

TABLE DES MATIERES

INDEX DES FIGURES.....	5
INDEX DES TABLEAUX.....	6
INTRODUCTION.....	7

PREMIERE PARTIE :

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE DES DONNEES CONCERNANT MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSPECIES PARATUBERCULOSIS ET LE LAIT

I - LE LAIT : UN VECTEUR POTENTIEL ?.....	11
1- Recherches sur le lait naturel.....	11
2- Recherches sur le lait pasteurisé.....	12
II – MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSPECIES PARATUBERCULOSIS :	
UNE RESISTANCE PARTICULIERE ?.....	13
1- Courbes d'inactivation thermique.....	14
2- Evaluation de l'efficacité des traitements thermiques sur des laits contaminés par <i>Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis</i>	17
3- Influence de l'augmentation de la température et/ou du temps de chauffage	22
4- Analyse des contradictions.....	23
a- Inoculats.....	24
Les souches.....	24
Mode d'obtention des cellules.....	24
Taux d'inoculation.....	25
b- Lait.....	26
c- Matériel de chauffage et de refroidissement.....	26

Matériels.....	26
Méthodes de mélange.....	27
Refroidissement.....	28
d- Détection.....	28
5- Hypothèse du « <i>clumping</i> ».....	31
a- Méthodes de « <i>declumping</i> ».....	32
b- Une hypothèse contestée.....	33

DEUXIEME PARTIE :

MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DETECTION STANDARDISEE DANS LE LAIT. RECHERCHE DE CELLULES VIVANTES PAR RT-PCR

I- PRINCIPES DE LA METHODE DE DETECTION.....	39
1- Utilisation du facteur d'élongation EF-Tu.....	41
a- Rappels concernant la synthèse protéique.....	41
L'initiation.....	42
L'élongation.....	42
La terminaison.....	43
b- Les facteurs d'élongation.....	43
Le facteur EF-Tu.....	44
Les sondes Taqman®.....	44
2- Utilisation du gène IS900.....	46
a- Choix d'une sonde fluorescente de type Taqman®.....	47
b- Validation des amorces et de la sonde en PCR quantitative sur ADN de souches.....	48
c- Validation des amorces et de la sonde en RT-QPCR quantitative sur ARN de souches.....	48
3- Démarche expérimentale.....	48

a-	Obtention des amorces.....	49
b-	Etude de la spécificité de la méthode de détection par EF-Tu.....	50
	Choix de la sonde fluorescente de type Taqman®.....	50
	Validation des amorces et de la sonde PCR quantitative sur des ADN de souches.....	51
	Validation des amorces et de la sonde en RT-PCR qualitative sur des ARN de souches.....	51
	Validation de la RT-QPCR sur du lait artificiellement contaminé par <i>Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis</i>	52
c-	Etude de la sensibilité de la méthode de détection.....	52
	Optimisation de gamme étalon d'ARN synthétique.....	52
	Sensibilité de la méthode sur du lait artificiellement contaminé par <i>Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis</i>	53
	Conclusion.....	53
II-	DETERMINATION DE L'ECHANTILLON.....	54
1-	Choix des animaux.....	54
2-	Collecte des laits.....	55
III-	PROTOCOLE EXPERIMENTAL ET RESULTATS.....	56
1-	Q-PCR pour la détection d'IS900.....	56
2-	RT-QPCR pour la détection de EF-Tu.....	57
	a- extraction d'ARNs et d'ADN issus de lait contaminé par <i>Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis</i>	57
	b- RT-QPCR.....	57
3-	Résultats.....	58
	a- Données globales.....	58
	b- Q-PCR ciblée sur IS900.....	58
	c- RT-QPCR ciblée sur EF-Tu.....	59
4-	Discussion des résultats.....	60
	a- L'animal n'est pas excréteur.....	61
	b- Le lait est contaminé mais ne contient aucun organisme viable.....	61

c- La technique de détection est défaillante.....	61
CONCLUSION.....	63
BIBLIOGRAPHIE.....	65
ANNEXES.....	71

INDEX DES FIGURES

<u>Figure 1</u> : Courbe d'inactivation thermique de <i>Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis</i> 63.5°C décrite par Grant et al.(1996).....	14
<u>Figure 2</u> : Courbes d'inactivation thermique de <i>Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis</i> (souche ATCC 43015) dans le lait à 63°C. A- Cellules agrégées. B- Cellules non agrégées (d'après Keswani et Franck, 1998).....	16
<u>Figure 3</u> : Résistance thermique à 63°C des cellules de <i>Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis</i> ayant subi un traitement de <i>declumping</i>	32
<u>Figure 4</u> : Illustration du temps de chauffage d'une sphère de diamètre .025mm [...], 0.5mm [- - -] et 1mm [___] dans un liquide à 72°C avec un nombre de Nusselt Nu=2.....	34
<u>Figure 5</u> : Illustration du temps de chauffage d'une sphère de diamètre .025mm [...] et 0.5mm [- - -] selon deux scénarios extrêmes de transfert thermique lent (Nu = 2) et rapide (Nu = 10).....	34
<u>Figure 6</u> : Principales étapes de la démarche expérimentale.....	40
<u>Figure 7</u> : Etape d'initiation de la synthèse protéique.....	42
<u>Figure 8</u> : Etape d'élongation de la synthèse protéique.....	43
<u>Figure 9</u> : Principe de la technique Taqman®.....	45
<u>Figure 10</u> : Courbe de l'intensité lumineuse au cours des cycles de RT-QPCR.....	46
<u>Figure 11</u> : Structure du gène IS900 d'après Doran et al (1997).....	47
<u>Figure 12</u> : Exemple de courbe étalon.....	52
<u>Figure 13</u> : Programme de la réaction de polymérisation en chaîne.....	56
<u>Figure 14</u> : Courbes obtenues avec les échantillons positifs en QPCR IS900.....	59
<u>Figure 15</u> : Courbes obtenues par la RT-QPCR EF-Tu.....	60

INDEX DES TABLEAUX

<u>Tableau 1</u> : Valeurs de D exprimées en secondes en fonction de la température sur des laits artificiellement contaminés par <i>Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis</i>	17
<u>Tableau 2</u> : Comparaison de l'efficacité des traitements thermiques LTLT et HTST sur du lait artificiellement contaminé par <i>Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis</i> à travers la valeur des réductions décimales données par différents auteurs....	20
<u>Tableau 3</u> : Récapitulatif des méthodes et techniques employées pour les essais de thermorésistance de <i>Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis</i>	21
<u>Tableau 4</u> : Données de pasteurisations réalisées dans un pasteurisateur de laboratoire de type Franklin (nécessitant un chauffage de 55 s pour atteindre la température de 72°C) publiées par Grant et al., 1999 et modifiées par Lund et al., 2002.....	22
<u>Tableau 5</u> : Résultats généraux du test.....	58

INTRODUCTION

Depuis plusieurs années et grâce à la mise en place de plans de prophylaxie stricts, on a pu assister à un très net recul des maladies bovines soumises à déclaration que sont la tuberculose, la brucellose et la leucose. Les efforts fournis ont permis de relâcher la pression prophylactique au profit d'une épidémiologie plus adaptée aux incidences actuelles de ces maladies.

En contrepartie, une attention nouvelle a pu être portée à des maladies jugées jusqu'alors de moindre importance. C'est le cas pour l'IBR (*Infectious Bovine Rhinotracheitis*), le BVD (*Bovine Viral Diarrhea*) ou bien encore la paratuberculose qui est une maladie cachectisante d'évolution lente due à une mycobactérie affectant les ruminants (*Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*) et dont le symptôme majeur est une diarrhée incoercible. Cette maladie a été au cœur de nombreux débats à cause de son rôle possible dans l'étiologie de la maladie de Crohn. En effet, cette maladie humaine se traduit par une inflammation intestinale chronique et présente de nombreuses analogies avec la paratuberculose (annexe 1). De plus, l'agent causal de la paratuberculose a été retrouvé à plusieurs reprises dans des prélèvements réalisés sur des patients atteints de la maladie de Crohn.

Même si les études les plus récentes tendent à montrer que *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* n'aurait qu'un très faible rôle, non spécifique dans l'apparition de la maladie de Crohn, le débat n'est toujours pas clos et de nombreuses équipes de chercheurs se sont intéressées aux propriétés spécifiques de Map. Ces travaux avaient pour but de valider les procédés garantis de l'innocuité de certaines denrées alimentaires d'origine alimentaire et plus particulièrement du lait dans la mesure où, dès 1993, il a été prouvé que *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* pouvait se retrouver dans le lait d'animaux fortement infectés.

Le point crucial à propos de cette mycobactérie est la difficulté à la mettre en évidence puisque aucune méthode ne permet à l'heure actuelle de la détecter avec une sensibilité acceptable de façon rapide.

Nous nous attacherons donc à effectuer une synthèse des études concernant la thermorésistance de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* puisque c'est là un enjeu majeur du domaine de la sécurité alimentaire et nous mettrons en avant les zones d'ombre et les contradictions qui persistent.

Nous aborderons ensuite la technique développée par les laboratoires Danone pour tenter de mettre en évidence des cellules vivantes à l'aide d'un test rapide et quantitatif utilisant la RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerisation Chain Reaction*) ciblée sur EF-Tu, un élément essentiel du génome des micro-organismes et présent en grande quantité. Nous pourrions ainsi voir les résultats obtenus par l'utilisation de ce test sur le lait d'animaux potentiellement contaminé par *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*.

PREMIERE PARTIE

**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE
DES DONNEES CONCERNANT
MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSPECIES
PARATUBERCULOSIS
ET LE LAIT**

I- LE LAIT : UN VECTEUR POTENTIEL ?

Au fur et à mesure que les données concernant *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* s'accumulaient, naissaient de nouvelles interrogations et le lien possible entre la maladie de Crohn et la paratuberculose a poussé différentes équipes de chercheurs à se pencher sur les éventuels vecteurs de la mycobactérie.

La transmission par voie orale étant celle qui avait rassemblé les suffrages, ce sont les denrées alimentaires issus des bovins infectés qui ont été particulièrement observées. Les populations d'éleveurs bovins n'étant pas significativement plus touchées que les autres, la possibilité d'une transmission oro-fécale due à un manque d'hygiène a été écartée. Les possibilités restantes étaient une contamination par le lait ou par la viande et les organes consommables.

Si c'est aujourd'hui le lait qui est au centre des débats de par l'abondance des travaux qui ont été menés, d'autres études sont en cours à l'heure actuelle pour rechercher *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* dans la viande et les tissus consommables par l'homme.

1-Recherches sur le lait naturel.

Plusieurs études ont été menées dans les années 90. Les chiffres sont très différents selon les méthodes de détection employées et les animaux considérés : certains chercheurs ont testé des animaux issus de troupeaux au sein desquels des cas cliniques avaient été enregistrés au préalable, d'autres n'ont pris en compte que les vaches positives (par coproculture ou par sérologie) et enfin une dernière démarche a consisté à prendre des échantillons de façon totalement aléatoire. Quoi qu'il en soit, le point commun de ces études est qu'elles ont montré avant toute chose que l'excrétion dans le lait était subordonnée à l'état clinique des animaux. *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* était ainsi détecté chez 35% des animaux ayant développé des signes cliniques alors que ce taux tombe à 11.6% chez les animaux asymptomatiques.

Une étude de (Streeter et al, 1995) semble montrer que le colostrum est plus facilement vecteur de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* que le lait puisque sur 126 animaux asymptomatiques testés, 36 présentaient des échantillons fécaux positifs et parmi ces mêmes animaux, huit présentaient *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* dans le colostrum contre seulement trois dans le lait.

Selon les techniques de détection utilisées, les taux de prélèvements positifs sont variables mais les taux de contamination restent toujours faibles (entre 2 et 5 ufc /50ml lait). Il va sans dire que ces mesures ne tiennent pas compte de probables contaminations fécales. Hammer, 1999 a utilisé de façon simultanée la culture et la *Polymerisation Chain Reaction* (sonde IS900) pour détecter *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* dans le lait et ses résultats montrent également la présence dans certains cas d'éléments détectables par PCR mais ne présentant aucune croissance. Ceci invite à se montrer prudents vis à vis de la PCR qui peut révéler des « faux » positifs.

Une étude plus récente menée sur des échantillons de lait cru commercialisé en Grande-Bretagne a isolé 4 prélèvements contenant des cellules viables de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* sur 244 testés (Grant et al., 2002a).

Il est à noter en revanche que les mêmes études menées sur des cheptels ovins n'ont montré que très exceptionnellement un passage de mycobactéries dans le lait.

2-Recherches sur le lait pasteurisé

Dans la mesure où il ne semblait pas y avoir de corrélation entre l'apparition de la maladie de Crohn chez l'homme et la consommation de lait cru, il a été évoqué le fait que Map puisse être présent dans le lait pasteurisé.

Une étude datant de 1996 (Millar et al) a montré la présence de *Mycobacterium avium subspecies .paratuberculosis* dans du lait après pasteurisation. Sur les 312 échantillons testés, 22 s'étaient avérés positifs après une détection par PCR IS900. Des mises en culture des échantillons testés ont été entreprises et ont donné des résultats positifs aussi bien parmi les échantillons PCR positifs que parmi ceux initialement négatifs.

On a ainsi trouvé que 50% des échantillons PCR positifs contenaient des éléments capables de générer des colonies, contre 16% au sein des échantillons PCR négatifs.

Des recherches plus larges ont été depuis entreprises sur des laits commercialisés et on a pu obtenir des cultures positives après isolement par PCR. La Food Standard Agency en 2000, a détecté des éléments viables dans 2.1% des échantillons issus du commerce (étude réalisée au Royaume-Uni).

Même s'il n'est pas possible d'exclure dans ce cas une contamination post-pasteurisation, la survie de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* au traitement thermique classique apparaît vraisemblable d'autant plus que d'autres études de vaste envergure ont donné des résultats allant dans le même sens pour les petits ruminants (Grant et al., 2002a).

II- MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSPECIES PARATUBERCULOSIS : **UNE RESISTANCE THERMIQUE PARTICULIERE ?**

La pasteurisation est à l'heure actuelle la méthode utilisée pour obtenir un lait propre à la consommation Cette méthode fait appel à des règles clairement établies et les contaminants de référence pour établir les schémas thermiques de pasteurisation sont *Coxiella burnetti* et *Mycobacterium tuberculosis* (agents responsables respectivement de la fièvre Q et de la tuberculose)

Différents schémas de pasteurisation toutefois équivalents peuvent être utilisés. En fonction de la courbe d'inactivation qui prend en compte la température et la durée d'exposition des microorganismes, certains pays préconisent des températures hautes pendant un temps court, on parle de HTST (*High Temperature Short Time*). C'est le cas de l'Europe où une température de 71.7°C pendant 15 s a été décrétée. Il est cependant possible d'utiliser des températures inférieures mais le temps d'exposition doit alors être augmenté. Les Etats-Unis ont eux adopté ce principe LTLT (*Low Temperature Long Time*) où une température de 63°C est maintenue pendant 30 min.

1-Courbes d'inactivation thermique

Suite à la découverte de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* dans le lait naturel, des interrogations sont nées concernant son comportement vis à vis de la pasteurisation. Mais toutes les recherches visant à mieux connaître ses caractéristiques spécifiques se sont avérées difficiles en raison des particularités de la croissance du microorganisme.

Dès 1993, Chiodini & Hermon Taylor ont montré que *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* pouvait survivre aux traitements thermiques habituellement utilisés, les laits utilisés étaient alors des laits artificiellement contaminés à des doses de 10^3 à 10^5 ufc/ml.

En 1996, Millar et al. réussissent à mettre en évidence le germe dans des laits pasteurisés pris au hasard dans le commerce au Royaume-Uni.

Suite à tous ces résultats, de nombreuses équipes de chercheurs ont tenté d'établir un profil plus précis des caractéristiques de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* et avant toute autre chose de tenter d'établir sa courbe d'inactivation thermique, indicateur majeur du comportement d'un germe au cours des processus de traitement thermique.

Une première courbe a été esquissée en 1996 par Grant et al. et s'est avérée concave et non linéaire comme pouvaient l'être celles des autres organismes.

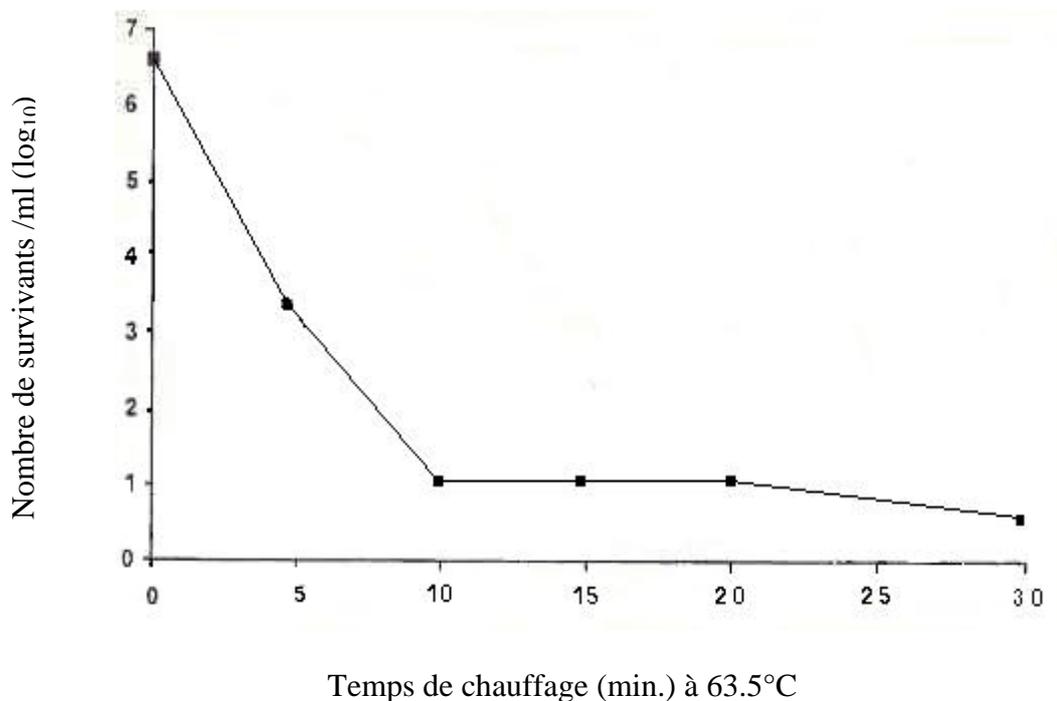


Figure 1 : Courbe d'inactivation thermique de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* à 63.5°C décrite par Grant et al. (1996a)

On peut très nettement observer une chute rapide de la population bactérienne initialement présente puis un très fort ralentissement de l'élimination des cellules survivantes, surtout lors des 25 dernières minutes de chauffage.

Ce phénomène s'explique par ce que l'on appelle le « *clumping* », c'est à dire une agrégation des mycobactéries entre elles ce qui leur permettrait à première vue de mieux résister aux températures élevées. Il est d'ailleurs à noter que ce comportement est reproduit par d'autres souches de mycobactéries dont les courbes d'inactivation sont également concaves (Grant et al., 1996b).

(Sung et Collins, 1998) ont déterminé des valeurs de D (temps de réduction décimal) pour des souches de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* d'origines humaine et

Les courbes d'inactivation ont été obtenues pour différentes souches de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (humaines et bovines) et ont été réalisées à la fois pour des échantillons contenant des cellules agrégées et des cellules non agrégées. On remarque d'ailleurs que le phénomène de *tailing* est plus limité que dans l'étude précédemment évoquée surtout aux températures élevées.

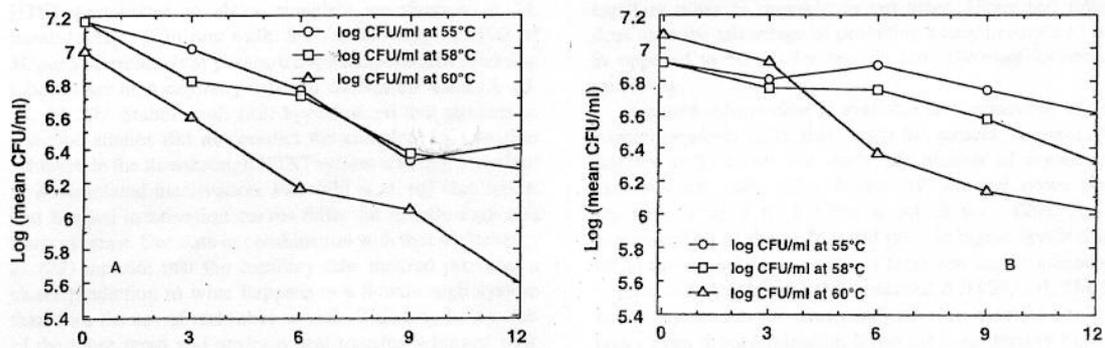


Figure 2 : Courbes d'inactivation thermique de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (souche ATCC 43015) dans le lait à 63°C. A- Cellules agrégées. B- Cellules non agrégées (d'après Keswani et Frank, 1998)

Un même reproche a été fait à toutes ces études menées depuis 1993, il s'agit du fait qu'elles ne reproduisent pas exactement les conditions de pasteurisation pratiquées en milieu industriel et plus précisément l'absence de flux de turbulence comme ceux rencontrés dans les grandes unités de pasteurisation.

Une seule étude a pu mettre en évidence des valeurs de D en pasteurisateur industriel sur de gros volumes de laits (Pearce et al., 2001). Les temps de réduction décimaux moyens ont été évalués à $D_{63^{\circ}\text{C}} = 15 \text{ s} \pm 2.8$ et $D_{66^{\circ}\text{C}} = 5.9 \text{ s} \pm 0.7$. Ainsi, la capacité de destruction d'un traitement thermique à 72°C pendant 15 s a pu être évaluée à plus de 7 log₁₀, ce qui équivaut à un $D_{72^{\circ}\text{C}}$ de 2.03 s. La valeur de Z correspondante était de 8.6°C.

Le tableau 1 recense toutes les valeurs de D présentes dans la littérature.

Température	Sung & Collins, 1998	Keswani & Frank, 1998	Pearce et al, 2001	Lund et al, 2002
60°C		660-690 * 492-846**		
62°C	139.3-324.6			
63°C		96-156* 108-174**	15±2.8	
65°C	41.7-55.7			
66°C			5.9±0.7	
68°C	16.8-23.8			
71°C	9.9-13.1			
72°C			2.03	3

* données obtenues pour des souches d'origine humaine

** données correspondant à des souches d'origine bovine

Tableau 1 : Valeurs de D exprimées en secondes en fonction de la température sur des laits artificiellement contaminés par *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*.

Les valeurs de D obtenues varient énormément selon les méthodologies appliquées et on remarque surtout un fossé entre les résultats de laboratoire et ceux obtenus dans des pasteurisateurs.

2- Evaluation de l'efficacité des traitements thermiques sur des laits contaminés par *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*

L'objectif des études portant sur les processus de pasteurisation pour des laits contaminés par *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* est double. Il s'agit d'une part de s'assurer avant tout de l'inactivation complète d'éléments potentiellement pathogènes

par les méthodes pratiquées habituellement, d'autre part, de comprendre le comportement particulier d'un germe dans les traitements thermiques.

Malheureusement, pour d'évidentes raisons techniques d'approvisionnement, rares sont les études ayant pu se baser sur des laits naturellement contaminés, avec des concentrations en *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* relativement élevées.

En 1997, Stabel et al ont tenté de valider les deux types de pasteurisation LTLT et HTST. La pasteurisation LTLT a lieu dans des tubes contenant 5 ml de lait cru inoculés avec 10^8 ufc/ml de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (une souche 19698 d'origine bovine et une souche Ben d'origine humaine) et immergés dans un bain-marie chauffé à 65, 72, 74 ou 76°C. Le chauffage des tubes a donné des réductions de l'ordre de 5-log_{10} pour un chauffage de 5 min à 65°C et de 4-log_{10} pour 1 min à 72°C. Après 30 min de chauffage à 76°C, il restait encore 1-log_{10} de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* d'origine bovine.

Les essais en HTST ont été conduits quant à eux, avec une unité laboratoire de pasteurisation permettant de chauffer 1 à 2 l de lait contaminé avec 10^4 à 10^6 ufc/ml. Les températures étaient de 55, 60, 65, 70 et 75°C. L'inactivation thermique a conduit à une réduction de 5.5 et 4.5-log_{10} ufc/ml à 55 et 60°C et la destruction des bacilles de Johne a été totale lors du chauffage à 65, 70 et 75°C pendant 15 s. La détection des cellules était réalisée par culture sur HEYM. Les auteurs eux-même ont mis en doute la valeur des résultats obtenus par la méthode en tubes dans un bain-marie, préconisant plutôt le système de pasteurisation engendrant un flux.

En utilisant un traitement thermique de 63°C pendant 30 min et 72°C pendant 15 s sur des tubes capillaires contenant 50 µl de laits UHT contaminés avec 40 à 1×10^5 ufc/ml, Keswani et Frank (1998) n'ont trouvé aucune cellule viable après culture sur milieu 7H11 et HEYM après chauffage. De même, aucune des souches testées n'a survécu à 1 min de chauffage à 60, 63, 68, 72 et 75°C. Mais certains *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* ont montré une résistance thermique lors de chauffage à 55, 58 et 60°C pendant 12 min. Il convient, cependant de noter que le seuil de détection de la méthode de comptage des colonies employée dans cette étude était de 1 ufc/250 µl et que le volume de chaque échantillon était de 50 µl. D'autre part, les auteurs suggèrent que leurs résultats soient confirmés dans des unités de pasteurisation à l'échelle pilote afin de confirmer la destruction réelle de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*.

Dans une étude de 1998, Grant et al ont étudié l'effet des barèmes de pasteurisation HTST (71.7°C / 15s) sur des laits crus contenant de faibles inocula : 10^3 , 10^2 et 10 ufc/ml. Des cellules de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* viables ont été retrouvés dans 14.8 et 10% des échantillons de laits contaminés à 10^3 et 10^2 , après pasteurisation. Cependant, aucun micro-organisme n'a pu être mis en évidence avec de faibles taux de contamination.

Plus récemment, une étude a été menée en pasteurisateur à l'échelle pilote travaillant en régime turbulent sur 120 l de lait cru contaminés avec 0.7 à 16×10^3 ufc/ml (Pearce et al, 2001). Différentes températures ont été utilisées : 63, 66, 69 et 72 °C pendant 15 s. Aucun *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* n'a survécu à 72°C mais une souche d'origine humaine a été isolée après chauffage à 69°C sur HEYM enrichi en mycobactine J. Malheureusement les données brutes de survie des souches aux faibles températures ne sont pas communiquées dans cet article.

Enfin, un dernier travail a été mené sur des laits naturellement contaminés par *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (Grant et al, 2002b). L'originalité du travail réside dans le fait que pour la première fois, l'étude a été réalisée avec des laits issus de troupeaux atteints de la maladie de Johne et en pasteurisateur industriel (2000 l/h). A l'issue des 2 types de traitements 73°C / 15 s et 73°C / 25 s, les analyses se sont avérées positives à la fois par IMS-PCR IS900 (30 échantillons) et par culture (10 échantillons) sur un total de 1444 échantillons de laits pasteurisés. L'augmentation du temps de pasteurisation à 25 s ne semble pas diminuer nettement la viabilité cellulaire mais le petit nombre d'échantillons positifs ne permet pas d'extrapoler la validité des résultats. En revanche, une homogénéisation des laits avant pasteurisation, effectuée à 52°C environ, semble avoir un effet marqué sur la survie de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. En effet, quel que soit le barème appliqué, les nombres d'échantillons contenant des cellules viables sont largement inférieurs à ceux obtenus sans homogénéisation.

On peut regrouper les résultats des travaux évoqués dans un tableau de synthèse et les comparer selon les niveaux de contamination qui sont assez variables d'une étude à l'autre.

Equipes	Traitements thermiques			
	LTLT 63°C / 30 min		HTST 72°C / 15 s	
	Inoculum[ml ⁻¹]	Réductions décimales	Inoculum[ml ⁻¹]	Réductions décimales
Chiodini & Hermon-Taylor (1993)	10 ⁴	<2	10 ⁴	<2
Grant et al (1996)	10 ⁶⁻⁷	5-6	10 ⁶⁻⁷	4.3-6
	10 ³⁻⁴	2-3.7	10 ³⁻⁴	2-3.7
Hope et al (1996)			<10 ⁵	~5
Stabel et al (1997)			10 ⁶⁻⁷	0.5-3
			10 ^{5.5-6}	>4.5-5
Sung et Collins(1998)	10 ⁵⁻⁶	>6	10 ⁵⁻⁶	1-2
Keswani et Frank (1998)	10 ⁶⁻⁷	>10	10 ⁵	~4
Grant et al (1999)			10 ⁵⁻⁶	5.6-6

Tableau 2.: Comparaison de l'efficacité des traitements thermiques LTLT et HTST sur du lait artificiellement contaminé par *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* à travers la valeur des réductions décimales données par différents auteurs.

Equipe	Nature des laits	Inoculats	Souches	Declumping	Pasteurisation LTLT	Pasteurisation HTST	Méthode de détection
Chiodini et Hermon-Taylor (1993)	Lait cru	10^3 à 10^5 ufc/ml	2 MAP d'origine bovine 2MAP d'origine humaine M.bovis ATCC + M.bovis sauvage	Sonication	Bain-marie avec mélange continu [10ml]	Double bain-marie avec mélange continu	Culture sur HEYM
Grant et al (1996a)	Lait cru	10^4 à 10^5 ufc/ml	9 MAP d'origine bovine 1MAP d'origine humaine 1 MAP d'origine caprine		Tubes clos dans bain-marie à 63.5°C /5,10, 15, 20, 30, 40 min	Unités de pasteurisation Franklin discontinue dans bain-marie 72°C pendant 15 s [250ml]	BACTEC HEYM PCR IS900 sur colonies
Hope et al (1996)	Lait cru	10^2 à 10^7 ufc/ml	1 MAP d'origine bovine 1 MAP d'origine caprine 1MAP isolé patient Crohn 1MAP ATCC			Unité de pasteurisation pilote continue [5 et 15 l]	HEYM BACTEC PCR IS900
Grant et al (1998)	Lait cru	0.2, 10, 10^2 , 10^3 ufc/ml	10 MAP d'origine humaine		Unité de pasteurisation dans bain-marie [250ml]		BACTEC HEYM PCR IS900sur colonies
Sung et Collins (1998)	Lait cru	10^5 à 10^6 ufc/ml	2 MAP d'origine bovine 2 MAP d'origine humaine 1 M. avium	Filtrations séquentielles	Chauffage à 62, 65, 68 et 71°C Bain-marie agité [1.5 ml]		BACTEC 7H9
Grant et al (1999)	Lait cru	10^6 ufc/ml				Unités de pasteurisation discontinue, dans bain-marie à 72, 75, 78, 80, 85 et 90°C /15s 72°C pendant 15, 20 et 25 s [250ml]	MPN BACTEC HEYM PCR IS900 sur colonies
Keswani et Frank (1998)	Lait UHT		3 MAP d'origine bovine	Suspension avec Tween 80 passée à travers une aiguille	1 tube capillaire immergé dans un bain-marie [0.05ml]	5 tubes capillaires immergés dans un bain-marie [0.05ml]	7H11 avec mycobactine HEYM
Rowe et al (2000)	Lait cru			Mélange suspension avec billes de verre 3 mm	Tubes clos immergés en bain-marie [5ml]	Unité de pasteurisation Franklin discontinue [250ml]	HEYM
Pearce et al (2001)	Lait cru	10^3 à 10^4 ufc/ml	2 MAP ATCC 3 MAP d'origine bovine		Unité de pasteurisation pilote continue à flux turbulent { 120 l/h } 63, 66, 69 et 772 °C pendant 15 s		BACTEC HEYM PCR IS900sur colonies
Grant et al (2002b)	Lait cru naturellement contaminé	?	MAP d'origine bovine	Homogénéisation		Pasteurisateur industriel [2000 l/h] 73°C pendant 15 et 25 s	HEYM PCR IS900

MAP : *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*

Tableau 3 : Récapitulatif des méthodes et techniques employées pour les essais de thermorésistance de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*.

3- Influence de l'augmentation de la température et/ou du temps de chauffage

Au vu des résultats assez hétérogènes des études menées sur l'inactivation thermique de Map, on a cherché à savoir si la modification des barèmes de pasteurisation aurait une influence forte sur la survie des mycobactéries dans le lait. La FSA a d'ailleurs recommandé en 1998 de relever ces barèmes (recommandation maintenue en 2002).

Cependant, peu d'études ont été consacrées aux pasteurisations à plus hautes températures et/ou avec de plus longs temps de chauffage.

<i>Traitement thermique appliqué</i>	<i>MPN moyen avant chauffage [ufc/ml]</i>	<i>MPN moyen après chauffage[ufc/ml]</i>	<i>Nombre de réductions décimales</i>
72°C / 15 s	1.5 10 ⁶	<0.3	>6
		1.6	>6
		0.4	>6
80°C / 15 s	9.3 10 ⁶	0.4	>6
		<0.3	>6
		<0.3	>6
90°C / 15 s	1.9 10 ⁶	0.4	>6
		<0.3	>6
		<0.3	>6
<hr/>			
72°C / 15 s	1.5 10 ⁶	<0.3	>6
	2.0 10 ⁶	1.6	>6
	2.5 10 ⁶	0.4	>6
72°C / 20 s	1.5 10 ⁶	<0.3	>6
	2.0 10 ⁶	<0.3	>6
	2.5 10 ⁶	0.4	>6
72°C / 25 s	1.5 10 ⁶	<0.3	>6
	2.0 10 ⁶	<0.3	>6
	2.5 10 ⁶	<0.3	>6

Tableau 4 : Données de pasteurisations réalisées dans un pasteurisateur de laboratoire de type Franklin (nécessitant un chauffage de 55 s pour atteindre la température de 72°C) publiées par Grant et al., 1999 et modifiées par Lund et al., 2002.

Des cellules de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* survivantes ont été retrouvées après des pasteurisations à 80 et 90°C pendant 15 s alors que le nombre de cellules survivantes à 72°C pendant 25 s était inférieur à la limite de détection Grant et al. (1999)

Les résultats de cette expérience, confortés par les travaux de Rowe et al. (2000), nous laissent conclure que l'augmentation du temps de chauffage est plus efficace pour réduire la population bactérienne que la hausse de la température. Ceci est à mettre en relation avec la présence d'agrégats cellulaires qui fourniraient une protection aux éléments les plus centraux. Il a aussi été évoqué le fait que des protéines de choc thermique pourraient être produites et qu'elles augmenteraient la résistance thermique des mycobactéries.

Cette thèse a été contestée ensuite par Cerf et Griffiths (2000) qui soutiennent que dans ces gammes de température, l'effet inverse devrait se produire. Elle est également remise en cause par Lund et al (2002), qui calculent le taux de létalité à une température donnée afin d'évaluer la capacité de destruction d'un barème de pasteurisation.

Ce paramètre est calculé selon la règle suivante :

$$L = 10^{(T_m - T_{ref})/Z}$$

Où L est le taux de létalité à la température donnée T_m , T_{ref} est la température de référence , et z est la variation de température (en °C) donnant une variation de 10 fois le temps de réduction décimale D.

Pour différentes valeurs de z comprises entre 4 et 10°C en accord avec les données expérimentales reportées par (Sung et Collins, 1998), ils concluent que l'augmentation de la température de chauffage doit avoir plus d'effet sur la mortalité cellulaire que l'augmentation du temps de chauffage.

4- Analyses des contradictions

L'observation des résultats bruts des différentes études menées au cours des dix dernières années montre une grande hétérogénéité due principalement à des protocoles expérimentaux non standardisés et dont les éléments de variation sont très nombreux. Nous allons donc essayer d'analyser pour chacun des points clés, les différentes possibilités et les conséquences du choix de l'une plutôt que de l'autre des méthodes.

a-Inoculats

Un des premiers éléments source de variation est l'inoculum utilisé puisque la plupart des études ont fait appel à du lait artificiellement contaminé. Il existe de nombreuses souches de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* et leurs caractéristiques ne sont pas strictement identiques. D'autre part, la quantité de cellules ajoutées aux prélèvements de lait et leur préparation avant et après l'expérience sont aussi des facteurs de variation.

①- Les souches

Les souches inoculées peuvent être de différentes origines (humaine, bovine, ovine,...). Cependant certaines souches ont été tout de même plus souvent utilisées, c'est notamment le cas des souches bovines ATCC 19698 et dans une moindre mesure, ATCC 43015. Pour les souches humaines, ce sont les souches Ben et Linda qui ont été les plus fréquemment employées.

Dans un premier temps, Chiodini et Hermon-Taylor (1993) ont affirmé que les souches d'origine humaine étaient plus thermorésistantes que celles d'origine bovine mais des études plus récentes semblent remettre en question cette affirmation (Grant et al., 1996a), (Stabel et al., 1997), (Sung et Collins, 1998).

La différence entre les souches n'est pourtant peut-être pas nécessairement liée à l'espèce d'origine. Sung et Collins (1998) pensent que la thermorésistance d'une souche dépend plus du niveau de sous-culture que de son origine. Des différences ont également été observées entre une même souche de *Mycobacterium avium subspecies avium* cultivée *in vivo* et *in vitro* qui semblerait alors plus résistante au chauffage (Merkal et al., 1979).

②- Mode d'obtention des cellules

Tour à tour, Klijn (1999) et Lund et al. (2002) ont évoqué ce point comme essentiel pour expliquer les contradictions apparues entre les différentes expérimentations :

- (Keswani et Frank, 1998) (Sung et Collins, 1998). La culture en bouillon produirait des cellules plus résistantes au chauffage que celles issues de culture sur gélose (ACMSF, 2000a).
- Congélation cellulaire (Chiodini et Hermon-Taylor, 1993) (Stabel et al., 1997) (Sung et Collins, 1998). I. Grant soutient quant à elle, qu'un inoculum de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* congelé à -80°C (de 2 jours à 6 mois) serait moins résistant au chauffage qu'un même inoculum non congelé (ACMSF, 2000a).
- Homogénéisation des suspensions cellulaires par mélange, sonication, ... (Chiodini et Hermon-Taylor, 1993) (Stabel et al., 1997) (Keswani et Frank, 1998) (Sung et Collins, 1998) (Rowe et al., 2000). Ces différentes méthodologies sont appliquées le plus souvent avant chauffage, mais interviennent parfois juste avant la remise en culture des bactéries potentiellement survivantes.

③- Taux d'inoculation

Le tableau 2 regroupait les données sur les études visant à tester la résistances de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* aux traitements standard LTLT ou HTST. Les valeurs des concentrations en mycobactérie y figurent et on se rend compte que ce paramètre varie de 10^3 à 10^7 ufc/ml. D'une part, les disparités qui découlent du choix de la quantité d'inoculum sont importantes mais d'autre part, cela représente des taux de contamination très élevés qui sont loin d'être en adéquation avec les estimations des taux de contamination naturelle qui avaient été estimés entre 2 et 8 ufc/ml (Sweeney et al., 1992).

D'après Hope et al. (1996), cela limite directement l'extrapolation des résultats à l'échelle industrielle.

Enfin, aucune donnée n'est disponible concernant le comportement des cellules naturellement excrétées dans le lait. Les différentes manipulations, même si les chercheurs ont tenté de les limiter autant que possible, modifient nécessairement le comportement de souches qui sont issues de collections et dont les caractéristiques sont peut-être déjà très éloignées de celles des souches sauvages.

b- Lait

C'est bien évidemment l'un des tous premiers paramètres susceptible d'induire une variation des résultats entre les différentes études de pasteurisation est la nature du lait utilisé avant contamination.

Le lait cru est majoritairement utilisé, mais certains travaux ont porté sur du lait UHT entier et écrémé, afin de réduire les interactions avec la flore endogène du lait. A première vue, le lait cru et le lait UHT ne semblent pas présenter de différences significatives lorsqu'ils sont entiers (Keswani et Frank, 1998).

Par contre, les courbes obtenues avec le lait écrémé sont à considérer avec plus de réserve du fait de l'effet protecteur des matières grasses (ACMSF Report, 2000a).

c-Matériel de chauffage et de refroidissement

Là aussi, les chercheurs ont utilisé des méthodologies très différentes de par le matériel utilisé pour le chauffage (depuis les appareils de laboratoire jusqu'aux pasteurisateurs industriels), pour le mélange ou même pour le refroidissement.

①- Matériels

La variété des matériels utilisés pour le chauffage joue un rôle primordial dans l'hétérogénéité des survies des cellules.

Ainsi on peut recenser :

- des pasteurisateurs industriels d'une capacité de 2000 l/h (Grant et al., 2002b)
- des pasteurisateurs pilotes à l'échelle industrielle de 120 l (Pearce et al., 2001)
- des échangeurs thermiques à flux continu (Stabel et al., 1997)
- des pasteurisateurs de laboratoire de type Franklin à ampoules fermées (Grant et al., 1996a, Grant et al., 1996b, Grant et al., 1998a)
- des ampoules ou tubes fermés chauffés en bain marie de volumes variant de 25 ml à 50 µl ... (Chiodini et Hermon-Taylor, 1993) (Keswani et Frank, 1998).

La majorité de ces traitements sont de type discontinu (*batch*) : le volume voulu de lait est chauffé à la température puis refroidi.

Le type de matériel utilisé et le mode de fonctionnement, continu ou discontinu, conditionnent la montée en température des laits. On peut citer, par exemple, 55 s pour les pasteurisateurs de type Franklin (Grant et al., 1996a, Grant et al., 1996b) (Rowe et al., 2000) à < 1 s pour les tubes capillaires (Keswani et Frank, 1998).

Ces paramètres influent aussi sur les conditions de mélange au sein de l'échantillon, et donc sur l'homogénéité de la température (contrôlée avec des thermomètres à mercure, des thermocouples, des sondes externes de température, ...) pour toutes les particules comprises dans le volume à chauffer.

②-Méthodes de mélange

Les premières expériences se contentaient d'immersion des solutions considérées (de faibles volumes) dans des bains-marie. Nous avons vu qu'avec l'existence du phénomène d'agrégation cellulaire, l'existence d'un flux générateur de turbulences était nécessaire à la reproduction des conditions des pasteurisateurs industriels.

Pearce et al.(2001) justifie l'emploi d'un pasteurisateur à échelle industrielle pour limiter au mieux les biais rencontrés avec des matériels de laboratoire et les extrapolations qui en découlent. Ils insistent particulièrement sur l'estimation du temps de résidence moyen, en plus du nombre de Reynolds qui doit refléter un volume infiniment mélangé (>3000). Frank (1999) précise que le point critique du traitement thermique reste le flux turbulent, qui assure une homogénéité de temps et de séjour dans le tube échangeur pour toutes les particules. Dans le cas d'un flux laminaire, la particule traversant le tube le plus vite pourra aller jusqu'à 2 fois plus vite que la moyenne des particules (Lund et al., 2002). Ainsi sur un temps de chauffage de 15 s à 72°C, la particule la plus rapide ne subirait un chauffage que durant 7.5 s (Hasting et al., 2001). Ceci pourrait être le cas pour les expérimentations réalisées par Stabel et al. (1997) et Sung et Collins (1998) où l'écoulement du lait est laminaire.

En pratique, les tubes échangeurs de chaleur servant à la pasteurisation des liquides à faible viscosité tels que le lait, sont conçus pour que le flux soit turbulent. Les diamètres internes, conditionnant le nombre de Reynolds, sont au moins de 38 mm, et les vitesses des fluides sont comprises entre 0.25 et 1.5 m/s. Les vitesses calculées pour les expériences en tube échangeur de chaleur en laboratoire sont nettement inférieures (Hasting et al., 2001) :

-0.02 m/s pour Stabel et al. (1997).

-0.003 à 0.007m/s pour Hope et al. (1996).

De plus, certains auteurs estiment que les traitements discontinus (*batch*) ne sont utiles que pour la détermination des temps de réduction décimaux lors d'un chauffage de plus de 1 minute. Les valeurs de D obtenues pour de courtes périodes de chauffage (ex : 15 s) ne sont pas jugées significatives du fait des conditions de mélange et de montée en température, et ceci quel que soit le type de micro-organismes (Huemer et al., 1998). (Cerf et Griffiths, 2000) soulignent particulièrement le problème des comparaisons de valeurs de D et de Z qui doivent avoir été déterminées dans la zone linéaire des courbes d'inactivation.

Enfin, selon d'autres études de thermorésistance de *Listeria monocytogenes* dans le lait, il semblerait que les essais portant sur des petits volumes tels que les tubes capillaires, donnent des estimations de D plus extrapolables aux pasteurisations commerciales lorsque les conditions de mélange ne sont pas optimales (Frank, 1999).

③- Refroidissement

Afin de pouvoir estimer de façon plus nette les temps de chauffage appliqués aux laits, ceux-ci sont généralement refroidis après la phase de pasteurisation elle-même. La méthode la plus couramment utilisée en laboratoire consiste à plonger l'échantillon dans de la glace (Grant et al., 1996b) (Grant et al., 1996a) (Stabel et al., 1997) (Keswani et Frank, 1998). D'autres équipes laissent le lait revenir à température ambiante puis le réfrigèrent à 4°C (Chiodini et Hermon-Taylor, 1993). Or le processus de refroidissement semble avoir une influence variable sur la viabilité cellulaire (Klijn et al., 2001).

d- Détection

En dehors des études ne s'attachant qu'à la survie cellulaire après traitement thermique, la méthode de détection utilisée a une importance énorme puisqu'elle influence directement le comptage des éléments cellulaires.

L'application des méthodes de dénombrement basées sur la culture sur milieux sélectifs est une question largement débattue pour de nombreux types de micro-organismes. Néanmoins, dans le cas de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*, les cinétiques de croissance extrêmement lentes ainsi que les besoins physiologiques particuliers à ces souches font que les taux de récupération sont difficiles à évaluer, y compris sur des milieux appropriés [7H9, 7H11, Dubos medium, HEYMM, Löwenstein-Jensen]. Ils varient de 1-10 ufc/ml à 1-10 ufc/100ml (Grant et al., 2001b).

Les limites de détection de ce type de méthodes ont été illustrées par (Grant et al., 1998b) , avec des comptages de souches détectées sur des laits non chauffés de moitié inférieurs aux concentrations d'inoculation (Grant et al., 1998a). Il semblerait que le taux de récupération des cellules de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* ayant subi un traitement thermique soit plus élevé lorsqu'une préculture a lieu en milieu liquide , avant étalement sur milieu gélosé (Klijn et al., 2001).

La nécessité d'appliquer un protocole de décontamination chimique afin d'inactiver les souches « endogènes » présentes dans le lait cru conditionne fortement les taux de présence de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* dans les laits naturellement contaminés. Par ailleurs, ce type de protocole appliqué à des cellules ayant déjà subi un stress thermique peut les rendre non cultivables et donc engendrer un résultat biaisé par des faux négatifs. L'application d'une technique de séparation immunomagnétique, afin de recueillir spécifiquement les cellules de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* avant la culture sur milieu HEYM, a donné des résultats mitigés, du fait de l'adhésion d'autres micro-organismes à culture rapide sur les billes (Grant et al., 2001b).

D'autres méthodes dites radiométriques, ont été mises au point pour suivre la survie de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* après traitement thermique. Dans cette méthode, l'échantillon est inoculé dans un milieu sélectif et ensuite incubé à 37°C . La présence de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* viable est déterminée indirectement par la mesure de la production de $^{14}\text{CO}_2$ issu du métabolisme du [^{14}C] palmitate. Cette méthode indirecte semble donner des courbes d'inactivation thermique plus linéaires que celles obtenues par dénombrement sur milieux et ne montrerait pas un phénomène de queue aussi marqué.

Les variations de D entre les 2 méthodes sont d'ailleurs significatives : $D_{62^\circ\text{C}} = 672$ s par dénombrement contre 324.6 s par méthode radiométrique (Sung et Collins, 1998). De plus, le milieu radiométrique a semblé avoir , vis à vis des cellules avant chauffage, une meilleure

sensibilité que le milieu HEYM avec mycobactine (Hope et al., 1996) et, vis à vis des cellules après chauffage, que le milieu 7H9 enrichi et supplémenté en mycobactine (Sung et Collins, 1998).

Lors des essais de pasteurisation, la méthode de détection par PCR basée sur la détection du fragment d'insertion IS900 spécifique à *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* a prioritairement servi à la confirmation de l'identification des colonies isolées sur gélose (Grant et al., 1996a) (Grant et al., 1999) (Pearce et al., 2001). En effet, la détection de l'ADN appliquée directement aux laits pasteurisés ne permet pas de distinguer les cellules viables des cellules mortes. Par exemple, (Millar et al., 1996) ont retrouvé 22 échantillons positifs par PCR IS900 sur 312 laits du commerce. Sur 18 échantillons PCR positifs, seuls 9 se sont avérés donner des cellules cultivables sur milieu Dubos. Dans la même étude, 6 échantillons sur 36 préalablement testés PCR négatifs, ont donné des cultures de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* positives.

De façon similaire, après une pasteurisation HTST, 20.8% des laits ont été testés positifs par PCR IS900 alors que seulement 6.9% étaient positifs par une méthode de culture (Grant et al., 2002c).

Un inconvénient souvent cité du test PCR IS900 pour l'analyse des laits pasteurisés est sa faible sensibilité (Boor, 2001) (Grant et al., 2001b). (Odumeru et al., 2001) obtiennent un seuil de 10^5 ufc/ml de lait lorsque l'ADN est extrait par la méthode d'ébullition. Les difficultés de détection par PCR s'expliquent d'une part par la matrice lait qui, outre les matières grasses, contient des concentrations élevées de calcium, inhibiteur de la PCR, d'autre part, par les étapes de centrifugation nécessaires à la récupération des cellules et, enfin, aux étapes de lyse cellulaire qui doivent être drastiques. Cette sensibilité ne pouvant pas être améliorée par une éventuelle phase d'enrichissement du fait des cinétiques de croissance de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*, les efforts se sont portés sur les phases de récupération des cellules, en appliquant une séparation immunomagnétique (Grant et al., 1998b) ou sur les phases de lyse des cellules, en utilisant un ribolyser ou un *bead beater* (qui provoque la rupture des parois cellulaires par agitation violente de tubes contenant des microbilles)

5- Hypothèse du *clumping*

Nous avons déjà évoqué le fait que les cellules de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* soient à l'état naturel sous forme d'agrégats. Ceci s'expliquerait par la nature hydrophobe de leur paroi (Lund et al., 2002).

Cela serait particulièrement sensible dans les cultures en milieu liquide, tant au niveau du nombre d'agrégats que du nombre de cellules par agrégat (ACMSF Report, 2000a).

Cette configuration particulière leur conférerait une résistance vis à vis du chauffage et ce phénomène expliquerait les « queues » trouvées lors de l'établissement des courbes d'inactivation thermique. Un exemple est illustré par l'article de (Grant et al., 1996b) qui montre les courbes d'inactivation thermique de différentes mycobactéries.

Ce phénomène expliquerait également les résultats obtenus lors des essais de pasteurisation industrielle comprenant une pré-phase d'homogénéisation des laits. L'homogénéisation, en détruisant/réduisant les agrégats cellulaires, aurait un effet négatif sur la survie finale de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (Grant et al., 2002c).

Dans le cas de laits contaminés par *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*, la proportion d'agrégats cellulaires est toujours inconnue tout comme leur taille. Ces deux paramètres dépendent de l'origine des souches, des conditions de culture et de préparation des inocula pour des laits artificiellement contaminés et, sans doute, des conditions de stockage, transport, etc... pour les laits naturellement contaminés.

Cela va donc influencer sur les cinétiques d'inactivation thermique. Ainsi, une proportion donnée de cellules de *Mycobacterium avium subspecies. paratuberculosis* se trouvant sous forme d'agrégats avant le traitement thermique pourrait générer une « queue » spécifique des courbes obtenues (Davey et al., 2001) (Stabel et al., 2001).

Un travail du NIZO hollandais a consisté à établir un modèle d'inactivation thermique de *Mycobacterium avium subspecies. paratuberculosis* en fonction de la fraction de cellules sous forme d'agrégats et des barèmes temps/température appliqués (Klijn et al., 2001). Selon la fraction de cellules regroupées, la réduction peut ainsi varier de 3 à 8 log₁₀ pour un même barème.

a- Méthodes de « declumping »

Pour contrecarrer ce phénomène d'agrégation

travaux

declumping (ruptures)

D'autres techniques plus ou moins élaborées ont été appliquées afin de limiter la proportion et/ou la taille des agrégats :

- sonication (Chiodini et Hermon-Taylor, 1993),
- mélange et agitation (Stabel et al., 1997),
- passage du fluide à travers une aiguille (Keswani et Frank, 1998),
- filtrations séquentielles (Sung et Collins, 1998).

Les résultats de cette étape de séparation des cellules ne semblent pas toujours concluants (Keswani et Frank, 1998) (Sung et Collins, 1998) (Hammer et al., 1998) (Hammer, 1999). De plus, aucune donnée sur l'efficacité de la séparation des agrégats (réduction de la taille des agrégats ? réduction du nombre total des agrégats ?), ni sur la viabilité et l'état physiologique des cellules après les étapes de « *declumping* » n'est fournie.

b- Une hypothèse contestée

Les travaux de (Davey et al., 2001), (Stabel et al., 2001) semblent remettre en question cette protection thermique de l'agrégation. Le temps d'équilibre de la température à l'intérieur d'agrégats cellulaires a été évalué à moins de 0.03 s, même si l'estimation du coefficient de transfert thermique à l'intérieur de l'agrégat est délicate. Les ordres de grandeur de ces temps de transfert thermiques sont donc très inférieurs à ceux pratiqués lors des pasteurisations. (Frank, 1999) explique que l'agrégation ne procure pas une plus grande résistance intrinsèque aux cellules mais que la nature logarithmique de la courbe est liée au fait que l'inactivation thermique concerne des amas plus gros.

En se référant aux données d'inactivation thermique obtenues par (Grant et al., 1999), il a été possible de modéliser le profil de température à l'intérieur des agrégats, assimilés pour les facilités de calcul, à des sphères de différents diamètres (Hasting et al., 2001). En prenant les deux scénarios extrêmes où le transfert de chaleur se fait presque uniquement par conduction (transfert lent) ou par convection (transfert rapide), les auteurs ont montré qu'une sphère de 0.25 mm de diamètre atteignait la température de 63°C en 0.5 s ($Nu = 2$) et 0.05 s

($Nu = 10$). Or, les seules données mesurées du diamètre des agrégats de Map sont de l'ordre de 0.075 mm (Keswani et Frank, 1998) soit trois fois inférieur.

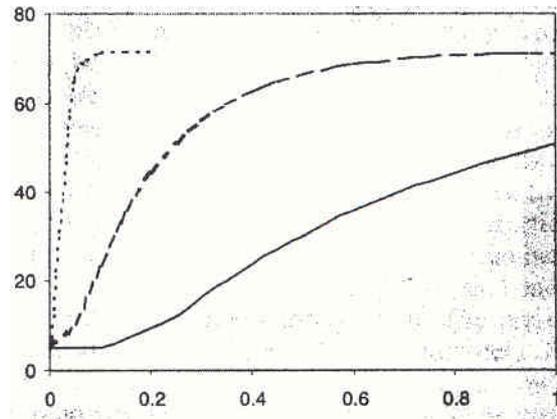


Fig.4 : Illustration du temps de chauffage d'une sphère de diamètre .025mm [...], 0.5mm [- - -] et 1mm [___] dans un liquide à 72°C avec un nombre de Nusselt $Nu=2$

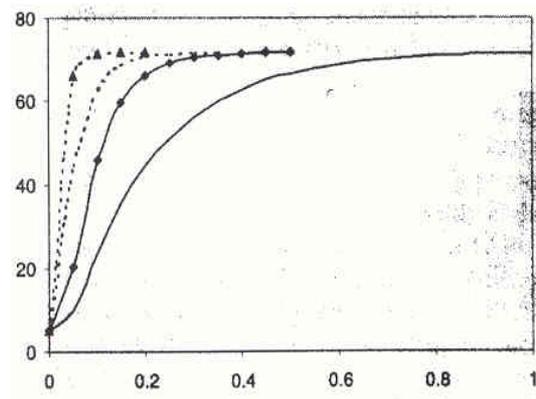


Fig.5 : Illustration du temps de chauffage d'une sphère de diamètre .025mm [...] et 0.5mm [- - -] selon deux scénarios extrêmes de transfert thermique lent ($Nu = 2$) et rapide ($Nu = 10$)

Par ailleurs, Davey et Stabel jugent qu'un agrégat cellulaire ayant subi un traitement thermique, mais possédant encore des cellules viables en son sein, ne formera en moyenne qu'une colonie sur milieu gélosé. Cela pourrait conduire à une sous-estimation des comptages cellulaires d'un facteur 100 à 1.000 (Klijn et al., 2001).

Ainsi, cette particularité peut être illustrée en prenant l'exemple d'une population ayant un D égal à 2 min : une réduction de $4 \log_{10}$ de cette population nécessitera un chauffage de 8 min. Un tel traitement réduira un agrégat de 20.000 cellules à 2 cellules viables, capables de donner une unique colonie. Les comptages des ufc seront alors équivalents avant et après chauffage (Frank, 1999) (Stabel et al., 2001).

Ces thèses sont à mettre en relation avec les déterminations de D réalisées à partir des dénombrements sur gélose ou des cultures radiométriques ; ces dernières ne sont théoriquement pas influencées par les agrégats donnant des courbes d'inactivation beaucoup plus linéaires (Sung et Collins, 1998).

(Frank, 1999) estime également que l'évaluation d'un traitement thermique doit être basée sur deux paramètres : le nombre d'ufc et la taille moyenne des agrégats. Il sera ensuite plus vraisemblable d'utiliser le paramètre D. Un lait contaminé contenant 100 ufc/ml avec une taille moyenne de 100 cellules par agrégat contiendra en réalité 10.000 cellules/ml. Après un traitement de pasteurisation assurant une réduction de 10D, le lait traité contiendra une cellule viable pour 1.000 l.

De plus, Davey et Stabel estiment que certains agrégats pourraient se former pendant le traitement thermique (Davey et al., 2001). Ces auteurs suggèrent que les « queues » des courbes d'inactivation thermiques pourraient être expliquées par des effets protecteurs dus au milieu chauffé (interactions physico-chimiques, réactions chimiques) ou bien encore par une adaptation des cellules face au stress environnemental. Dans ce dernier cas, les changements intracellulaires ne pourraient apparaître que lors des traitements prolongés (D de l'ordre de minutes et non de secondes).

DEUXIEME PARTIE

**MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DETECTION
STANDARDISEE DE MAP DANS LE LAIT
RECHERCHE DE CELLULES VIVANTES
PAR RT-PCR**

Il ne s'agit ici ni d'un test à visée diagnostique, ni d'une étude de prévalence de la maladie, mais uniquement d'une tentative d'obtenir une démarche standard sur des laits potentiellement contaminés pour mettre en évidence des organismes viables. Une fois la technique validée et étalonnée, il serait alors possible de s'appuyer sur des données plus précises concernant le lait naturellement contaminé et peut-être lever les questions qui se posent encore sur l'efficacité des méthodes de pasteurisation vis à vis de cette mycobactérie.

Dans un avenir moins proche, on pourrait même envisager un contrôle qualité sur des échantillons de lait destiné à la consommation humaine si ce test rapide s'avérait donner des résultats fiables.

I- PRINCIPES DE LA METHODE DE DETECTION

Le test se décompose en deux parties :

- une détection un peu plus spécifique de *Mycobacterium avium subspecies. paratuberculosis* via le gène IS900 nécessaire puisque le facteur d'élongation EF-Tu est commun à *Mycobacterium avium subspecies. paratuberculosis* et *Mycobacterium avium subspecies. avium*.
- une détection des cellules vivantes de *Mycobacterium avium subspecies. paratuberculosis* par une méthode utilisant la RT-QPCR appliquée aux ARNm du facteur d'élongation EF-Tu (brevet Danone EP 0943010 27/10/1997). Cette cible est présente en de nombreux exemplaires ce qui augmente théoriquement la sensibilité du test. En revanche, les données concernant l'étape d'extraction des acides nucléiques sont insuffisantes et restent la zone floue de la méthode.

Map : *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*

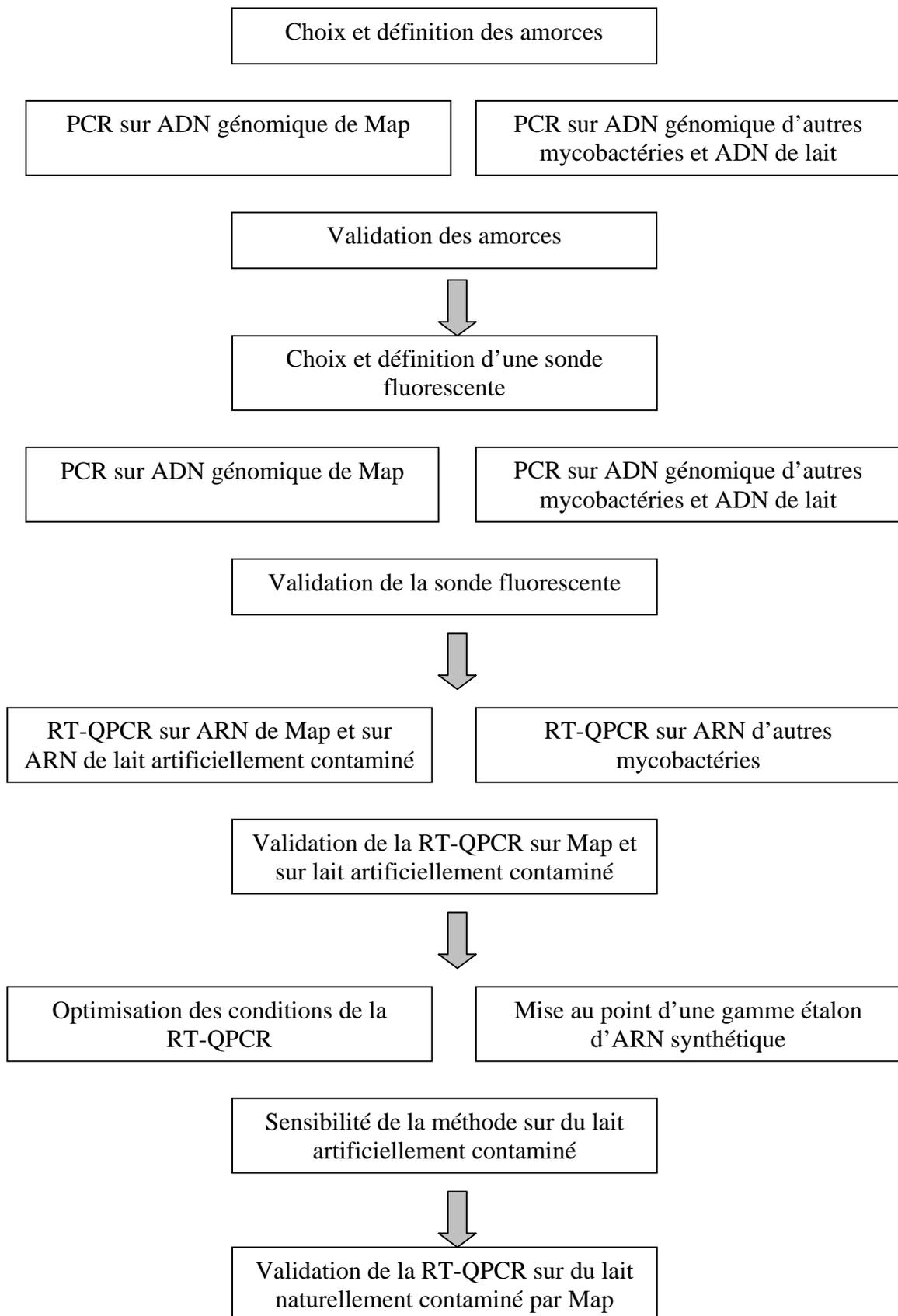


Fig. 6 : Principales étapes de la démarche expérimentale

La RT-PCR (polymérisation par réaction en chaîne , combinée à une transcription inverse) appliquée à des extraits d'ARN totaux, est une méthode de choix pour détecter la présence des ARNm (ARN messagers) des cellules vivantes de *Mycobacterium avium subspecies. paratuberculosis*.

Cette technique consiste à effectuer tout d'abord une phase RT (Reverse Transcription) à partir des ARNm transcrits, en présence d'une amorce et d'une transcriptase inverse. Sur les ADN complémentaires (ADNc) ainsi obtenus, une amplification PCR est réalisée en présence de deux amorces oligonucléotidiques spécifiques encadrant la région à amplifier, de dNTPs (désoxynucléotides triphosphates) et de l'enzyme Taq polymérase.

L'utilisation d'une sonde fluorescente spécifique de la région amplifiée de type Taqman® permet de quantifier le nombres de copies de la cible présente dans l'échantillon d'ARN total de départ.

Donc :

- La phase RT permet de nous renseigner sur la viabilité des cellules (les ARN sont essentiels à la vie de la cellule et sont plus rapidement dégradés que l'ADN après la mort cellulaire)
- La PCR va nous donner la spécificité d'espèce (selon les caractéristiques des sondes utilisées)
- La sonde fluorescente va permettre de quantifier les éléments présents initialement en mesurant la production de lumière au cours des cycles de la PCR.

1- Utilisation du facteur d'élongation EF-Tu

a-Rappels concernant la synthèse protéique

Lors de la traduction, la séquence protéique de l'ARNm est traduite en séquences d'acides aminés de la protéine spécifique. Chez les Procaryotes, la traduction peut se diviser en trois étapes :

- l'initiation,
- l'élongation,
- la terminaison.

L'initiation : elle nécessite la sélection d'un ARNm pour la traduction par un ribosome. Après la liaison de l'ARNm au ribosome, ce dernier trouve le cadre de lecture et la traduction commence.

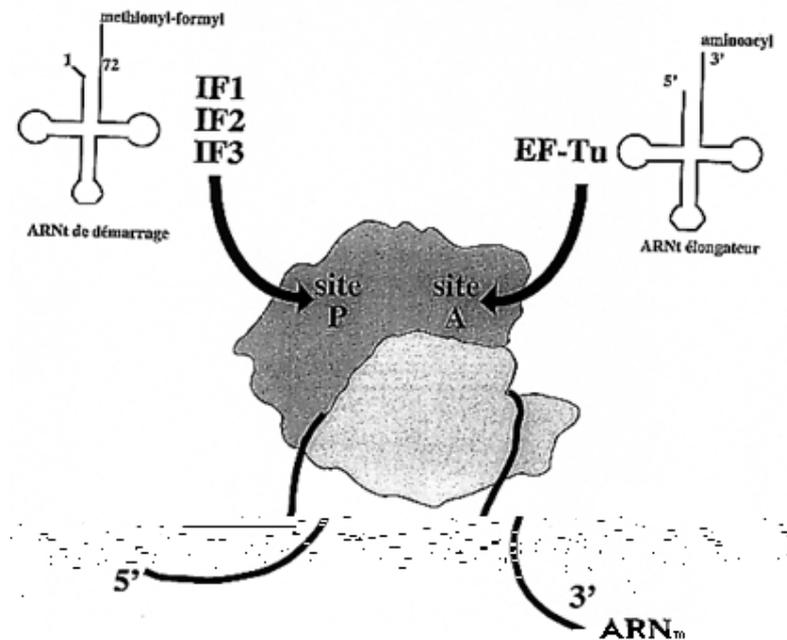


Fig.7 : Etape d'initiation de la synthèse protéique.

L'élongation : elle comprend plusieurs phases, catalysées par des protéines appelées facteurs d'élongation et elles mêmes synthétisées par la cellule. Ces différentes phases sont la liaison de l'aminoacyl-ARNt au site A, la formation de la liaison peptidique et la translocation.

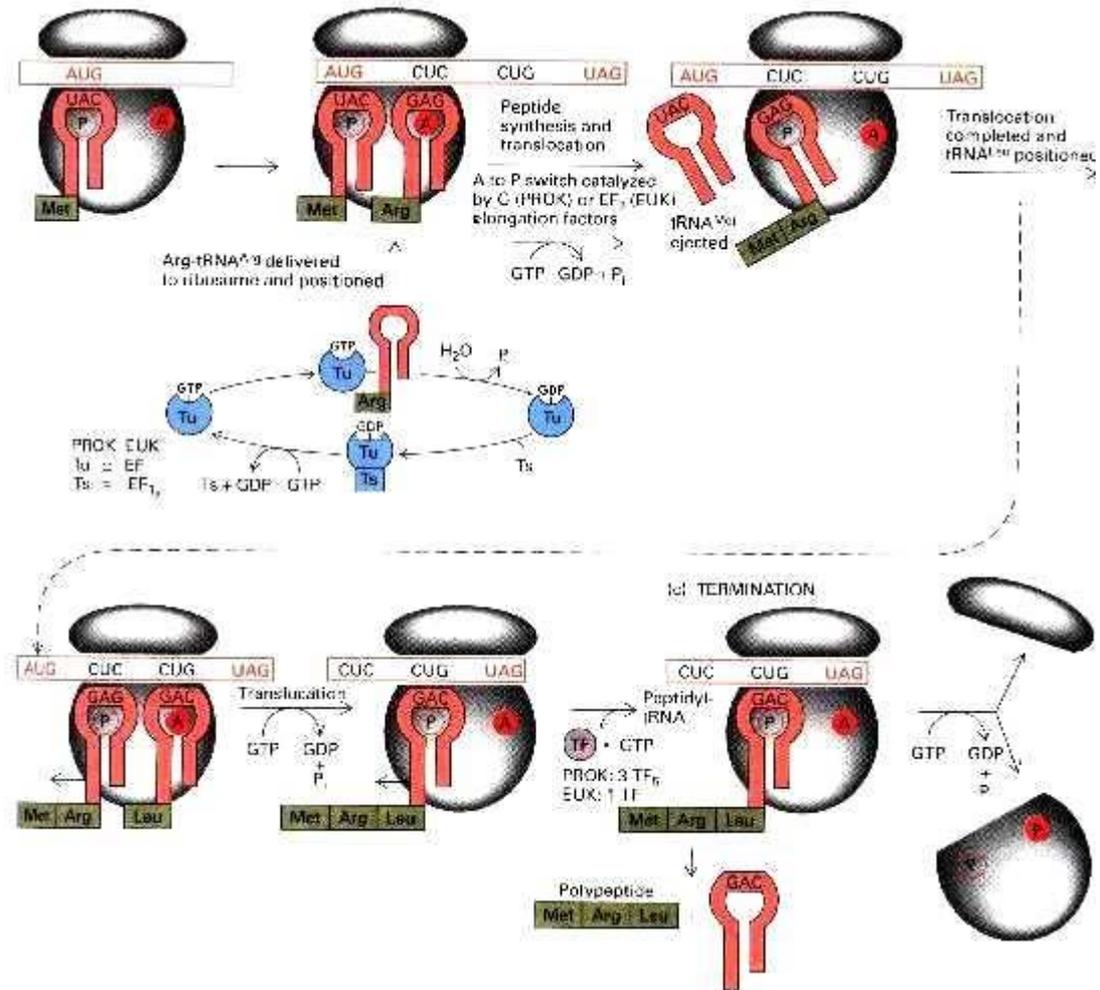


Fig.8 : Etape d'élargissement de la synthèse protéique.

La terminaison : lorsque l'un des codons non-sens (ou codon stop) apparaît au site A, le facteur de libération ainsi que le GTP et la peptidyltransférase favorisent l'hydrolyse de la liaison entre le peptide et l'ARNt

b-Les facteurs d'élargissement

Parmi les diverses molécules qui interviennent dans la synthèse protéique chez les Procaryotes se trouvent les facteurs d'élargissement tels que EF-Tu et EF-G.

①-Le facteur EF-Tu

Le facteur d'élongation EF-Tu est la molécule qui apporte les aminoacyls-ARNt au site A de la sous-unité 70S du ribosome. Le complexe binaire (EF-Tu • GTP) se lie à l' aminoacyl-ARNt pour former le complexe ternaire (aminoacyl-ARNt • EF-Tu • GTP). La liaison entre le complexe binaire et l' aminoacyl-ARNt est particulièrement forte.

Le complexe ternaire se fixe au site A uniquement si le site P du ribosome est déjà occupé par un peptidyl-ARNt. Lorsque l' aminoacyl-ARNt a été placé dans le site A, la reconnaissance codon-anticodon entraîne un changement de conformation de EF-Tu. Le GTP est alors clivé en GDP+Pi et le complexe binaire (EF-Tu • GDP) est libéré. Cette forme de EF-Tu est inactive et ne fixe plus efficacement l' aminoacyl-ARNt. Il y a quasiment autant de molécules de EF-Tu que d' aminoacyls-ARNt, ce qui implique que la plupart des aminoacyls-ARNt sont engagés dans des complexes ternaires.

La libération de EF-Tu est nécessaire pour que le ribosome puisse entreprendre la formation de la liaison peptidique : le groupement α -aminé du nouvel aminoacyl-ARNt sur le site A exerce une attaque nucléophile sur le groupement carboxyle estérifié du peptidyl-ARNt occupant le site P.

Le facteur d'élongation EF-Tu est codé par 2 gènes, tufA et tufB. Ces deux gènes sont exprimés en quantités similaires. En effet, d'une part leur inactivation étant létale pour la cellule, ce sont des gènes essentiels et d'autre part, ils sont exprimés en grande quantité.

②-Les sondes Taqman®

Ces sondes sont des fragments d'acide nucléiques à l'extrémité desquels sont fixés des marqueurs fluorescents. Les marqueurs ne libèrent leur énergie lumineuse qu'à la fin de la polymérisation du brin sur lequel ils s'étaient fixés.

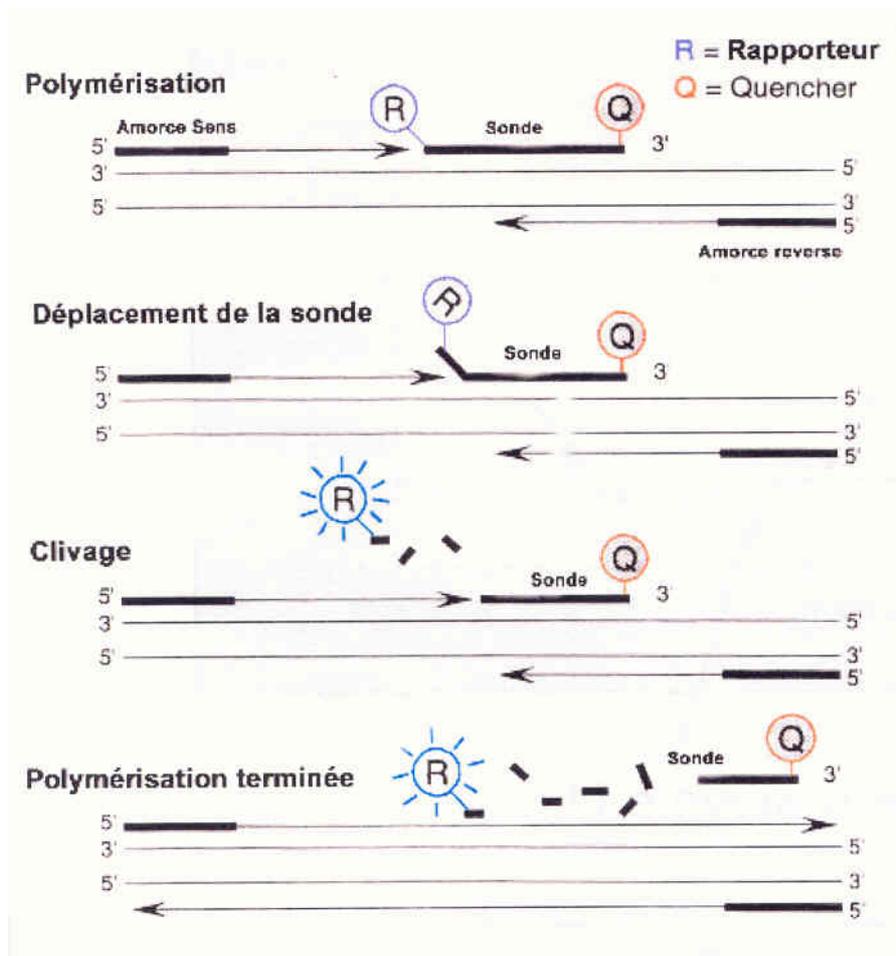


Fig.9 : Principe de la technique Taqman®

La portion appelée rapporteur correspond à une molécule libérant de la lumière lorsqu'elle est coupée du reste de la sonde.

Dans la mesure où la libération lumineuse est simultanée à la fin de la polymérisation, on peut relier la quantité de la cible présente initialement à l'intensité lumineuse.

Avec des quantités d'acides nucléiques déterminées, on a pu établir des courbes étalon et ainsi, la PCR peut revêtir un aspect quantitatif, on peut retrouver à partir d'une intensité lumineuse, la quantité initiale du micro-organisme cible.

On obtient des courbes du type de celle présentée dans la figure 10.

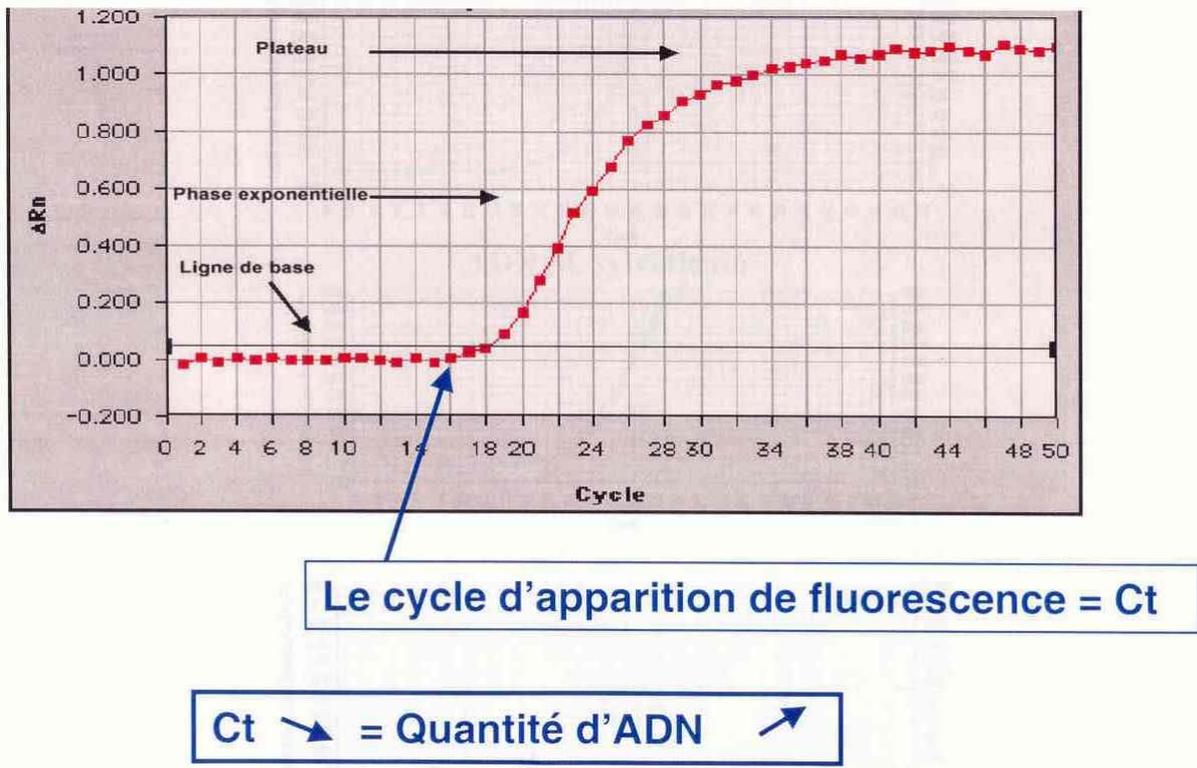


Fig.10 : Courbe de l'intensité lumineuse au cours des cycles de RT-QPCR

2- Utilisation du gène IS900

IS900 est un élément mobile transposable spécifique de *Mycobacterium avium subspecies avium* largement décrit dans la littérature. Il est présent dans toutes les souches de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* qui ont été isolées jusqu'alors. Il comprend 1451 bp (paires de bases) et se retrouve en 15 à 20 copies dans le génome de la bactérie. Deux ORFs (*Opening Reading Frame*) localisées sur les brins d'ADN opposés ont été caractérisées sur ce transposon :

- ORF1 codant pour une protéine p43, de 399 acides aminés, similaire à une transposase, et pouvant être exprimée *in vitro*.
- ORF2, localisée sur le brin complémentaire et notée *hed* (Host Expression Dependand) codant pour une protéine putative, Hed, qui serait impliquée dans une voie alternative pour le mécanisme de transport du fer.

De nombreux travaux de PCR et de RT-PCR sur le gène IS900 ont été publiés (Doran et al, 1997 ; Bull et al., 2000) traitant de son utilisation comme moyen de détection spécifique de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. Ils ont montré qu'il était possible de cibler l'ARNm de *hed* par RT-PCR. Une transcription inverse avec une amorce P90 effectuée sur de l'ARN total extrait de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* suivie d'une amplification par PCR avec le couple d'amorce P25 et P26, permettent d'amplifier un fragment de 228 bp spécifique du messager *hed* (P90, P25 et P26 sont des amorces internes à IS900).

a- Choix d'une sonde fluorescente de type Taqman®

La sonde MAP003 a été définie à partir de la séquence d'IS900 publiée par Green et al.(1989). Elle est localisée dans le fragment P25/P26 de 228 bp décrit par Doran et al.(1997) et répond aux critères requis pour la PCR quantitative.

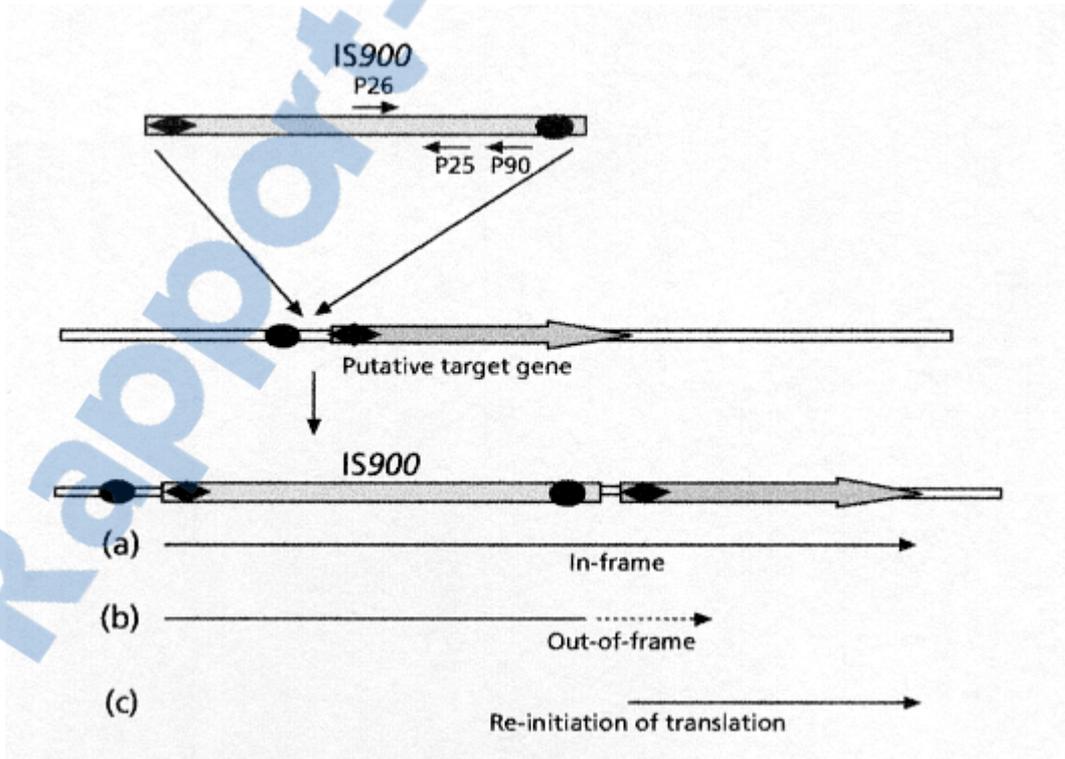


Fig.11 : Structure du gène IS900 d'après Doran et al (1997)

b- Validation des amorces et de la sonde en PCR quantitative sur ADN de souches

Des essais d'amplification sur de l'ADN en QPCR, utilisant le couple d'amorces P25/P26 et la sonde MAP003 ont montré :

- La présence d'un amplicon de 228bp dans des extraits d'ADN de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* souches ATCC et 7912,
- Que cet amplicon est détectable si l'amplification est effectuée sur des ADN extraits de quatre isolats de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* issus de fécès bovins.
- Qu'aucune amplification n'est détectable sur les autres mycobactéries du complexe *Mycobacterium avium subspecies intracellulare*, ainsi que sur l'ADN de *Mycobacterium bovis*.
- L'absence d'amplification sur de l'ADN extrait de lait cru ou pasteurisé.

c- Validation des amorces et de la sonde en RT-QPCR quantitative sur ARN de souches

Nous avons montré qu'il est possible de cibler et de quantifier l'ARNm de *hed*, et ceci exclusivement dans des extraits d'ARN totaux de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. Aucune réaction croisée avec les ARN totaux des laits non contaminés n'est observée.

Cependant, en raison d'un niveau d'expression insuffisant, la RT-PCR ciblée sur *hed* n'a pas été réalisée lors des recherches que nous avons conduit. Seule la PCR « classique » a été utilisée pour garantir la spécificité vis à vis de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*

3- Démarche expérimentale

L'approche choisie dans ce projet consiste à utiliser les protocoles validés par un brevet, à la détection spécifique et au comptage des cellules de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* vivantes en utilisant une technique basée sur une *Reverse Transcriptase* (marqueur de viabilité lié à la labilité des ARNm dans les cellules mortes) et

sur une PCR (spécificité d'espèce) simultanées, effectuées avec une technologie TaqMan/AbiPrism pour obtenir un aspect quantitatif. Une fois cette technique mise au point, elle sera validée sur des laits naturellement contaminés par *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*.

a- Obtention des amorces

Dans un premier temps les travaux ont porté sur la mise au point des techniques de culture de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* et d'extraction des acides nucléiques : ADN puis ARN totaux.

Mais ensuite, le travail a consisté à valider les amorces universelles décrites dans le brevet Danone pour détecter spécifiquement *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. Ces amorces qui « visent » le gène codant pour le facteur d'élongation EF-Tu de toutes les bactéries n'ont pas permis d'obtenir une spécificité de reconnaissance suffisante pour détecter *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*.

Des amorces spécifiques de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* ont alors été recherchées. Pour cela, les amorces du brevet ont été utilisées. Le gène EF-Tu de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* a alors été cloné pour être séquencé. Une première séquence partielle du gène codant pour le facteur d'élongation EF-Tu des souches de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (ATCC 19698), *Mycobacterium avium subspecies avium* (709) et *Mycobacterium avium subspecies avium* (9203) a été obtenue.

Suite à ces premiers séquençages, des amorces et sondes spécifiques à l'identification de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* ont été définies après ajustement des séquences trouvées. Ces amorces ont été validées à la fois sur l'ADN par PCR et sur l'ARNm par RT-PCR, on s'est en effet bien assuré que les amorces permettaient l'hybridation lors des PCR. Cette sonde appliquant la technologie Taqman® nous a aussi permis de déterminer quantitativement le nombre de copies d'ARNm présentes.

Après cette première étape de détection qualitative de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* vivant, une étude de la spécificité des amorces vis à vis des autres mycobactéries a été réalisée. Il en résulte que les amorces précédemment définies s'hybridaient également avec les acides nucléiques de *Mycobacterium avium subspecies avium*, *Mycobacterium avium subspecies sylvaticum* et *Mycobacterium intracellulare*.

La spécificité de la méthode de détection concerne donc les mycobactéries à croissance lente du groupe avium/intracellulare. Il n'a été noté aucune interférence avec d'autres mycobactéries telles que *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* ou *Mycobacterium kansasii*...

Par contre, les amorces définies ne subissent pas d'interférence avec la matrice « lait » et la détection des ARNm extraits de laits crus ou pasteurisés contaminés artificiellement avec des cellules vivantes de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* s'est avérée parfaitement réalisable.

Face à cette interférence de la méthode basée sur EF-Tu entre mycobactéries du groupe avium, nous avons essayé d'augmenter la spécificité en définissant une sonde s'hybridant encore plus fidèlement avec l'ADN ou l'ARN de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. Malheureusement, les séquences du gène EF-Tu de *Mycobacterium avium subspecies avium* et de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* ne différant que d'un nucléotide, il n'a pas été possible d'augmenter la spécificité de détection de la méthode RT-PCR ciblée sur EF-Tu.

Afin de compléter la détection quantitative des cellules vivantes, une courbe étalon d'ARN synthétique a ensuite été élaborée. La limite de détection inférieure a pu être évaluée 640 copies d'ARNm.

b- Etude de la spécificité de la méthode de détection par EF-Tu

①- Choix de la sonde fluorescente de type Taqman®

L'alignement *in silico* des séquences du gène tufA des génomes partiellement (*Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*, *Mycobacterium avium subspecies avium*) ou totalement (*Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium smegmatis*) séquencés et présents dans les banques de données a révélé :

- Que la séquence du gène tufA de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* présentait une homologie de 77 à 91% avec celles de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium smegmatis*.
- Qu'un seul nucléotide sur la totalité du gène différenciait *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* de *Mycobacterium avium subspecies avium* : G pour *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*, A pour *Mycobacterium avium*

subspecies avium, en position 753. Cette différence est localisée au sein du fragment de 142 bp servant de base à notre étude.

L'amplification et le séquençage dans le laboratoire de Danone du fragment de 142 bp de *tufA* dans les souches de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*, *Mycobacterium avium subspecies avium*, *Mycobacterium avium subspecies sylvaticum* et *Mycobacterium intracellulare* mises à notre disposition, n'ont pas permis de mettre en évidence de différence de nucléotide entre ces quatre sous-espèces.

La sonde MAP001 a été définie, en tenant compte des critères requis pour la PCR quantitative, et des variabilités nucléotidiques observées.

②- Validation des amorces et de la sonde PCR quantitative sur ADN de souches

Des essais d'amplification sur de l'ADN en Q-PCR, en utilisant le couple d'amorces OFF165/OFF166 et la sonde MAP001 ont montré :

- La présence d'un amplicon de 142 bp dans les extraits d'ADN de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*, *Mycobacterium avium subspecies avium*, *Mycobacterium avium subspecies sylvaticum*.
- Qu'aucune amplification n'est détectable sur des extraits d'ADN de *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium segmatis*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis*.
- L'absence d'amplification sur de l'ADN extrait de lait cru ou pasteurisé.

③- Validation des amorces et de la sonde en RT-PCR qualitative sur ARN de souches

De la même manière, il a été observé :

- L'amplification d'un fragment de 142 bp sur des extraits d'ARN totaux de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*, *Mycobacterium avium subspecies avium*, *Mycobacterium avium subspecies sylvaticum*, *Mycobacterium intracellulare*.
- L'absence d'amplification sur des ARN totaux extraits de lait cru ou pasteurisé.

④- Validation de la RT-QPCR sur du lait artificiellement contaminé par *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*

Du lait cru et du lait pasteurisé ont été artificiellement contaminés par deux souches de Map : ATCC et 7912.

L'extraction des ARN totaux sur ces échantillons a été réalisée par l'AFSSA.

Les expérimentations de RT-QPCR sur ces extraits ont montré qu'un amplicon de 142 bp était détectable. Nous pouvons déduire de ces résultats que la matrice « lait » n'apporte pas d'inhibiteurs pour la reverse transcription ou la PCR.

c- Etude de la sensibilité

①- Optimisation de la gamme étalon d'ARN synthétique

La gamme étalon a été réalisée à partir d'ARNm synthétiques. Après une dilution préalable, ceux-ci ont subi une étape de transcription inverse. Les ADNc générés lors de cette étape servent ensuite à réaliser une gamme étalon pour la PCR quantitative allant de $6.4 \cdot 10^9$ à 64 copies.

Un exemple de courbe étalon obtenue est présenté ci-dessous

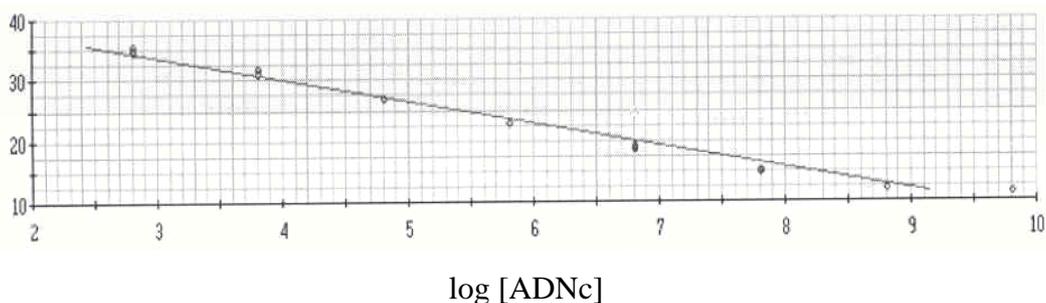


Fig.12 : Exemple de courbe étalon

L'efficacité de la PCR est en moyenne supérieure à 90% et le nombre minimal détectable de copies de la cible est de 640.

Nous avons également validé la répétitivité et reproductibilité de la méthode de RT-QPCR mise au point pour détecter l'ARNm synthétique de tufA.

②- Sensibilité de la méthode sur du lait artificiellement contaminé par *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*

Des «échantillons de lait cru et pasteurisé ont été contaminés par des dilutions successives de deux souches de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (ATCC et 7912). Les dilutions en question sont 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} .

Les ARN totaux de chaque échantillon ont été extraits et traités à la Dnase I (AFSSA).

Il est à noter que la quantité d'ARN totaux extraits n'est pas homogène d'un échantillon à l'autre, d'une expérimentation à l'autre et que les rendements d'extraction sont variables. De ce fait, il semble difficile de corrélérer un nombre de cellules contaminantes à la quantité d'ARNm cible détecté par RT-QPCR.

Nous avons décidé d'étudier la sensibilité de la méthode en ne travaillant que sur deux échantillons, répondant positivement en RT-QPCR (échantillons correspondant aux dilutions 10^0 et 10^{-2}).

Ces extraits d'ARN totaux, dilués au 1/10, 1/100 et 1/1.000 ont été testés en RT-QPCR. En se reportant à la courbe étalon, nous avons pu déterminer que le seuil minimal de détection de l'ARNm de tufA dans le lait artificiellement contaminé par *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* est de l'ordre de 1.000 copies.

③- Conclusion

Nous avons validé la spécificité pour le complexe *intracellulare* des amorces OFF165 et OFF166, et de la sonde MAP001 pour l'amplification et la quantification d'un fragment de l'ARNm de tufA, et ceci sans interférence avec la matrice lait.

Nous avons donc une méthode permettant de détecter la présence de cellules vivantes de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* dans le lait, ciblant spécifiquement l'ARNm du facteur d'élongation EF-Tu.

La courbe de corrélation entre le nombre de cellules viables (ou du moins cultivables) et le nombre de copies d'ARNm n'est pas encore accessible du fait des variations observées sur les rendements d'extraction des acides nucléiques.

Ce gros décalage fait que les animaux concernés connaissent souvent une chute très importante de leur production laitière. Dans la plupart des cas, les éventuels candidats étaient alors écartés faute de lait.

-un problème « logistique »

Il est apparu fastidieux de prélever des animaux un par un, vu la quantité attendue. Le temps total de l'étude aurait été extrêmement long.

La méthode choisie a alors été la suivante : les collectes de lait ont concerné des cheptels laitiers engagés avec les Groupements de Défense Sanitaire départementaux dans des plans d'éradication de la paratuberculose. Cela signifie que ces cheptels avaient présenté d'assez nombreux cas cliniques au cours des années précédentes et que tous les animaux de plus de 2 ans étaient l'objet d'un contrôle systématique par coproculture.

Cela a permis de regrouper les différents prélèvements. Selon le niveau d'infection des cheptels et la rapidité d'élimination des animaux positifs on a pu effectuer entre 2 et 8 prélèvements par exploitation.

La non simultanée des analyses n'a aucune influence sur les résultats puisque la très bonne spécificité du test diagnostique fait que les animaux positifs peuvent être considérés comme tel avec un risque d'erreur très faible et le statut infecté des animaux est irréversible, seul le niveau d'excrétion est variable dans le temps.

2-Collecte des laits

Le prélèvement des laits a été effectué de telle sorte que les conditions soient les plus proches possibles des conditions habituelles de collecte par l'éleveur.

Les prélèvements ont eu lieu sur les exploitations, au moment de la traite. Les trayons ont été désinfectés selon la technique utilisée habituellement par l'éleveur. Les pots à prélèvement étaient des pots stériles et pour chaque animal, un pot de un litre puis un second de 250 ml ont été remplis. La traite a été faite à la main dans

d'autres animaux à traire) et ce biais est compensé par le volume du lait ainsi collecté qui entraîne une dilution d'éventuelles particules contaminantes présentes de toute façon en faible quantité dans le lait.

Le volume important des prélèvements trouve aussi sa justification dans le fait que les analyses effectuées ultérieurement sur ces laits peuvent nécessiter d'être renouvelées plusieurs fois, cela permet donc d'avoir un stock suffisant pour réaliser plusieurs tests de vérification.

Ces laits supposés naturellement contaminés ont ensuite été acheminés vers le laboratoire de Danone Vitapole dans un délai maximal de 24 heures (ils étaient alors conservés à une température de + 4°C) par un transporteur ou par nos propres soins.

C'est au total 26 prélèvements effectués sur des animaux infectés asymptomatiques qui ont été analysés. Ces échantillons étaient répartis sur 5 exploitations.

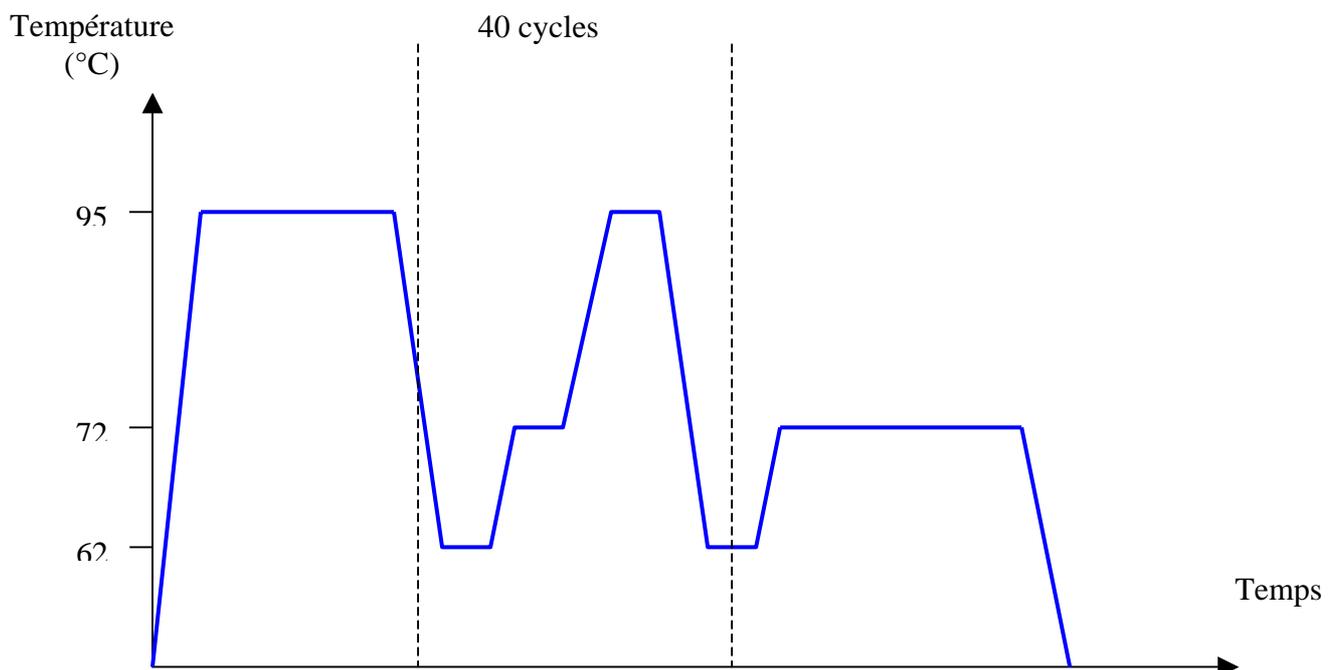
III- PROTOCOLE EXPERIMENTAL ET RESULTATS

1- Q-PCR pour la détection d' IS900

Le protocole de détection des cellules de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* commence par une PCR « classique » qui permet de réaliser un premier tri dans les prélèvements.

La méthodologie expérimentale est détaillée dans l'annexe 2.

Chaque essai expérimental est réalisé en 3 exemplaires. Les réactions de PCR se font dans un iCycler® BIORAD (annexe 3), sous les conditions thermiques suivantes :



2- RT-QPCR pour la détection de EF-Tu

a- Extraction d'ARNs et d'ADN issus de lait contaminé par *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*

L'ensemble des manipulations nécessaires à l'obtention des ARN se trouve dans l'annexe 4.

b- RT-QPCR

Les échantillons d'ARN totaux sont traités à la DNase I (Amplification Grade, référence 18068-015 Invitrogen®, annexe 6) pour éliminer toute possibilité d'une contamination par de l'ADN. Cette décontamination est vérifiée par Q-PCR qui doit s'avérer négative.

L'étape de reverse transcription est réalisée en utilisant le kit Sensiscript Reverse Transcriptase (Référence 205211, Quiagen®, annexe 7).

A 3 µl d'ARN totaux traités à la DNaseI sont ajoutés 2 µl de Tampon RT 10X, 2 µl d'un mélange de dNTP (5mM de chaque), 500 pmole d'amorce sens P26 et 16 µl d'H₂O. Les tubes sont placés à 70°C pendant 5 min pour déstabiliser les structures secondaires des ARN, et rapidement refroidis dans la glace. Un µl d'enzyme Sensiscript Reverse Transcriptase est ajouté. Le programme de reverse transcription est le suivant :

37°C pendant 60mn	1 cycle	Etape de reverse transcription
93°C pendant 5mn	1 cycle	Etape de dénaturation de l'enzyme

Il faut ensuite faire migrer sur gel d'agarose 1%, à 100V pendant 60min et vérifier la présence de bandes d'ADN (ce qui valide l'extraction).

L'étape de PCR quantitative qui suit se fait en utilisant 1/5 de ce produit. C'est le Icyclor IQ de Biorad® (annexe 2) qui est utilisé, ce qui permet la lecture d'un large spectre de fluorochromes et la détection quantitative de l'amplification.

La technologie Taqman fait appel ici à une sonde marquée par un composé fluorescent de type FAM.

3- Résultats

a- Données globales

Exploitations	Animaux	PCR IS900	RT-QPCR	Culture 37°C Milieu HEYM, 14 semaines
A	1	Négatif	Négatif	Pas de colonie visible
	2	Négatif	Négatif	Pas de colonie visible
	3	Positif	Négatif	Pas de colonie visible
	4	Négatif	Négatif	Pas de colonie visible
	5	Négatif	Négatif	Pas de colonie visible
	6	Négatif	Négatif	Pas de colonie visible
	7	Négatif	Négatif	Pas de colonie visible
	8	Négatif	Négatif	Pas de colonie visible
B	1	Négatif	Négatif	Pas de colonie visible
	2	Positif	Négatif	Pas de colonie visible
	3	Négatif	Négatif	Pas de colonie visible
	4	Négatif	Négatif	Pas de colonie visible
C	1	Négatif	Négatif	Pas de colonie visible
	2	Négatif	Négatif	Pas de colonie visible
	3	Négatif	Négatif	Pas de colonie visible
	4	Négatif	Négatif	Pas de colonie visible
	5	Négatif	Négatif	Pas de colonie visible
	6	Négatif	Négatif	Pas de colonie visible
D	1	Négatif	Négatif	Pas de colonie visible
	2	Négatif	Négatif	Pas de colonie visible
	3	Négatif	Négatif	Pas de colonie visible
	4	Négatif	Négatif	Pas de colonie visible
	5	Négatif	Négatif	Pas de colonie visible
E	1	Négatif	Négatif	Pas de colonie visible
	2	Négatif	Négatif	Pas de colonie visible
	3	Négatif	Négatif	Pas de colonie visible

Tableau 5 : Résultats généraux du test

b- Q-PCR IS900

Amorces P25/P26

Sonde : MAP003

Deux échantillons de lait (A3 et B2) ont donné des résultats positifs après la Q-PCR ciblée sur IS900. Les PCR ont été réalisées trois fois pour chaque échantillon..

Les autres prélèvements n'ont pas révélé la présence d'ADN de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*.

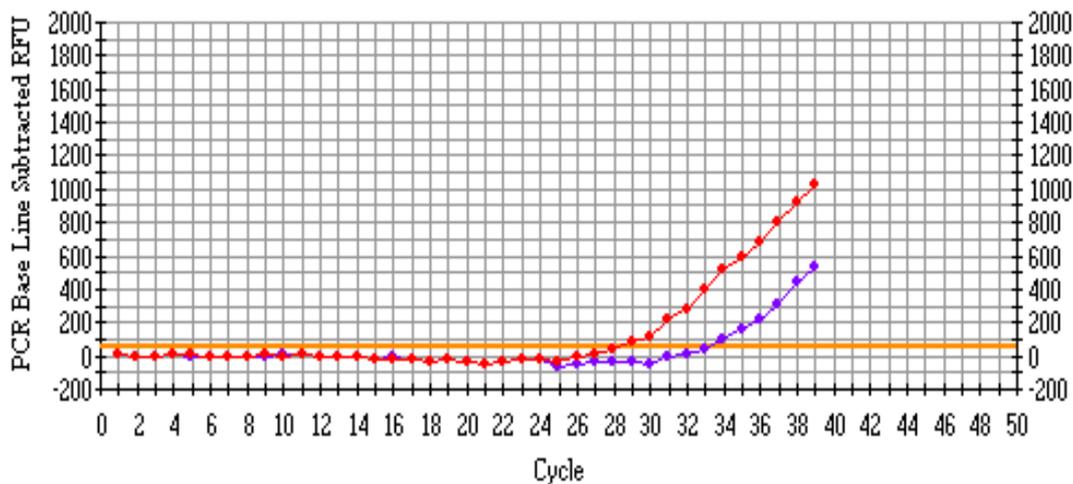


Fig.14 : Courbes obtenues avec les échantillons positifs en QPCR IS900
(Laits positifs = A3 et B2)

Cependant, une mise en culture de tous les prélèvements « négatifs » a été entreprise. Après décontamination (Phosphate Buffer Saline Solution et HexadecylPyridinium Chloride), les cultures ont été effectuées sur milieu HEYM additionné de mycobactine J et incubées à 37 °C. Chaque culture a été réalisée en double exemplaire.

Après 14 semaines de culture, aucune colonie n'est apparue. Même si cela rend très improbable la présence de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*, cette durée ne permet cependant pas d'exclure totalement la présence d'organismes viables puisque certaines cultures nécessitent jusqu'à 52 semaines d'incubation.

c- RT-QPCR

Les deux échantillons qui avaient donné des résultats positifs lors de la première PCR ont été analysés par le biais de RT-PCR dont le principe a été précédemment exposé.

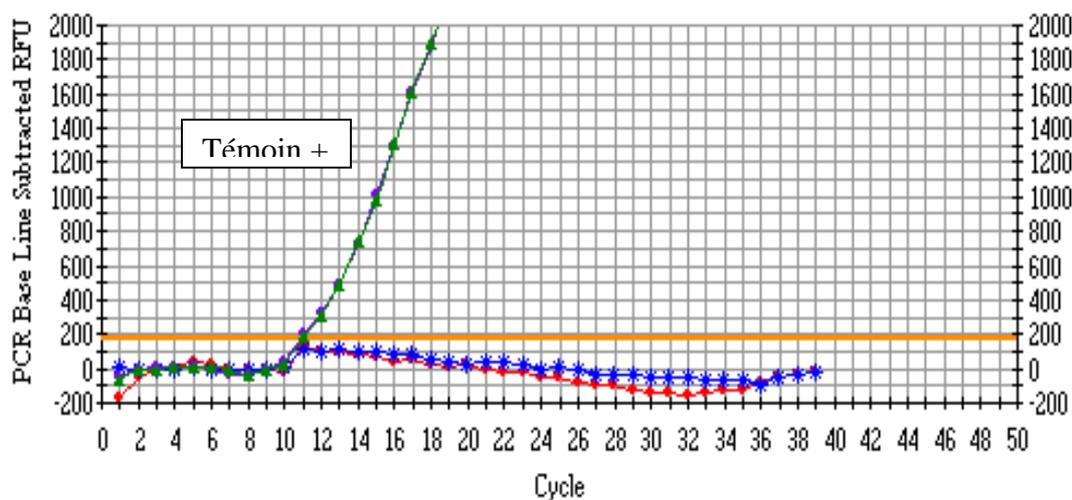


Fig.15 : Courbes obtenues par la RT-QPCR ciblée sur EF-Tu

Aucune de ces RT-PCR n'a révélé la présence d'ARN de mycobactéries du groupe *avium / intracellulare*

Il a donc été décidé de procéder à des mises en culture de ces deux échantillons pour confronter les résultats des deux analyses.

4- Discussion des résultats

La PCR ciblée sur IS900 a montré la présence de fragments d'ADN spécifique de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* pour deux échantillons sur les 26 analysés, on constate déjà dans un premier temps que l'on est proche des incidences rapportées par Streeter et al.(1995) quant à la présence du bacille de Johne dans le lait (7.69% ici pour une présence évaluée à l'époque à environ 11% chez les animaux asymptomatiques).

En revanche, aucun ARN n'a pu être mis en évidence par la RT-PCR ciblée sur EF-Tu. Cela aurait pu s'expliquer de trois façon :

a- L'animal n'est pas excréteur

Son lait n'est pas contaminé par *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. C'est peut-être le cas pour 24 animaux dont les prélèvements se sont avérés négatifs après la PCR ciblée sur IS900. Même si la culture n'a pas été maintenue sur une durée suffisante pour pouvoir conclure avec certitude sur le statut de ces animaux, la combinaison des deux tests rend quasi certain le fait qu'aucun organisme (et à plus forte raison aucun organisme viable) n'était présent à l'origine dans le lait de ces animaux.

b- Le lait est contaminé mais ne contient aucun organisme viable

Deux des prélèvements effectués se sont révélés positifs après la PCR ciblée sur IS900. Cela démontre la présence d'ADN de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* dans le lait des animaux prélevés. Nous avons déjà évoqué le fait que l'ADN était plus stable dans le temps que l'ARN qui est véritablement un marqueur de la viabilité de la cellule.

Soit les prélèvements ne contenaient aucun organisme viable à l'origine, soit les organismes ont été détériorés au cours des étapes de transport et de conservation.

Cette dernière éventualité ne peut être écartée mais semble improbable au regard des précautions prises et des caractéristiques intrinsèques de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*.

c- La technique de détection est défaillante

Les prélèvements peuvent contenir des éléments viables de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* mais n'ont pas été détectés par la méthode développée.

La phase critique dans la méthodologie est la phase d'extraction des ARN qui n'a pas un rendement de 100%. De plus, les niveaux d'excrétion dans le lait sont supposés faibles, il est donc possible que la combinaison de ces deux facteurs fasse que l'on se situe sous la limite de détection du test qui a prouvé son efficacité sur des laits artificiellement contaminés.

CONCLUSION

Ce travail de recherche a été réalisé davantage dans un cadre agroalimentaire que vétérinaire puisque l'objectif n'était pas d'élaborer un nouveau test visant à reconnaître l'individu infecté. Ce test devait permettre de détecter *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* dans le lait. Cela montre si besoin était l'implication du vétérinaire dans le cadre de l'hygiène alimentaire.

D'ailleurs, cette étude nécessitait une intervention sur le terrain pour la sélection des troupeaux infectés en coordination avec un laboratoire spécialisé dans le domaine agroalimentaire.

Nous avons bien souligné, dans la synthèse bibliographique, toutes les hypothèses émises sur *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*, dans le domaine de la santé publique, ainsi que les difficultés rencontrées pour la mise en évidence de cette mycobactérie.

La méthode de détection développée dans cette thèse utilise des technologies parmi les plus avancées de la microbiologie, à savoir la PCR et la RT-PCR.

Les résultats obtenus se sont avérés décevants dans la mesure où il est pour l'instant impossible de démontrer l'intérêt de l'emploi de ce test..

Il est nécessaire, pour valider cette technique, de continuer avec un plus grand nombre d'échantillons en vue de conclure sur la capacité de ce test à atteindre ses objectifs.

Il est certain que le coût élevé d'un tel test ne permet pas son utilisation ultérieure en pratique vétérinaire bovine mais il s'agit d'une avancée dans les nouvelles voies de biotechnologie permettant d'améliorer la maîtrise des points critiques pouvant être évoqués dans le cas de la paratuberculose.

BIBLIOGRAPHIE

ACMSF (2000a). Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food : Heat resistance of *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis (MAP) in milk at pasteurisation temperatures. Paper ACM/486 presented to the committee on the 19 September 2000. **ACM/486**

ACMSF (2000b). Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food : Preliminary results from the national study on the microbiological quality and heat processing of cows' milk : *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis. Paper ACM/485 presented to the committee on the 19 September 2000. **ACM/485**

BOOR, KJ. (2001) Fluid dairy product quality and safety : looking to the future. *J. Dairy Sc.*, **84**,1-11.

BULL TJ, HERMON-TAYLOR J, PAVLIK I, EL ZAATARI FA, TIZARD M. (2000) Characterization of IS900 loci in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and development of multiplex PCR typing. *Microbiology*, **146(9)**, 2185-2197.

CERF O, GRIFFITHS MW. (2000) *Mycobacterium paratuberculosis* heat resistance. *Lett. Appl. Microbiol.*, **30**, 341-344.

CHIODINI RJ, HERMON-TAYLOR J. (1993) The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **5**, 629-631.

DAVEY KR, THOMAS CJ, CERF O. (2001) Thermal death of bacteria. *J. Appl. Microbiol.*, **90**, 148-150.

DIXON B. (2002) The mystery MAP. *Lancet*, **2**, 316.

DORAN T, TIZARD M, MILLAR DS, FORD J, SUMAR N, LOUGHLIN M, HERMONT-TAYLOR J. (1997) IS900 targets translation initiation signals in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to facilitate expression of its *hed* gene. *Microbiology*, **143**, 547-552.

GIESE SB, AHRENS P. (2000) Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. *Vet. Microbiol.*, **77**, 291-297.

GOWER-ROUSSEAU C, SALOMEZ JL, DUPAS JL, MARTI R, NUTTENS MC, VOTTE A, LEMAHIEU M, LEMAIRE B, COLOMBEL JF, CORTOT A. (1994) Incidence of inflammatory bowel disease in northern France (1988-1990). *Gut* **35**, 1433-1438.

GRANT IR. (1998) Does *Mycobacterium paratuberculosis* survive current pasteurization conditions? *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2760-2761.

GRANT IR, BALL HJ, NEILL SD, ROWE MT. (1996a) Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cows' milk at pasteurization temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 631-636.

GRANT IR, BALL HJ, ROWE MT. (1996b) Thermal inactivation of several *Mycobacterium* spp. in milk by pasteurization. *Lett. Appl. Microbiol.* **22**, 253-256.

GRANT IR, BALL HJ, ROWE MT. (1998a) Effect of high-temperature, short-time (HTST) pasteurization on milk containing low numbers of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Lett. Appl. Microbiol.* **26**, 166-170.

GRANT IR, BALL HJ, ROWE MT. (1998b) Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from milk by immunomagnetic separation. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3153-3158.

GRANT IR, BALL HJ, ROWE MT. (1999) Effect of higher pasteurization temperatures, and longer holding times at 72 degrees C, on the inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk *Lett. Appl. Microbiol.* **28**, 461-465.

GRANT IR, BALL HJ, ROWE MT. (2002a) Incidence of Mycobacterium paratuberculosis in Bulk Raw and Commercially Pasteurized Cows' Milk from Approved Dairy Processing Establishments in the United Kingdom. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2428-2435.

GRANT IR, HITCHINGS EI, MAC CARTNEY A,FERGUSON F, ROWE MT. (2002b) Effect of commercial high-scale high-temperature short-time pasteurization on the viability of Mycobacterium paratuberculosis in naturally infected cows' milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 602-607.

GRANT IR, O'RIORDAN LM, BALL HJ, ROWE MT. (2001) Incidence of Mycobacterium paratuberculosis in raw sheep and goat's milk in England, Wales and Northern Ireland. *Vet. Microbiol.* **79**, 123-131.

GRANT IR, ROWE MT,DUNDEE L, HITCHINGS EI. (2001) Mycobacterium avium ssp. Paratuberculosis : ist incidence, heat resistance and edtection in milkand dairy products. *Int. J. Dairy Technol.* **54**, 2-13.

GREEN EP, TIZARD ML, MOSS MT, THOMPSON J, WINTERBOURNE DJ, MAC FADDEN JJ, HERMON-TAYLOR J. (1989) Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of Mycobacterium pratuberculosis. *Nucleic Acids Res.* **17**, 9063-9073.

HAMMER P, KNAPPSTEIN K, HAHN G. (1998) Significance of Mycobacterium paratuberculosis in milk. *Bull. IDF* **330**, 12-16.

HASTING APM, BLACKBURN CDW, CROWTHER JS. (2001) Mycobacterium paratuberculosis and the commercial pasteurization of milk. *Trans. IChemE* **79**, 83-88.

HERMON-TAYLOR J, BULL T.(2002) Crohn's disease caused by Mycobacterium paratuberculosis : a public health tragedy whose resolution is long overdue. *J. Med. Microbiol.* **51**, 3-6.

HOLSINGER VH, RAJKOWSKI KT, STABEL JR. (1997) Milk pasteurization and safety : a brief history and update. *Rev. Sci. Tech.* **16**, 441-451.

KESWANI J, FRANK JF. (1998) Thermal inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *J. Food. Prot.* **61**, 974-978.

KLIJN N, HERREWEGH AA, DE JONG P. (2001) Heat inactivation data for *Mycobacterium paratuberculosis* : implications for interpretation. *J. Appl. Microbiol.* **91**, 697-704.

KLITGAARD NIELSEN K, AHRENS P. (2002) Putative in vitro expressed gene fragments unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **214(2)**, 199-203.

LUND BM, GOULD GW, RAMPLING A. (2002) Pasteurization of milk and the heat resistance of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* : a critical review of the data. *Int. J. Food. Microbiol.* **77**, 135-145.

MANNING EJ, COLLINS MT. (2001) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* : pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev. Sci. Tech.* **20**, 133-150.

MERKAL RS , CRAWFORD JA, WHIPPLE DL. (1979) Heat inactivation of *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare* complex organisms in meat products. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**, 831-835.

MILLAR DS, FORD J, SANDERSON J, WITHEY S, TIZARD M, DORAN T, HERMONTAYLOR J. (1996) IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3446-3452.

MURPHY SC, KOZLOWSKI SM, BANDLER DK, BOOR KJ. (1998) Evaluation of adenosine triphosphate-bioluminescence hygiene monitoring for trouble-shooting fluid milk shelf-life problems. *J. Dairy Sci.* **81**, 817-820.

ODUMERU J, GAO A, CHEN S, RAYMOND M, MUTHARIA L. (2001) Use of the bead beater for preparation of *Mycobacterium paratuberculosis* template DNA in milk. *Can. J. Vet. Res.* **65**, 201-205.

O'MAHONY J, HILL C. (2002) A real time PCR assay for the detection and the quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using SYBR Green and the Light Cycler. *J. Microbiol. Methods.* **51(3)**, 283-293.

PEARCE LE, TRUONG HT, CRAWFORD RA, YATES GF, CAVAGNAC S, DE LISLE GW. (2001) Effect of Turbulent-Flow Pasteurization on Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Added to Raw Milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3964-3969.

RALYEA RD, WIEDMANN M, BOOR KJ. (1998) Bacterial tracking in a dairy production system using phenotyping and ribotyping methods. *J. Food Prot.* **61**, 1336-1340.

ROWE MT, GRANT IR, DUNDEE L, BALL HJ. (2000) Heat resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *Irish J. of Agr. and Food Res.* **39**, 203-209.

SHANAHAN F. (2002) Crohn's disease. *Lancet* **359**, 62-69.

STAL JR, PEARCE LE, CHANDLER R, HAMMER P, KLIJN, CERF O, COLLINS MT, HEGGUM C, MURPHY P. (2001) Destruction by heat of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk and milk products. *Bull. IDF* **362**, 53-61.

STABEL JR, STEADHAM EM, BOLIN CA. (1997) Heat inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk : are current pasteurization conditions effective? *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4975-4977.

STREETER RN, HOFFSIS GF, BECH-NIELSEN S, SHULAW WP, RINGS DM. (1995) Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am. J. Vet. Res.* **56**, 1322-1324.

SUNG N, COLLINS MT. (1998) Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 999-1005.

SWEENEY RW, WHITLOCK RH, ROSENBERGER AE. (1992) Mycobacterium paratuberculosis cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 166-171.

VAITILINGOM M, GENDRE F, BRIGNON P. (1998) Direct Detection of Viable Bacteria, Molds, and Yeasts by Reverse Transcriptase PCR in Contaminated Milk Samples after Heat Treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1157-1160

WEIJLAND A, HARMAK K, COOL RH, ANBORGH PH, PARMEGGIANI A.(1992) Elongation factor Tu : a molecular switch in protein biosynthesis. *Mol. Microbiol.* **6**, 683-688.

ANNEXES

- 1- Tableau comparatif des aspects pathologiques de la paratuberculose et de la maladie de Crohn.**
- 2- Protocole PCR IS900**
- 3- Notice iCycler IQ Bio-rad®**
- 4- Protocole d'extraction des ARNs et de l'ADN**
- 5- Notice iCycler iQ Real-Time PCR Detection System Bio-rad®**
- 6- Notice DNase I Amplification Grade Invitrogen®**
- 7- Notice Sensiscript Reverse Transcriptase Qiagen®**

1- Tableau comparatif des aspects pathologiques de la paratuberculose et de la maladie de Crohn

	Maladie de Crohn	Paratuberculose
Localisation des lésions		
-cavité buccale et oesophage	Oui	Non
-iléon et colon	Oui	Oui
-nœuds lymphatiques mésentériques	Oui	Oui
-rectum, anus	Oui	Evolution tardive
-autres parties du tube digestif	Oui	Oui
Examen macroscopique		
-aspect macroscopique	Oedème de la paroi intestinale concernée	Epaississement de la paroi intestinale
-oedème pariétal	Oui	Oui
-sténose	Oui	Rare
-perforation	Oui	Rare
-fistules	Oui	Non
-pseudopolypes	Oui	Non
-aspect de la muqueuse	pierreuse	plissée
Examen microscopique		
-	Oui	Oui
-fibrose	Oui	Non
-agrégations lymphoïdes	Oui	Oui
-granulomes	Oui	Oui
-caséification	Non	Non en général
-fissures	Oui	Non
-bacilles acido-résistants visibles	Non	Oui

2- Protocole PCR IS900

a- Mélange à préparer pour chaque échantillon (49µl par puit)

Tampon 10X de la Taq	5µl
dNTP	1µl
P25 (10µM)	1µl
P26 (10µM)	1µl
Taq (Roche)	0.5µl
H2O	40.5µl

b- Ajouter 1µl d'échantillon

c- Lancer avec le programme suivant :

95°C pendant 10 min.

40 cycles : 95°C pendant 30 s.
62°C pendant 30 s.
72°C pendant 30 s.

Puis 72°C pendant 10min.

3- Notice iCycler IQ Bio-rad®

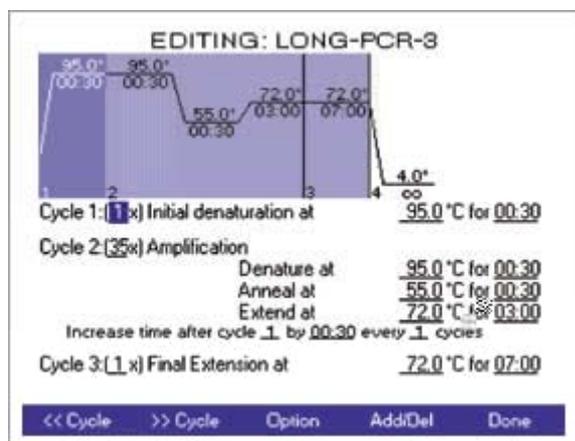
iCycler Thermal Cycler



The iCycler thermal cycler maximizes what a thermal cycler can do for your laboratory. It features multiple sample formats, an easy graphic interface, and best of all, direct upgradability to real-time quantitative PCR. The iCycler thermal cycler will raise your expectations of what a thermal cycler can do for you.

iCycler Thermal Cycler Features:

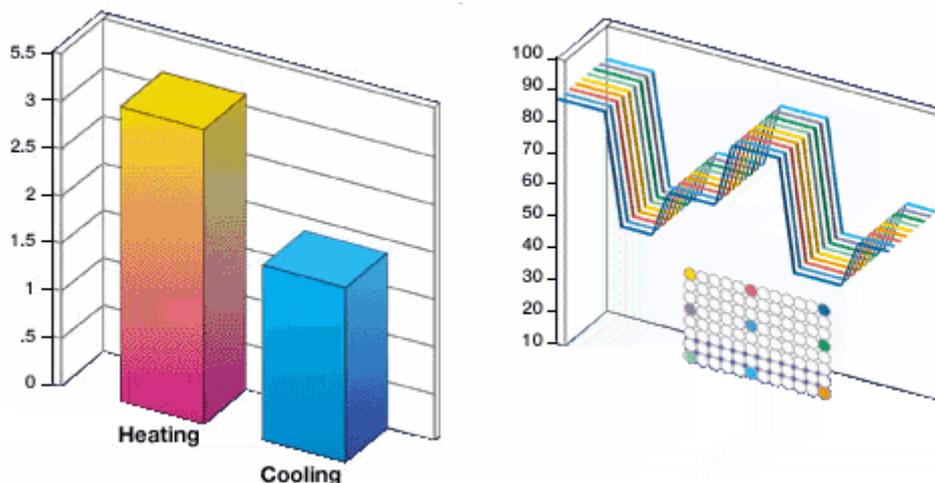
- Graphical representation of protocols, menu-driven software, and ready-made templates for ease in viewing, editing, and running
- Direct modular upgrade to quantitative PCR capability
- Maximum sample flexibility accommodates 0.2 ml tubes, strips and plates, and 0.5 ml tubes
- Temperature monitoring and control can be specified by in-sample probe, block, or instrument algorithm
- Optional security for protection of folders and protocols
- Wide range of programmable personal preferences
- Alphanumeric naming for maximum flexibility in storing protocols, naming folders, and identifying users
- Storage of detailed validation and run reports as well as hundreds of protocols
- NIST-traceable accuracy of temperature measurements
- Free thermal gradient upgrade
- Gradient design for maximum reagent optimization



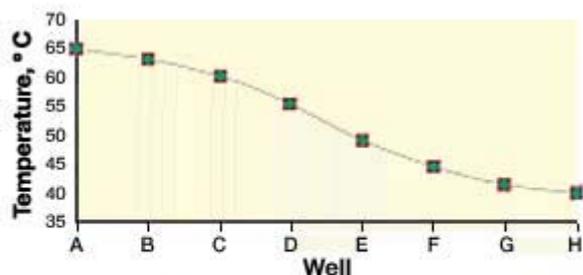
- 1/4 VGA screen that displays graphs and protocols in familiar language
- Preprogrammed protocol templates to jump-start your PCR analysis and real-time quantitative PCR

The iCycler base unit provides superior accuracy, uniformity, and speed, as well as an exceptionally reliable high level of cycling performance.

- In many instruments currently available, accuracy decreases as sample block temperature increases. The iCycler thermal cycler is manufactured using a NIST-traceable process to ensure accuracy of $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ over the entire range of cycling temperatures
- Likewise, sample block uniformity is difficult to maintain at higher temperatures, yet the iCycler instrument achieves an exceptional $\pm 0.4^{\circ}\text{C}$ over the entire sample block area



- Speed of cycling is critical to obtaining high throughput of samples and maximum availability of the instrument for multiple researchers; the iCycler thermal cycler attains heating speeds of up to 3.3°C per second, and temperature can be controlled via block, probe, or algorithm



Displayed (◆) and actual (■) temperatures for the iCycler. Actual temperatures are average \pm SD for 4 thermal cyclers. (Error bars showing SD are smaller than size of symbols.)

- A free firmware upgrade provides thermal gradient functionality. The design of the iCycler thermal gradient provides maximum reagent and thermal optimization possibilities. The accuracy of the displayed temperature ensures a smooth transition to your standard assay.

Practice of the patented polymerase chain reaction (PCR) process requires a license. The iCycler iQ system includes a licensed thermal cycler and may be used with PCR licenses available from Applied Biosystems. Its use with authorized reagents also provides a limited PCR license in accordance with the label rights accompanying such reagents. Some applications may require licenses from other parties.

4- Protocole d'extraction des ARNs et de l'ADN

Remarque : Manipuler les produits chimiques sous hotte.

Les produits chimiques utilisés sont conservés à 4°C

A partir de l'étape 12, travailler dans la glace

1- Ajouter environ 46ml d'eau milliQ stérile à 20 ml de lait contaminé et équilibrer les tubes sous la hotte avec de l'eau mQ stérile

2- Ultracentrifugation à 50000 x g (45000rpm) à 4°C pendant 1 heure.

3- Elimination de la crème avec une spatule stérile et élimination du petit lait, on ne conserve que le culot (possibilité de congeler le culot à -80°C).

4- Effectuer 3 lavages successifs du culot avec 2ml du PBS avec entre chaque lavage une centrifugation 15000g à 4°C pendant 15 minutes. Bien resuspendre le culot après centrifugation.

Après le 3^e lavage, repartir le culot resuspendu dans 4 tubes Eppendorff (1ml dans chaque, 2 pour les ARN et 2 pour les ADN) et s'aider du bout d'une pipette stérile.

Culot repris dans 0.5 ml de trizol ,et répartition de 2 Eppendorff dans 1 des tubes à bouchon bleu HYBAID RiboLyserTM en s'aidant d'une pipette stérile.

5- Laisser 5 minutes dans la glace.

6- Casser les cellules à l'aide d'un HYBAID RiboLyserTM vitesse 6 pendant 30 secondes puis placer les tubes 30 secondes dans la glace.

7- Répéter l'étape 6.

8- Ajouter 0.2 ml de chloroforme (CH₃Cl) par ml de trizol et vortexer pendant 15 secondes.

9- Centrifuger les tubes 15 minutes à 12000g à 10°C (sur la minispin eppendorff, garder le rotor à -20°C avant les manip).

10- Prélever le surnageant et ajouter 0.6 vol d'isopropanol par rapport au volume prélevé et laisser toute la nuit à -20°C.

11- Centrifuger 30 minutes à 12000g à 4°C.

12- Faire 2 lavages successifs à l'éthanol 70% (280µl éthanol 100% + 120µl d'eau DEPC) froid (200µl-12000g pendant 5mn à 4°C) et sécher sous une hotte 10min. maximum (bien retirer les gouttes à l'aide d'une pipette) à température ambiante.

13- Resuspendre les culots dans 30µl d'eau DEPC.

14- Garder à -80°C un exemplaire de chaque tube comme ADN.

15- Traitement à la DNase , amplification Grade I (Invitrogen®) :

Ajouter 5µl de tampon 10X DNase + 13µl d'eau DEPC + 2µl de DNase (Vtot=50µl).

Laisser 15min à température ambiante.

16- Centrifuger rapidement les tubes Phase Lock Gel (pour faire descendre le gel).

17- Ajouter 50µl d'eau DEPC puis transférer dans cette phase aqueuse les échantillons.

18- Ajouter 100µl de chloroforme/alcool isoamylique (IAA,pH=7.9) et vortexer.

19- Centrifuger 15 min 12000g à 4°C.

20- Prélever le surnageant et le transférer en eppendorff.

21- Ajouter 10µl d'acétate de sodium (3M) et 200µl d'éthanol 100% froid et laisser 30min à -80°C.

22- Centrifuger 30 min 15000g à 4°C.

23- Vider avec une pipette le surnageant et sécher les petits culots à température ambiante sous une hotte environ 5minutes.

24- 2^e traitement DNase amplification Grade I (Invitrogen®, annexe 6) : 12.5µl d'eau DEPC +1.5µl de tampon 10X DNase + 1µl de DNase I amplification grade.

25- Laisser 15 min à température ambiante.

26- Ajouter 1µl d'EDTA 25mM puis chauffer 10 min à 65°C.

27- Conserver les ARN à -80°C.

5- Notice iCycler iQ Real-Time PCR Detection System Bio-rad®



The iCycler iQ real-time PCR detection system is a sophisticated optical system that fits directly above the iCycler thermal cycler. It covers the widest range of excitation/emission wavelengths available, facilitating the greatest array of fluorescent PCR strategies. With this upgrade the iCycler thermal cycler expands the advantages PCR brings to your research.

Features:

- Real-time analysis can be viewed online, during the PCR
- Range of fluorophore excitation and emission from 400–700 nm
- 4 different fluorophores can be multiplexed per sample tube
- 96 samples can be tracked simultaneously, maximizing throughput
- Sample data can be reanalyzed at any time
- Raw data files are user accessible
- Easy, intuitive software speeds setup and data presentation
- Storage of hundreds of protocols
- Standard PCR plate format accommodates existing protocols and minimizes costs
- User interface offers easy yet powerful options for data analysis
- Real-time quantitative PCR provides accurate quantitation, accelerating lead identification in drug discovery and improving viral load assessment
- iCycler iQ software is designed to automate analysis options, including quantitative and melt-curve analysis; you can also choose to reanalyze raw data at any point post-run
- Monitor the thermal protocol in real time, saving time and effort in your analysis
- Closed-tube analysis reduces contamination concerns and speeds time to results

Practice of the patented polymerase chain reaction (PCR) process requires a license. The iCycler iQ system includes a licensed thermal cycler and may be used with PCR licenses available from Applied Biosystems. Its use with authorized reagents also provides a limited PCR license in accordance with the label rights accompanying such reagents. Some applications may require licenses from other parties.

6- Notice Dnase amplification grade I Invitrogen



Deoxyribonuclease I, Amplification Grade

Cat. No. 18068-015
Conc.: 1 U/ μ l

Size: 100 Units
Store at -20°C in a non-frost-free freezer.

Description:

Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (DNase I, Amp Grade) digests single- and double-stranded DNA to oligodeoxy-ribonucleotides containing a 5'-phosphate. It is suitable for eliminating DNA during critical RNA purification procedures such as those prior to RNA-PCR amplification. DNase I, Amp Grade is purified from bovine pancreas and has a specific activity of $\geq 10,000$ U/mg.

Components:

18068-015 DNase I, Amp Grade
Y02340 10X DNase I Reaction Buffer
Y02353 25 mM EDTA (pH 8.0)

Unit Definition:

One unit increases the absorbance of a high molecular weight DNA solution at a rate of $0.001 A_{260}$ units/min/ml of reaction mixture at 25°C.

Storage Buffer:

20 mM sodium acetate (pH 6.5)
5 mM CaCl_2
0.1 mM PMSF
50% (v/v) Glycerol

Unit Assay Conditions:

0.1 M sodium acetate (pH 5.0)
5 mM MgCl_2
50 μ g/ml calf thymus DNA

10X DNase I reaction Buffer:

200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 20 mM MgCl_2 , 500 mM KCl

Doc. Rev.: 012802

This product is distributed for laboratory research only. CAUTION: Not for diagnostic use. The safety and efficacy of this product in diagnostic or other clinical uses has not been established.

For technical questions about this product, call the Invitrogen Tech-LineSM U.S.A. 800 955 6288

Quality Control:

The ability to digest double-stranded DNA to oligonucleotides is confirmed. DNase I and components are tested for the absence of RNase activity by incubating with 0.24-9.5 Kb RNA Ladder; gel analysis shows no degradation of the RNA ladder as compared to a no-DNase I control.

The enclosed buffers were assayed with the enzyme and met quality control specifications.

Protocols:

Preparation of RNA Sample Prior to RT-PCR:

Prepare duplicate tubes if positive and negative reverse transcriptase (RNA) samples are to be used in the amplification reaction. Add the following to an RNase-free, 0.5-ml microcentrifuge tube on ice:

- 1 µg RNA sample
- 1 µl 10X DNase I Reaction Buffer
- 1 µl DNase I, Amp Grade, 1 U/µl
- DEPC-treated water to 10 µl

NOTE: To work with larger amounts of RNA, scale up the reaction (including volume) linearly.

Incubate tube(s) for 15 min at room temperature. Inactivate the DNase I by the addition of 1 µl of 25 mM EDTA solution to the reaction mixture. Heat for 10 min at 65°C. The RNA sample is ready to use in reverse transcription, prior to amplification.

NOTE: It is important not to exceed the 15-minute incubation time or the room-temperature incubation. Higher temperatures and longer time could lead to Mg⁺⁺-dependent hydrolysis of the RNA. Additionally, it is vital that the EDTA be added to at least 2 mM prior to heat-inactivation to avoid this problem.

Cat. No. 18068-015

7- Notice Sensiscript Reverse Transcriptase Qiagen®

For reverse transcription using small amounts of RNA (i.e., less than 50 ng RNA including carrier RNA)

- Novel enzyme and unique buffer for high specificity
- Detect as few as 10 copies or start with as little as 1 pg RNA
- H

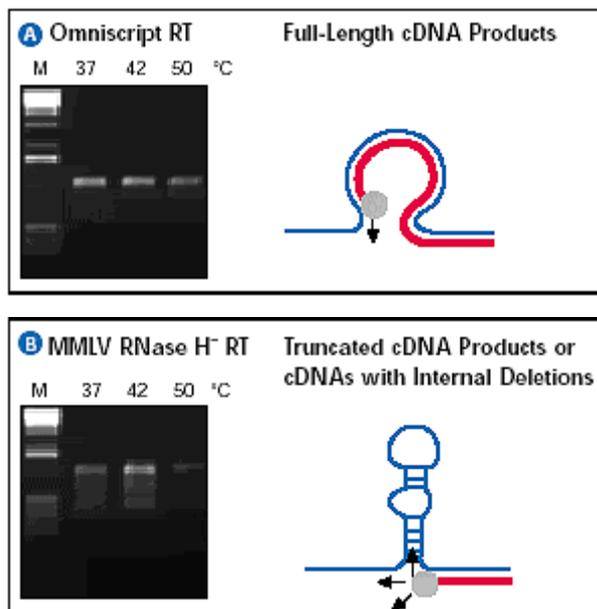
Principle

QIAGEN offers two recombinant reverse transcriptases with high affinity for RNA. This high affinity results in highly specific and sensitive RT-PCR even with low-copy transcripts, giving them the ability to read through even complex RNA secondary structures without adjusting temperature or reaction conditions.

Regions of RNA with high GC content can cause other reverse transcriptases to stop, dissociate from the RNA template, or skip over looped-out regions of RNA (see figure "[Full-Length RT-PCR Products](#)"). These difficult templates, however, prove no problem for QIAGEN reverse transcriptases (see figure "[Full-Length RT-PCR Products](#)"). With no need for optimization, the Sensiscript RT Kit makes reverse transcription trouble-free.

Lot-to-lot reproducibility of QIAGEN RT Kits is ensured by rigorous quality control at QIAGEN. The optimized Buffer RT, dNTPs, and water included in all Sensiscript RT Kits, are guaranteed RNase-free, and each lot of QIAGEN Reverse Transcriptases is thoroughly tested for RT-PCR reproducibility.

Full-Length RT-PCR Products



RT-PCR was carried out with total RNA from maize leaves using the indicated RT reaction temperatures. A 1.2 kb fragment of the GC-rich maize *gl2* transcript was amplified. **A** RT was carried out using the standard Omniscrypt RT protocol at the standard (37°C) and higher reaction temperatures as indicated. **B** RT was carried out using the standard MMLV RNase H⁻ RT protocol (Supplier L) at the standard (42°C) and other reaction temperatures as indicated. This standard protocol was carried out with the required preliminary denaturation step and the recommended RNase H digest step following RT. (Data from [reference 1](#))

Applications

QIAGEN Reverse Transcriptases are the ideal choice for gene-expression analysis and other applications such as:

- cDNA synthesis
- RT-PCR
- Quantitative RT-PCR
- Primer-extension and RACE analysis
- Differential display

Cited Reference

1. Korfhage, C., Fisch, E., Schröder-Stumberger, I., and Oelmüller, U. (2000) Solving difficult template problems in RT-PCR. *QIAGEN News* 2000 No. 1, 12

CONTAMINATION DU LAIT DE VACHE PAR MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSPECIES PARATUBERCULOSIS : ESSAI DE DETECTION PAR RT-PCR

Nom et Prénom : BLAVETTE Gaël

RESUME

La paratuberculose est une maladie courante du bétail causée par *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. Il a été suggéré que cette mycobactérie puisse jouer un rôle dans la maladie de Crohn chez l'homme. *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* peut être présente dans le lait des animaux infectés et semble avoir la capacité de résister aux traitements de pasteurisation. L'objectif de cette étude était de récolter du lait naturellement contaminé et de le soumettre à un test alliant une PCR spécifique ciblée sur IS900 et une RT-QPCR quantitative ciblée sur EF-Tu, un élément du génome bactérien présent en grande quantité, pour garantir la viabilité des éléments détectés. **Méthode** : Le protocole incluait 26 animaux de race laitière ayant un statut positif certain vis à vis de la paratuberculose. Les échantillons de lait étaient soumis à un premier tri par la PCR IS900. Puis la RT-QPCR devait confirmer la présence de cellules de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* vivantes et les quantifier. **Résultats** : La PCR IS900 a relevé des traces d'ADN de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* dans 2 des échantillons testés mais tous les autres tests se sont avérés négatifs. **Discussion** : Plusieurs hypothèses sont envisageables pour expliquer les résultats négatifs en culture et en RT-PCR, il est actuellement impossible de valider ce test dans le cadre de la détection de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* dans le lait.

Mots clés : paratuberculose, *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*, RT-PCR, lait, vache

JURY

Président :
Directeur : Pr. BRUGERE-PICOUX
Assesseur : Pr. CARLIER
Invitée : Mme PARIS

Adresse de l'auteur :
BLAVETTE G.- 51 rue du Souchet – 61270 AUBE

COW'S MILK'S CONTAMINATION BY MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSPECIES PARATUBERCULOSIS : DETECTION ATTEMPT BY RT-PCR

SURNAME and given name : BLAVETTE Gaël

SUMMARY

Paratuberculosis is a common disease of cattle caused by the infection with *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. It has been suggested that this mycobacterium may play a role in the aetiology of Crohn's disease in humans. *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* can be shed in contaminated cow's milk and seems to be able to survive pasteurization. The aim of this study was to get naturally contaminated raw milk and submit it to a test composed with a specific PCR targetting IS900 and a RT-QPCR aiming EF-Tu, an element of bacterial genoma highly present, to guaranty the viability of detected elements. **Méthod** : The protocol concerned 26 animals that were preliminary ELISA positive for paratuberculosis. Milk samples were first screened with the PCR IS900. Then, the RT-QPCR was performed to confirm the presence of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* alive and quantify it. **Résultats** : PCR IS900 revealed DNA from *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* in two of 26 tested samples but any of the other detection methods didn't give a positive result. **Discussion** : There are many hypothesis to explain the negative results of PCR and cultivation, it's actually impossible to validate it for the detection of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* in milk.

Key words : paratuberculosis, *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*, RT-PCR, milk, cow

JURY

President :
Director : Pr. BRUGERE-PICOUX
Assessor : Pr. CARLIER
Guest : Ms. PARIS

Author's address :
BLAVETTE G.- 51 rue du Souchet – 61270 AUBE