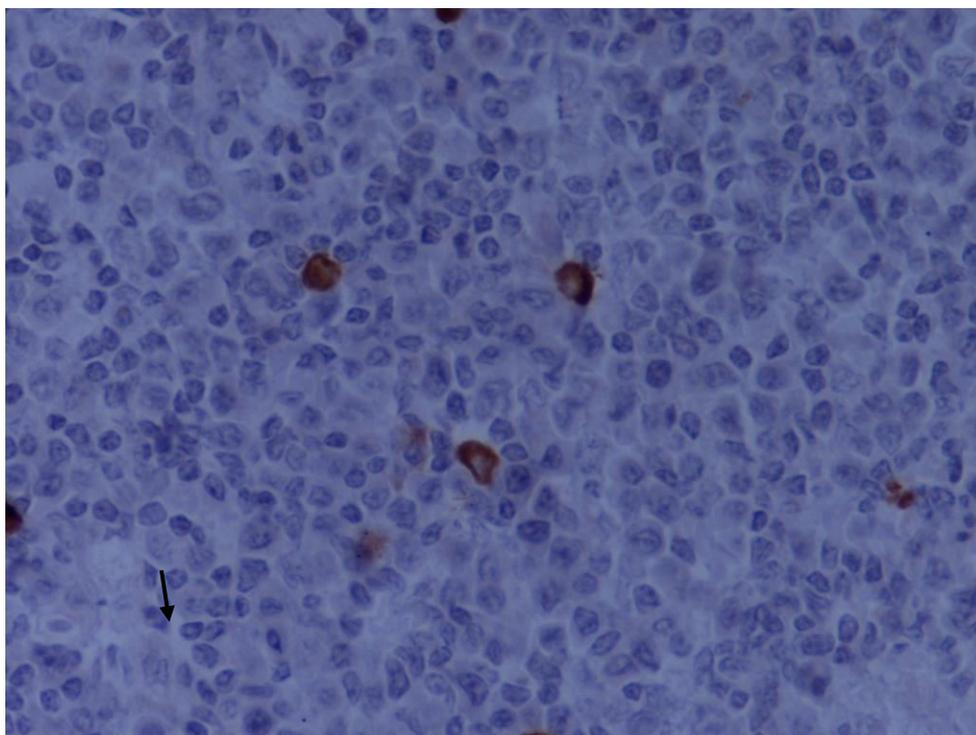
L'analyse des résultats de l'analyse immunohistochimique des coupes histologiques de l'intestin (iléum) utilisant un anticorps polyclonal de MAP a indiqué que sur 400 échantillons d'iléum examinés, 204 échantillons (51%) ont montré un signal positif (Figure 17) distribués comme 110 (27.5%), 76 (19%) et 18 (4.5%) spécimens étaient dans les groupes d'intensité de signal légère, modérée et forte respectivement (tableau 5). Cependant, quand les résultats d'IHC des GLMs correspondants ont été analysés, 49% étaient positifs. En outre, les résultats de l'analyse IHC des ganglions lymphatiques examinés a montré que sur 400, 144 (36%) étaient dans le groupe de signal à intensité légère, 36 (9%) à intensité modérée et 16 (4%) à forte intensité (tableau 6 ; Figures 24 et 25).

**Table.5. Distribution de l'intensité du signal positif des cas positifs de la maladie de Johne dans les bovins par examen immunohistochimique de l'intestin (iléum), Tiaret, 2011-2012.**

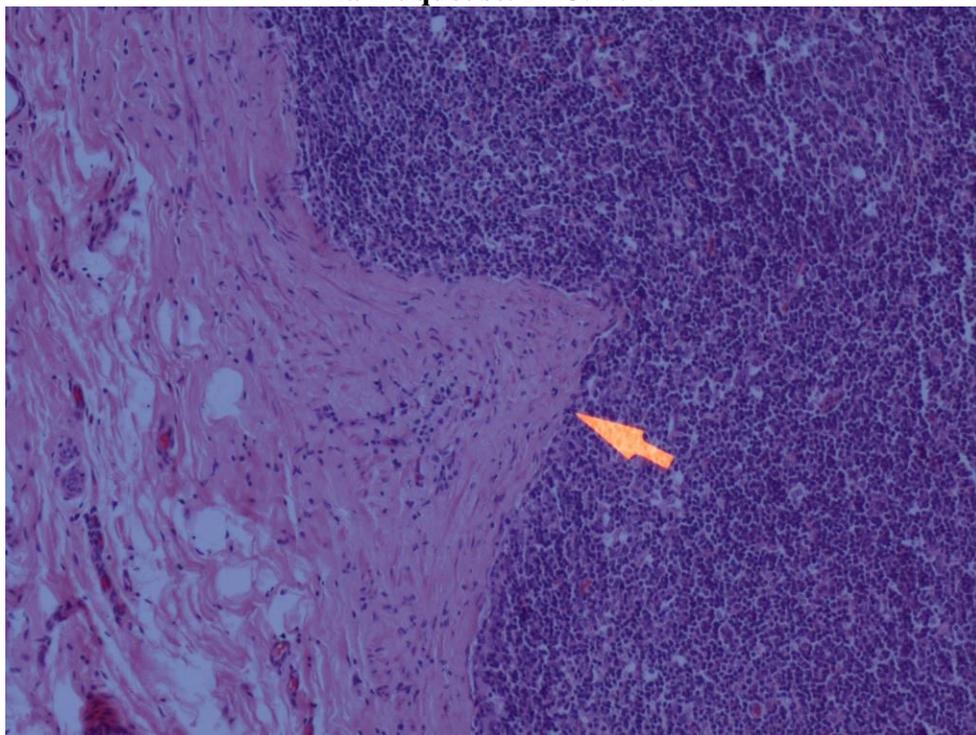
Région	Nombre total	Intensité du signal positif			(%) de signal positif
		Légère (%)	Modérée (%)	Forte (%)	
Tiaret	300	72 (24%)	56 (19%)	12 (4%)	140 (47%)
Sougueur	100	38 (38%)	20 (20%)	6 (6%)	64 (64%)
<b>Total</b>	<b>400</b>	<b>110 (27.5%)</b>	<b>76 (19%)</b>	<b>18 (4.5%)</b>	<b>204 (51%)</b>

**Table.6. Distribution de l'intensité du signal positif des cas positifs de la maladie de Johne dans les bovins par examen immunohistochimique des GLMs, Tiaret, 2011-2012.**

Région	Nombre total	Intensité du signal positif			(%) de signal positif
		Légère (%)	Modérée (%)	Forte (%)	
Tiaret	300	114 (38%)	28 (9%)	12 (4%)	154 (51%)
Sougueur	100	30 (30%)	8 (8%)	4 (4%)	42 (42%)
<b>Total</b>	<b>400</b>	<b>144 (36%)</b>	<b>36 (9%)</b>	<b>16 (4%)</b>	<b>196 (49%)</b>



**Figure 25. Iléum ; bovin. Signal MAP-positif d'intensité modérée dans la région basale de la muqueuse. IHC. 40x.**



**Figure 26. GLM ; bovin. Infiltration massive du sinus paracortical ; notez l'absence du sinus. H&E. 10x.**

## DISCUSSION

La paratuberculose continue à être une maladie importante des ruminants domestiques et est responsable des pertes économiques considérables partout dans le monde (Kurade et al., 2004). En raison de la forte excrétion des mycobactéries aux stades avancés de la MJ et de l'infectiosité élevée de l'agent étiologique, le dépistage précoce des animaux infectés est essentiel pour éviter la propagation de la maladie (Coetsier et al., 1998).

Dans la présente étude, l'occurrence de la paratuberculose subclinique dans les bovins était de 54%, 51%, 8%, et 7.5% utilisant les techniques de diagnostic mentionnées ci-dessus; l'histopathologie, IHC, ELISA et ZN, respectivement (tableaux 2 et 3). Si la détection des bactéries causatives MAP (protéine) dans les prélèvements de tissu d'iléum comme démontrés par l'IHC, peut être considéré définitive de l'infection, il y a en conséquence une occurrence de 51% dans les bovins à l'abattage dans la province de Tiaret (Ouest Algérien). Ceci pourrait être expliqué par l'âge moyen des vaches examinées ( $\geq 5$  ans) et l'indifférence à la maladie (aucun programme de surveillance et de contrôle). Il convient de noter que presque toutes les vaches laitières sont importées. En fait, la maladie peut être considérée comme barrière commerciale où l'examen des animaux est demandé aux frontières considérant ses pertes économiques significatives (Hailat et al., 2012). En outre, la coopération internationale devrait avoir lieu pour aider les pays qui manquent des capacités agricoles et des laboratoires pour diagnostiquer la maladie et pour procéder à un programme de surveillance et de contrôle approprié.

Parmi les techniques de diagnostic de la paratuberculose, les faibles sensibilités obtenues avec ELISA (8%) et ZN (7.5%) par rapport à l'histopathologie peuvent être expliqués par le fait qu'un nombre significatif d'animaux avait des lésions focales limitées (deux premiers grades) contenant aucune ou seulement quelques bacilles acido-résistants (BAAR) limitées la plupart du temps à la sous-muqueuse. Selon Kurade et autres 2004, les grades des lésions n'ont pas montré un rapport avec la durée de l'infection ; rencontrant des lésions précoces avec des BAAR. D'ailleurs, on a signalé que l'histopathologie a été considérée un meilleur indicateur de la paratuberculose que la bactériologie chez les moutons (Kurade et al., 2004).

L'étude histologique a révélé des variations dans l'extension des lésions, la composition des cellules épithélioïdes, géantes multinucléées et des lymphocytes ainsi que le nombre de mycobactéries présentes avec une prédominance des lésions tuberculoïdes caractérisées par des

cellules épithélioïdes avec peu de MAP. Ce résultat est en accord avec les constatations de (Clarke et Little, 1996; Pérez et al., 1996; Clarke, 1997; Krüger et al., 2015).

Puisque, les critères diagnostiques peuvent varier entre les institutions (Huda et Jensen, 2003b) ; le diagnostic subclinique précis a besoin de plus d'un test pour compléter le diagnostic histopathologique. Nous avons prouvé précédemment qu'un antisérum polyclonal qui a été produit en inoculant MAP détruite à la chaleur, pour être utile, comme moyen de diagnostic, pour la détection de MJ dans le tissu infecté. Des ganglions lymphatiques préfémoreaux et cervicaux et des échantillons de foie obtenus à partir des porcs infectés en intraveineuse par *M. bovis* ont été colorés avec des anticorps polyclonaux de MAP. Les tissus étaient exempts de réactivité positive une fois évalués aux mêmes dilutions qui ont démontré une positivité dans les tissus infectés par MAP (Stabel, 1997b; Hailat et al., 2012). Dans la présente étude, nous avons utilisé le même anticorps pour accomplir nos résultats histopathologiques.

La prévalence de la paratuberculose dans les bovins en Australie, en Nouvelle Zélande, Europe, et aux Etats-Unis s'étend de 10 à 60% (Harris et Barletta, 2001a). Cependant, les études indiquent une prévalence de troupeau s'étendant de 0% en Norvège et en Suède à 22% des troupeaux de cheptels laitiers aux Etats-Unis et peuvent atteindre 41.8% (Collins, 1994; Johnson-Ifeorundu et al., 2000; Sternberg et Viske, 2002; Djønne et al., 2003). Deux études menées en Hollande ont indiqué une prévalence de 50-70% dans des troupeaux de vaches laitières dans les provinces nordiques. Nielsen et autres 2000 a rapporté une prévalence de troupeau de 70% dans les troupeaux de vaches laitières danois. La paratuberculose a été rapporté chez les moutons au Maroc (Benazzi et al., 1995b) et un cas de paratuberculose pigmentée chez le mouton en Arabie Saoudite (Mahmoud et al., 2002). Cependant, en Egypte, Salem et autres 2005 ont rapporté une occurrence de la paratuberculose de 16.7% chez les vaches locales et de 85.7% chez des vaches Holstein élevées en Egypte (Salem et al., 2005). Dans une étude précédente effectuée en Jordanie, nous avons rapporté une prévalence de paratuberculose de 60% chez des vaches apparemment saines (Hailat et al., 2012). Basé sur ces données, la MJ subclinique dans les bovins apparemment sains en Algérie est dans la gamme sinon relativement élevée, suggérant qu'il faut prendre les mesures nécessaires pour contrôler la propagation de cette menace cachée.

Des modèles sensiblement différents de l'occurrence de la maladie ont été obtenus utilisant divers tests dans cette étude, (excepté l'histopathologie et l'IHC de l'iléum). L'occurrence de la

maladie était élevée utilisant l'histopathologie (54%) et IHC (51%), cependant, une faible occurrence a été détectée utilisant ZN et l'ELISA. De tels résultats probablement contradictoires sont dû en grande partie du fait que la méthode de ZN détecte seulement les organismes intacts, tandis que les techniques d'immunohistochimie identifient en outre les antigènes mycobactériens libres, les fragments de cellules, et les microorganismes changés avec des parois cellulaires altérées (Coetsier et al., 1998). L'avantage principal de l'IHC est la visualisation simultanée de l'antigène et des changements pathologiques. La technique est également appropriée pour l'identification des agents à culture difficile ou des agents qui ont besoin d'une longue durée d'incubation pour l'identification. L'IHC a été décrite pour l'identification de MAP in situ dans des échantillons de tissus de chèvres et de bovins inclus dans la paraffine (Thoresen et al., 1994). Dans les cas de changements post mortem, les coupes histologiques peuvent contenir des bactéries mortes, qui peuvent plus être cultivées mais sont facilement détectées au moyen d'IHC. Bien que plus laborieuse et longue, l'IHC soit un supplément valable dans le diagnostic d'une maladie insidieuse et chronique telle que le paratuberculose.

Beaucoup d'auteurs ont proposé que la classification des lésions histologiques (grades) selon différents modèles histologiques puisse être employée pour classer les stades de la maladie puis qu'elles se corrèlent avec l'état subclinique des animaux à différentes phases du développement de l'infection chez les moutons, les chèvres, et les lapins (Buergelt et Ginn, 2000; Kurade et al., 2004). L'évaluation et la classification de la paratuberculose basée sur des résultats histologiques a été employée dans plusieurs études indépendantes comprenant des études que nous avons effectuées précédemment avec des moutons et des bovins en Jordanie (Hailat et al., 2010; Hailat et al., 2012) et dans deux études chez les moutons en Espagne (Pérez et al., 1996; Perez et al., 1999). Dans une étude d'infection naturelle de lapin menée au R-U, (Beard et al., 2001) les lésions ont été classées dans seulement deux groupes léger et sévère. En outre, Buergelt et autres (2000) a étudié la paratuberculose chez le bison nord-américain et a classé les lésions dans trois catégories comme positif, suspect, et négatif (Buergelt et Ginn, 2000). Des lésions ont été classées par catégorie dans cinq groupes dans une étude similaire des chèvres naturellement infectées réalisée en Espagne par Perez (Perez et al., 1996; Corpa et al., 2000).

Dans la présente étude, les mêmes critères d'évaluation décrits ci-dessus compatibles avec la paratuberculose ont été appliqués. La combinaison de ces critères avec la classification en stades d'IHC a donné une sensibilité significativement élevée.

Les résultats obtenus à partir de l'examen des ganglions lymphatiques mésentérique utilisant l'histopathologie (22%) ont montré une différence significative avec ceux obtenus avec l'intestin (iléum ; 54%) et avec les résultats de la technique d'IHC (49% ; Tableau 3). Ceci pourrait être expliqué par la structure histologique spéciale des ganglions lymphatiques et ainsi, la difficulté d'évaluer des infiltrations lymphocytaires, qui limite la véritable évaluation de l'infiltration. Ainsi, ayant des sections d'iléum est suffisant pour l'examen par l'histopathologie.

Il est intéressant de signaler qu'en utilisant l'IHC, les résultats étaient en corrélation avec ceux obtenus par l'histopathologie et ont reflété la relation entre la réaction immunitaire et les changements histologiques chronologiques (Sigurdardottir et al., 1999; Kurade et al., 2004). Les résultats obtenus avec l'IHC ont montré l'utilité de cette technique pour la détection des antigènes bactériens. D'autre part, on a observé une corrélation significative des prélèvements de tissu d'intestin (iléum) 51% et des GLMs correspondants 49% utilisant cette technique (tableau 3). On a également signalé que l'examen d'IHC avec des anticorps s'est avéré utile et sensible pour détecter des macrophages, et a facilité la classification des lésions (Corpa et al., 2000).

Les données présentées ont montré une corrélation entre l'histopathologie et l'IHC ; ainsi, nous pouvons employer les deux techniques ou choisir seulement l'histopathologie. Bien que cette technique est considérée comme bon moyen de diagnostic une fois associée à d'autres méthodes diagnostiques immunologiques particulièrement du type d'immunité à médiation cellulaire (Stabel, 1997b; Lee et al., 2001).

Quoique rapporté comme moyen rapide pour le diagnostic de la paratuberculose, la technique de ZN n'a montré aucune valeur pratique dans les cas subcliniques 12 (7.5%) et 10 (6%) pour l'iléum et les échantillons de GLMs, respectivement. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Salem qui a confirmé que cette technique n'est pas fiable et montre un grand pourcentage de réactions faux négatives (Salem et al., 2005).

La technique d'ELISA avait détecté seulement 24 (8%) sur 300 sérums examinés (tableau 2). Comparé à d'autres techniques (54% pour l'histopathologie et 51% pour l'IHC), la séroprévalence utilisant le test d'ELISA est considérée très basse. La réaction immunitaire humorale se produit tard au cours de l'infection de MJ, ainsi l'ELISA détecte des anticorps sériques chez des animaux aux tardives.

Nos résultats corrélés avec la faible sensibilité de la technique rapportée par beaucoup d'auteurs (Nielsen et al., 2000). En considérant le « concept d'iceberg » de la MJ, nous proposons de classer nos résultats en vaches ELISA positives (en tant que cas cliniques) et les vaches positives par histopathologie et IHC (en tant que cas subcliniques). Mettant en considération la composition de la population cible, on rapporte que la technique ELISA est le meilleur test à des fins de dépistage. Ceci a été expliqué par Nielsen qui a proposé que, dans une population infectée avec beaucoup d'animaux avec une infection latente, la sensibilité de l'ELISA est très élevée, mais la sensibilité de la culture est assez faible (Nielsen et al., 2000). En outre, les résultats obtenus sont en accord avec l'étude publiée par Al Hajri qui a rapporté 2-4.5% séropositifs dans des cas subcliniques de MJ dans les bovins (Al Hajri et Alluwaimi, 2007).

Bien que cette étude soit limitée à une région (wilaya) et ne démontre pas la prévalence globale de la paratuberculose bovine en Algérie, elle apporte l'information que la maladie existe et est facilement diagnostiquée par des méthodes existantes.

Nous concluons que la MJ subclinique s'est produit dans les bovins en Algérie (Tiaret) à un taux élevé basé sur des examens d'IHC et d'histopathologie. Bien que, l'histopathologie exige un personnel qualifié et plusieurs fois de lecture, c'est une technique très sensible et peu coûteuse. En outre, l'examen des échantillons d'iléums est suffisant pour le diagnostic de MJ (sans GLMs).

Cette étude représente la première étude en profondeur de la présence de la MJ dans les bovins en Algérie. Nous croyons que ce problème soit sous-diagnostiquée et un problème subclinique significatif en Afrique du Nord.

## Références bibliographiques :

- Ackermann, M. R., Cheville, N. F. and Deyoe, B. L. (1988). Bovine ileal dome lymphoepithelial cells: endocytosis and transport of *Brucella abortus* strain 19. *Veterinary pathology*, **25**, 28-35.
- Adams, D. O. (1976). The granulomatous inflammatory response. A review. *The American Journal of Pathology*, **84**, 164-191.
- Adams, J. L. and Czuprynski, C. J. (1994). Mycobacterial cell wall components induce the production of TNF- $\alpha$ , IL-1, and IL-6 by bovine monocytes and the murine macrophage cell line RAW 264.7. *Microbial pathogenesis*.
- Adúriz, J. J., Juste, R. A. and Cortabarria, N. (1995). Lack of mycobactin dependence of mycobacteria isolated on Middlebrook 7H11 from clinical cases of ovine paratuberculosis. *Veterinary microbiology*, **45**, 211-217.
- Ahmad, F., Tobias, E., Amr, E.-S. and Michael, Z. (2015). Improvement of sensitivity for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (MAP) detection in bovine fecal samples by specific duplex F57/IC real-time and conventional IS900 PCRs after solid culture enrichment. *Tropical Animal Health and Production*, **47**, 721-726.
- Al Hajri, S. and Alluwaimi, A. (2007). ELISA and PCR for evaluation of subclinical paratuberculosis in the Saudi dairy herds. *Veterinary microbiology*, **121**, 384-385.
- Aleksandersen, M., Hein, W. R. and Landsverk, T. (1990). Distribution of lymphocyte subsets in the large intestinal lymphoid follicles of lambs. *Immunology*.
- Allen, S., Sotos, J., Sylte, M. J. and Czuprynski, C. J. (2001). Use of Hoechst 33342 staining to detect apoptotic changes in bovine mononuclear phagocytes infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, **8**, 460-464.
- Aly, S. S., Anderson, R. J., Whitlock, R. H., Fyock, T. L., McAdams, S., Adaska, J. M., Jiang, J. and Gardner, I. A. (2009). Reliability of environmental sampling to quantify *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis on California free-stall dairies. *Journal of Dairy Science*, **92**, 3634-3642.
- Amal, O. A. and Michele, S. S. (2002). A phagosome of one's own: a microbial guide to life in the macrophage. *Current opinion in microbiology*, **5**, 56-61.
- Anderson, J. L., Meece, J. K. and Koziczkowski, J. J. (2007). *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in scavenging mammals in Wisconsin. *Journal of wildlife ...*
- Antognoli, M., Hirst, H., Garry, F. and Salman, M. (2007). Immune response to and faecal shedding of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis in young dairy calves, and the association between test results in the calves and the infection status of their dams. *Zoonoses and Public health*, **54**, 152-159.
- Ashutosh, W., Graham, J. H. and Shigetoshi, E. (2012). Opportunities for Improved Serodiagnosis of Human Tuberculosis, Bovine Tuberculosis, and Paratuberculosis. *Veterinary Medicine International*, **2012**.
- Ashwani, T., John, A. V., Ian, R. D., Greg, P. K. and Alfons, W. (2008). Estimate of the direct production losses in Canadian dairy herds with subclinical *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection. *The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne*, **49**, 569-576.
- Astari-Dequeker, C., Diaye, E. N. N., Cabec, V. L., Rittig, M. G., Prandi, J. and Maridonneau-Parini, I. (1999). The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *Infection and immunity*, **67**, 469-477.
- Atreya, R., Bülte, M., Gerlach, G. F. and Goethe, R. (2014). Facts, myths and hypotheses on the zoonotic nature of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. ... *of Medical Microbiology*.
- 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.

- Badi, F. A., Al Haroon, A. I. and Alluwaimi, A. M. (2010). The  $\gamma\delta$  cells as marker of non-seroconverted cattle naturally infected with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Research in veterinary science*, **88**, 72-76.
- Bannantine, J. P., Li, L., Mwangi, M. and Cote, R. (2014). Complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis, isolated from human breast milk. *Genome* ....
- Bannantine, J. P. and Stabel, J. R. (2002). Killing of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis within macrophages. *BMC microbiology*, **2**, 2.
- Bannantine, J. P., Zhang, Q., Li, L. L. and Kapur, V. (2003). Genomic homogeneity between *Mycobacterium avium* subsp. avium and *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis belies their divergent growth rates. *BMC microbiology*.
- Barclay, R., Ewing, D. F. and Ratledge, C. (1985). Isolation, identification, and structural analysis of the mycobactins of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*, and .... *Journal of bacteriology*.
- Barclay, R. and Ratledge, C. (1983). Iron-binding compounds of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, and mycobactin-dependent *M. paratuberculosis* and *M. avium*. *Journal of bacteriology*.
- Beard, P., Stevenson, K., Pirie, A., Rudge, K., Buxton, D., Rhind, S., Sinclair, M., Wildblood, L., Jones, D. and Sharp, J. (2001). Experimental Paratuberculosis in Calves following Inoculation with a Rabbit Isolate of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Journal of clinical microbiology*, **39**, 3080-3084.
- Beard, P. M., Rhind, S. M., Sinclair, M. C., Wildblood, L. A., Stevenson, K., McKendrick, I. J., Sharp, J. M. and Jones, D. G. (2000). Modulation of  $\gamma\delta$  T cells and CD1 in *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection. *Veterinary immunology and immunopathology*, **77**, 311-319.
- Bech-Nielsen, S., Jorgensen, J. B., Ahrens, P. and Feld, N. (1992). Diagnostic accuracy of a *Mycobacterium phlei*-absorbed serum enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of bovine paratuberculosis in dairy cows. *Journal of clinical microbiology*, **30**, 613-618.
- Begara-McGorum, I., Wildblood, L. A., Clarke, C. J., Connor, K. M., Stevenson, K., McInnes, C. J., Sharp, J. M. and Jones, D. G. (1998). Early immunopathological events in experimental ovine paratuberculosis. *Veterinary immunology and immunopathology*, **63**, 265-287.
- Begg, D., O'Brien, R., Mackintosh, C. and Griffin, J. (2005). Experimental infection model for Johne's disease in sheep. *Infection and immunity*, **73**, 5603-5611.
- Begg, D. J., de Silva, K., Carter, N., Plain, K. M., Purdie, A. and Whittington, R. J. (2011). Does a Th1 over Th2 dominance really exist in the early stages of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infections? *Immunobiology*, **216**, 840-846.
- Benazzi, S., Berrada, J. and Schliesser, T. (1995a). First Report of Paratuberculosis (Johne's Disease) in Sheep in Morocco. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, **42**, 339-344.
- Benazzi, S., Berrada, J. and Schliesser, T. (1995b). First report of paratuberculosis (Johne's disease) in sheep in Morocco. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, **42**, 339-344.
- Bendixen, P. H., Bloch, B. and Jorgensen, J. B. (1981). Lack of intracellular degradation of *Mycobacterium paratuberculosis* by bovine macrophages infected in vitro and in vivo: light microscopic and electron microscopic observations. *American journal of veterinary research*, **42**, 109-113.
- Benedictus, G., Dijkhuizen, A. and Stelwagen, J. (1987). Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. *Veterinary Record*, **121**, 142-146.
- Berghaus, R. D., Farver, T. B., Anderson, R. J., Jaravata, C. C. and Gardner, I. A. (2006). Environmental Sampling for Detection of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis on Large California Dairies. *Journal of Dairy Science*, **89**, 963-970.
- Billman- Jacobe, H., Carrigan, M., Cockram, F., Corner, L., Gill, I., Hill, J., Jessep, T., Milner, A. and Wood, P. (1992). A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Australian veterinary journal*, **69**, 25-28.
- Boelaert, F., Walravens, K., Biron, P. and Vermeersch, J. P. (2000). Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population. *Veterinary* ....

- Bolton, M., Pillars, R., Kaneene, J., Mauer, W. and Grooms, D. (2011). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in naturally exposed dairy heifers and associated risk factors. *Journal of dairy science*, **94**, 4669-4675.
- Borghesi, C., Regoli, M., Bertelli, E. and Nicoletti, C. (1996). MODIFICATIONS OF THE FOLLICLE-ASSOCIATED EPITHELIUM BY SHORT-TERM EXPOSURE TO A NON-INTESTINAL BACTERIUM. *The Journal of Pathology*, **180**, 326-332.
- Brown, C., Baker, D. and Barker, I. (2007). Alimentary system. *Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals*, **2**, 1-296.
- Brugère-Picoux, J. (2012). Actualités sur la paratuberculose bovine. *Bull Acad Vét France*.
- Buergelt, C. D. and Ginn, P. E. (2000). The histopathologic diagnosis of subclinical Johne's disease in North American Bison (*Bison bison*). *Veterinary Microbiology*, **77**, 325-331.
- Buergelt, C. D., Hall, C., McEntee, K. and Duncan, J. R. (1978). Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. *Veterinary pathology*, **15**, 196-207.
- Buergelt, C. D., Williams, E., Monif, G. R., Pinedo, P. and Decker, J. H. (2006). Nested polymerase chain reaction and prenatal detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (MAP) in bovine allantoic fluid and fetuses. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, **4**, 232.
- C, L., La, R., P, W., Ka, A., McGREGOR, H. and Rj, W. (2004). Intrauterine and transmammary transmission of *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis in sheep. *Australian Veterinary Journal*, **82**, 504-508.
- Cardona, P. J. (2009). A dynamic reinfection hypothesis of latent tuberculosis infection. *Infection*.
- Carvalho, I. A., Pietralonga, P. A. G., Schwarz, D. G. G., Faria, A. C. S. and Moreira, M. A. S. (2012). Short communication: Recovery of viable *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from retail pasteurized whole milk in Brazil. *Journal of Dairy Science*, **95**, 6946-6948.
- Cha, S. B., Park, H. T. and Shin, M. K. (2013). Analysis of Transcriptional Profiles to Discover Biomarker Candidates in *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis-Infected Macrophages, RAW 264.7. *Journal of microbiology and biotechnology*, **23**, 1167-1175.
- Chastel, M. (2008a). Épidémiologie de la paratuberculose des ruminants: conséquences sur les mesures de contrôle et de prévention.
- Chastel, M. (2008b). Épidémiologie de la paratuberculose des ruminants: conséquences sur les mesures de contrôle et de prévention. *Épidémiologie de la paratuberculose des ruminants: conséquences sur les mesures de contrôle et de prévention*.
- Cheville, N. F., Hostetter, J., Thomsen, B. V., Simutis, F., Vanloubbeeck, Y. and Steadham, E. (2001). Intracellular trafficking of *Mycobacterium avium* ss. paratuberculosis in macrophages. *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, **108**, 236-243.
- Chiodini, R., Van Kruiningen, H. and Merkal, R. (1984a). Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects [Cattle, *Mycobacterium paratuberculosis*]. *Cornell Veterinarian*.
- Chiodini, R., Van Kruiningen, H., Thayer, W., Merkal, R. and Coutu, J. (1984b). Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences*, **29**, 1073-1079.
- Chiodini, R. J. (1989). Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clinical Microbiology Reviews*.
- Chiodini, R. J. (1993). Abolish *Mycobacterium paratuberculosis* strain 18. *Journal of clinical microbiology*, **31**, 1956-1958.
- Chiodini, R. J., Chamberlin, W. M., Sarosiek, J. and McCallum, R. W. (2012). Crohn's disease and the mycobacterioses: A quarter century later. Causation or simple association? *Critical Reviews in Microbiology*, **38**, 52-93.
- Cirillo, J. D., Falkow, S. and Tompkins, L. S. (1997). Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infection and ....*
- Clark, M. A., Hirst, B. H. and Jepson, M. A. (1998). M-cell surface beta1 integrin expression and invasion-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infection and immunity*, **66**, 1237-1243.

- Clarke, C. J. (1997). The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *Journal of comparative pathology*, **116**, 217-261.
- 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.
- Coetsier, C., Havaux, X., Mattelard, F., Sadatte, S., Cormont, F., Buergelt, K., Limbourg, B., Latinne, D., Bazin, H. and Denef, J.-F. (1998). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in infected tissues by new species-specific immunohistological procedures. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, **5**, 446-451.
- Colgrove, G., Thoen, C., Blackburn, B. and Murphy, C. (1989). Paratuberculosis in cattle: a comparison of three serologic tests with results of fecal culture. *Veterinary microbiology*, **19**, 183-187.
- Collins, M. and Sockett, D. (1993). Accuracy and economics of the USDA-licensed enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **203**, 1456.
- Collins, M., Sockett, D., Ridge, S. and Cox, J. (1991). Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for Johne's disease. *Journal of clinical microbiology*, **29**, 272-276.
- Collins, M. T. (1994). Clinical approach to control of bovine paratuberculosis. *JOURNAL-AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION*, **204**, 208-208.
- Collins, M. T. (2011). Diagnosis of paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, **27**, 581-591.
- Collins, M. T., Gardner, I. A., Garry, F. B., Roussel, A. J. and Wells, S. J. (2006). Consensus recommendations on diagnostic testing for the detection of paratuberculosis in cattle in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **229**, 1912-1919.
- Collins, M. T., Kenefick, K. B., Sockett, D. C., Lambrecht, R. S., McDonald, J. and Jorgensen, J. B. (1990). Enhanced radiometric detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by using filter-concentrated bovine fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, **28**, 2514-2519.
- Collins, M. T., Sockett, D. C. and Goodger, W. J. (1994). Herd prevalence and geographic distribution of, and risk factors for, bovine paratuberculosis in Wisconsin. *JOURNAL- ....*
- 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.
- Corner, L. A. L., Pfeiffer, D. U. and Abbott, K. A. (2004). The respiratory tract as a hypothetical route of infection of cattle with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Australian veterinary journal*, **82**, 170-173.
- Corpa, J. M., Garrido, J., García Marín, J. F. and Pérez, V. (2000). Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *Journal of comparative pathology*, **122**, 255-265.
- Corpa, J. M., Juste, R. A., Marín, J. F. and Reyes, E. (2001). Distribution of Lymphocyte Subsets in the Small Intestine Lymphoid Tissue of 1- Month- Old Lambs. *Anatomia*.
- Costanzo, G., Pinedo, F. A., Mon, M. L., Viale, M., Gil, A., Illia, M. C., Gioffré, A., Arese, A., Travería, G. and Romano, M. I. (2012). Accuracy assessment and screening of a dairy herd with paratuberculosis by three different ELISAs. *Veterinary microbiology*, **156**, 183-188.
- Cottreau. (1970). La paratuberculose des Ruminants. *Cahiers de Médecine Vétérinaire*, **43**, 275-289.
- Coussens, P. M. (2001). *Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system. *Animal Health Research Reviews*, **2**, 141-162.
- Coussens, P. M. (2004). Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in cattle. *Infection and immunity*.
- Cristian, P., Alessio, S., Luigi, B., Viviana, G., Matteo, R., Norma, A., Anna, B., Andrea, U. and Paola, R. (2015). Identification of immunoreactive proteins of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *PROTEOMICS*, **15**, 813-823.
- David, J., Barkema, H. W., Mortier, R., Ghosh, S. and De Buck, J. (2014). Gene expression profiling and putative biomarkers of calves 3 months after infection with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Veterinary immunology and immunopathology*, **160**, 107-117.
- De Buck, J., Shaykhutdinov, R., Barkema, H. W. and Vogel, H. J. (2014). Metabolomic profiling in cattle experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis.

- de Silva, K., Begg, D. J., Plain, K. M., Purdie, A. C., Kawaji, S., Dhand, N. K. and Whittington, R. J. (2013). Can early host responses to mycobacterial infection predict eventual disease outcomes? *Preventive veterinary medicine*, **112**, 203-212.
- Dehkordi, A. J., Karimi, I. and Khosravi, M. (2009). A comparison of ELISA and histopathology for the detection of paratuberculosis in dairy cattle. *Comparative Clinical Pathology*, **18**, 413-417.
- Djønne, B., Jensen, M., Grant, I. and Holstad, G. (2003). Detection by immunomagnetic PCR of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from dairy goats in Norway. *Veterinary microbiology*, **92**, 135-143.
- Dobson, B., Liggett, S., O'Brien, R. and Griffin, J. (2013). Innate immune markers that distinguish red deer (*Cervus elaphus*) selected for resistant or susceptible genotypes for Johne's disease. *Vet Res*, **44**.
- Douglas, J. B. and Richard, J. W. (2008). Experimental animal infection models for Johne's disease, an infectious enteropathy caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *The Veterinary Journal*, **176**, 129-145.
- Dreier, S., Khol, J. L., Stein, B., Fuchs, K., Güttler, S. and Baumgartner, W. (2006). Serological, Bacteriological and Molecularbiological Survey of Paratuberculosis (Johne's Disease) in Austrian Cattle. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, **53**, 477-481.
- Eisenberg, S., Veldman, E., Rutten, V. and Koets, A. (2015). A longitudinal study of factors influencing the result of a *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* antibody ELISA in milk of dairy cows. *Journal of dairy science*, **98**, 2345-2355.
- Eisenberg, S. W. F., Nielen, M. and Santema, W. (2010). Detection of spatial and temporal spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment of a cattle farm through bio-aerosols. *Veterinary ...*
- Elisabeth, A. P. (2011). Paratuberculosis Vaccination. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, **27**, 573580.
- Elise, A. L., Adel, M. T., Paul, M. C., John, P. B., Yrjo, T. G., Robab, K., Ling-ling, L., Vivek, K. and Srinand, S. (2014). Screening of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mutants for attenuation in a bovine monocyte-derived macrophage model. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **4**.
- Elise, A. L., John, P. B., Aníbal, A., Don Sanjiv, A. and Srinand, S. (2012). Identification and Characterization of a Spore-Like Morphotype in Chronically Starved *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis* Cultures. *PLoS ONE*, **7**.
- Eltholth, M. M., Marsh, V. R., Winden, S. V. and Guitian, F. J. (2009). Contamination of food products with *Mycobacterium avium paratuberculosis*: a systematic review. *Journal of Applied Microbiology*, **107**, 1061-1071.
- Eppleston, J. and Windsor, P. A. (2007). Lesions attributed to vaccination of sheep with Gudair for the control of ovine paratuberculosis: post farm economic impacts at slaughter. *Australian veterinary journal*, **85**, 129-133.
- Espejo, L. A., Godden, S., Hartmann, W. L. and Wells, S. J. (2012). Reduction in incidence of Johne's disease associated with implementation of a disease control program in Minnesota demonstration herds. *Journal of dairy science*, **95**, 4141-4152.
- Fang, Y., Wu, W.-H., Pepper, J. L., Larsen, J. L., Marras, S. A., Nelson, E. A., Epperson, W. B. and Christopher-Hennings, J. (2002). Comparison of real-time, quantitative PCR with molecular beacons to nested PCR and culture methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine fecal samples. *Journal of clinical microbiology*, **40**, 287-291.
- Ferrouillet, C., Wells, S. J., Hartmann, W. L., Godden, S. M. and Carrier, J. (2009). Decrease of Johne's disease prevalence and incidence in six Minnesota, USA, dairy cattle herds on a long-term management program. *Preventive veterinary medicine*, **88**, 128-137.
- Finlay, B. B. and Cossart, P. (1997). Exploitation of Mammalian Host Cell Functions by Bacterial Pathogens. *Science*, **276**, 718-725.
- Franck, B., Maria Laura, B., Marie Françoise, T. and Laurence, A. G. (2005). Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium*-intracellulare complex (MAC). *Veterinary research*, **36**, 411-436.

- Frost, A. J., Bland, A. P. and Wallis, T. S. (1997). The early dynamic response of the calf ileal epithelium to *Salmonella typhimurium*. *Veterinary Pathology Online*.
- Fry, M. P., Kruze, J. and Collins, M. T. (2008). Evaluation of Four Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for the Diagnosis of Bovine Paratuberculosis in Chilean Dairy Herds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **20**, 329-332.
- Fujimura, Y. (1986). Functional morphology of microfold cells (M cells) in Peyer's patches. *Gastroenterologia Japonica*, **21**, 325-334.
- Fujimura, Y. and Owen, R. L. (1996). M cells as portals of infection: clinical and pathophysiological aspects. *Infectious agents and disease*, **5**, 144-156.
- Garcia Marin, J., Benazzi, S., Perez, V. and Badiola, J. (1992). Study of the entrance of *M. paratuberculosis* in the lambs intestinal mucosa using immunohistochemical methods for antigen detection. *Proceedings of the Third International Colloquium of Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Providence, RI*, pp. 370-377.
- Gasteiner, J., Awad-Masalmeh, M. and Baumgartner, W. (2000). *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in cattle in Austria, diagnosis with culture, PCR and ELISA. *Veterinary microbiology*.
- Gebert, A., Fassbender, S., Werner, K. and Weissferdt, A. (1999). The Development of M Cells in Peyer's Patches Is Restricted to Specialized Dome-Associated Crypts. *The American Journal of Pathology*, **154**, 1573-1582.
- Gebert, A. and Posselt, W. (1997). Glycoconjugate expression defines the origin and differentiation pathway of intestinal M-cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*.
- Ghosh, J., Larsson, P. and Singh, B. (2009). Sporulation in mycobacteria. *Proceedings of the ....*
- Gillan, S., O'Brien, R., Hughes, A. D. and Griffin, J. F. T. (2010). Identification of immune parameters to differentiate disease states among sheep infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Clinical and vaccine immunology*, **17**, 108-117.
- Gilmour, N. J. L., Nisbet, D. I. and Brotherston, J. G. (1965). Experimental oral infection of calves with *Mycobacterium johnei*. *Journal of comparative pathology*.
- Glawischnig, W., Awad-Masalmeh, M., Khaschabi, D. and Schönbauer, M. (2004). [Detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis from the testicles of a clinically infected breeding animal]. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, **117**, 136-139.
- Goepfert, C., Regenscheit, N., Schumacher, V., Roos, S., Rossier, C., Baehler, C., Schmitt, S. and Posthaus, H. (2014). *Mycobacterium avium* Subsp. *avium* infection in four veal calves: differentiation from intestinal tuberculosis. *BioMed research international*, **2014**, 715841.
- González, J., Geijo, M., Garcia-Pariente, C., Verna, A., Corpa, J., Reyes, L., Ferreras, M., Juste, R., Marin, J. G. and Pérez, V. (2005). Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. *Journal of comparative pathology*, **133**, 184-196.
- Gordon, S. and Andrew, P. W. (1996). Mycobacterial virulence factors. *Journal of Applied Bacteriology*, **81**, 10S-22S.
- Grange, J. M. (1988). *Mycobacteria and human disease*. Edward Arnold (Publishers) Ltd.
- Grant, I. R., Ball, H. J. and Rowe, M. T. (2002). Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Applied and environmental microbiology*, **68**, 2428-2435.
- Green, E., Tizard, M., Moss, M., Thompson, J., Winterbourne, D., McFadden, J. and Hermon-Taylor, J. (1989a). Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate or *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Research*, **17**, 9063-9073.
- Green, E. P., Tizard, M. L. V., Moss, M. T., Thompson, J., Winterbourne, D. J., McFadden, J. J. and Hermon-Taylor, J. (1989b). Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate or *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Research*, **17**, 9063-9073.
- Griebel, P. J. and Hein, W. R. (1996). Expanding the role of Peyer's patches in B-cell ontogeny. *Immunology today*.

- Groenendaal, H. and Galligan, D. (1999). Economical consequences of Johne's disease control programs. *Center of Animal Health and Productivity School of Veterinary Medicine University of Pennsylvania*.
- Guicharnaud, M. (2009). Prevalence of paratuberculosis in dairy cattle herd worldwide: review and analysis. *Doctorate in Veterinary Medicine Thesis*.
- Gumber, S., Taylor, D. L., Marsh, I. B. and Whittington, R. J. (2009). Growth pattern and partial proteome of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis during the stress response to hypoxia and nutrient starvation. *Veterinary microbiology*.
- Hailat, N., Hemida, H., Hananeh, W., Stabel, J., Rezig, F., Jaradat, S. and Al-Saleh, A.-A. (2012). Investigation on the occurrence and pathology of paratuberculosis (Johne's disease) in apparently healthy cattle in Jordan. *Comparative Clinical Pathology*, **21**, 879-888.
- Hailat, N. Q., Hananeh, W., Metekia, A. S. and Stabel, J. R. (2010). Pathology of subclinical paratuberculosis (Johne's disease) in Awassi sheep with reference to its occurrence in Jordan. *Vet Med*.
- Harris, N. B. and Barletta, R. G. (2001a). *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in Veterinary Medicine. *Clinical Microbiology Reviews*, **14**, 489-512.
- Harris, N. B. and Barletta, R. G. (2001b). *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in Veterinary Medicine. *Clinical microbiology reviews*.
- Hathaway, L. J. and Kraehenbuhl, J. P. (2000). The role of M cells in mucosal immunity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **57**, 323-332.
- Hendrick, S. H., Duffield, T. F., Kelton, D. F., Leslie, K. E., Lissemore, K. D. and Archambault, M. (2005). Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays performed on milk and serum samples for detection of paratuberculosis in lactating dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **226**, 424-428.
- Hermon-Taylor, J. (2009). *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, Crohn's disease and the Doomsday scenario. *Gut pathogens*.
- Hett, E. C. and Rubin, E. J. (2008). Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*.
- Hines, M. E., Turnquist, S. E., Ilha, M. R., Rajeev, S., Jones, A. L., Whittington, L., Bannantine, J. P., Barletta, R. G. G., Gröhn, Y. T. T., Katani, R., Talaat, A. M., Li, L. and Kapur, V. (2014). Evaluation of novel oral vaccine candidates and validation of a caprine model of Johne's disease. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, **4**, 26.
- Holstad, G., Sigurðardóttir, Ó., Storset, A. K., Tharaldsen, J., Nyberg, O., Schönheit, J. and Djønné, B. (2005). Description of the Infection Status in a Norwegian Cattle Herd Naturally Infected by *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Acta Veterinaria Scandinavica*.
- Hope, A., Kluver, P., Jones, S. and Condrón, R. (2000). Sensitivity and specificity of two serological tests for the detection of ovine paratuberculosis. *Australian veterinary journal*, **78**, 850-856.
- Hostetter, J., Steadham, E., Haynes, J., Bailey, T. and Cheville, N. (2003). Phagosomal maturation and intracellular survival of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in J774 cells. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **26**, 269-283.
- Hostetter, J. M., Steadham, E. M., Haynes, J. S., Bailey, T. B. and Cheville, N. F. (2002). Cytokine effects on maturation of the phagosomes containing *Mycobacteria avium* subspecies paratuberculosis in J774 cells. *FEMS immunology and medical microbiology*, **34**, 127-134.
- Huda, A. and Jensen, H. (2003a). Comparison of histopathology, cultivation of tissues and rectal contents, and interferon-gamma and serum antibody responses for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Journal of comparative pathology*, **129**, 259-267.
- Huda, A. and Jensen, H. E. (2003b). Comparison of Histopathology, Cultivation of Tissues and Rectal Contents, and Interferon-gamma and Serum Antibody Responses for the Diagnosis of Bovine Paratuberculosis. *Journal of Comparative Pathology*, **129**, 259-267.
- Hüttner, K., Krämer, U. and Kleist, P. (2011). Effect of Map-vaccination in ewes on body condition score, weight and Map-shedding. *Berliner und Munchener tierärztliche Wochenschrift*, **125**, 449-451.

- Imperiale, B., Zumárraga, M. and Gioffré, A. (2012). Disease caused by non-tuberculous mycobacteria: diagnostic procedures and treatment evaluation in the North of Buenos Aires Province. *Revista argentina de ...*
- Jeffrey, S. S. and Andrea, M. C. (2003). Macrophage signalling upon mycobacterial infection: the MAP kinases lead the way. *Cellular Microbiology*, **5**, 133-142.
- Johnson-Ifearulundu, Y. and Kaneene, J. (1997). Epidemiology and economic impact of subclinical Johne's disease: a review. *Veterinary Bulletin (United Kingdom)*.
- Johnson-Ifearulundu, Y., Kaneene, J., Sprecher, D., Gardiner, J. and Lloyd, J. (2000). The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on days open in Michigan, USA, dairy cows. *Preventive veterinary medicine*, **46**, 171-181.
- Joseph, O. F. (2003). Mycobacterial Aerosols and Respiratory Disease. *Emerging Infectious Diseases*, **9**.
- Jude, E. U., Paula, C., Robert, H. W., Perry, L. H., Phillip, S. and Raymond, W. S. (2003). Efficacy of commercial and field-strain *Mycobacterium paratuberculosis* vaccinations with recombinant IL-12 in a bovine experimental infection model. *Vaccine*, **21**, 3101-3109.
- Jungersen, G., Mikkelsen, H. and Grell, S. N. (2011). Use of the johnin PPD interferon-gamma assay in control of bovine paratuberculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **148**.
- Junwook, C., John, A. V., Alfons, W. and Gregory, P. K. (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.
- Juste, R. A., Elguezal, N., Pavón, A., Garrido, J. M., Geijo, M., Sevilla, I., Cabriada, J. L., Tejada, A., García-Campos, F., Casado, R., Ochotorena, I. and Izeta, A. (2008). Association between *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis DNA in blood and cellular and humoral immune response in inflammatory bowel disease patients and controls. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, **13**, 247-254.
- Kaufmann, S. H. E. (2001). How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol*, **1**, 20-30.
- Kennedy, D. and Benedictus, G. (2001). Control of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in agricultural species. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, **20**, 151-179.
- Kennedy, D. and Nielsen, S. S. (2007). Report from the first IDF ParaTB Forum. *The ParaTB Forum*, pp. 3-7.
- Kernéis, S., Bogdanova, A., Kraehenbuhl, J.-P. and Pringault, E. (1997). Conversion by Peyer's Patch Lymphocytes of Human Enterocytes into M Cells that Transport Bacteria. *Science*, **277**, 949-952.
- Khalifeh, M. and Stabel, J. (2013). Clinical disease upregulates expression of CD40 and CD40 ligand on peripheral blood mononuclear cells from cattle naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, **20**, 1274-1282.
- Kheirandish, R., Tafti, A. K. and Hosseini, A. (2009). Classification of lesions and comparison of immunohistochemical and acid fast staining in diagnosis of naturally occurring paratuberculosis in goats. *Small Ruminant Research*, **87**, 8185.
- Khol, J. L., Pinedo, P. J. and Buergelt, C. D. (2012). The collection of lymphatic fluid from the bovine udder and its use for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in the cow. *Journal of Veterinary ...*
- Körmendy, B. (1994). The effect of vaccination on the prevalence of paratuberculosis in large dairy herds. *Veterinary microbiology*, **41**, 117-125.
- Krüger, C., Köhler, H. and Liebler-Tenorio, E. M. (2015). Cellular composition of granulomatous lesions in gut-associated lymphoid tissues of goats during the first year after experimental infection with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Veterinary immunology and immunopathology*, **163**, 33-45.
- Kudahl, A. B. and Nielsen, S. S. (2009). Effect of paratuberculosis on slaughter weight and slaughter value of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **92**, 4340-4346.
- Kudahl, A. B., Østergaard, S. and Sørensen, J. T. (2007). A stochastic model simulating paratuberculosis in a dairy herd. *Preventive veterinary ...*

- Kurade, N. P., Tripathi, B. N., Rajukumar, K. and Parihar, N. S. (2004). Sequential Development of Histologic Lesions and Their Relationship with Bacterial Isolation, Fecal Shedding, and Immune Responses during Progressive Stages of Experimental Infection of Lambs with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Pathology Online*, **41**, 378-387.
- Lambrecht, R. S., Carriere, J. F. and Collins, M. T. (1988). A model for analyzing growth kinetics of a slowly growing *Mycobacterium* sp. *Applied and environmental microbiology*, **54**, 910-916.
- Landsverk, T. (1981). The epithelium covering Peyer's patches in young milk-fed calves: an ultrastructural and enzyme histochemical investigation [epithelial cells, microfolds, endocytosis]. *Acta Veterinaria Scandinavica (Denmark)*.
- Landsverk, T. (1987). The follicle-associated epithelium of the ileal Peyer's patch in ruminants is distinguished by its shedding of 50 nm particles. *Immunol Cell Biol.*
- Landsverk, T. (1988). Phagocytosis and transcytosis by the follicle-associated epithelium of the ileal Peyer's patch in calves. *Immunology and cell biology*, **66 ( Pt 4)**, 261-268.
- Landsverk, T., Halleraker, M. and Aleksandersen, M. (1991). The intestinal habitat for organized lymphoid tissues in ruminants; comparative aspects of structure, function and development. *Veterinary immunology ...*
- Larsen, H. J. and Landsverk, T. (1986). Distribution of T and B lymphocytes in jejunal and ileocaecal Peyer's patches of lambs. *Research in veterinary science*, **40**, 105-111.
- Laukkanen, H., Soini, H. and Kontunen-Soppela, S. (2000). A mycobacterium isolated from tissue cultures of mature *Pinus sylvestris* interferes with growth of Scots pine seedlings. *Tree ...*
- Lee, H., Stabel, J. and Kehrl Jr, M. (2001). Cytokine gene expression in ileal tissues of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Veterinary immunology and immunopathology*, **82**, 73-85.
- Liebler, E. M., Lemke, C. and Pohlenz, J. F. (1995). Ultrastructural study of the uptake of ferritin by M cells in the follicle-associated epithelium in the small and large intestines of pigs. *American journal of veterinary research*, **56**, 725-730.
- Liebler, E. M., Pohlenz, J. F. and Cheville, N. F. (1988a). Gut-associated lymphoid tissue in the large intestine of calves. II. Electron microscopy. *Veterinary Pathology Online*.
- Liebler, E. M., Pohlenz, J. F. and Woode, G. N. (1988b). Gut-associated lymphoid tissue in the large intestine of calves. I. Distribution and histology. *Veterinary Pathology Online*.
- Lilenbaum, W., Marassi, C. and Oelemann, W. (2007). Paratuberculosis: an update. *Brazilian Journal of Microbiology*, **38**, 580-590.
- Logar, K., Bandelj, P., Starič, J., Lapanje, A. and Ocepek, M. (2012). Evaluation of combined high-efficiency DNA extraction and real-time PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in subclinically infected dairy cattle: comparison with faecal culture, milk real-time PCR and milk ELISA. *BMC veterinary research*, **8**, 49.
- Lombard, J. E., Garry, F. B., McCluskey, B. J. and Wagner, B. A. (2005). Risk of removal and effects on milk production associated with paratuberculosis status in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **227**, 1975-1981.
- Lombard, J. E., Wagner, B. A., Smith, R. L., McCluskey, B. J., Harris, B. N., Payeur, J. B., Garry, F. B. and Salman, M. D. (2006). Evaluation of Environmental Sampling and Culture to Determine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Distribution and Herd Infection Status on US Dairy Operations. *Journal of Dairy Science*, **89**, 4163-4171.
- Lowden, S. and Heath, T. (1992). Lymph pathways associated with Peyer's patches in sheep. *Journal of anatomy*.
- Lu, Z., Schukken, Y. H., Smith, R. L. and Gröhn, Y. T. T. (2013). Using vaccination to prevent the invasion of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy herds: a stochastic simulation study. *Preventive veterinary medicine*, **110**, 335-345.
- Lybeck, K. R., Løvoll, M., Johansen, T. B., Olsen, I., Storset, A. K. and Valheim, M. (2013). Intestinal Strictures, Fibrous Adhesions and High Local Interleukin-10 Levels in Goats Infected Naturally with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of Comparative Pathology*, **148**, 157-172.

- MacHugh, D. E., Taraktsoglou, M., Killick, K. E., Nalpas, N. C., Browne, J. A., Park, S., Hokamp, K., Gormley, E. and Magee, D. (2012). Pan-genomic analysis of bovine monocyte-derived macrophage gene expression in response to in vitro infection with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Vet Res*, **43**, 25.
- Mackintosh, C. G., Labes, R. E. and Griffin, J. F. T. (2005). The effect of Johne's vaccination on tuberculin testing in farmed red deer (*Cervus elaphus*). *New Zealand Veterinary Journal*, **53**, 216-222.
- 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 Comput Biol*, **10**, e1003414.
- Mahmoud, O. M., Haroun, E. M., Elfaki, M. G. and Abbas, B. (2002). Pigmented paratuberculosis granulomata in the liver of sheep. *Small Ruminant Research*, **43**, 211-217.
- Manning, E. and Collins, M. (2001). pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, **20**, 133-150.
- Manning, E. J., Steinberg, H., Krebs, V. and Collins, M. T. (2003). Diagnostic testing patterns of natural *Mycobacterium paratuberculosis* infection in pygmy goats. *Canadian journal of veterinary research*, **67**, 213.
- Marcé, C. (2010). Modelling the transmission of and effectiveness of control measures for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy herds, Rennes 1.
- Marfell, B. J., O'Brien, R. and Griffin, J. F. T. (2013). Global gene expression profiling of monocyte-derived macrophages from red deer (*Cervus elaphus*) genotypically resistant or susceptible to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Developmental & Comparative Immunology*, **40**, 210-217.
- Mark, P. K., Ralph, G., Anja, H., Ellruth, M., Manfred, R., Gareth, G. and Peter, V. W. (2001). Characterization of the intracellular survival of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: phagosomal pH and fusogenicity in J774 macrophages compared with other mycobacteria. *Cellular Microbiology*, **3**, 551-566.
- Marra, A. and Isberg, R. R. (1997). Invasin-dependent and invasin-independent pathways for translocation of *Yersinia pseudotuberculosis* across the Peyer's patch intestinal epithelium. *Infection and immunity*.
- Martinson, S. A., Hanna, P. E., Ikede, B. O., Lewis, J. P., Miller, L. M., Keefe, G. P. and McKenna, S. L. (2008). Comparison of bacterial culture, histopathology, and immunohistochemistry for the diagnosis of Johne's disease in culled dairy cows. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **20**, 51-57.
- McDonald, W., Ridge, S., Hope, A. and Condron, R. (1999). Evaluation of diagnostic tests for Johne's disease in young cattle. *Australian Veterinary Journal*, **77**, 113-119.
- McKenna, S., Keefe, G. P., Barkema, H. and Sockett, D. (2005). Evaluation of three ELISAs for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using tissue and fecal culture as comparison standards. *Veterinary microbiology*, **110**, 105-111.
- McNab, W. B., Meek, A. H., Duncan, J. R., Brooks, B. W., Van Dreumel, A. A., Martin, S. W., Nielsen, K. H., Sugden, E. A. and Turcotte, C. (1991). An evaluation of selected screening tests for bovine paratuberculosis. *Canadian journal of veterinary research*, **55**, 252.
- Merkal, R., Kopecky, K., Larsen, A. and Ness, R. (1970). Immunologic mechanisms in bovine paratuberculosis. *American journal of veterinary research*, **31**, 475-485.
- Merkal, R. S. and Curran, B. J. (1974). Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Applied microbiology*.
- Middleton, A. M., Chadwick, M. V., Nicholson, A. G., Dewar, A., Groger, R. K., Brown, E. J. and Wilson, R. (2000). The role of *Mycobacterium avium* complex fibronectin attachment protein in adherence to the human respiratory mucosa. *Molecular Microbiology*, **38**, 381-391.
- Mitchell, R. M., Medley, G. F., Collins, M. T. and Schukken, Y. H. (2012). A meta-analysis of the effect of dose and age at exposure on shedding of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) in experimentally infected calves and cows. *Epidemiology and Infection*, **140**, 231-246.

- Momotani, E., Romona, N. M., Yoshihara, K., Momotani, Y., Hori, M., Ozaki, H., Eda, S. and Ikegami, M. (2012). Molecular pathogenesis of bovine paratuberculosis and human inflammatory bowel diseases. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **148**, 55-68.
- Momotani, E., Whipple, D. L. and Thiermann, A. B. (1988). Role of M cells and macrophages in the entrance of Mycobacterium paratuberculosis into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Veterinary Pathology* ....
- Mortier, R. A., Barkema, H. W. and De Buck, J. (2015). Susceptibility to and diagnosis of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection in dairy calves: A review. *Preventive veterinary medicine*.
- Mortier, R. A., Barkema, H. W., Negron, M. E., Orsel, K., Wolf, R. and De Buck, J. (2014a). Antibody response early after experimental infection with Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in dairy calves. *Journal of dairy science*, **97**, 5558-5565.
- Mortier, R. A. R., Barkema, H. W., Wilson, T. A., Sajobi, T. T., Wolf, R. and Buck, J. (2014b). Dose-dependent interferon-gamma release in dairy calves experimentally infected with Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **161**, 205-210.
- Mortier, R. A. R., Barkema, H. W., Wilson, T. A., Sajobi, T. T., Wolf, R. and De Buck, J. (2014c). Dose-dependent interferon-gamma release in dairy calves experimentally infected with Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **161**, 205-210.
- Motiwalla, A. S., Strother, M., Theus, N. E., Stich, R. W., Byrum, B., Shulaw, W. P., Kapur, V. and Sreevatsan, S. (2005). Rapid detection and typing of strains of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from broth cultures. *Journal of clinical microbiology*, **43**, 2111-2117.
- Mowat, A. M. I. and Viney, J. L. (1997). The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunological reviews*.
- Münster, P., Fechner, K., Völkel, I. and von Buchholz, A. (2013). Distribution of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis in a German zoological garden determined by IS900 semi-nested and quantitative real-time PCR. *Veterinary* ....
- Mura, M., Bull, T. J. and Evans, H. (2006). Replication and long-term persistence of bovine and human strains of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis within Acanthamoeba polyphaga. *Applied and* ....
- Murray, E. H., Judith, R. S., Raymond, W. S., Frank, G., Adel, M. T., Douwe, B., Geart, B., William, C. D., Geoffrey, W. d. L., Ian, A. G., Ramon, A. J., Vivek, K., Ad, K., Jim, M., Greg, P. and Robert, H. W. (2007). Experimental challenge models for Johne's disease: a review and proposed international guidelines. *Veterinary microbiology*, **122**, 197-222.
- Muskens, J., Barkema, H. W. and Russchen, E. (2000). Prevalence and regional distribution of paratuberculosis in dairy herds in The Netherlands. *Veterinary* ....
- Mutwiri, G., Watts, T. and Lew, L. (1999). Ileal and jejunal Peyer's patches play distinct roles in mucosal immunity of sheep. *IMMUNOLOGY*- ....
- Nabil, H., Houari, H., Wael, H., Judy, S., Feth Eddine, R., Saied, J. and Abed-Alrahman, A.-S. (2011). Investigation on the occurrence and pathology of paratuberculosis (Johne's disease) in apparently healthy cattle in Jordan. *Comparative Clinical Pathology*, **21**, 879-888.
- 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. *The Lancet*, **364**, 1039-1044.
- NcNab, W. B., Meek, A. H. and Duncan, J. R. (1991). An epidemiological study of paratuberculosis in dairy cattle in Ontario: study design and prevalence estimates. *Canadian journal of* ....
- Nebbia, P., Robino, P., Zoppi, S. and Meneghi, D. D. (2006). Detection and excretion pattern of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in milk of asymptomatic sheep and goats by Nested-PCR. *Small Ruminant Research*, **66**, 116-120.
- Nedjraoui, D. (2003). Profil fourrager. *Université des Sciences et de la Technologie H. Boumediène (USTHB). Alger*.
- Neutra, M. R., Mantis, N. J. and Kraehenbuhl, J.-P. (2001). Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat Immunol*, **2**, 1004-1009.

- Neutra, M. R., Pringault, E. and Kraehenbuhl, J.-P. (1996). ANTIGEN SAMPLING ACROSS EPITHELIAL BARRIERS AND INDUCTION OF MUCOSAL IMMUNE RESPONSES. *Annual Review of Immunology*, **14**, 275-300.
- Nielsen, S. S. (2010). 24 Immune-based Diagnosis of Paratuberculosis. *Paratuberculosis: organism, disease, control*, 284.
- Nielsen, S. S., Thamsborg, S. M., Houe, H. and Bitsch, V. (2000). Bulk-tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds. *Preventive veterinary medicine*, **44**, 1-7.
- 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. *Veterinary microbiology*.
- Nielsen, S. S. and Toft, N. (2009). A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Preventive veterinary medicine*.
- Nielsen, S. S. and Toft, N. (2011). Effect of management practices on paratuberculosis prevalence in Danish dairy herds. *Journal of Dairy Science*, **94**, 1849-1857.
- Nisbet, D. I., Gilmour, N. J. L. and Brotherston, J. G. (1962). Quantitative studies of mycobacterium johnei in tissues of sheep: III Intestinal histopathology. *Journal of Comparative Pathology ...*
- Nordlund, K., Goodger, W., Pelletier, J. and Collins, M. (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.
- Obli Rajendran, V., Lakshmanaswamy, G., Berty Samuel Masilamony, R. and Singamani Masilamoni, S. (2012). Slaughterhouse prevalence of ovine paratuberculosis in Southern India. *Tropical Animal Health and Production*, **45**, 1063-1069.
- Olöf, G. S., Mette, V. and Charles Mc, L. P. (2004). Establishment of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in the intestine of ruminants. *Advanced drug delivery reviews*, **56**, 819-834.
- Olsen, I., Sigurðardóttir, Ó. and Djønné, B. (2002). Paratuberculosis with special reference to cattle A review. *Veterinary quarterly*, **24**, 12-28.
- Otilia, V. V., Roberto, J. B. and Sergio, G. (2002). Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochemical Journal*, **366**, 689-704.
- Ott, S. L., Wells, S. J. and Wagner, B. A. (1999). Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Preventive veterinary medicine*, **40**, 179-192.
- Ove, F. T., Knut, F. and Øystein, E. (1994). Comparison of Immunohistochemistry, Acid-Fast Staining, and Cultivation for Detection of Mycobacterium Paratuberculosis in Goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **6**, 195-199.
- Owen, R. L. (1999). Uptake and transport of intestinal macromolecules and microorganisms by M cells in Peyer's patches—a personal and historical perspective. *Seminars in immunology*.
- Paar, M., Liebler, E. M. and Pohlenz, J. F. (1992). Uptake of ferritin by follicle-associated epithelium in the colon of calves. *Veterinary Pathology Online*.
- Pak, S. I., Kim, D. and Salman, M. (2003). Estimation of paratuberculosis prevalence in dairy cattle in a province of Korea using an enzyme-linked immunosorbent assay: application of Bayesian approach. *Journal of veterinary science*, **4**, 51-56.
- Paliwal, O. and Reh binder, C. (1981). Ultrastructural studies of paratuberculosis (Johne's disease) in goats. *Acta Veterinaria Scandinavica (Denmark)*.
- Paola, M., Antonio, M. S., Aurea, L., Sara, C., Alessandra, B., Pietrina, L. and Stefania, Z. (2013). Molecular identification of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in oral biopsies of Crohn's disease patients. *Gut Pathogens*, **5**, 18.
- Papadimitriou, J. M. and Spector, W. G. (1971). The origin, properties and fate of epithelioid cells. *The Journal of Pathology*, **105**, 187-203.
- Pappo, J., Steger, H. J. and Owen, R. L. (1988). Differential adherence of epithelium overlying gut-associated lymphoid tissue. An ultrastructural study. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, **58**, 692-697.
- Parsons, K. R., Bland, A. P. and Hall, G. A. (1991). Follicle associated epithelium of the gut associated lymphoid tissue of cattle. *Veterinary Pathology Online*.

- Parsons, K. R., Howard, C. J. and Jones, B. V. (1989). Investigation of bovine gut associated lymphoid tissue (GALT) using monoclonal antibodies against bovine lymphocytes. *Veterinary Pathology* ....
- Pavlik, I., Matlova, L., Bartl, J., Svastova, P. and Dvorska, L. (2000). Parallel faecal and organ Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis culture of different productivity types of cattle. *Veterinary ...*
- Payne, J. and Rankin, J. D. (1961). A comparison of the pathogenesis of experimental Johne's disease in calves and cows. *Research in Veterinary Science*, **2**, 175-179.
- Perez, V., Marín, J. and Badiola, J. (1996). Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *Journal of comparative pathology*, **114**, 107-122.
- Pérez, V., Marín, J. F. G. and Badiola, J. J. (1996). Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *Journal of comparative pathology*, **114**, 107-122.
- Perez, V., Tellechea, J., Corpa, J., Gutierrez, M. and García, M. J. (1999). Relation between pathologic findings and cellular immune responses in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *American journal of veterinary research*, **60**, 123-127.
- Peter, A. W. and Richard, J. W. (2010). Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *The Veterinary Journal*, **184**, 37-44.
- Peter, V.-W. and Ralph, G. (1999). Pathogenesis of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infections in ruminants: still more questions than answers. *Microbes and Infection*, **1**, 1121-1127.
- Pickup, R. W., Rhodes, G. and Arnott, S. (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 .... *Applied and ...*
- Pieters, J. (2001). Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, **3**, 249-255.
- Pinedo, P., Rae, D., Williams, J., Donovan, G., Melendez, P. and Buergelt, C. (2008). Association among results of serum ELISA, faecal culture and nested PCR on milk, blood and faeces for the detection of paratuberculosis in dairy cows. *Transboundary and emerging diseases*, **55**, 125-133.
- Plain, K. M., Purdie, A. C., Begg, D. J., de Silva, K. and Whittington, R. J. (2010). Toll-like receptor (TLR) 6 and TLR1 differentiation in gene expression studies of Johne's disease. *Veterinary immunology and immunopathology*, **137**, 142-148.
- Plante, Y., Remenda, B. W., Chelack, B. J. and Haines, D. M. (1996). Detection of Mycobacterium paratuberculosis in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by the polymerase chain reaction. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire*, **60**, 115-120.
- Pozzato, N., Gwozdz, J., Gastaldelli, M. and Capello, K. (2011). Evaluation of a rapid and inexpensive liquid culture system for the detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in bovine faeces. *Journal of ...*
- Purdie, A. C., Plain, K. M., Begg, D. J., de Silva, K. and Whittington, R. J. (2012). Expression of genes associated with the antigen presentation and processing pathway are consistently regulated in early Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, **35**, 151-162.
- Raizman, E., Fetrow, J. and Wells, S. (2009). Loss of income from cows shedding Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis prior to calving compared with cows not shedding the organism on two Minnesota dairy farms. *Journal of dairy science*, **92**, 4929-4936.
- Raizman, E. A., Wells, S. J., Godden, S. M., Bey, R. F., Oakes, M. J., Bentley, D. C. and Olsen, K. E. (2004). The Distribution of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis in the Environment Surrounding Minnesota Dairy Farms. *Journal of Dairy Science*, **87**, 2959-2966.
- Raizman, E. A., Wells, S. J., Godden, S. M., Fetrow, J. and Oakes, J. M. (2007). The associations between culling due to clinical Johne's disease or the detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis fecal shedding and the diagnosis of clinical or subclinical diseases in two dairy herds in Minnesota, USA. *Preventive Veterinary Medicine*, **80**, 166-178.

- Ramos-Vara, J. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology Online*, **42**, 405-426.
- Reddacliff, L., Eppleston, J., Windsor, P. and Whittington, R. (2006). Efficacy of a killed vaccine for the control of paratuberculosis in Australian sheep flocks. *Veterinary ...*
- Regoli, M., Borghesi, C., Bertelli, E. and Nicoletti, C. (1994). A morphological study of the lymphocyte traffic in Peyer's patches after an in vivo antigenic stimulation. *The Anatomical Record*, **239**, 47-54.
- Renström, L. H. M., Press, C. M. and Trevelia, W. (1995). Response of leucocyte populations in the ileal Peyer's patch of fetal lambs treated with ferritin per os. *Journal of Immunology ...*
- Reynolds, J. D. and Morris, B. (1983). The evolution and involution of Peyer's patches in fetal and postnatal sheep. *European journal of immunology*.
- Richard, J. W. and Peter, A. W. (2009). In utero infection of cattle with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: A critical review and meta-analysis. *The Veterinary Journal*, **179**, 60-69.
- RIDÉY, D. and Jopling, W. (1966). Classification of Leprosy according to Immunity. A Five-Group System. *International Journal of Leprosy*, **34**, 255-273.
- Rienske, A. R. M., Herman, W. B., Karin, O., Robert, W. and Jeroen De, B. (2014). Shedding patterns of dairy calves experimentally infected with Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. *Veterinary Research*, **45**, 71.
- Ris, D., Hamel, K. and Ayling, J. (1988). The detection of Mycobacterium paratuberculosis in bovine faeces by isolation and the comparison of isolation with the examination of stained smears by light microscopy. *New Zealand veterinary journal*, **36**, 112-114.
- Rosseels, V. and Huygen, K. (2008). Vaccination against paratuberculosis. *Expert Review of Vaccines*, **7**, 817-832.
- Ryan, J. A., Pekka, M., Joanna, D., Andrew, P., Philip, G. and Scott, N. (2014). From mouth to macrophage: mechanisms of innate immune subversion by Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *Veterinary Research*, **45**, 54.
- Saito, H., Tomioka, H., Sato, K. and Tasaka, H. (1989). Identification and partial characterization of Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare by using DNA probes. *Journal of clinical ...*
- Salem, M., Zeid, A. A., Hassan, D., El- Sayed, A. and Zschoeck, M. (2005). Studies on Johne's Disease in Egyptian Cattle. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, **52**, 134-137.
- Salgado, M., Collins, M. T., Salazar, F. and Kruze, J. (2011). Fate of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis after application of contaminated dairy cattle manure to agricultural soils. *Applied and ...*
- Sanchez, M. P. J. (1998). *Méthodes de diagnostic expérimental da la paratuberculose bovine: étude bibliographique et réactualisation*.
- Sangari, F. J., Goodman, J. and Petrofsky, M. (2001). Mycobacterium avium invades the intestinal mucosa primarily by interacting with enterocytes. *Infection and ...*
- Saxegaard, F., Baess, I. and Jantzen, E. (1988). Characterization of clinical isolates of Mycobacterium paratuberculosis by DNA-DNA hybridization and cellular fatty acid analysis. *APMIS*, **96**, 497-502.
- Schaaf, J. and Beerwerth, W. (1960). Die Bedeutung der Generalisation der Paratuberkulose, der Ausscheidung des Erregers mit der Milch und der kongenitalen Uebertragung fuer die Bekämpfung der Seuche. *Rindertuberkulose und Brucellose*, **9**, 115-124.
- Schaik, V. G., Schukken, Y. H. and Crainiceanu, C. (2003). Prevalence estimates for paratuberculosis adjusted for test variability using Bayesian analysis. *Preventive veterinary ...*
- Schorey, J. S., Holsti, M. A., Ratliff, T. L., Allen, P. M. and Brown, E. J. (1996). Characterization of the fibronectin-attachment protein of Mycobacterium avium reveals a fibronectin-binding motif conserved among mycobacteria. *Molecular Microbiology*, **21**, 321-329.
- Schorey, J. S., Li, Q., McCourt, D. W., Bong-Mastek, M., Clark-Curtiss, J. E., Ratliff, T. L. and Brown, E. J. (1995). A Mycobacterium leprae gene encoding a fibronectin binding protein is used for efficient invasion of epithelial cells and Schwann cells. *Infection and immunity*, **63**, 2652-2657.

- 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. (2002). Fibronectin attachment protein is necessary for efficient attachment and invasion of epithelial cells by Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *Infection and immunity*.
- Seitz, S. E., Heider, L. E., Heuston, W. D., Bech-Nielsen, S., Rings, D. M. and Spangler, L. (1989). Bovine fetal infection with Mycobacterium paratuberculosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **194**, 1423-1426.
- Seth, M., Lamont, E. A., Janagama, H. K., Widdel, A., Vulchanova, L., Stabel, J. R., Waters, W. R., Palmer, M. V. and Sreevatsan, S. (2009). Biomarker discovery in subclinical mycobacterial infections of cattle. *PLoS ONE*, **4**, e5478.
- Shannon, A. M., Paul, E. H., Basil, O. I., Jeff, P. L., Lisa, M. M., Greg, P. K. and Shawn, L. B. M. (2008). Comparison of bacterial culture, histopathology, and immunohistochemistry for the diagnosis of Johne's disease in culled dairy cows. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, **20**, 51-57.
- Shawn, L. B. M., Greg, P. K., Ashwani, T., John, V. and Herman, W. B. (2006). Johne's disease in Canada part II: disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers. *The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne*, **47**, 1089-1099.
- Shin, M. K., Shin, S. W., Im, Y. B. and Cho, Y. I. (2015). Whole-Blood Gene-Expression Profiles of Cows Infected with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Reveal Changes in Immune Response and Lipid Metabolism. *Journal of microbiology and biotechnology*, **25**, 255-267.
- Sigur-Dardóttir, 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., Press, C. M., Saxegaard, F. and Evensen, Ø. (1999). Bacterial isolation, immunological response, and histopathological lesions during the early subclinical phase of experimental infection of goat kids with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *Veterinary Pathology Online*, **36**, 542-550.
- Skovgaard, K., Grell, S. N., Heegaard, P. M., Jungersen, G., Pudrith, C. B. and Coussens, P. M. (2006). Differential expression of genes encoding CD30L and P-selectin in cattle with Johne's disease: Progress toward a diagnostic gene expression signature. *Veterinary immunology and immunopathology*, **112**, 210-224.
- Slana, I., Kralik, P., Kralova, A. and Pavlik, I. (2008). On-farm spread of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination. *International journal of food ...*
- Smeed, J., Watkins, C., Gossner, A. and Hopkins, J. (2010). Expression profiling reveals differences in immuno-inflammatory gene expression between the two disease forms of sheep paratuberculosis. *Veterinary immunology and immunopathology*, **135**, 218-225.
- Smith, R. L., Schukken, Y. H., Pradhan, A. K. and Smith, J. M. (2011). Environmental contamination with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in endemically infected dairy herds. *Preventive veterinary ...*
- Soumya, M., Pillai, R., Antony, P., Mukhopadhyay, H. and Rao, V. (2009). Comparison of faecal culture and IS900 PCR assay for the detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in bovine faecal samples. *Veterinary research communications*, **33**, 781-791.
- Stabel, J. (1998). Johne's disease: a hidden threat. *Journal of Dairy Science*, **81**, 283-288.
- Stabel, J. (2000). Transitions in immune responses to Mycobacterium paratuberculosis. *Veterinary Microbiology*, **77**, 465-473.
- Stabel, J., Wells, S. and Wagner, B. (2002). Relationships between fecal culture, ELISA, and bulk tank milk test results for Johne's disease in US dairy herds. *Journal of dairy science*, **85**, 525-531.
- Stabel, J. R. (1995). Temporal effects of tumor necrosis factor-alpha on intracellular survival of Mycobacterium paratuberculosis. *Veterinary immunology and immunopathology*, **45**, 321-332.

- Stabel, J. R. (1996). Production of  $\gamma$ -interferon by peripheral blood mononuclear cells: an important diagnostic tool for detection of subclinical paratuberculosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **8**, 345-350.
- Stabel, J. R. (1997a). An improved method for cultivation of Mycobacterium paratuberculosis from bovine fecal samples and comparison to three other methods. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*.
- Stabel, J. R. (1997b). An improved method for cultivation of Mycobacterium paratuberculosis from bovine fecal samples and comparison to three other methods. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **9**, 375-380.
- Stabel, J. R. (2006). Host responses to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: a complex arsenal. *Animal Health Research Reviews*, **7**, 61-70.
- Stabel, J. R., Waters, W. R., Bannantine, J. P. and Lyashchenko, K. (2011). Mediation of host immune responses after immunization of neonatal calves with a heat-killed Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis vaccine. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, **18**, 2079-2089.
- Stahl, D. A. and Urbance, J. W. (1990). The division between fast-and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. *Journal of Bacteriology*.
- Sternberg, S. and Viske, D. (2002). Control strategies for paratuberculosis in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **44**, 247-249.
- Stewart, D., Vaughan, J., Stiles, P., Noske, P., Tizard, M., Prowse, S., Michalski, W., Butler, K. and Jones, S. (2004). A long-term study in Merino sheep experimentally infected with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: clinical disease, faecal culture and immunological studies. *Veterinary microbiology*, **104**, 165-178.
- Stringer, L. A., Wilson, P. R., Heuer, C. and Mackintosh, C. G. (2013). A randomised controlled trial of Silirim vaccine for control of paratuberculosis in farmed red deer. *Vet. Rec.*
- Subharat, S., Shu, D., Neil Wedlock, D., 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.
- Sweeney, R. W. (1996). Transmission of paratuberculosis. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, **12**, 305-312.
- Sweeney, R. W., Whitlock, R. H. and Rosenberger, A. E. (1992). Mycobacterium paratuberculosis isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. *American journal of veterinary research*, **53**, 477-480.
- Thomsen, V. T., Nielsen, S. S. and Thakur, A. (2012). Characterization of the long-term immune response to vaccination against Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Danish dairy cows. *Veterinary immunology ...*
- Thorel, M., Huchzermeyer, H. and Michel, A. (2001). Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare infection in mammals. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, **20**, 204-218.
- Thorel, M., Huchzermeyer, H., Weiss, R. and Fontaine, J. (1997). Mycobacterium avium infections in animals. Literature review. *Veterinary research*, **28**, 439-447.
- Thorel, M. F. and Krichevsky, M. (1990). Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of Mycobacterium avium, and description of Mycobacterium avium subsp. avium .... *International journal of ...*
- Thoresen, O. F., Falk, K. and Evensen, Ø. (1994). Comparison of immunohistochemistry, acid-fast staining, and cultivation for detection of Mycobacterium paratuberculosis in goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **6**, 195-199.
- Thorne, J. G. and Hardin, L. E. (1997). Estimated prevalence of paratuberculosis in Missouri, USA cattle. *Preventive veterinary medicine*.
- Tiwari, A., VanLeeuwen, J. A. and McKenna, S. L. B. (2006). Johne's disease in Canada Part 1: Clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Canadian veterinary ...*
- Traag, B. A., Driks, A., Stragier, P. and Bitter, W. (2010). Do mycobacteria produce endospores? *Proceedings of the ...*

- Turk, J. L. and Waters, M. F. R. (1971). Immunological significance of changes in lymph nodes across the leprosy spectrum. *Clinical and Experimental Immunology*, **8**, 363-376.
- Valheim, M., Storset, A. K., Aleksersen, M., Brun-Hansen, H. and Press, C. M. (2002). Lesions in Subclinical Paratuberculosis of Goats are Associated with Persistent Gut-associated Lymphoid Tissue. *Journal of Comparative Pathology*, **127**, 194202.
- Van der Giessen, J., Haring, R., Vauclare, E., Eger, A., Haagsma, J. and Van der Zeijst, B. (1992). Evaluation of the abilities of three diagnostic tests based on the polymerase chain reaction to detect Mycobacterium paratuberculosis in cattle: application in a control program. *Journal of clinical microbiology*, **30**, 1216-1219.
- Van Kruiningen, H. J., Chiodini, R., Thayer, W., Coutu, J., Merkal, R. and Runnels, P. (1986). Experimental disease in infant goats induced by aMycobacterium isolated from a patient with Crohn's disease. *Digestive Diseases and Sciences*, **31**, 1351-1360.
- Van Nhieu, G. T., Krukonis, E. S., Reszka, A. A., Horwitz, A. F. and Isberg, R. R. (1996). Mutations in the cytoplasmic domain of the integrin beta1 chain indicate a role for endocytosis factors in bacterial internalization. *The Journal of biological chemistry*, **271**, 7665-7672.
- Vazquez-Torres, A. and Fang, F. C. (2000). Cellular routes of invasion by enteropathogens. *Current opinion in microbiology*, **3**, 54-59.
- Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Baumler, A. J., Falkow, S., Valdivia, R., Brown, W., Le, M., Berggren, R., Parks, W. T. and Fang, F. C. (1999). Extraintestinal dissemination of Salmonella by CD18-expressing phagocytes. *Nature*, **401**, 804-808.
- Ventura, M., Canchaya, C. and Tauch, A. (2007). Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and ...*
- Verlaine, J. T., Michelle, M. G., Hazel, M. M., George, D. and Brett, A. N. (2011). How accurately can we detect Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection? *Journal of Microbiological Methods*, **85**, 18.
- Waters, W. R., Nonnecke, B. J. and Palmer, M. V. (2004). Use of recombinant ESAT-6: CFP-10 fusion protein for differentiation of infections of cattle by Mycobacterium bovis and by M. avium subsp. avium and M. avium subsp. .... *Clinical and ...*
- Weber, M., Verhoeff, J., Van Schaik, G. and Van Maanen, C. (2009). Evaluation of Ziehl–Neelsen stained faecal smear and ELISA as tools for surveillance of clinical paratuberculosis in cattle in the Netherlands. *Preventive veterinary medicine*, **92**, 256-266.
- Weiss, D. J., Evanson, O. A., Moritz, A., Deng, M. Q. and Abrahamsen, M. S. (2002). Differential responses of bovine macrophages to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and Mycobacterium avium subsp. avium. *Infection and immunity*, **70**, 5556-5561.
- Whan, L., Grant, I. R. and Rowe, M. T. (2006). Interaction between Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and environmental protozoa. *BMC microbiology*.
- White, C. I., Birtles, R. J. and Wigley, P. (2010). avium subspecies paratuberculosis in free-living amoebae isolated from fields not used for grazing. *Veterinary Record*.
- Whitlock, R. H. and Buergelt, C. (1996a). Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice*, **12**, 345-356.
- Whitlock, R. H. and Buergelt, C. (1996b). Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, **12**, 345-356.
- Whittington, R. J. (2009). Factors affecting isolation and identification of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from fecal and tissue samples in a liquid culture system. *Journal of clinical microbiology*.
- Whittington, R. J. and Marsh, I. B. (2005). Survival of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in dam water and sediment. *Applied and ....*
- Whittington, R. J., Marshall, D. J. and Nicholls, P. J. (2004). Survival and dormancy of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in the environment. *Applied and ....*
- Whittington, R. J. and Sergeant, E. S. G. (2001). Progress towards understanding the spread, detection and control of Mycobacterium avium subsp para- tuberculosis in animal populations. *Australian Veterinary Journal*.

- Whittington, R. J., Whittington, A. M. and Waldron, A. (2013). Development and validation of a liquid medium (M7H9C) for routine culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to replace modified Bactec 12B medium. *Journal of clinical ...*
- Wilson, D. J., Rossiter, C., Han, H. and Sears, P. (1995). Financial effects of *Mycobacterium paratuberculosis* on mastitis, milk production, and cull rate in clinically normal cows. *Agri-Practice (USA)*.
- Windsor, P. A. (2014). Managing control programs for ovine caseous lymphadenitis and paratuberculosis in Australia, and the need for persistent vaccination. *Veterinary Medicine: Research & Reports*, **5**.
- Windsor, P. A. (2015). Paratuberculosis in sheep and goats. *Veterinary Microbiology*.
- Xiaofei, L., Zhengyu, F., Harris, N. B., Jeffrey, D. C., Herve, B. and Raúl, G. B. (2001). Identification of a secreted superoxide dismutase in *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters*, **202**, 233-238.
- Yoshimura, H. H. and Graham, D. Y. (1988). Nucleic acid hybridization studies of mycobactin-dependent mycobacteria. *Journal of clinical microbiology*.
- You, Q., Verschoor, C. P., Pant, S. D., Macri, J., Kirby, G. M. and Karrow, N. A. (2012). Proteomic analysis of plasma from Holstein cows testing positive for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). *Veterinary immunology and immunopathology*, **148**, 243-251.
- Zhao, B., Collins, M. T. and Czuprynski, C. J. (1997). Effects of gamma interferon and nitric oxide on the interaction of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with bovine monocytes. *Infection and immunity*, **65**, 1761-1766.
- Zhao, B. Y., Czuprynski, C. J. and Collins, M. T. (1999). Intracellular fate of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in monocytes from normal and infected, interferon-responsive cows as determined by a .... *Canadian journal of ...*
- Zhong, L., Taylor, D., Begg, D. and Whittington, R. (2011). Biomarker discovery for ovine paratuberculosis (Johne's disease) by proteomic serum profiling. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, **34**, 315-326.
- zu Bentrup, K. H. and Russell, D. G. (2001). Mycobacterial persistence: adaptation to a changing environment. *Trends in microbiology*.
- 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.
- Zurbrick, B. G., Follett, D. M. and Czuprynski, C. J. (1988). Cytokine regulation of the intracellular growth of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine monocytes. *Infection and immunity*.

## VI. ANNEXES

### Annexe 1 : Caractéristiques et qualités des principaux tests ELISA disponibles.

ELISA	Svanova	IDEXX	Pourquier	Pfizer Santé Animale	Synbiotic Corp.,
Nom déposé	SVANOVIR® ELISA	Herdcheck® <i>M. paratuberculosis</i> ELISA	ELISA Paratuberculosis	Paracheck ELISA®	SERELISA ParaTB®
Antigène	Polysaccharide lipoarabinomannan (LAM)	Cellule entière	Antigène protoplasmatique	Antigène protoplasmatique	
Absorption du sérum	Non <sup>3</sup>	Oui	Oui	Oui	Non
Antigène pour l'absorption du sérum <sup>2</sup>	Non	<i>Mycobacterium phlei</i>	<i>Mycobacterium phlei</i>	<i>Mycobacterium phlei</i>	
Valeur cutt-off	32-53% (OD%)	0,15–0,3 (S /P-value)	60-70% (OD%)		
Spécificité <sup>1</sup> (%)	~ 76	~ 94 / [0,985-0,995]	~ 99	98	
Sensibilité <sup>1</sup> (%)	~ 70	~ 55 / [30-40]	~ 53	27	

## ANNEXE 2 : Protocol d'immunohistochimie M. Paratuberculosis polyclonal de Lapin. (Judy Stabel et Allyn Lambertz).

### Rabbit Polyclonal *M. paratuberculosis* Immunohistology Protocol

Judy Stabel, Allyn Lambertz

#### Reagents:

- Xylene or Propar
- 70%, 95%, and 100% EtOH
- TBS
 

Tris HCl	6g (37.5mM)
Tris Base	1.4g (11.6mM)
NaCl	9g (150mM)
BSA	10g
Distilled Water	to 1L
Tween 20	0.3ml, heat solution to dissolve
- Enzyme Treatment (Intestinal tissue only)
 

Trypsin	0.25g (0.1%)
CaCl <sub>2</sub>	0.25g (0.1%)
Distilled Water	250mls

 Must be made fresh daily
- Hydrogen Peroxide: 3% (Lymph Nodes only)
- Antigen Retrieval (Lymph Nodes only)
 

HCL	1N
-----	----
- Rabbit Primary Antibody
 

Made in house  
or  
*Mycobacterium paratuberculosis* (bovine), DAKO Corporation, Code 312,  
Made in Denmark
- Secondary and Tertiary Antibody and Staining Solution
 

HistoMark RED Phosphatase Kit, Kirkegaard and Perry Laboratories (KPL), # 55-69-00  
Contains: PhThalo RED Solution, Activator Soln, Buffered Substrate, and Contrast Blue  
(this kit stains the *M. ptb* red with a blue background and is what we utilize)  
Or  
Streptavitin-Biotin DAB Staining Kit, DAKO Corporation  
(this kit stains the *M. ptb* brown with a blue (Hematoxylin, not found in the kit) background)
- Counterstain (if utilizing the DAKO kit, is included in the KPL kit)
 

Gill's Hematoxylin, can be found in solution or powdered form from many sources  
Or  
Meyer's Hematoxylin (what we utilize)
- Blueing water (for use with Gill's Hematoxylin)
 

NH <sub>3</sub> OH	1.1ml
Distilled Water	1L
- Scott's Tap Water Substitute (for use with Meyer's Hematoxylin)

Tap Water	1L		
Magnesium sulfate (anhydrous)	10g	or	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O
20g			
Sodium bicarbonate	2g		

Protocol for Intestinal Tissue:

1. Deparaffinize the sections
  - i. 3 changes of Xylene or Propar for 5 min. each
  - ii. 1 change of 100% EtOH for 2 min.
  - iii. 1 change of 95% EtOH for 1 min.
  - iv. 1 change of 70% EtOH for 1 min.
  - v. 1 change of distilled water for 5 min.
2. Rinse in TBS for 5 min.
3. Enzyme treatment: preheat the solution for 20 sec. In a microwave, then incubate slides in it for 20 min. at 37C
4. Rinse in TBS for 5 min.
5. Blocking serum from kit (Normal Goat 10%) approximately 3 drops (enough to cover the tissue) 30 min. at room temperature
6. Pour off liquid
7. Primary antibody, 1:1000, 1.5 hours at 37C (this can be experimented with, I believe that a shorter time and room temperature can be utilized)
8. Rinse in TBS for 5 min.
9. Secondary antibody (Biotinylated link) for 30 min. at room temperature(KPL) or 10 min. at room temperature (DAKO)
10. Rinse in TBS for 5 min.
11. Tertiary antibody (Streptavidin-phosphatase) for 30 min. at room temperature(KPL) or 10 min. at room temperature (DAKO)
12. Rinse in TBS for 5 min.
13. Mix HistoMark Red solution (KPL)(do not mix in advance)  
Mix and let sit (Solution 1):

Distilled water	5ml
Buffer Solution	0.5ml (found in kit)
Levamisole	2 drops

Mix separately (Solution 2):

PhThalo Red	100ul (found in kit)
Activator Solution	100ul (found in kit)

Allow Solution 2 to sit for 3 min., then mix with Solution 1 and use immediately.
14. Place approximately 3 drops of Histomark Red solution on slides for 10 min. at room temperature(KPL) or DAB (DAKO) for 2 to 5 min. at room temperature
15. Rinse in distilled water for 5 min.
16. Counterstain with either Gill's or Meyer's Hematoxylin for 2 min.
17. 3 changes of distilled water, 5 dips each
18. Blue in Blueing water (Gill's) for 30 sec. or Scott's Tap Water (Meyer's) for 30 sec.
19. 3 changes of distilled water, 5 dips each
20. Dehydrate
  - i. 1 change of 95% EtOH for 1 min.
  - ii. 3 changes of 100% EtOH for 1 min. each
  - iii. 3 changes of Xylene or Propar for 1 min. each
21. Coverslip with the appropriate mountant depending on whether Xylene or Propar was utilized.

Protocol for Lymph Nodes:

1. Deparaffinize the sections
  - vi. 3 changes of Xylene or Propar for 5 min. each
  - vii. 1 change of 100% EtOH for 2 min.
  - viii. 1 change of 95% EtOH for 1 min.
  - ix. 1 change of 70% EtOH for 1 min.
  - x. 1 change of distilled water for 5 min.
2. Rinse in TBS for 5 min.
3. Place in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min. at room temperature
4. Rinse in distilled water
5. Antigen Retrieval: Heat 1N HCl to Boiling in a microwave (approximately 2 min.), add the slides gently to the liquid and incubate for 8 min.
6. Rinse in TBS for 5 min.
7. Blocking serum from kit (Normal Goat 10%) approximately 3 drops (enough to cover the tissue) 30 min. at room temperature
8. Pour off liquid
9. Primary antibody, 1:1000, 1.5 hours at 37C (this can be experimented with, I believe that a shorter time and room temperature can be utilized)
10. Rinse in TBS for 5 min.
11. Secondary antibody (Biotinylated link) for 30 min. at room temperature(KPL) or 10 min. at room temperature (DAKO)
12. Rinse in TBS for 5 min.
13. Tertiary antibody (Streptavidin-phosphatase) for 30 min. at room temperature(KPL) or 10 min. at room temperature (DAKO)
14. Rinse in TBS for 5 min.
15. Mix HistoMark Red solution (KPL)(do not mix in advance)  
Mix and let sit (Solution 1):

Distilled water	5ml
Buffer Solution	0.5ml (found in kit)
Levamisole	2 drops

Mix separately (Solution 2):

PhThalo Red	100ul (found in kit)
Activator Solution	100ul (found in kit)

Allow Solution 2 to sit for 3 min., then mix with Solution 1 and use immediately.
16. Place approximately 3 drops of Histomark Red solution on slides for 10 min. at room temperature(KPL) or DAB (DAKO) for 2 to 5 min. at room temperature
17. Rinse in distilled water for 5 min.
18. Counterstain with either Gill's or Meyer's Hematoxylin for 2 min.
19. 3 changes of distilled water, 5 dips each
20. Blue in Blueing water (Gill's) for 30 sec. or Scott's Tap Water (Meyer's) for 30 sec.
21. 3 changes of distilled water, 5 dips each
22. Dehydrate

- iv. 1 change of 95% EtOH for 1 min.
- v. 3 changes of 100% EtOH for 1 min. each
- vi. 3 changes of Xylene or Propar for 1 min. each
21. Coverslip with the appropriate mountant depending on whether Xylene or Propar was utilized.

Rapport-gratuit.com

LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES



**ANNEXE 3. Méthode de préparation d'une solution de formaline  
tamponnée 10%.**

---

<b>Ingrédients</b>	
Formaldéhyde (37-40% solution mère)	100 ml
Eau	900 ml
Phosphate de sodium dibasique $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	4g/L
Phosphate de sodium monobasique $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	6.5g/L

---