Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE À FINALITÉ APPROFONDIE

Caractérisation d'un modèle expérimental d'infection **in utero par Brucella melitensis chez la souris**

BARBIEUX, Emeline

Award date:
2019

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 02. May. 2026

Faculté des Sciences

CARACTERISATION D'UN MODELE EXPERIMENTAL D'INFECTION *IN UTERO* PAR *BRUCELLA MELITENSIS* CHEZ LA SOURIS

Mémoire présenté pour l'obtention

du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Emeline BARBIEUX

Janvier 2019

Université de Namur
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - http://www.unamur.be

Caractérisation d'un modèle expérimental d'infection *in utero*
par *Brucella melitensis* chez la souris

BARBIEUX Emeline

Résumé

Brucella est une bactérie Gram négative intracellulaire appartenant aux α-protéobactéries causant la brucellose, zoonose mondialement répandue. Chez les animaux, l'infection entraîne principalement l'avortement chez les femelles gestantes et la stérilité chez les mâles. L'homme est un hôte accidentel qui peut être infecté de manière chronique. Chez les souris adultes, le contrôle de l'infection par *Brucella* implique une réponse de type Th1, régulée par les lymphocytes T CD4 producteurs d'IFN-γ. Le système immunitaire fœtal des nouveau- nés est généralement considéré comme immature et peu apte à produire une réponse Th1.
Le premier objectif de ce mémoire fut de développer un modèle expérimental de transmission maternelle de *Brucella melitensis* chez la souris et de déterminer le taux d'infection des fœtus. Après une infection par $5x10^4$ CFU des souris gestantes, une infection par *Brucella* est détectée chez ~50% des fœtus. En dépit d'une importante infection du placenta et de la membrane vitelline, certains fœtus ne présentent pas d'infection détectable. Notre deuxième objectif fut d'analyser la capacité des souris nées de mères infectées par *Brucella* durant leur gestation (F1 *Br*-M) à contrôler à l'âge adulte une nouvelle infection par *Brucella*. De manière surprenante, nous avons observé que plus de 90% des F1 *Br*-M présentent une bien meilleure résistance à une nouvelle infection par *Brucella*. Les taux de bactéries dans la rate et le foie sont 10 à 100 fois plus faibles que ceux de souris contrôles infectées. Une réponse humorale spécifique de *Brucella*, dominée par des IgG3, ainsi qu'une production d'IFN-γ importante sont détectées chez ~10-20% des F1 *Br*-M et ne semblent pas systématiquement corrélées au contrôle d'infection. De manière surprenante, l'IFN-γ produit par les F1 *Br*-M lors d'un challenge *in vivo* par *Brucella* n'est pas produit par les lymphocytes T. Cette origine inhabituelle de l'IFN-γ suggère que certains F1 *Br*-M ont développé une mémoire non conventionnelle contre *Brucella*.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2019

Promoteur: E.Muraille, **Co-Promoteur:** X. De Bolle

Remerciements

Je souhaiterais remercier mon promoteur, le professeur Eric Muraille pour m'avoir proposé ce sujet de mémoire très intéressant et enrichissant. Je vous remercie pour les discussions très instructives concernant le sujet du mémoire, l'immunologie, les souris, la bactérie *Brucella.* Je vous remercie également pour le temps passé à me conseiller, à éclaircir mes idées ainsi qu'à corriger mon écrit. Un grand merci également pour votre disponibilité et la confiance que vous m'avez accordée pour mener à bien ce sujet de mémoire.

J'aimerais remercier les membres de mon jury, les professeurs T. Arnould et I. Hamer, le docteur F. Bauer et madame M. Van der Henst pour vos conseils, vos questions pertinentes et bien sûr pour le temps que vous avez consacré à lire et évaluer le travail effectué durant les 10 derniers mois.

La personne à énormément remercier est Aurore, ma tutrice. Je te remercie pour ta patience et ton écoute. Je te remercie pour m'avoir poussée dans mes retranchements et franchir ce stress un peu trop envahissant. Je te remercie pour ta bonne humeur et ton talent de chanteuse, un merci particulier pour avoir enrichi ma culture musicale. Je te remercie pour tes conseils et ton aide durant les journées de challenge. Je te remercie pour ta compagnie au BL3 durant les longues journées que nous avons passées seules dans l'alcôve « invité ». Je te remercie pour m'avoir fait partager ce monde de la recherche et formé au métier de chercheur durant ces dix mois.

Je souhaiterais remercier toutes les personnes du laboratoire pour leurs conseils et l'aide dans la réflexion. Je souhaiterais particulièrement remercier Georges et Angy qui se sont intéressés à mon sujet de mémoire ainsi que Katy pour les discussions concernant le futur.

Merci aux mémorants et stagiaires, Thomas, Antoine, Mélanie, Boutaina, FX et Ysaline pour m'avoir supportée durant plusieurs mois ! Entre le stress, la joie, les manips qui ratent sans raison compréhensible, les résultats qui sont prometteurs, je ne devais pas être facile à vivre. Je m'excuse aussi pour la chaleur que j'ai infligée au bureau. On était dans la même galère mais on l'a surmontée et ce malgré les bruits des travaux !

Je souhaiterais ajouter un mot pour remercier ma famille, particulièrement mes parents et ma sœur pour m'avoir soutenue durant mon parcours. Je remercie ma petite-cousine pour m'écouter et surtout comprendre lorsque je parlais de mes études. Je remercie aussi le KapForScience et ses membres qui m'ont écoutée parler de souris, de *Brucella*, d'immunité, de manipulations tous les jours.

Abréviations

ARN	Acide ribonucléique
BCR	*B cell receptor*
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BCV	*Brucella containing vacuole*
BL3	*Biosafety level 3 lab*
BSA	*Bovine Serum Albumin*
C57BL/6	*C57 black 6*
CD	*Cluster of differentiation*
CD4	*CD4 αβTCR T cells*
CD8	*CD8 αβTCR T cells*
CFU	*Colony forming units*
Ctrl	Contrôle
dNTP	Désoxyribonucléotide
DO	Densité optique
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
ER	Réticulum endoplasmique
F1 *Br*-M	Souris dont la mère a été infectée avec la bactérie *Brucella*
F1 PBS-M	Souris dont la mère a été injectée avec du PBS
FcR	Récepteurs Fc
FACS	*Fluorescence-activated cell sorting*
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GBS	Streptococcus de groupe B
HBV	Virus de l'hépatite B
HK	*Heat-killed*
IFN	Interféron
IFN-γR	Interféron-gamma Receptor
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukin
i.n.	Intranasale
i.p.	Intrapéritonéale
i.v.	Intraveineuse
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharides
M	Souris mère
M *Br*	Mère infectée avec la bactérie *Brucella*
M PBS	Mère injectée avec du PBS
MHC	Complexe majeur d'histocompatibilité
µMT	Mu-MT
NK	*Natural Killers*
ns	Non significatif
OMS	Organisation mondiale de la Santé

ORF	*Open reading frame*
P	*P-value*
PAMPs	*Pathogen Associated Molecular Patterns*
PBS	*Phosphate Buffer Sodium*
p.c	*post challenge*
PCR	*Polymerase chain reaction*
PFA	Paraformaldéhyde
pH	Potentiel hydrogène
p.i.	*Post-infection*
PRRs	*Pattern Recognition Receptors*
RPM	Révolution par minute
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute medium*
RT	*Room Temperature*
SAW	Séroagglutination de Wright
s.c.	Sous-cutanée
sp	*Species*
SPF	*Specific Pathogen Free*
spp	*Species pluralis*
ss	S*ingle-stranded*
STAT	*Signal Transducers and Activators of Transcription*
T-bet	*T-box expressed T cells*
T4SS	Système de sécrétion de Type IV
TCR	*T cell receptor*
Th	*T helper*
TLR	*Toll-like receptors*
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF-α	*Tumor necrosis factor alpha*
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VRS	Virus syncytial
WT	*Wild type*
YT	*Yeast Extract Tryptone*

Table des matières

Remerciements 3

Abréviations 4

Introduction 10

1. Relation entre deux organismes 11

2. Le système immunitaire 11

2.1 La réponse innée 11

2.2 La réponse adaptative 13

3. La brucellose 15

3.1 Symptômes de la brucellose 15

3.2 Détection de la brucellose 16

3.3 Vaccination et traitement de la brucellose 17

3.4 Niches tissulaires et cellulaires de *Brucella* 17

3.5 Trafic intracellulaire de *Brucella* 19

4 Le modèle expérimental d'infection souris par *Brucella* 19

4.1 La réponse immune contre *Brucella* chez la souris 20

4.2 Mécanisme d'échappement au système immunitaire de *Brucella* 21

5. La réponse immunitaire des nouveau-nés après une infection *in utero* 22

5.1 Transmission verticale d'anticorps 23

5.2 Réponse de type Th1 chez le nouveau-né 24

5.3 Développement d'une mémoire immune chez le nouveau-né 25

5.4 Transmission verticale des pathogènes 26

6. L'infection maternelle par *Brucella* 28

Objectifs 29

Matériel et méthodes 30

1. Animaux, souches bactériennes et solutions 31

1.1 Souris 31

1.2 Comité éthique 31

1.3 Bactéries 31

1.4 Milieu de culture bactérien 2YT agar 31

1.5 Milieu de culture bactérien 2YT liquide 32

1.6 Solution saline tamponnée au phosphate (PBS 10X) 32

1.7 Milieu de lyse Triton X-100 32
1.8 Milieu de fixation, paraformaldéhyde (PFA – 4 %) 32
1.9 Tampon pour le FACS (FACS buffer) 33
2. Méthodes 33
2.1 Réveil d'une souche de *Brucella* 33
2.2 Culture liquide de *Brucella* 33
2.3 Infection de souris par voie intrapéritonéale 34
2.4 Mesure de la charge bactérienne (CFU) des tissus 34
2.5 Détection de *Brucella* par PCR sur des colonies 35
2.6 Récupération du plasma des souris 35
2.7 Euthanasie de souris gestantes et de fœtus 36
2.8 Dosage des anticorps anti-*Brucella* dans le plasma de souris par ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 36
2.9 Mesure de la fréquence des cellules exprimant l'IFN-γ dans la cavité péritonéale 37
2.10 Cytométrie en flux intracellulaire 38
2.11 Analyses statistiques des résultats 39
Résultats 40
1. Détermination de la dose infectieuse optimale 41
2. Identification du mode d'infection des F1: oral versus *in utero* 42
3. Développement d'un modèle expérimental afin de mesurer l'impact d'une infection *in utero* par *Brucella melitensis* sur la croissance des F1 et leur résistance à une nouvelle infection par *Brucella* 44
4. L'infection maternelle ne semble pas affecter la croissance des F1 45
5. L'infection maternelle induit chez certains F1 une réponse humorale dominée par les IgG3 45
6. L'infection maternelle par *Brucella* induit chez les F1 une meilleure résistance à une seconde infection par *Brucella*, dépendante de la réponse humorale 47
7. L'infection maternelle par *Brucella* augmente la capacité des F1 à produire une réponse Th1 lors d'une nouvelle infection par *Brucella* 48
8. L'infection maternelle à basse dose induit également une augmentation de la résistance à *Brucella* 50
Discussion 51
1. Etablissement d'un modèle d'infection *in utero* par la bactérie *Brucella melitensis* chez la souris... 52
2. Les souris provenant de mères infectées par *Brucella* durant la gestation acquièrent une résistance face à une nouvelle infection par *Brucella.* 53
Perspectives 55

1. Reproduction des résultats 56
2. Injection de souris gestantes avec *Brucella melitensis* WT HK..... 56
3. Injection de souris gestantes avec *Brucella melitensis* Δ*vir*B..... 56
4. Infection par voie intranasale..... 56
5. F1 hétérozygotes pour la production d'Ig 57
6. Détermination de l'importance de l'IL-12 produit par les F1 pour contrôler l'infection 57
7. Corrélation entre infection *in utero* (CFU), présence d'Ig spécifiques anti-*Brucella* et détection de l'IFN-γ..... 57
8. Evaluation de l'importance de la persistance de *Brucella* chez les F1 infectés *in utero* dans le développement d'une mémoire protectrice contre *Brucella* 58
9. Evaluation du taux d'infanticide en fonction de l'injection 58
10. Identification des cellules productrices d'IFN-γ chez les souris F1 âgées de 9 semaines 58
Bibliographie..... 59
Figures supplémentaires 69

> « J’ai appris que le courage n’est pas l’absence de peur, mais la capacité de la vaincre. »
>
> Nelson Mandela

Introduction

Introduction

1. Relation entre deux organismes

La symbiose (du grec σύν sýn, ensemble et βίος bíos, vivre) est une association durable entre organismes d'espèces différentes. On distingue schématiquement les associations au profit des deux organismes (**mutualisme**) et au profit d'un seul organisme sans effet sur le second (**commensalisme**). Mais elles peuvent aussi être bénéfiques pour un des organismes tandis que l'autre subit des effets négatifs (**parasitisme**). Dans ce dernier cas, l'organisme « parasite » tire profit de l'organisme hôte pour se nourrir, se reproduire et se protéger de l'environnement extérieur. On parle d'**agent infectieux** ou **pathogène** pour désigner les organismes pratiquant le parasitisme, ayant la capacité de se multiplier au sein de leur hôte et infligeant des dégâts à celui-ci. Un agent infectieux doit nécessairement disposer de mécanismes lui permettant d'échapper au système immunitaire de son hôte.

2. Le système immunitaire

Le système immunitaire est un ensemble coordonné d'éléments de reconnaissance et de défense capable de discriminer le soi du non-soi. Il participe à l'entretien de l'organisme (notamment l'élimination des cellules en apoptose) et à la défense de celui-ci contre les agents infectieux. Il est traditionnellement divisé en **système immunitaire inné et adaptatif**. Les éléments du système inné sont prêts à agir lors de l'entrée d'un agent pathogène au sein de l'hôte. La réponse innée est rapide et stéréotypée. Elle est déclenchée par la reconnaissance de structures conservées et typiques des agents pathogènes, les ***Pathogen Associated Molecular Patterns*** (**PAMPs**). A l'inverse, le système adaptatif présente une grande plasticité dans sa réponse. Celle-ci se développe lentement lors d'une infection mais est très spécifique de l'agent pathogène. Elle donne lieu à une réponse effectrice et à une mémoire immunitaire de longue durée permettant une réponse plus rapide et plus efficace lors d'un nouveau contact avec le même agent pathogène.

2.1 La réponse innée

Les PAMPs sont reconnus par des récepteurs cellulaires nommés ***Pattern Recognition Receptors*** (**PRRs**). L'activation de ces PRRs induit la réponse immunitaire innée, composée de cellules mais également d'éléments solubles capables de réagir immédiatement à la présence d'un agent pathogène.
Parmi ceux-ci, citons:

- **Les *Natural Killers* (NK)**, cellules lymphocytaires capables, une fois activées, d'induire la mort cellulaire programmée (apoptose) des cellules infectées. Pour y

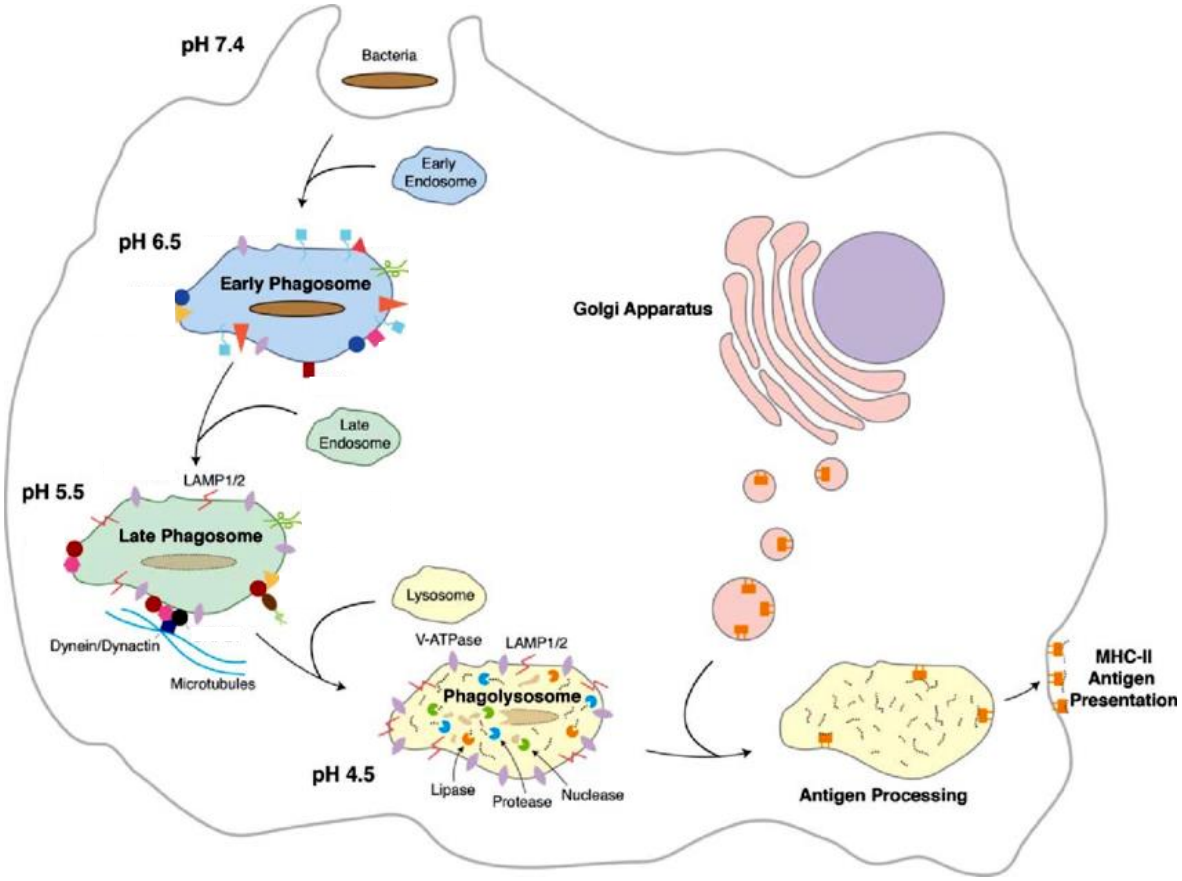


Figure 1 : La phagocytose par un macrophage. Le pathogène à proximité de la cellule se fait encercler par les pseudopodes formés par le macrophage et internaliser. Le pathogène se retrouve dans une vacuole qui va progressivement s'acidifier et fusionnera avec un lysosome contenant des enzymes de dégradation. Les débris du pathogène sont évacués en dehors de la cellule par exocytose et les peptides antigéniques générés sont présentés à la surface cellulaire en association avec le MHCII.
(Figure modifiée à partie de Poirier *and* Av-Gay, 2016)

parvenir, les NK génèrent des perforations dans la membrane des cellules par l'intermédiaire de perforines permettant la pénétration de granzymes (sérines protéases) capables de déclencher l'apoptose des cellules. Elles produisent également des cytokines proinflammatoires comme le *Tumor Necrosis Factor – alpha* (TNF-α) et l'Interféron gamma (IFN-γ) (Bancroft, 1993 ; Topham *and* Hewitt, 2009).

- **Les macrophages** sont des cellules myéloïdes réalisant, entre autre, la phagocytose (Aderem *and* Underhill, 1999 ; Metschnikoff, 1891).
  La phagocytose peut être de différents types :
  - Endocytose : processus indépendant de l'actine qui permet d'internaliser de petites molécules. Les puits d'internalisation peuvent être recouverts de clathrines. La membrane va se replier sur elle-même et fusionner pour former une vésicule contenant les molécules à ingérer.
  - Phagocytose : processus qui dépend de l'actine. Les macrophages internalisent des particules d'un diamètre supérieur à 0,5 µm qui peuvent être des microbes, des débris cellulaires, des cellules mortes.
  - Autophagie : la cellule dégrade les éléments propres à la cellule (organites, facteurs solubles, cytosol).

  Lorsque le phagocyte rencontre la cible et la détecte grâce à ses récepteurs de surface, il reçoit des informations sur ses propriétés qu'elles soient chimiques ou physiques. En fonction de ces informations, la cible ne sera pas dégradée de la même manière, la cellule phagocytaire va répondre différemment. La taille des particules influence le type de cytokines inflammatoires. Par exemple, l'interféron α est produit quand la particule a une taille entre 220 nm et 500 nm (comme certains virus) mais pas lorsque qu'elle mesure 1200 nm (Underhill *and* Goodridge, 2012).

  De manière générale, la phagocytose (**Figure 1**) consiste à internaliser les agents pathogènes dans une vacuole intracellulaire, le ***phagosome précoce*** (*early phagosome)*. Il fusionnera avec des lysosomes contenant des enzymes et des radicaux libres (H_20_2, NO) permettant la dégradation des agents pathogènes et la formation d'un ***phagolysosome***. Les micro-organismes se lient aux cellules phagocytaires par l'intermédiaire de ***scavenger receptors***, reconnaissant directement des PAMPs présents sur les micro-organismes ou via la reconnaissance d'opsonines (compléments, anticorps) fixés sur le pathogène. Les cellules immunitaires forment des pseudopodes qui correspondent à des extensions membranaires transitoires qui s'étendent autour de la particule cible pour l'internaliser.
  Les neutrophiles et les cellules dendritiques sont également capables de phagocyter (Aderem *and* Underhill, 1999 ; Metschnikoff, 1891).

  Dans le cas de certains agents infectieux, comme les bactéries *Brucella* ou *Mycobacterium tuberculosis*, la bactérie est capable de dévier le trafic intracellulaire du phagosome et d'échapper à la formation du phagolysosome, ce qui permet une multiplication intracellulaire de la bactérie. Les bactéries intracellulaires disposent de plusieurs stratégies. Elles peuvent empêcher la fusion des lysosomes, survivre dans le

phagolysosome ou sortir du phagosome pour se multiplier dans le cytoplasme (Aderem *and* Underhill, 1999 ; Metschnikoff, 1891).

- **La réaction inflammatoire** entraîne la sécrétion de ***chemokines*** par les tissus endommagés et les cellules immunitaires innées s'y trouvant. Ces molécules vont attirer les cellules phagocytaires circulantes (monocytes et neutrophiles) vers les tissus infectés. Des médiateurs libérés permettent d'augmenter les fonctions phagocytaires des cellules recrutées mais aussi de modifier l'environnement pour faciliter la réponse immunitaire adaptative (Aderem *and* Underhill, 1999 ; Metschnikoff, 1891).

2.2 La réponse adaptative

Si l'agent pathogène n'a pas été éliminé par la réponse innée, une réponse immunitaire adaptatrice peut également se développer.
Les lymphocytes sont les principaux acteurs de la réponse adaptative. Ils expriment des récepteurs membranaires ou solubles, nommés **récepteurs antigéniques**. Ceux-ci résultent d'un processus complexe de recombinaison aléatoire de gènes et de mutations. Par conséquent, chaque lymphocyte exprime un récepteur antigénique spécifique et unique. L'ensemble des récepteurs antigéniques des lymphocytes forme le **répertoire immunitaire adaptatif**. Celui-ci est riche de centaines de millions de récepteurs et est potentiellement capable de reconnaître n'importe quelle structure moléculaire.
Les lymphocytes qui détectent un agent pathogène via leur récepteur antigénique se multiplient intensément et forment une population cellulaire clonale importante. Celle-ci va participer à la réponse contre l'agent infectieux mais va également former une population avec une longue durée de vie permettant, parfois des années plus tard, une réponse spécifique contre un agent infectieux préalablement rencontré (**mémoire immunitaire**).
On distingue les **lymphocytes T**, responsables de l'**immunité cellulaire**, et les **lymphocytes B**, responsables de l'**immunité humorale**.

2.2.1 Les lymphocytes T :

Les lymphocytes T sont produits par la moelle. Sous forme immature, ils migrent dans le **thymus** où ils sont maturés et acquièrent l'expression de leur récepteur antigénique spécifique, nommé ***T cell receptor***, **TCR**. Le ligand du TCR est un complexe comprenant un peptide antigénique associé aux récepteurs du complexe majeur d'histocompatibilité (**MHC**).
On distingue deux grands types de lymphocytes T :

- les **cellules T CD8$^+$** exprimant le récepteur CD8, qui reconnaissent le MHCI et possèdent des capacités cytotoxiques.
- les **cellules T CD4$^+$** exprimant le récepteur CD4, qui reconnaissent le MHCII et dont la principale fonction est d'orchestrer l'ensemble de la réponse adaptative en régulant l'activité des lymphocytes B et des lymphocytes T CD8 via la sécrétion de cytokines.

Les T CD4$^+$ naïfs peuvent se différencier et acquérir une spécialisation qui est de contrôler certains types d'infection. On parle de réponse immune *T helper* (Th). Il existe trois types

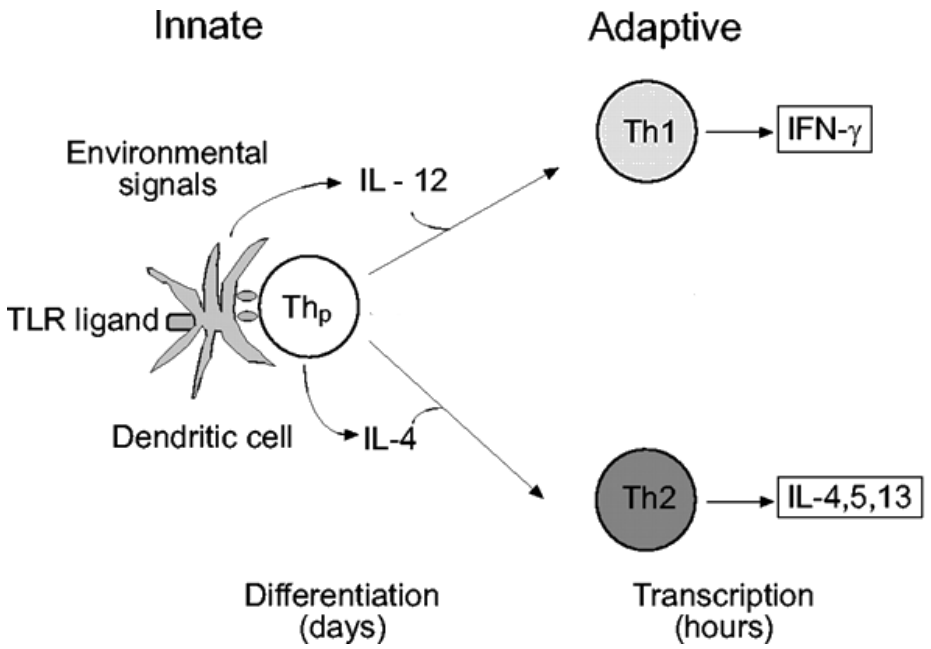


Figure 2 : Régulation du devenir des cellules lymphocytaires T en fonction des signaux reçus par les cellules dendritiques. La différenciation en lymphocytes T générant une réponse de type Th1 est permise grâce à la production l'IL-12. Une réponse de type Th1 se traduit par la production d'IFN-γ. Si les lymphocytes T naïfs reçoivent un signal IL-4, ils se différencient en cellules T de type Th2. La réponse de type Th2 implique la production d'interleukines (IL) 4, 5 et 13 (modifié de Georas, 2005).

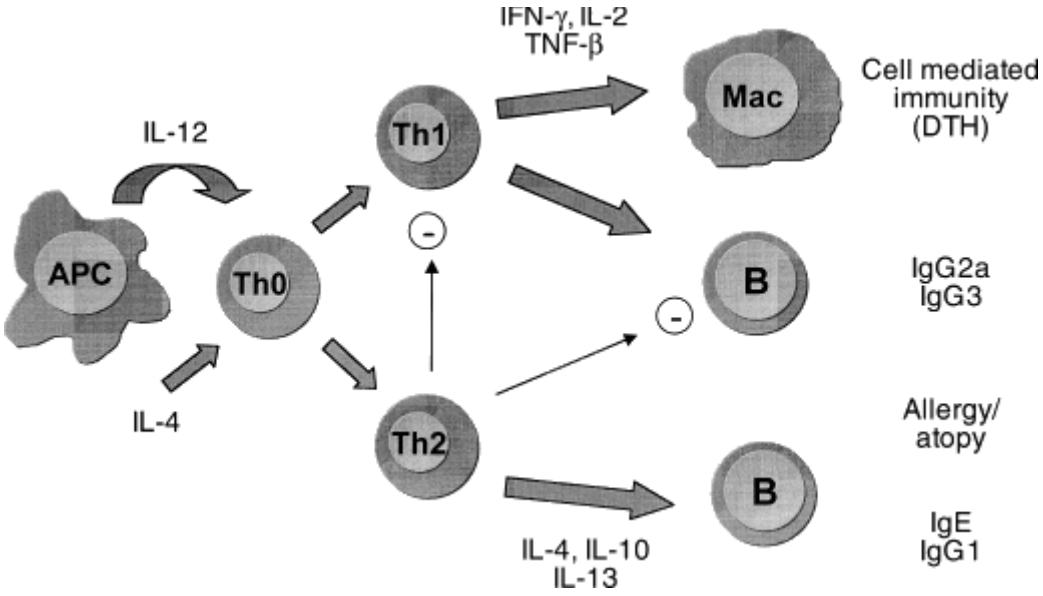


Figure 3 : Relation entre le type de réponse immunitaire et la production des anticorps chez la souris. L'Il-12 permet la différentiation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T de type Th1. L'IL-4 permet quant à elle d'induire des lymphocytes T de type Th2. La réponse Th1 induit un signal permettant la production IgG2a et IgG3 par les lymphocytes B et la réponse Th2, la synthèse d'IgE et IgG1 (Holdsworth *et al*, 1999).

majeurs de réponses immunes Th, induites en réponse aux cytokines produites par la réponse immune innée.

→ Les **Th1** sont induits par la présence d'**IL-12**, ils produisent de l'**IFN-γ** qui régule positivement l'activation des macrophages, des NK, des lymphocytes B produisant des **immunoglobulines G2a (IgG2a)** et des lymphocytes T CD8. Ils sont spécialisés dans la lutte contre les pathogènes (virus, bactéries, protozoaires) intracellulaires. STAT-4 est un facteur de transcription induit par l'IL-12 qui entraîne la synthèse d'IFN-γ (Barnes, 2008).

T-bet est un autre facteur de transcription qui modifie l'état de chromatine, ce qui semblerait être le déclencheur de l'expression de l'IFN-γ (**Figure 2**) (Georas, 2005).

→ Les **Th17** sont induits par l'**IL-23** et produisent de l'**IL-17** qui régule positivement l'activité microbicide des neutrophiles, des épithéliums et l'activation des lymphocytes B producteurs d'**IgA**. Ils sont spécialisés dans la lutte contre les bactéries extracellulaires et les tumeurs malignes (Joseph *et al*, 2018).

→ Les **Th2** sont induits par l'**IL-4** et produisent l'IL-4 qui favorise l'activité des mastocytes, des éosinophiles et l'activation des lymphocytes B producteurs d'**IgE**. Ils sont spécialisés dans le contrôle des parasites extracellulaires comme les helminthes et sont acteurs des réactions allergiques (**Figure 3**) (Holdsworth *et al*, 1999 ; Joseph *et al*, 2018).

2.2.2 Les lymphocytes B :

Les lymphocytes B sont produits dans la moelle et y sont maturés pour acquérir leurs récepteurs antigéniques, nommés ***B cell receptor***, **BCR**.

Une fois activés, les lymphocytes B vont se multiplier dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques) et se différencier en plasmocytes ou en lymphocytes B mémoires. Les plasmocytes peuvent sécréter leurs récepteurs antigéniques, qui sont alors dénommés **anticorps**. Ces derniers disposent de nombreuses fonctions effectrices. Ils peuvent favoriser la phagocytose (***opsonisation***), la fixation du complément ou neutraliser les agents pathogènes en les empêchant d'adhérer à leurs cellules cibles.

Il existe différents types d'anticorps (ou immunoglobulines) produits par les lymphocytes B (Hofmann *and* Lai, 2017 ; Hurwitz *and* Meyer, 1916), en fonction de leur activation.

Les lymphocytes B sont activés par les cellules T $CD4^+$ (**activation T dépendante**) et en fonction de la sous-classe Th1, Th2 ou Th17, les lymphocytes B produisent des anticorps d'un isotype particulier: respectivement IgG2a, IgE et IgA.

Les lymphocytes B peuvent également être activés sans l'intervention des lymphocytes T $CD4^+$ (**activation T indépendante**). Des antigènes de type PAMPs, comme les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries et la flagelline, peuvent être des signaux activateurs de lymphocytes B. Cette voie d'activation mène préférentiellement à la production d'**IgG3**.

Espèces	Animal hôte de préférence
Brucella melitensis	Mouton, chèvre
Brucella abortus	Bovin
Brucella suis	Cochon
Brucella canis	Chien
Brucella ceti	Dauphin, baleine (cétacés)
Brucella microti	Souris
Brucella ovis	Mouton
Brucella inopinata	Hôte inconnu
Brucella pinnipedialis	Phoque
Brucella papionis	Babouin
Brucella vulpis	Renard roux

Tableau 1 : Les différentes espèces de *Brucella* en fonction des hôtes de préférence (Atluri *et al*, 2011 ; Hofer *et al*, 2016 ; Moreno, 2014).

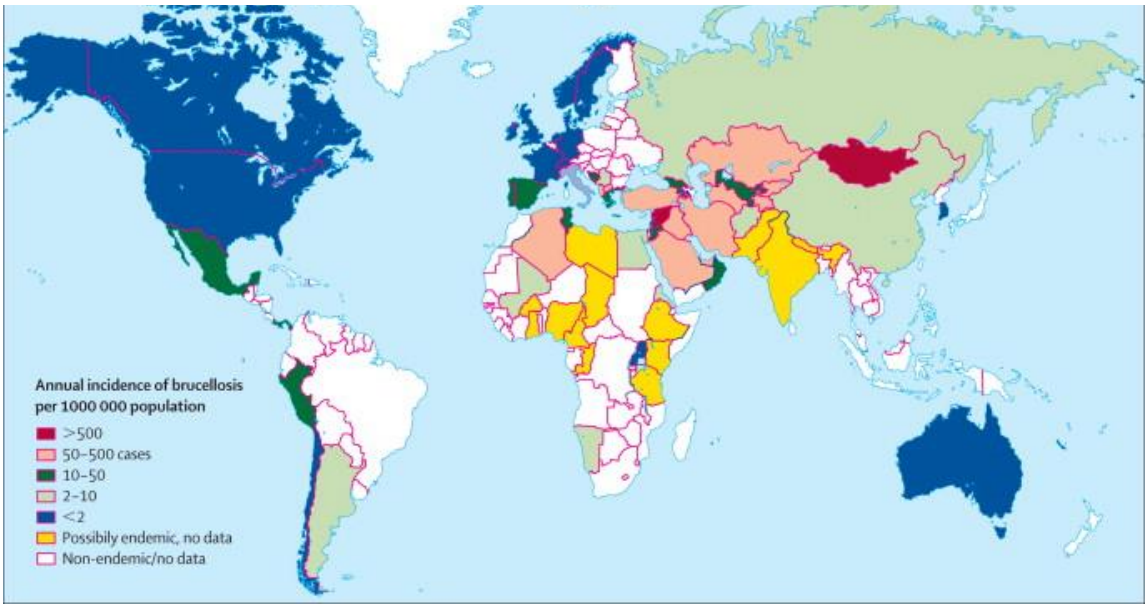


Figure 4 : Carte mondiale reprenant l'incidence de la brucellose humaine. La maladie est très peu représentée en Amérique du Nord, l'Europe de l'est et l'Australie. Cependant dans des pays en voie de développement, la brucellose est encore très répandue (Pappas *et al*, 2006).

3. La brucellose

La brucellose est une zoonose mondialement répandue causée par la bactérie *Brucella* qui est une bactérie intracellulaire et facultativement extracellulaire. Il s'agit d'une cocobacille de type Gram négatif appartenant aux α−protéobactéries. L'infection par *Brucella* est considérée comme accidentelle chez l'humain, celui-ci ne transmettant pas l'infection. La première bactérie *Brucella melitensis*, de son ancien nom *Micrococcus melitensis,* a été isolée en 1887 par le chirurgien David Bruce sur l'île de Malte après une dissection du foie d'un de ses soldats décédés (Moreno, 2014). Il existe plus d'une dizaine d'espèces de *Brucella* mais les espèces les plus virulentes pour l'Homme sont *Brucella melitensis*, *abortus* et *suis*, qui infectent respectivement les chèvres et moutons, les bovins et les cochons (**Tableau 1**). Nous avons choisi de travailler avec *Brucella melitensis* parce qu'il s'agit de l'espèce isolée dans 80% des cas d'infection humaine (Atluri *et al*, 2011 ; Jordan *and* Borts, 1947; Traum, 1930). L'étendue de la brucellose humaine est reprise sur la **Figure 4**.
Chez l'animal, la brucellose peut se transmettre par différentes routes, comme les aérosols causés par l'avortement d'un fœtus contaminé, l'accouplement et l'allaitement (Atluri *et al*, 2011 ; Carpenter *and* Baok, 1928; Damon *and* Fagan, 1947) (**Figure 5**). Chez la chèvre, l'urine peut également être un mode de transmission (Traum, 1930). La brucellose est principalement transmise à l'Homme par ingestion de lait non pasteurisé ou de fromage contaminés par les bactéries mais également par des aérosols ou, moins fréquemment, par contact direct entre une lésion cutanée ouverte et des tissus ou fluides contaminés (Atluri *et al*, 2011 ; Carpenter *and* Baok, 1928; Damon *and* Fagan, 1947).

3.1 Symptômes de la brucellose

Les symptômes ou manifestations cliniques peuvent varier d'une espèce à l'autre. Chez la chèvre par exemple, l'infection par *Brucella* est généralement asymptomatique. Cependant la brucellose peut se manifester par des avortements, des orchites et des mammites. Comme pour les chèvres, les porcs peuvent être infectés mais ne présentent aucun signe clinique spécifique. L'infection peut se traduire par une infection placentaire et fœtale, un avortement et une orchite. De manière générale, pour la majorité des animaux, l'infection entraîne principalement l'avortement chez les femelles gestantes et la stérilité chez les mâles.
Chez l'humain, la brucellose se manifeste par une fièvre ondulante et un état grippal, d'où son nom de ***Fièvre de Malte*** (Köse *et al*, 2014 ; Scozzafave *and* Warner, 1928; Traum, 1930). Si la maladie n'est pas traitée rapidement, elle peut entraîner une infection chronique accompagnée de manifestations cliniques graves comme des méningites, des problèmes cardiaques ou bien des endocardites prostatites (Atluri *et al*, 2011; Quintin *and* Stalker, 1946).

Des cas d'infections chez une femme enceinte ont été décrits. Par exemple, Chheda *et al* ont décrit qu'une jeune femme enceinte, qui a accouché d'un enfant prématuré mais viable, présentait, durant sa grossesse, des symptômes grippaux mais aussi des saignements vaginaux. Un frottis placentaire a révélé que la coloration de Gram était négative et que la

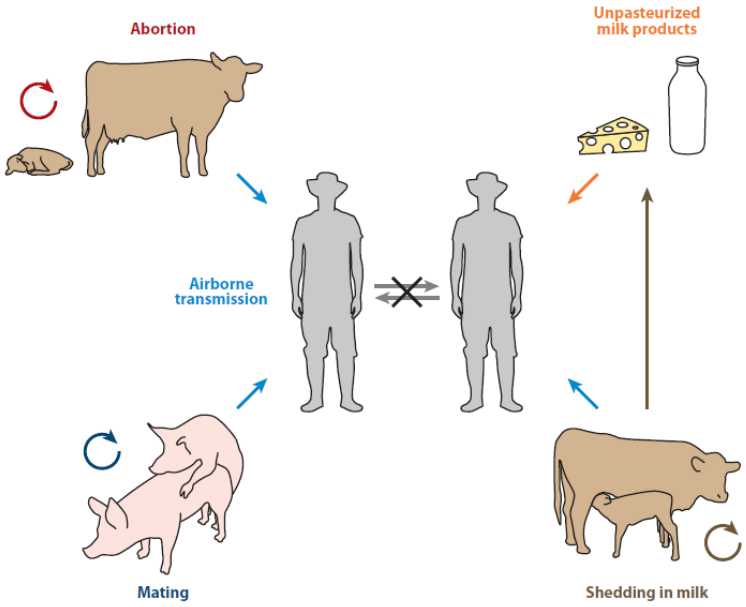


Figure 5 : Modes de transmission de *Brucella sp*.. La transmission peut se réaliser au sein de l'espèce de l'hôte naturel mais aussi à l'Homme. Il peut y avoir un transfert par l'intermédiaire de contacts génitaux lors de l'accouplement, par l'avortement ou par l'ingestion de lait. L'humain peut se faire infecter en se nourrissant de lait et de fromage contaminés non pasteurisés. Les aérosols sont un moyen d'infection qui concerne tous les hôtes. Les transmissions interhumaines sont considérées comme des exceptions au vue du nombre de cas rapportés (Atluri *et al*, 2011).

culture bactérienne était positive pour *Brucella melitensis*. Une enquête a révélé que la mère de l'enfant vivait dans une ferme et travaillait au contact des chèvres et des vaches permettant d'expliquer l'origine de l'infection (Chheda *et al*, 1997). Un autre exemple est celui d'un bébé présentant des problèmes respiratoires qui a été décelé, ainsi que sa maman, positif pour une infection par *Brucella melitensis*. Etant donné que le bébé n'a pas été allaité pendant les premiers jours qui ont suivi l'accouchement et qu'il n'a pas reçu de transfusion sanguine, une transmission transplacentaire a donc été citée comme étant la voie d'infection la plus probable dans ce cas (Aydın *et al*, 2013).

D'autres cas d'infection chez les bébés ont été recensés. Généralement les enfants sont issus d'une famille d'agriculteurs ou travaillant dans une ferme qui élève des chèvres ou des moutons ou de familles ingérant des produits laitiers non pasteurisés (Cacace *et al*, 2013). Cependant le mode de transmission de l'infection chez les nouveau-nés peut être externe à la relation avec sa mère. En effet, les nouveau-nés ont besoin, dans certains cas, d'une transfusion sanguine lorsqu'ils ont un taux de bilirubine trop important. Cette transfusion peut être la cause de l'infection par *Brucella*. En pratique, si les hémocultures réalisées chez le nouveau-né avant la transfusion est négative ainsi que les hémocultures maternelles mais que les analyses sanguines après la transfusion sont positives pour *Brucella melitensis*, la transmission provient alors de la transfusion (Akçakuş *et al*, 2005 ; Mosayebi *et al*, 2005).

Des statistiques ont démontré que des femmes enceintes atteintes de brucellose chronique pouvaient mener une grossesse à terme. Cependant, la brucellose peut entraîner des accouchements prématurés, des avortements durant le premier trimestre de grossesse ou des fœtus nés à terme avec un poids plus faible que les bébés nés d'une mère non atteinte par la brucellose, des chorioamnionite, d'endométrites *post-partums* (Aydın *et al*, 2013 ; Gulsun *et al*, 2011).

3.2 Détection de la brucellose

Pour détecter une infection par *Brucella* chez l'Homme et les animaux, différents tests diagnostiques sont utilisés:

- Un diagnostic direct, basé sur l'isolation de la bactérie, peut être réalisé. Généralement l'analyse est faite sur une hémoculture, mais les analyses peuvent être faites sur d'autres prélèvements comme les ganglions, la moelle osseuse et le liquide céphalo-rachidien.
- Une PCR est utilisée pour réaliser un diagnostic moléculaire. Cette technique, détectant les gènes spécifiques de *Brucella* (élément répétitif IS711, gène bcsp31, gène de l'ARN ribosomal 16S, ORF AO512) est très sensible. Elle peut être réalisée sur des échantillons de sang, de sérum ou de biopsies tissulaires.
- Des analyses sérologiques peuvent également être réalisées. Les IgM sont les premiers anticorps à apparaître, ils sont détectés à partir de 10 jours. Les IgG se développent par la suite et deviennent les anticorps dominants. Durant la phase chronique, les IgM disparaissent tandis que les IgG persistent (**Tableau 2**). Un test ELISA permet de détecter la présence de LPS de *Brucella* dans le sérum. Cependant le LPS de *Brucella* possède une structure commune avec le LPS d'autres bactéries notamment avec *Yersinia enterocolitica*. Cette

IgA	Présentes dans les : - Muqueuses intestinales - Muqueuses respiratoires - Muqueuses urogénitales
IgG	- Anticorps majeurs de la réponse immunitaire - Transmission verticale de la mère à sa progéniture (elles sont capables de passer la barrière placentaire chez certains animaux)
IgM	- Présentes dans le sérum - Premières à être sécrétées durant la réponse immunitaire
IgD	- Anticorps membranaires des lymphocytes B naïfs
IgE	Impliquées dans: - Les réactions allergiques - Les infections parasitaires

Type de réponse	Immunoglobulines chez la souris	Immunoglobulines chez l'Homme
Th1	IgG2a	IgG1
	IgG3	IgG3
Probablement Th1	IgG2b	IgG2
Th2	IgG1	IgG4

Tableau 2 : Tableaux récapitulatifs des immunoglobulines G (IgG) homologues chez les souris et les humains associées aux différentes réponses Th (Holdsworth *et al*, 1999).

bactérie se retrouve chez les bovins mais est très peu pathogène. Le diagnostic peut donc être faussé.
- Le test SAW (séroagglutination de Wright) peut aussi être utilisé. Il permet de détecter les IgM à partir du dixième ou du douzième jour d'infection. Il s'agit de la méthode référencée par l'OMS.
- Les IgG sont détectées spécifiquement par une réaction de fixation du complément.
- Les antigènes de *Brucella* peuvent être mis en évidence par le rose Bengale. Il s'agit d'une réaction d'agglutination. Cette technique est sensible, rapide et spécifique. Elle permet de détecter presque tous les cas de brucellose, c'est pourquoi elle est utilisée pour diagnostiquer, pour surveiller le développement de la maladie mais aussi pour établir les enquêtes épidémiologiques (Pinto da Silva Mol *et al*, 2012).

3.3 Vaccination et traitement de la brucellose

Chez l'animal, plusieurs vaccins ont été développés pour prévenir les risques d'infection. La souche « S19 » est utilisée pour vacciner les bovins (van Straten *et al*, 2016) et la souche « Rev1 », quant à elle, est administrée aux ovins (Zygmunt *et al*, 1994). Ces vaccins ne sont pas parfaits, ce sont des souches vivantes atténuées qui peuvent induire l'avortement et infecter l'humain.

Aucun vaccin ne permet de protéger efficacement l'humain. La prévention pour l'Homme repose donc principalement sur des mesures d'hygiène alimentaire (cuire ses aliments, boire du lait et manger du fromage pasteurisés). Pour les personnes à professions risquées, notamment les vétérinaires, des mesures particulières sont à prendre (port de gants, de masque). Des traitements existent pour éliminer le pathogène de l'organisme en phase aigüe. Il s'agit d'un traitement à base d'antibiotiques d'une durée de 6 semaines composé de doxycycline et de rifampicine. Cette combinaison, recommandée par l'OMS, permet de maîtriser la division de *Brucella* et d'éviter certaines complications que la chronicité de l'infection pourrait induire.

3.4 Niches tissulaires et cellulaires de *Brucella*

Il a été montré chez les cochons d'Inde, les chiens et les souris que *Brucella* se répliquait préférentiellement dans plusieurs niches comme le placenta, le liquide fœtal, le sperme et l'épididyme (de Souza *et al*, 2018 ; Essenberg *et al*, 2002 ; Keppie *et al*, 1965, Smith *et al*, 1962). Il existe différentes hypothèses expliquant cette spécificité. Premièrement, il y a une forte concentration d'érythritol dans ces régions, les bactéries y prolifèrent abondamment car l'érythritol est utilisé comme source préférentielle d'énergie (Barbier *et al*, 2017). Deuxièmement, lors la grossesse, l'utérus devient un **site immunitaire privilégié**. En d'autres termes, il devient tolérant à l'introduction de nouveaux antigènes. Ceux-ci ne déclenchent pas de réponse immunitaire inflammatoire, potentiellement néfastes pour le fœtus (Raghupathy, 1997, Wegmann *et al*, 1993). Au cours de la gestation, l'expression des MHCII, indispensables au rejet de greffe, est réduite. A l'inverse, l'expression des cytokines

immunosuppressives comme l'IL-10 est augmentée (Zhang *et al*, 2016). Les hormones synthétisées par le placenta sont également impliquées dans le mécanisme de non-rejet du fœtus (Contractor *and* Davies, 1973). La progestérone notamment est connue pour être un agent immunosuppresseur (Munroe, 1971). En conclusion, la **tolérance fœto-maternelle** consiste en la mise en place de mécanismes de tolérance qui permettent l'évitement du rejet du fœtus pendant la grossesse. En contrepartie, ce système immunitaire affaibli est caractérisé par une diminution significative de l'immunité cellulaire et par une réduction de la réactivité des lymphocytes Th1, profitant à la multiplication de *Brucella* (Kim *et al*, 2005 ; Wang *et al*, 2014).
Chez la souris, il a été démontré que *Brucella* persiste essentiellement dans les organes lymphoïdes tels que la rate et les ganglions lymphatiques. *Brucella* infecte principalement les cellules phagocytaires comme les macrophages (Forestier *et al*, 1999), les neutrophiles (Riley *and* Robertson, 1984), les cellules dendritiques et les ostéoblastes (Delpino *et al*, 2009), mais aussi les cellules non phagocytaires comme les fibroblastes, les trophoblastes (Anderson *and* Cheville, 1986) et les cellules épithéliales (Pizarro-Cerdá *et al*, 1998). Au cours de l'infection des souris, la réponse de l'hôte est une réponse T helper 1 (Th1), caractérisée par une production d'IFN-γ par les lymphocytes T et les NK (Copin *et al*, 2007). L'IFN-γ induit l'activation des macrophages et l'induction d'IL-12 (Maródi, 2006). L'IFN-γ joue donc un rôle essentiel dans le contrôle de l'infection par *Brucella* et est même crucial car il assure la survie de la souris infectée (Goenka *et al*, 2011).

Après une infection par la **voie intra-péritonéale**, les bactéries persistent plusieurs jours dans le sang. Pour échapper au système immunitaire les bactéries vont pénétrer, en moins de 24h, dans les globules rouges qui assurent une fonction protectrice (Vitry *et al*, 2014b). Les bactéries vont ensuite, très rapidement, migrer vers la rate où les cellules infectées sont majoritairement des macrophages et se situent principalement dans la pulpe rouge et la zone marginale (Copin *et al*, 2012). Les cellules dendritiques inflammatoires sont quant à elles progressivement infectées. Plusieurs jours après l'infection, les cellules infectées migrent vers la pulpe blanche de la rate (Copin *et al*, 2012).

Certaines espèces de *Brucella* comme *Brucella canis* peuvent infecter les reins des leurs hôtes et plus particulièrement les cellules épithéliales des tubules convolutés proximaux et distaux, des boucles de Henle et des tubules collecteurs. Les bactéries peuvent être excrétées dans l'urine des chiots (de Souza *et al*, 2018).

Comme dit précédemment, l'infection peut avoir lieu par les **voies respiratoires**. Les macrophages alvéolaires sont les principales cellules infectées dans cette situation lors des 48 premières heures de l'infection. Ils transmettent par la suite les bactéries depuis les poumons aux ganglions médiastinaux qui vont assurer la dissémination dans tout l'organisme (Archambaud *et al*, 2010). L'infection se propage après 6 jours à la rate tandis que le taux de bactéries dans les poumons décroit (Hanot Mambres *et al*, 2016).

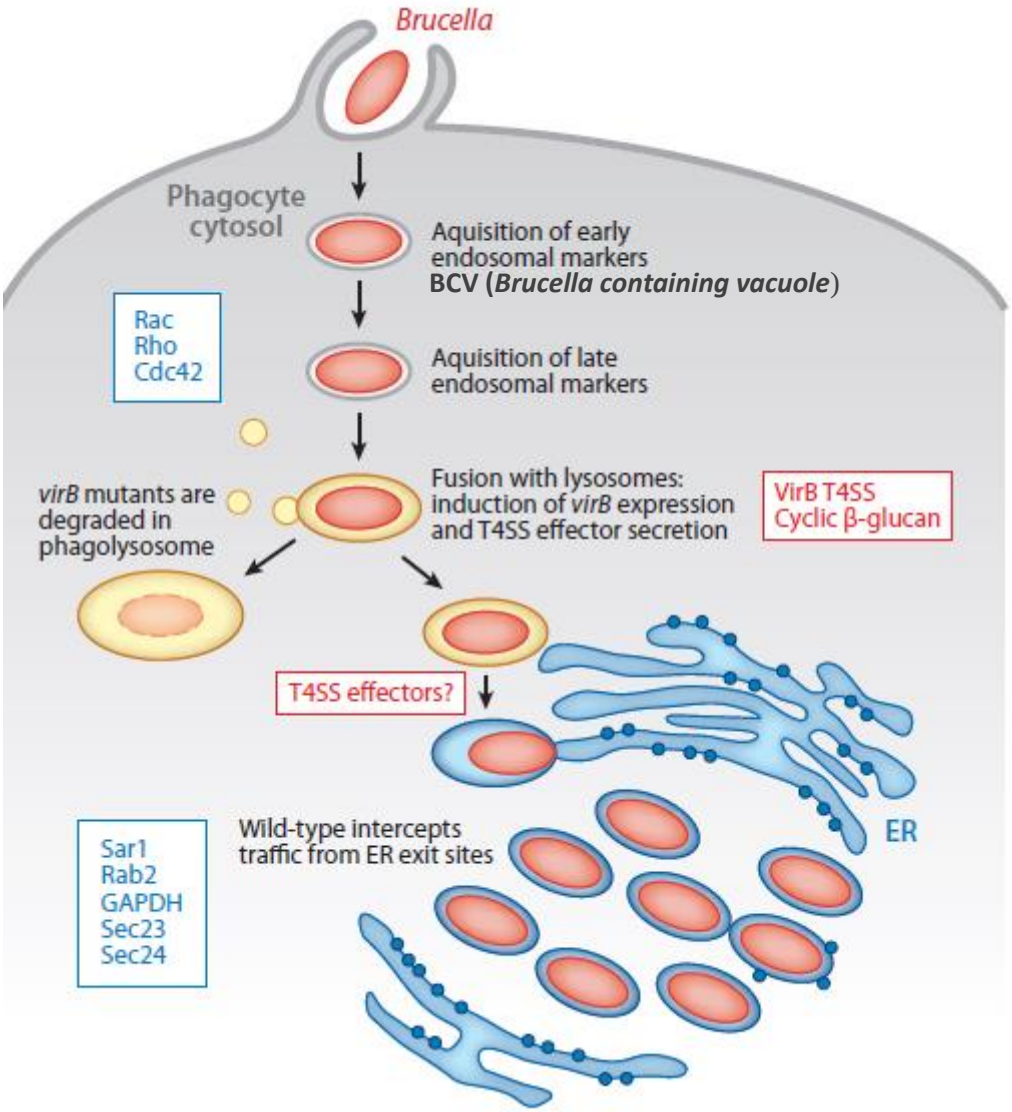


Figure 6 : Entrée et trafic intracellulaire de *Brucella spp.* dans les macrophages. Les bactéries pénètrent et prolifèrent dans les cellules grâce à certains facteurs de la cellule hôte indiqués dans les cases bleues. La survie de *Brucella* est permise grâce à des facteurs de virulence qu'elle possède, représentés en rouge.
ER : réticulum endoplasmique;
GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase;
T4SS : système de sécrétion de type IV.
(figure modifiée de Atluri *et al*, 2011)

L'équipe du Professeur Muraille travaille sur l'infection par **voie intradermique** au niveau des coussinets des pattes postérieures de souris. Ils ont découvert que les fibroblastes et les macrophages sont infectés 2 heures post infection. 24 heures après l'infection, les cellules infectées sont principalement les macrophages et les neutrophiles (A. Demars, résultats non publiés).

3.5 Trafic intracellulaire de *Brucella*

In vitro, lors de l'infection de lignées de macrophages, *Brucella* peut suivre deux voies intracellulaires différentes. La première dépend de l'opsonisation par les anticorps. Les IgG fixées sur la bactérie seront reconnues par les récepteurs Fc des macrophages. Cependant dans la deuxième voie, la bactérie entre par l'intermédiaire des *lipid rafts* (Quelch *et al*, 1984 ; Naroeni *and* Porte, 2002). Les macrophages possèdent des récepteurs qui détectent les bactéries dont le récepteur *scavenger* de classe A qui interagit avec le LPS de la bactérie (Kim *et al*, 2004).
La ***Brucella containing vacuole*** (**BCV**) est une vacuole au sein de laquelle se trouve *Brucella* lorsque qu'elle est internalisée dans la cellule. Cette dernière va interagir avec des endosomes précoces, tardifs puis avec des lysosomes. Les lysosomes sont connus pour s'acidifier (pH 4,0-4,5) et dégrader leur contenu. Cette acidification va induire l'activation de l'opéron *virB* qui encode notamment pour le système de sécrétion de Type IV (T4SS) (O'Callaghan *et al*, 1999 ; Boschiroli *et al*, 2002). L'activation du T4SS va permettre à la bactérie, en sécrétant des effecteurs dans le cytoplasme de la cellule hôte, de dévier le trafic intracellulaire de cette dernière à son profit pour atteindre une niche réplicative qui est le réticulum endoplasmique (**Figure 6**) (Anderson *and* Cheville, 1986 ; Atluri *et al*, 2011). Dans le cas où l'entrée de la bactérie dépend de l'opsonisation, *Brucella* va par contre se répliquer dans une vacuole qui ne contient pas de réticulum endoplasmique (Bellaire *et al*, 2005).

4 Le modèle expérimental d'infection souris par Brucella

Le modèle expérimental de la souris est utilisé depuis les années 1970' pour étudier l'infection persistante de *Brucella* pour différentes raisons :

- Les bactéries peuvent persister dans les organes systémiques comme c'est le cas chez les hôtes naturels.
- L'infection engendre certains symptômes comme chez les humains (la splénomégalie et l'hépatomégalie) (Grilló *et al*, 2012).
- Les souris sont faciles à élever car elles sont petites et se reproduisent rapidement.
- Il existe de nombreuses souris *knockout*.
- Le système immunitaire de la souris est l'un des mieux connu.
- Il est utilisé depuis plus de 10 ans dans le laboratoire de microbiologie de l'université de Namur pour étudier *Brucella melitensis*.

L'évolution de la brucellose chez la souris dépend de différents facteurs bactériens comme la virulence, la souche, le mode d'infection et la dose. Certains paramètres de l'hôte peuvent aussi influencer l'infection, comme l'âge, l'origine génétique, le sexe, le statut physiologique ou encore le statut de l'animalerie (SPF ou conventionnelle) (Grilló *et al*, 2012).

L'infection se déroule en trois étapes chez des souris infectées par voie intrapéritonéale (i.p.) par une souche virulente de *Brucella melitensis* :

1) l'**invasion** de l'hôte par la bactérie,
2) la **phase aiguë**, à partir de 2 jusqu'à 3 semaines. Elle correspond à la phase où les bactéries se répliquent dans différents organes des voies réticulo-endothéliales et reproductrices,
3) la **phase chronique** qui peut durer pendant une longue période allant de quelques mois à plusieurs années (Martirosyan *et al*, 2011).

Expérimentalement, les souris peuvent être infectées par différentes voies comme i.p., intraveineuse (i.v.), intranasale (i.n.) et sous-cutanée (s.c.). En infections i.p. et i.v., la dose infectante peut varier entre 10^4 et 10^7 CFU par souris dans un volume de 0,05 à 0,2 mL. Ces deux dernières voies permettent l'infection de la majorité des organes et les niveaux d'infection sont similaires. Même si elle n'est pas physiologique, la voie i.p. est préférée par les expérimentateurs car elle est techniquement plus simple, elle permet d'administrer un volume plus important ce qui diminue les erreurs de doses infectieuses. Avec ce type d'inoculation, les organes sont rapidement infectés, en particulier la rate (Grilló *et al*, 2012). Celle-ci se retrouve infectée déjà 1 heure après une injection en i.p. avec *Brucella melitensis* (Machelart *et al*, 2017a).

4.1 La réponse immune contre *Brucella* chez la souris

Chez les souris, après une infection par *Brucella* par voie i.p., les lymphocytes T CD4 et T CD8 ainsi que les NK produisent de l'IFN-γ (Sathiyaseelan *et al*, 2006; Copin *et al*, 2012). Les lymphocytes T CD4 deviennent par la suite les producteurs principaux d'IFN-γ chez les souris sauvages (Copin *et al*, 2012). Les lymphocytes B, quant à eux, ont un effet délétère lors d'une infection primaire. Les souris déficientes pour les lymphocytes B contrôlent plus efficacement l'infection, elles sont capables d'éliminer les bactéries et présentent une meilleure résistance à l'infection. L'immunité humorale médiée par les lymphocytes B joue cependant un rôle important lors d'une infection secondaire par le même pathogène. Elle permet une réponse mémoire protectrice contre *Brucella melitensis* (Vitry *et al*, 2014a ; Goenka *et al*, 2011). Les anticorps permettent de limiter la dissémination de *Brucella* dans le sang de la souris infectée par voie i.p. tandis que l'immunité cellulaire intervient dans la lutte contre l'infection au sein des tissus. Les lymphocytes T CD4 et la production d'IFN-γ ont un rôle essentiel pour contrôler une infection primaire mais également pour maîtriser une seconde infection par *Brucella melitensis* (Vitry *et al*, 2014a ; Hanot Mambres *et al*, 2016).

TLR	PAMPs
TLR 1	Peptidoglycans
TLR 2	Lipoprotéines
TLR 3	dsRNA
TLR 4	LPS
TLR 5	Flagelline
TLR 6	Lipoprotéines diacyles
TLR 7	ssRNA
TLR 8	ssRNA
TLR 9	Motifs CpG non méthylés
TLR 10	Non déterminé
TLR 11	Protéine de type profiline
TLR 12	Protéine de type profiline
TLR 13	RNA ribosomique 23s

Tableau 3 : Correspondances entre les TLR (*Tool Like Receptor*) et les PAMPS qu'ils reconnaissent.

4.2 Mécanisme d'échappement au système immunitaire de *Brucella*

En absence de traitement antibiotique, *Brucella* persiste chez son hôte en échappant à la réponse immunitaire innée et adaptative via différents mécanismes.

La bactérie échappe au système immunitaire inné:

- De manière générale, les agents pathogènes sont reconnus par les TLR (*Tool Like Receptor)* (au nombre de 13 chez la souris) qui reconnaissent les signatures spécifiques des bactéries comme les LPS, la flagelline ou encore les acides lipotéichoïques (**Tableau 3**) (Janssens *and* Beyaert, 2003 ; Vijay, 2018). *Brucella* ne se fait que très peu détecter pas les récepteurs TLR (Iwasaki *and* Medzhitov, 2004). Elle possède une modification de son LPS, ce qui lui permet d'échapper plus facilement à la reconnaissance par le TLR4. Le LPS de *Brucella* étant très résistant (Cardoso *et al*, 2006), il peut aussi résister au dépôt du composant du complément C3 (Hoffmann *and* Houle, 1983). *Brucella* possède aussi une flagelline à laquelle il manque un domaine essentiel pour la reconnaissance par le TLR5 (Terwagne *et al*, 2013). En outre, *Brucella* ne possède ni flagelle, ni pili, ni capsule, qui sont des éléments facilement détectables par le système immunitaire.
- Lors d'une infection, les cellules dendritiques produisent de l'IL-12. Cependant lors d'une infection par l'agent bactérien *Brucella*, la sécrétion d'IL-12 est inhibée. *Brucella* inhiberait la maturation des cellules dendritiques pour permettre la diminution de la production d'IL-12 (Salcedo *et al*, 2008).
- L'IL-10 est synthétisé par les cellules phagocytaires et les lymphocytes. Cette cytokine permet de diminuer l'inflammation générée par les macrophages et les lymphocytes T. Elle réduit la production d'IL-12. Les LPS de *Brucella* induisent la production d'IL-10. A l'inverse, il a été montré que l'IFN-γ est capable de réduire la production de l'IL-10 et d'augmenter la production d'IL-12 (Kariminia *et al*, 2002).
- *Brucella* possède un opéron *virB.* Ce dernier, une fois transcrit et traduit, permet l'activation du T4SS qui dévie les bactéries du trafic intracellulaire en empêchant la fusion de la vacuole qui contient les bactéries et les lysosomes (**Figure 6**).

La bactérie échappe à la réponse immunitaire adaptative :

Dans les macrophages, *Brucella* se réplique en masse mais n'induit pas l'apoptose. Au contraire, elle inhibe la mort cellulaire programmée (Gross *et al*, 2000). Par contre, *Brucella* est capable d'induire l'apoptose des autres cellules du système immunitaire dans lesquelles elle ne se réplique pas. En effet, *Brucella abortus* est capable d'interférer directement avec les lymphocytes T et de diminuer l'efficacité de la réponse des lymphocytes T en réduisant le taux de lymphocytes T CD4 périphériques durant la phase chronique de l'infection (Skendros *et al*, 2008). Il s'agit du mécanisme d'apoptose qui est choisi par *Brucella spp* pour détruire les lymphocytes T de l'hôte et

lui permettre de se répliquer et de survivre tout en restant invisible pour le système immunitaire (Vela´squez *et al*, 2012). *Brucella* est donc une bactérie qui est capable de se protéger du système immunitaire mais elle est aussi capable de se maintenir en vie en empêchant l'apoptose des cellules au sein desquelles elle s'abrite.

- *Brucella* est capable d'inhiber les molécules MHCII et donc la présentation des antigènes par les lymphocytes T CD4. Les lipoprotéines de *Brucella* interviennent dans cette inhibition et les LPS de *Brucella* interfèrent avec la voie de présentation des MHCII (Barrionuevo *et al*, 2008).

5. La réponse immunitaire des nouveau-nés après une infection in utero

Dans la littérature scientifique, le système immunitaire des nouveau-nés est souvent considéré comme **immature**. Il est moins compétent que celui de l'adulte et ce pour différentes raisons.

- Les concentrations plasmatiques néonatales des composants du complément sont présentent en quantité plus faibles chez les nouveau-nés que chez les adultes (Firth *et al*, 2005).

- Chez les mammifères, les nouveau-nés possèdent un nombre réduit de cellules progénitrices de granulocytes et de monocytes. Cette réduction peut entraîner un défaut quantitatif du nombre de neutrophiles dans des conditions de stress (par exemple, une septicémie). Les nouveau-nés possèdent également des neutrophiles qui, à l'inverse des neutrophiles des adultes, ne sont pas capables de faire de la chimiotaxie (Carr, 2000). Les nouveau-nés ont moins de monocytes par rapport aux adultes et possèdent moins de molécules MHCII à leur surface, ce qui les rend moins efficaces pour la présentation antigénique (Jones *et al*, 2002).

- Le taux de cytokines pro-inflammatoires, en particulier l'IL-12, est réduit dans les monocytes des nouveau-nés. Ils présentent une déficience fonctionnelle suite à un remodelage de la chromatine (Lissner *et al*, 2015 ; Marchant *et al*, 2015). En fonction de l'âge, l'expression des gènes est différente ce qui entraîne des différences spécifiques (Lissner *et al*, 2015).

- Grâce au TLR2 et à l'IL-10, les nouveau-nés possèdent des mécanismes de régulation qui contrôlent la réponse inflammatoire par l'intermédiaire de ces voies de signalisation. C'est pourquoi, lors d'une infection générale, les nouveau-nés déficients pour le TLR2 présentent des taux réduits de cytokines inflammatoires lors d'une septicémie.
  Andrade et son équipe ont publié en 2013 une étude basée sur un cas d'exception (le streptococcus de groupe B (GBS)). Ils ont mis en avant qu'une production d'IL-10 dépendante du TLR2, chez les nouveau-nés, inhibe le recrutement des neutrophiles sur

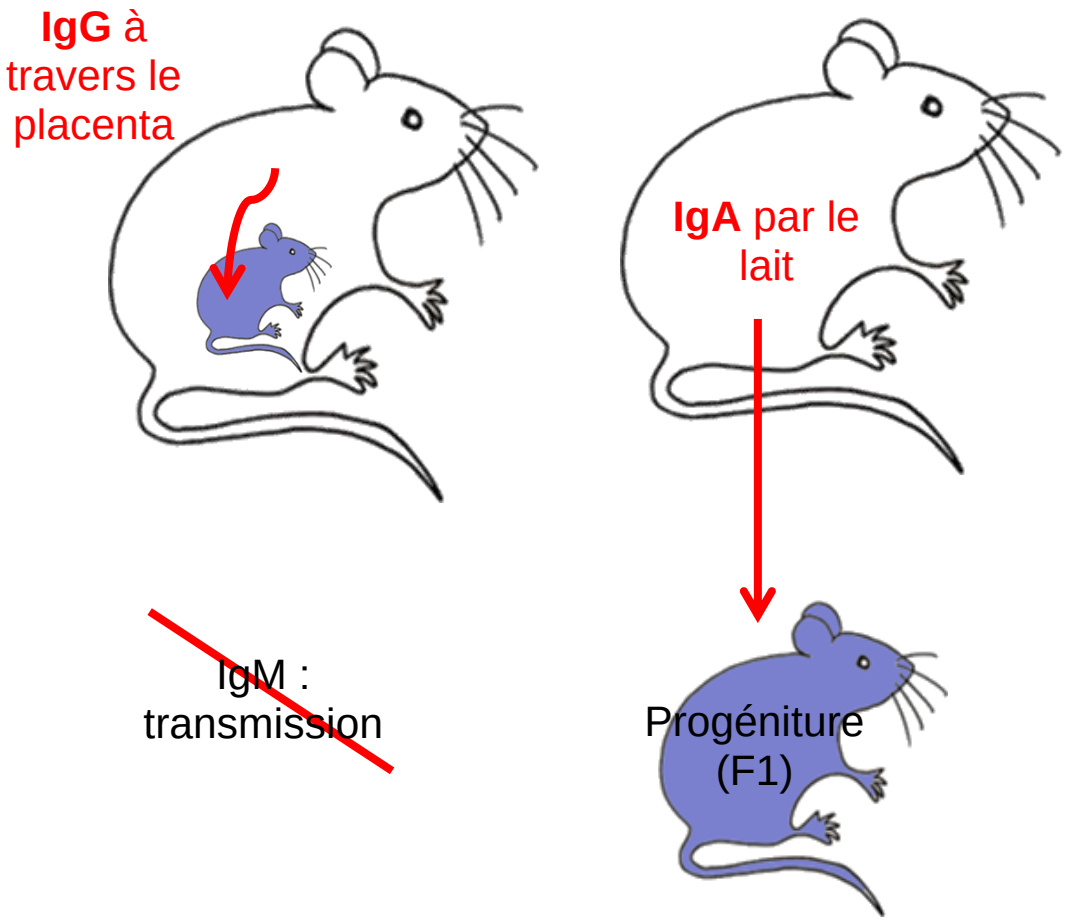


Figure 7 : Schéma de transmission des anticorps. Les IgG se transmettent de la mère au fœtus à travers le placenta. Les IgA se retrouvent dans le lait et les IgM ne sont pas transmises.

le site d'une infection bactérienne et empêche l'élimination de celle-ci. La production d'IL-10 induite par le TLR2 est une voie de signalisation ayant une grande importance dans la réponse immunitaire innée face aux infections bactériennes néonatales. Lorsqu'un nouveau-né est sain, ses cellules produisent plus d'IL-10 par rapport aux cellules adultes. Cependant chez les souris, les nouveau-nés déficients pour le TLR2 ainsi que pour l'IL-10 sont résistants à la septicémie induite par le GBS. Lors des expériences réalisées avec ce pathogène, plus aucune bactérie n'est détectée dans les organes de la souris déficiente pour le TLR2 (Andrade *et al*, 2013).

5.1 Transmission verticale d'anticorps

Pour protéger le fœtus des infections *in utero*, un passage de certains anticorps spécifiques des antigènes auxquels la mère a été exposée est possible de la mère au fœtus. La transmission peut être faite par les glandes mammaires et la circulation sanguine maternelle via le placenta ainsi qu'à travers les tissus intermédiaires, la membrane fœtale (Brambell, 1969). Le lait après la naissance est un moyen de transmission de l'immunité passive (Adkins *et al*, 2004; Brambell, 1969). Le placenta est également un organe qui permet la transmission des Ig comme les IgG (Brambell, 1969). Les études du docteur Xu sur les cochons d'Inde ont démontré que toutes les sous-classes d'IgG traversent le placenta. Il a également montré que le taux de ces anticorps augmente avec l'avancement de la grossesse. Cette transmission peut conduire à deux effets. Le premier permet d'intervenir dans la réduction de l'exposition maternelle aux anticorps. Le deuxième permet de contribuer à l'exposition progressive du fœtus à des niveaux plus importants d'IgG suite au déroulement de la gestation (Xu *et al*, 2017). Les IgA sont transmises par allaitement. Par contre, les IgM ne sont pas transmises par la mère (Brambell, 1969) (**Figure 7**). Malgré cette immunité humorale transférée, les nouveau-nés peuvent avoir une réponse protectrice limitée lorsqu'ils sont infectés par le pathogène déjà rencontré par la mère. Cela peut être dû au petit nombre de cellules immunitaires parce que les nouveau-nés possèdent un système immunitaire en développement. Par conséquent, la qualité de la réponse pourrait être affectée (Sarzotti *et al*, 1996). Pour contrer ce faible taux de cellules immunitaires produites par le fœtus, certaines cellules immunitaires maternelles traversent l'espace fœto-maternel (Krishnan *et al*, 2013).

Par exemple, le cytomégalovirus humain est le pathogène congénital le plus communément transmis. Il est probablement transmis aux nourrissons *in utero* par l'intermédiaire du placenta via la circulation sanguine maternelle. Le tractus génital peut également être infecté et pourrait être un moyen de transmission (Itell *et al*, 2017 ; Ross *et al*, 2011). Les IgG maternelles spécifiques du cytomégalovirus humain permettent une immunité passive ainsi qu'une protection contre la transmission congénitale (Prince *and* Lapé-Nixon, 2014). Lors de la transmission verticale, des IgG peuvent être transmises par l'intermédiaire des syncytiotrophoblastes (Itell *et al*, 2017).

Un autre exemple de transmission d'anticorps est le transfert de la mère au fœtus d'anti-streptolysine qui est un anticorps produit lors d'une infection à streptocoque bêta-hémolytique

du groupe A. Le taux d'anticorps anti-streptolysine détecté dans le cordon ombilical est supérieur à la quantité observée dans le sang maternel (Murray *et al*, 1953).

Une protection contre le choléra peut également avoir lieu par l'intermédiaire d'une transmission d'anticorps de la mère à sa progéniture. Dans ce cas-ci, le transfert est principalement réalisé via le lait ou le colostrum. Lors des analyses, il a été montré que les souris nées de parents immunisés sont plus résistantes à un challenge d'un sérotype homologue ou hétérologue. Les nouveau-nés sont alors résistants et immunisés contre une infection. Les nouveau-nés peuvent se faire infecter par la voie *in utero* lorsque la mère est elle-même infectée. Dans ce cas, la protection contre le choléra n'est pas observée. Par contre, des souris descendantes de parents sains peuvent être protégées en se nourrissant du lait d'une souris infectée et ayant développé des anticorps contre le choléra, ce qui suggère que le lait est le moyen de transmission des anticorps contre le choléra (Pitkin *and* Actor, 1972).

Le *Streptococcus* de groupe B (GBS) peut également être transmis *in utero* ou lors du passage dans le tractus génital. Les nouveau-nés peuvent développer des infections néonatales sévères telles que des septicémies, des méningites, des pneumonies et des infections urinaires dus à un manque de protection. Cependant, lors de l'administration transplacentaire d'anticorps provenant d'une mère immunisée dans une mère gestante, les nouveau-nés descendants de cette dernière présentent alors des anticorps au stade embryonnaire et postnatal et développent aussi une réponse Th1. Ils synthétisent de l'IFN-γ et un taux élevé d'IgG2a. Un transfert d'anticorps de la mère à l'embryon permet alors une protection de la progéniture contre une infection par les GBS. La distribution des sous-classes d'IgG dans les sérums de la descendance mime la distribution maternelle. L'étude a démontré que les anticorps persistent longtemps car ils étaient toujours présents 7 mois après la vaccination (Bernardini *et al*, 2017). Kempe et son équipe ont obtenu en 1952 des résultats de dosage d'anticorps qui étaient plus élevés dans le sang des nouveau-nés par rapport au sang de leurs mères. Différentes hypothèses ont été émises pour expliquer ce taux d'anticorps. Une forte concentration dans le placenta de ces anticorps et un transfert à travers le placenta sont deux raisons qui permettraient d'expliquer la quantité d'anticorps supérieure dans le sang du nouveau-né par rapport au sang de sa maman (Kempe, 1952).

5.2 Réponse de type Th1 chez le nouveau-né

Le groupe de O. Levy a montré en 2007 qu'une exposition prénatale ou postnatale à un agent pathogène peut mener à une accélération de la maturation du système immunitaire du nouveau-né. L'utérus de la mère, étant un site de privilège immun, se fait facilement infecter. Pour protéger le fœtus, il possède un système de détection des pathogènes qui engendre l'induction de l'expression de médiateurs qui accélèreront la maturation des poumons du nouveau-né. Il y a probablement un lien entre le développement du système respiratoire et le système immunitaire inné du fœtus (Levy, 2007).
De nombreuses études ont démontré que le système immunitaire fœtal a une tendance à se développer vers une réponse de type Th2 face aux infections. Celle-ci semble essentielle pour

assurer la survie du fœtus (Levy, 2007). Elles sont parvenues à la conclusion que les lymphocytes T CD4 sanguins des nouveau-nés développent une réponse de type Th2 à l'inverse des lymphocytes T CD4 adultes (Hebel *et al*, 2014). Cependant, les nouveau-nés peuvent développer une protection antivirale Th1 grâce à des lymphocytes T CD8 actifs. Ces cellules produisent de l'IFN-γ et de la perforine qui a une activité cytolytique (Chen *et al*, 2004 ; Hermann *et al*, 2002). Les nouveau-nés possèdent également dans leur sang des lymphocytes T CD4 ayant un phénotype de mémoire effectrice qui possèdent des caractéristiques semblables aux lymphocytes T mémoires adultes (Zhang *et al*, 2014). Lors d'expériences précédentes de vaccination *in utero* et néonatale avec le Bacillus Calmette-Guérin (vaccin BCG), des cellules fœtales développant une réponse de type Th1 ont été découvertes. Ces découvertes ont permis de démontrer que les réponses de type Th2 ne sont pas les seules à exister chez les fœtus (Zhang *et al*, 2014). Par exemple, lors d'une infection par l'agent pathogène causant la maladie de Chagas, les nouveau-nés produisent plus d'IFN-γ par rapport à des nouveau-nés sains, ce qui indique qu'ils sont capables de développer une réponse de type Th1. L'environnement immunitaire dans l'utérus associé à la présence d'un pathogène entraîne donc un changement précoce de la réponse immunitaire (Dauby *et al*, 2009).

Les différents exemples cités indiquent que certains stimuli permettent de surmonter l'immaturité du système immunitaire du nouveau-né. Ils permettent d'induire une production de cytokines qui polarisent une réponse de type Th1 permettant aux nouveau-nés d'avoir une protection en cas d'infection (Levy, 2007).

En conclusion, même s'ils montrent une tendance à se différencier en cellules produisant une réponse de type Th2, les lymphocytes T précoces peuvent générer une réponse de type Th1 en fonction des conditions environnementales.

5.3 Développement d'une mémoire immune chez le nouveau-né

Parler de « mémoire » pour le système immunitaire du nouveau-né peut sembler surprenant. Pourtant, il semble capable dans certaines circonstances de développer une mémoire immunitaire adaptative dès son plus jeune âge.

Levy et Levy ont récemment démontré chez la souris que dans certaines conditions l'immunité innée possède une capacité de mémoire. Ce phénomène est réalisé par des modifications de l'expression génique de cellules immunitaires, comme les monocytes, grâce à des changements épigénétiques. Ce phénomène est appelé immunité entraînée (***trained immunity***). La reprogrammation épigénétique des monocytes peut être induite par l'administration de bacilles Calmette-Guérin (BCG), qui est une souche atténuée de la bactérie *Mycobacterium bovis*. La reprogrammation permet d'assurer une fonction plus grande mais aussi d'apporter une protection contre une large gamme d'infections d'une manière dépendante des macrophages tissulaires et des cellules T (Levy *and* Levy, 2015).

Malhotra *et al,* ont réalisé une sensibilisation *in utero* aux helminthes chez l'humain qui a permis le développement d'une mémoire immunologique maintenue durant l'enfance. Cette sensibilisation prénatale a été plus efficace qu'une exposition directe à ces pathogènes durant l'enfance. Elle a aidé à la mise en place d'une réponse immunitaire plus rapide en cas d'une

infection naturelle. En comparant les cytokines sécrétées chez le nourrisson et chez l'enfant de 10-14 mois, ils ont pu conclure que le nourrisson qui a été sensibilisé *in utero* produit des cytokines majoritairement de la réponse de type 2 (Malhotra *et al*, 1999).
Une expérience avec *Babesia microti* a démontré que des souris provenant d'une mère infectée durant la grossesse développe une réponse plus rapidement contre le pathogène à l'âge adulte que les adultes provenant d'une mère saine pour le pathogène. Il y a donc une résistance à la maladie pour la génération suivante qui pourrait être due à l'environnement maternel et qui permettrait une adaptation du phénotype de la progéniture. Ce phénomène est la programmation fœtale et résulte d'une exposition maternelle à des infections, des maladies, de la malnutrition (Curno *et al*, 2011).
Afin de protéger au mieux les fœtus des agents pathogènes tels que le streptocoque du groupe B et le virus syncytial (VRS), des vaccinations maternelles peuvent avoir lieu. Elles consistent en l'induction d'anticorps chez les femelles gestantes ainsi que sur le transfert passif d'IgG de la mère au fœtus. Ce principe permet d'exposer les lymphocytes T fœtaux aux antigènes *in utero*. Ces lymphocytes T peuvent également être activés par contact avec des antigènes provenant de la mère ou par contact avec des médiateurs inflammatoires maternels qui peuvent traverser la barrière placentaire (Zhang *et al*, 2017).
Les interactions avec la mère peuvent mener à des modulations du système immunitaire des nouveau-nés. Par exemple, lorsqu'un vaccin est administré à un nouveau-né, les réponses immunitaires sont influencées par les potentielles infections de la mère. Les bébés nés de mères infectées par des helminthes ont développé une réponse biaisée Th2 face à la vaccination par le BCG. Les nouveau-nés infectés de manière congénitale par le *Trypanosoma cruzi* développent une activation des lymphocytes T spécifiques (réponse de type Th1) lors d'une réponse immunitaire. Par contre, si une mère infectée ne transmet pas le pathogène, les nouveau-nés sont plus susceptibles de développer des cytokines proinflammatoires (Odorizzi *and* Feeney, 2016).

5.4 Transmission verticale des pathogènes

Une étude chez les bovins et les souris a montré que le placenta n'est pas une barrière efficace pour protéger le fœtus de certaines infections dont *Brucella* (Tobias *et al*, 1993). Le cordon ombilical peut aussi être une porte d'entrée de l'agent infectieux chez le fœtus, comme c'est le cas avec le *Streptococcus* de groupe B (Nakstad *et al*, 2016). Par conséquent, une transmission verticale des bactéries est possible.

5.4.1 Infection par *Listeria monocytogenes*

L'infection d'un animal gestant avec *Listeria monocytogenes*, bactérie Gram positive et intracellulaire facultative, provoque des avortements, des fœtus morts à la naissance et des méningoencéphalites néonatales (Benshushan *et al*, 2002). Une fois les souris infectées à 14

jours de gestation, les bactéries se propagent rapidement dans le placenta (6h) et la charge bactérienne augmente avec la durée (Le Monnier *et al*, 2006). Les syncytiotrophoblastes sont des cellules placentaires qui sont en contact direct avec le sang maternel. Ces cellules peuvent être infectées et mener à l'infection du nouveau-né. (Lamond *and* Freitag, 2018). Cette infection peut engendrer une perte rapide des fœtus (Abram *et al*, 2003). Une diminution de l'IFN-γ et une augmentation de la cytokine IL-10 sont observées chez les souris gestantes et infectées par *Listeria monocytogenes* ce qui suggère une plus faible réponse Th1 (Abram *et al*, 2003 ; Krishnan *et al*, 2013).

5.4.2 Infection par *Salmonella*

Lorsqu'un animal gestant est infecté par *Salmonella*, une bactérie Gram négative intracellulaire facultative, cela peut également causer des avortements, des morts néonatales et des transmissions verticales (Sethi *et al*, 2017). Les taux d'expression placentaire d'IFN- γ, de TNF, d'IL-6 et d'IL-18 sont augmentés lors d'une infection par *Salmonella typhimurium*. Les ligands des TLR4 des trophoblastes interagissent avec les LPS de la bactérie ce qui engendre une inflammation locale et le déclenchement de l'apoptose des trophoblastes. Suite à l'infection, il y a une diminution du recrutement et d'activation des neutrophiles, des cellules NK et des cellules dendritiques (Pejcic-Karapetrovic *et al*, 2007).
Une protection des nourrissons peut être développée après une exposition aux organismes pathogènes ou lors d'une vaccination. Cette protection permet d'induire une augmentation de l'efficacité du système immunitaire inné par l'intermédiaire d'un processus appelé immunité entraînée comme déjà mentionné au point 5.3 (Hong *et al*, 2015). Lorsqu'une souris vaccinée (présentant déjà des anticorps contre un pathogène spécifique) est challengée, ce qui signifie que le pathogène lui est à nouveau injecté, les chercheurs ont pu observer une infection beaucoup plus faible que l'infection initiale (ou le vaccin) est au niveau du placenta et de la rate (Bosseray, 1983).

5.4.3 Infection par des virus

Dans le monde viral, certains agents pathogènes peuvent aussi être transmis à la descendance durant la gestation. Par exemple, Rubella, qui est un virus à ARN, peut se transmettre *in utero* bien que des dommages ne sont pas engendrés systématiquement dans tous les cas d'infections fœtales (Santis *et al*, 2006). L'infection transplacentaire des fœtus par Rubella peut se faire par la circulation sanguine. Cette maladie se caractérise par des problèmes de vue, des anomalies squelettiques, des problèmes cardiaques, des retards de croissance et peut également engendrer la mort des fœtus (Dudgeon, 1967).
Concernant le virus de l'hépatite B (HBV), le risque que l'infection se développe en une infection chronique est augmenté si elle se déroule à la naissance ou durant la période périnatale. L'infection chronique est caractérisée par un défaut de la réponse des cellules T spécifiques du HBV. Le taux de lymphocytes T circulants de type CD4 et CD8 spécifiques au

virus de l'hépatite B est très faible ainsi que le taux en intrahépatique. Ce faible taux de lymphocytes T entraîne une faible production d'anticorps spécifiques au HBV (Hong *and* Bertoletti, 2017). Les nourrissons ou les jeunes enfants atteints par le HBV ne présentent généralement pas de symptôme contrairement aux adultes qui développent des cirrhoses, des pathologies hépatiques (Hong *and* Bertoletti, 2017). Contrairement aux recherches menées dans le passé sur l'immunité des fœtus, leur système immunitaire n'est pas immature. Ils sont capables de développer une réponse avec des lymphocytes T pour combattre les infections virales (Marchant *et al*, 2003).

Dans le cas du VIH, le nouveau-né dont la mère est séropositive peut développer une protection contre le virus. Il va produire des lymphocytes T ayant une réponse spécifique au VIH *in utero*, et ce même sans transmission du virus (Dauby *et al*, 2012). Dans le cas de la grippe, qui est un virus, les fœtus ont un retard de croissance et naissent avant le terme (Pazos *et al*, 2012).

6. L'infection maternelle par *Brucella*

L'infection par *Brucella* des animaux gestants peut entraîner un avortement. Chez les souris, la dose infectieuse et le jour de l'infection pendant la gestation influencent l'induction de l'avortement. Plus l'infection par *Brucella abortus* se fait tôt pendant la gestation, plus le risque d'avortement est élevé. En effet, au jour 4.5 de la gestation, un taux élevé d'avortements est observé tandis qu'au jour 9.5, le taux est plus faible pour finalement être nul au jour 14.

Durant l'infection maternelle par *Brucella*, on sait que la quantité d'IFN-γ augmente dans le sérum et qu'il est déterminant pour le maintien du fœtus. Un niveau trop élevé d'IFN-γ peut induire l'avortement (Kim *et al*, 2005).

Le système de sécrétion de type IV contribue à l'avortement de manière indirecte car il contrôle l'internalisation et la réplication intracellulaire de *Brucella* (Kim *et al*, 2005). *Brucella melitensis* induit également des avortements chez les souris gestantes. Comme pour *Brucella abortus*, le déclenchement de l'avortement dépend des périodes d'infection pendant la gestation (Wang *et al*, 2014). Il a été reporté que l'infection des fœtus par *Brucella abortus* provoque leur mauvaise croissance (Hashino *et al*, 2012).

Une croissance bactérienne peut être observée au sein du fœtus ainsi qu'au niveau de la rate et du placenta de la mère (Kim *et al*, 2005), mais le taux d'infection, la réponse immunitaire ainsi que le développement d'une mémoire contre *Brucella* chez le nouveau-né sont autant de choses encore inconnues et très peu étudiées après une infection de souris gestante par *Brucella*.

Objectifs

Le système immunitaire des nouveau-nés est très différent de celui de l'adulte, notamment par sa composition cellulaire et sa capacité à réagir aux infections. Entre autre, il est peu apte à développer une réponse immunitaire de type Th1, régulée par l'IFN-γ, pour contrer les infections par les pathogènes intracellulaires tels que virus et bactéries. Dans certaines circonstances, il a cependant été reporté qu'il était à même de développer une réponse immunitaire protectrice contre ces agents. Les mécanismes impliqués sont encore très mal compris. Leur identification pourrait aider à l'amélioration des vaccins destinés à la protection des nouveau-nés.

Durant ce mémoire, nous nous sommes fixés comme objectif de développer chez la souris un modèle expérimental original d'infection maternelle induisant une transmission congénitale de l'agent infectieux.

Nous avons choisi comme pathogène la bactérie *Brucella melitensis*, responsable de l'une des principales zoonoses mondiales. *Brucella melitensis* est une bactérie Gram négative intracellulaire appartenant aux α-protéobactéries. Chez les animaux, en condition naturelle, l'infection entraîne principalement l'avortement chez les femelles gestantes et la stérilité chez les mâles. L'Homme est un hôte accidentel qui peut être infecté de manière chronique avec des conséquences graves en absence de détection et de traitement antibiotique. Il n'existe aucun vaccin efficace contre la brucellose humaine.

Chez les souris adultes, le contrôle de l'infection par *Brucella* implique une réponse de type Th1, régulée par les lymphocytes T CD4 producteurs d'IFN-γ. Il a été reporté que l'infection à haute dose de femelles gestantes peut induire l'avortement de celles-ci, mais que des doses modérées sont tolérées et permettent une gestation normale. Le placenta constitue un site privilégié de multiplication pour *Brucella* et l'infection des nouveau-nés de mères infectées a été documentée par plusieurs auteurs. Le mode de transmission de *Brucella* aux nouveau-nés est cependant peu clair. Sont-ils infectés *in utero* ou durant l'allaitement? L'impact de cette infection sur le système immunitaire du nouveau-né est totalement inconnu. La présence de la bactérie durant la maturation du système immunitaire induit-elle une tolérance à cet agent pathogène ou au contraire une meilleure résistance? En cas de résistance, quels sont les mécanismes de défense impliqués? Autant de questions auxquelles nous voulions répondre au cours de ce mémoire.

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

1. Animaux, souches bactériennes et solutions

1.1 Souris

Des souris C57BL/6 et BALB/c de type sauvage (wild-type) et des souris C57BL/6 MuMT-déficientes ont été fournies par Harlan (Bicester, Royaume-Unis). Toutes les souris utilisées dans cette étude ont été élevées et reproduites dans l'animalerie de Gosselies (Campus de l'Université Libre de Bruxelles (ULB, Bruxelles, Belgique)). Pour les expériences, les souris reproductrices (les parents) étaient âgées de 10 semaines minimum et les souris issues des croisements expérimentaux ont été utilisées soit au stade de fœtus, à 10 jours, à 2 semaines, à 4 semaines, à 6 semaines ou à 7 semaines suivant les expériences.

1.2 Comité éthique

Les procédures utilisées dans cette étude sont conformes à la législation européenne en vigueur (directive 86/609/CEE) et à la loi belge correspondante « Arrêté royal relatif à la protection des animaux d'expérience du 6 avril 2010 publié le 14 mai 2010 ». Le Comité du bien-être animal de l'Université de Namur (UNamur, Belgique) a examiné et approuvé le protocole complet décrivant nos expériences (numéro de permis: 18-316).

1.3 Bactéries

Une souche de *Brucella melitensis* 16M de type sauvage (WT) a été utilisée. Cette souche est résistante à l'acide nalidixique. Nous avons également utilisé une souche de *Brucella melitensis* 16M exprimant de manière stable et constitutive le gène du fluorochrome mCherry. La construction de la souche *Brucella melitensis* 16M mCherry a été décrite précédemment (Copin *et al*, 2012). Lors de la construction de celle-ci, un gène de résistance à l'antibiotique kanamycine a été introduit au génome de *Brucella*. Les souches de *Brucella* sont conservées dans des congélateurs à -80 °C et manipulées dans les laboratoires de biosécurité de niveau III.

1.4 Milieu de culture bactérien 2YT agar

- 44 g de 2YT agar (20 g/L de milieu de culture LB, 5 g/L d'extrait de levure, 6 g/L de peptone et 13 g/L d'agar) par litre d'eau déminéralisée ;

- Autoclaver la solution.

Si un antibiotique est utilisé dans le milieu : l'ajouter à concentration finale voulue (1 mL/L de milieu) lorsque le milieu est tiédi et homogénéiser.

→Acide nalidixique

Mettre l'acide nalidixique à une concentration de 25 mg/mL de NaOH 0,2 M et filtrer la solution sous hotte. Aliquoter dans des Eppendofs.

→Kanamycine

Mettre la kanamycine à une concentration de 50 mg/mL d'eau déionisée et filtrer la solution sous hotte. Aliquoter dans des Eppendofs.

1.5 Milieu de culture bactérien 2YT liquide

- Mettre 31 g de 2YT (20 g/L de milieu de culture LB, 5 g/L d'extrait de levure et 6 g/L de peptone) dans 1 L d'eau déminéralisée ;
- Autoclaver la solution.

1.6 Solution saline tamponnée au phosphate (PBS 10X)

- Ajouter 80 g/L de NaCl, 2 g/L de KCl, 11,5 g/L de Na_2HPO_4 et 2,4 g/L de KH_2PO_4 dans 1 L d'eau bidistillée ;
- Mélanger à l'agitateur magnétique ;
- Mettre à pH (7-7,4) ;
- Conserver à température ambiante.

1.7 Milieu de lyse Triton X-100

- Mettre 1 mL de triton dans 1 L de PBS 1X ;
  Pour prélever le triton, couper le bout d'un tips car la solution est très visqueuse ;
- Autoclaver et conserver à température ambiante.

1.8 Milieu de fixation, paraformaldéhyde (PFA – 4 %)

- Ajouter 80 g/L de paraformaldéhyde dans de l'eau bidistillée ;
- Mélanger à l'agitateur magnétique ;
- Chauffer la solution à maximum 70 °C ;
- Ajouter quelques gouttes de NaOH à 1 M pour faciliter la dissolution ;
- Refroidir la solution sur glace ;
- Ajouter 10 mL de PBS 10X ;

- Mettre à pH (7-7,4) ;
- Mettre à volume final de 100 mL. ;
- Filtrer à travers des pores de 0,22 µM ;
- Aliquoter ;
- Conserver la solution à -20 °C.

La PFA est un composé toxique. Il est important de la manipuler sous une hotte chimique avec des gants et un masque.

1.9 Tampon pour le FACS (FACS buffer)

- Ajouter 2 g/L de BSA, 0,2 g/L de NaN3 dans 500 mL de PBS 1X ;
- Mélanger à l'agitateur magnétique.

2. Méthodes

2.1 Réveil d'une souche de *Brucella*

- Récupérer la souche de *Brucella* se trouvant dans le congélateur à -80 °C du BL3 (laboratoire de niveau de sécurité 3) nécessaire pour réaliser la manipulation (*Brucella melitensis* 16M WT, *Brucella melitensis* 16M mCherry) ;
- Déposer le tube contenant les bactéries sur un portoir de refroidissement pour maintenir la souche congelée ;
- Utiliser une anse pour récupérer des bactéries et les étaler sur une boîte de Pétri contenant du 2YT agar. ;
- Placer la boite à l'incubateur à 37 °C

Cette manipulation doit être réalisée environ 4 jours avant l'utilisation des colonies qui auront proliféré. Le réveil peut être conservé 1 semaine et demie.

2.2 Culture liquide de *Brucella*

Utiliser un réveil réalisé au minimum 4 jours avant l'utilisation.

- Utiliser une anse pour récupérer les colonies bactériennes. ;
- Mélanger les bactéries dans 10 mL de 2YT liquide dans un tube falcon de 50 mL ;
- Utiliser un contrôle négatif composé uniquement du 2YT liquide pour s'assurer de la stérilité du 2YT liquide ;
- Incuber overnight sous agitation à 37 °C dans l'incubateur du BL3.

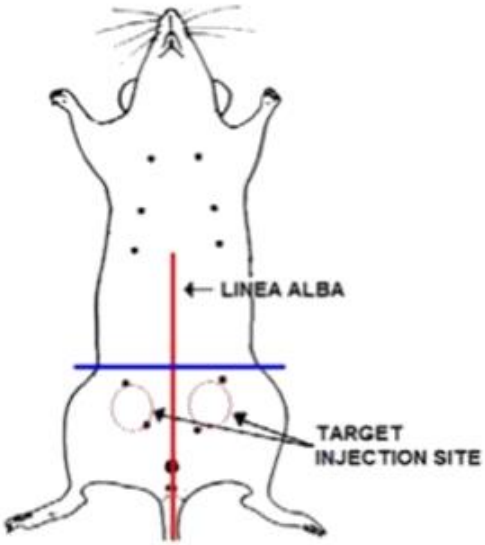


Figure 8 : Schéma d'injection en intrapéritonéal. Les points représentent les mamelles de la souris. La ligne rouge indique la ligne médiane qui représente la symétrie de la souris. La ligne bleue indique la zone sous laquelle il faut réaliser l'injection. Les cercles représentent les zones dans lesquelles les injections doivent être faites (UNC-IACUC(Basic MOUSE Handling and Technique Guide) UNC Chapel Hill Revised 2/2017).

2.3 Infection de souris par voie intrapéritonéale

- Réaliser une culture liquide de *Brucella* environ 15 h avant l'expérience (la veille) ;
- Mesurer la densité optique à 600 nm de la culture liquide avant la manipulation (utiliser comme blanc du 2YT liquide). Utiliser la culture liquide possédant une densité optique entre 0,7 et 1 (les bactéries sont en fin de phase de croissance) pour la suite de la manipulation ;
- Centrifuger les tubes falcons 10 min à 3500 RPM à température ambiante (RT) ;
- Réaliser 2 lavages au RPMI (10 mL) ;
- Suspendre le culot dans les 10 mL de RPMI ;
- Mesurer la densité optique à 600 nm avec du RPMI comme blanc ;
  Cette mesure permet de calculer la dose infectante.

Facteur de dilution = $\frac{\mathrm{DO}_{600\ \mathrm{nm}} \times 3 \times 10^9}{\text{nombre bactérie/mL}}$

Volume initial (à prélever de la suspension à diluer dans du RPMI) =
$\frac{Volume\ final\ (en\ fonction\ du\ nombre\ de\ souris\ \text{à}\ injecter)}{facteur\ de\ dilution}$

Injection des souris gestantes par voie i.p. avec $5x10^3$, $5x10^4$, 10^5, $5x10^5$ ou 10^7 CFU (Colonny Forming Units) de *Brucella melitensis* 16M WT dans 500 µL de milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute-1640 medium) à environ 14 ou 18 jours (selon l'expérience) de gestation. Des souris témoins (M PBS) ont été inoculées avec le même volume de PBS.

La dose infectante est contrôlée en étalant sur boîte de Pétri, contenant un milieu de 2YT agar, différentes dilutions. Le nombre de colonies est compté après 5 jours passé dans l'incubateur à 37 °C.

La **Figure 8** représente la position où sont injectées les bactéries ou le PBS. Nous réalisons les injections uniquement sur le côté droit (sens de la souris) du ventre car moins d'organes sont présents à cet endroit.

2.4 Mesure de la charge bactérienne (CFU) des tissus

- Sacrifier les souris par dislocation cervicale ;
- Stériliser les souris à l'éthanol ;
- Disséquer les souris et récupérer les différents organes en fonction des expériences (rate, foie, poumon, ganglion lymphatique poplité et thymus) ;
- Si besoin, homogénéiser les tissus et transférer dans 500 µL ou 1 mL de PBS / 0,1% de Triton X-100 ;
- Etaler la totalité ou des dilutions d'échantillons sur un milieu de 2YT agar ;

- Compter les CFU après 5 jours d'incubation à 37 °C pour évaluer la charge bactérienne.

2.5 Détection de *Brucella* par PCR sur des colonies

Pour confirmer la présence de *Brucella* dans les organes des souris F1 :

- Récupérer une colonie provenant de l'inoculation d'un organe et la mettre dans 100 µL de PBS dans un tube Eppendorf pour PCR ;
- Immerger les tube Eppendorfs dans un bain-marie à 80 °C pendant 1 h pour tuer les bactéries *Brucella* ;
- Effectuer une amplification de l'ADN des colonies (PCR de 30 cycles au cours de laquelle la phase d'élongation est réalisée à 55 °C) ;

Pour 1 µL d'échantillon

Elément	Concentration
Gotaq (ADN polymérase)	0,5 µL/µL
Désoxyribonucléotides (dNTP)	1,2 µL/µL
Amorce forward (diluée 10X dans eau) *	0,5 µL/µL
Amorce reverse (diluée 10X dans eau) *	0,5 µL/µL
Tampon **	6 µL/µL
Eau	20,3 µL/µL
ADNg (provenant de la solution de 100 µL de PBS)	1 µL/µL

* Amorce forward : RT_EryD_F : 5'-CGAAATCGAACATGGCGATCAAGAG-3'
Amorce reverse : RT_DeoR_R : 5'-CGCGCCAATGCTTCTTCC-3'

** Tampon contenant le cofacteur nécessaire à l'activité polymérase

- Déposer 10 µL d'échantillons amplifiés dans les puits d'un gel d'agarose 1 % contenant 5 µL de bromure d'éthidium. Le marqueur moléculaire utilisé est Quick-Load Purple 2-Log DNA Ladder (0,1 - 10,0 kb). La bande désirée indiquant la présence d'un gène pour le catabolisme de l'érythritol spécifique de *Brucella* se situe à 1,2 kb.

2.6 Récupération du plasma des souris

Réaliser une saignée :

- Chauffer la queue de la souris sous une lampe infrarouge afin de dilater sa veine caudale durant environ 3 minutes ;
- Couper moins de 2 mm de l'extrémité de la queue à l'aide de ciseaux ;

- Récupérer le sang dans un capillaire hépariné au sodium de 75 µL (Hirschmann, REF 9100275). Lorsque les souris sont âgées de 4 semaines, un demi-capillaire est rempli tandis qu'à l'âge de 7 semaines, 2 capillaires sont remplis ;
- Vider les capillaires dans des tubes Eppendorfs ;
- Centrifuger à 10.000 g durant 10 min à RT.

Si les échantillons ne sont pas utilisés directement, ils peuvent être conservés au congélateur.

2.7 Euthanasie de souris gestantes et de fœtus

- Les souris femelles gestantes sont anesthésiées avec de l'isoflurane (Zoetis) ;
- Elles sont euthanasiées par dislocation cervicale ;
- Les fœtus ont été retirés des cornes utérines maternelles ;
- Ils sont posés pendant 15 min dans des boîtes de Pétri disposées sur de la glace pour les euthanasier (Barbier *et al*, 2017 ; Kato *et al*, 2013).

2.8 Dosage des anticorps anti-*Brucella* dans le plasma de souris par ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

JOUR 1 Coating des plaques 96 puits NUNC 69620 :

- Déposer 50 µl/puits de solution de *Brucella melitensis* heat-killed (HK) (solution initialement à 10^9/mL diluée dans PBS pour obtenir 10^7/mL) (tapoter la plaque pour évacuer les bulles d'air et pour recouvrir entièrement la surface des puits) ;
- Incuber overnight à 4 °C (recouvrir la plaque avec du Parafilm M afin de protéger car elle est fournie sans couvercle).

JOUR 2 Saturation des sites non spécifiques :

- Vider la boîte (« flikker » : la retourner d'un seul coup, d'une manière vive) ;
- Déposer 200 µl/puits d'une solution d'hydrolysat de caséine et de PBS 1x (3,65 g d'hydrolysat de caséine/100 mL de PBS) ;
- Incuber 2 h à RT.

Test ELISA :

- Flikker ;
- Déposer 50 µl/puits des plasmas à tester, de tests positifs (IgG3 *Brucella* : 12B12 ou 12F12) et de tests négatifs (plasma de souris naïve dilué 30x et du PBS) ;
  → 4 dilutions (10 x, 30 x, 90 x, 270 x) dans de l'hydrolysat de caséine (préparer les dilutions à part, dans plaque 96 puits avec des puits coniques) ;
- Incuber 1 h à RT.

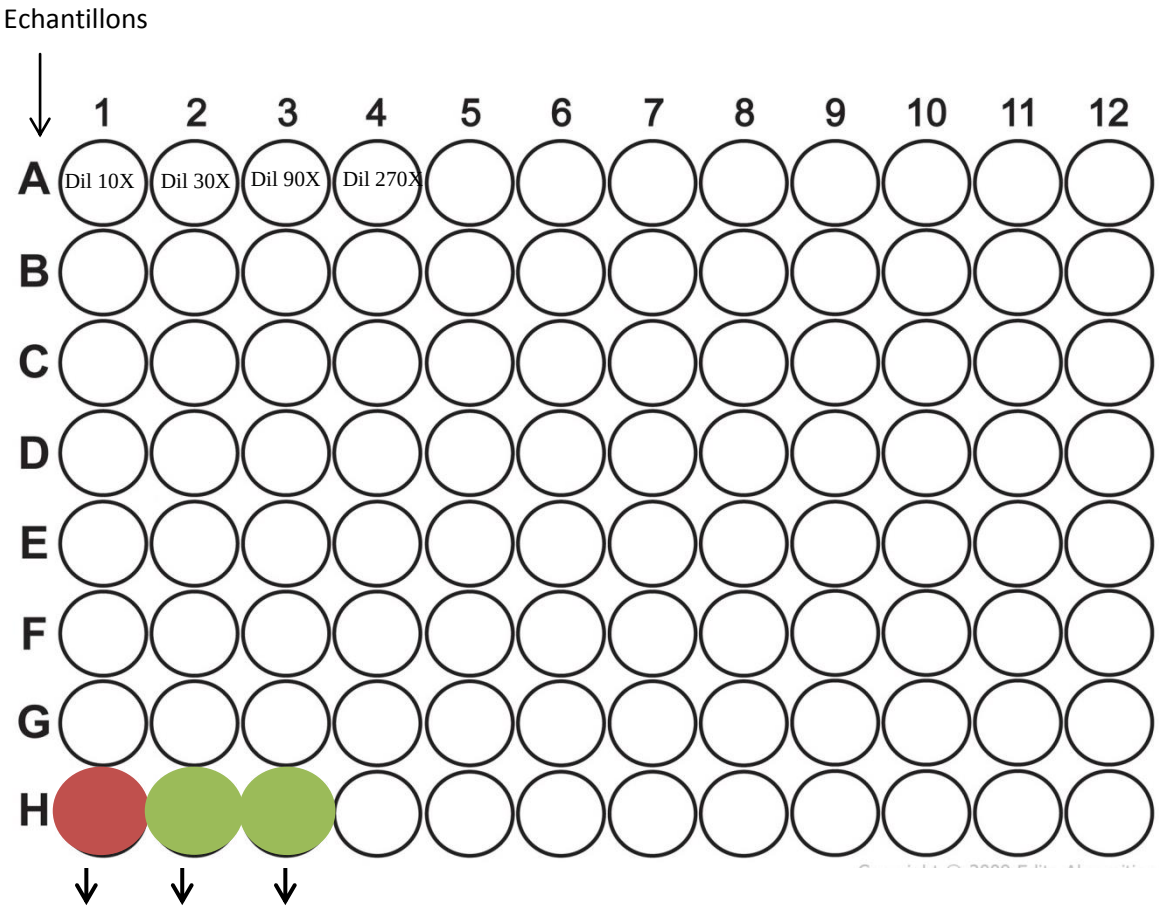


Figure 9 : Schéma d'un exemple d'une plaque 96 puits NUNC 69620 pour un test ELISA avec les dilutions réalisées.

Révélation :

- Laver 4 x avec du PBS ;
- Déposer 50 µl/puits d'anticorps αIgM, αIgG3, αIgG1 ou αIgG2a dilués dans de l'hydrolysat de caséine. Ces anticorps sont en solution dans du glycérol ;
- Incuber 1 h à RT ;
- Laver 4 x avec du PBS ;
- Ajouter 100 µl/puits de TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)
- Placer dans le noir à RT durant 10 à 15 min ;
- Stopper la réaction avec 50 µl/puits d'H2SO4 2N ;
  Tapoter la boîte pour homogénéiser la solution.
- Lecture de la DO à 450 nm.

La **Figure 9** schématise un exemple de la position des échantillons sur la plaque 96 puits.

Anticorps	Concentration
Anti-Mouse IgG-Peroxydase antibody (A2554, Sigma-aldrich)	1/4000
Anti-Mouse IgM-Peroxydase antibody (18786, Sigma-aldrich)	1/4000 (ex : 1,25 µl pr 5ml)
LO MG1-13 (IgG1) - perox (chez LO-IMEX)	1/2000
LO MG2b-2 (IgG2b) – perox	1/2000
LO MG2a-9 (IgG2a et 2c) – perox	1/2000
LO MG3-13 (IgG3) – perox	1/2000

2.9 Mesure de la fréquence des cellules exprimant l'IFN-γ dans la cavité péritonéale

- Challenger des souris de 7 semaines (souris F1) par voie intrapéritonéale avec 10^5 CFU de *Brucella melitensis* 16M mCherry dans 500 µL de RPMI.

Reprendre les cellules de la cavité péritonéale à 12 h post challenge

- Sacrifier les souris ;
- Les passer dans l'alcool pour désinfecter ;
- Injecter 10 mL de PBS froid (sur glace) dans la cavité péritonéale avec une aiguille fine (25 G) ;
- Laisser reposer 5 min ;
- Piquer la cavité péritonéale des souris avec une large aiguille (18 G) ;
- Recueillir le liquide dans un tube falcon de 15 mL.

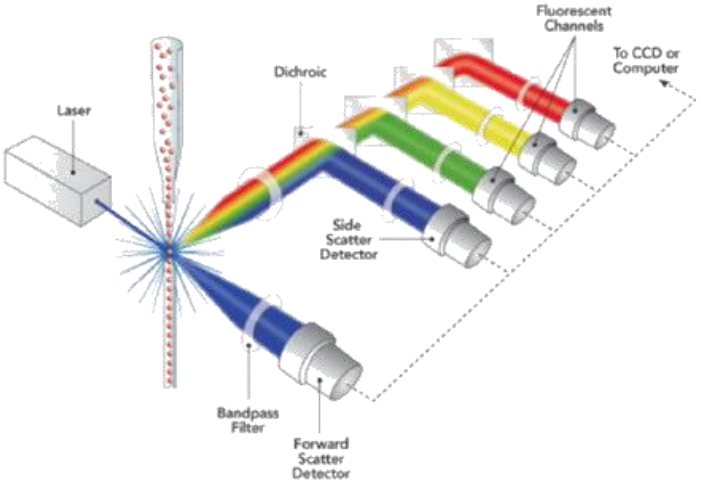


Figure 10 : Principe du cytomètre en flux. Les cellules passent individuellement devant un laser et les faisceaux lumineux sont diffractés, reflétés et réfractés lorsqu'ils croisent les cellules. La diffraction fournit des informations sur la taille et la réflexion et la réfraction informent sur la granularité des cellules. Des programmes informatiques permettent ensuite d'analyser les résultats.

2.10 Cytométrie en flux intracellulaire

- Centrifuger les tubes falcons contenant le liquide de la cavité péritonéale pendant 7 min à 1400 RPM à 4 °C ;
- Jeter le surnageant ;
- Resuspendre les cellules dans 1 mL de milieu complet (500 mL de RPMI, 100 µL de FBS /mL de RPMI, 10 µL/mL d'acides aminés non essentiels, 10 µL/mL de pyruvate sodium et 10 µL/mL de L-glutamine) avec 1 µl/mL de Golgi Stop (BD Pharmingen) ;
- Incuber les tubes falcons durant 5 h à 37 °C, sous 5 % de CO_2 (faire attention à ne pas serrer trop fort le bouchon, pour permettre une oxygénation des cellules) ;
- Centrifuger les tubes falcons à 1400 RPM durant 7 min à 4°C ;
- Jeter le surnageant ;
- Resuspendre les cellules dans 1 mL de milieu complet ;
- Incuber les tubes falcons overnight à 4 °C (faire attention à ne pas serrer trop fort le bouchon pour permettre une oxygénation des cellules).

Le lendemain:

- Centrifuger les tubes falcons à 1400 RPM durant 7 min à 4 °C ;
- Jeter le surnageant ;
- Ajouter 150 µL de FACS buffer dans chaque tube falcon ;
- Transférer le contenu de chaque tube falcon dans les puits d'une plaque 96 puits ;
- Laver les cellules deux fois avec du FACS buffer (centrifuger à 2000 RPM durant 2 min à 4 °C) ;
- Incuber les cellules avec des doses saturantes de 2.4G2 (anti-mouse FcR; American Type Culture Collection - dilution 1/ 200) dans 200 µL de FACS buffer/puits (20 min à 4 °C) pour bloquer les sites aspécifiques ;
- Laver les cellules avec du FACS buffer (centrifugation à 2000 RPM durant 2 min à 4 °C) ;
- Incuber les cellules 30 min dans les anticorps souhaités (de surface seulement →CD3 FITC 1/100 et CD4 PE 1/200) dans 200 µL de FACS buffer ;
- Laver avec du FACS buffer (centrifugation à 2000 RPM durant 2 min à 4 °C) ;
- Fixer les cellules dans 200 µL de FACS buffer/2 % PFA durant 40 min à 4 °C ;
- Laver 2 fois au FACS buffer (centrifugation à 2000 RPM durant 2 min à 4 °C) ;
- Perméabiliser les cellules durant 30 min à 4 °C avec un tampon à base de saponine (10x Perm/Wash dans du FACS Buffer) contenant les anticorps intracellulaires (IFN-γ APC 1/300) ;
- 2 lavages au FACS buffer ;
- Analyser à l'aide du BD FACSCalibur de la société BD Biosciences.

La **Figure 10** représente le principe général de la cytométrie en flux.

2.11 Analyses statistiques des résultats

Nous avons utilisé des tests (Wilcoxon-) Mann-Whitney et des comparaisons multiples réalisés par le logiciel GraphPad Prism pour analyser statistiquement nos résultats. Chaque groupe de souris témoins (injectées avec du PBS) a été comparé aux souris infectées avec *Brucella melitensis* 16M WT ou *Brucella melitensis* 16M mCherry. Nous avons également comparé chaque groupe les uns avec les autres et affiché les résultats. Des valeurs de p value <0,05 ont été considérées comme représentant une différence significative. *, **, *** et **** désignent p value <0,05, p value <0,01, p value <0,001 et p value <0,0001, respectivement. Les valeurs de p value > 0,05 indiquent qu'il n'y a pas de différence significative.

Résultats

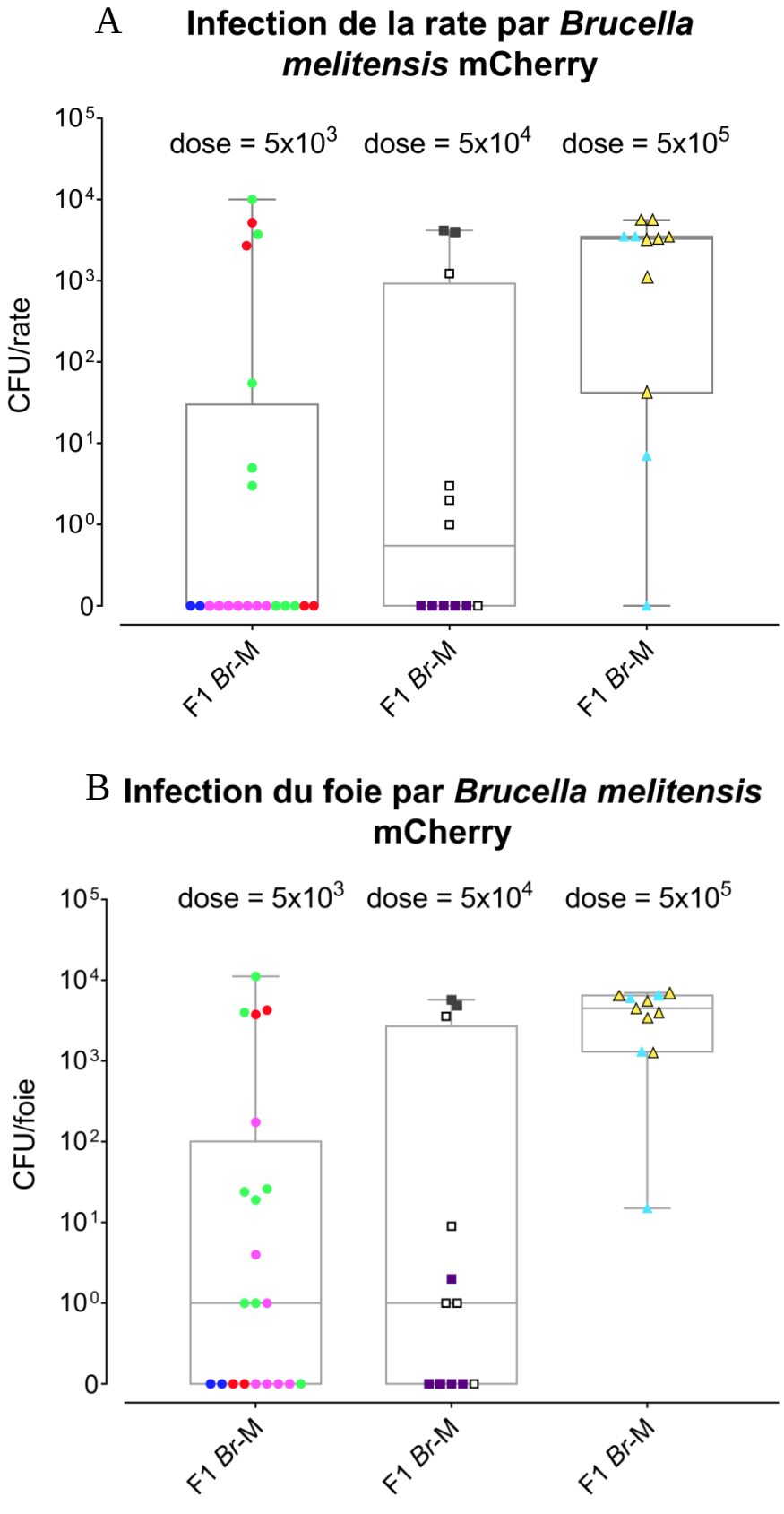


Figure 11 : Evaluation de l'infection des souris F1. Les souris gestantes ont été infectées à 14 jours de gestation en i.p. avec la bactérie *Brucella melitensis* mCherry. 3 doses infectieuses ont été testées : $5x10^3$, $5x10^4$ et $5x10^5$ CFU. Les souris nées des mères infectées (F1 *Br*-M) ont été euthanasiées à l'âge de 10 jours. Leur foie et leur rate ont été récupérés pour des analyses en CFU. Les souris F1 d'une même portée sont représentées par la même couleur.

Résultats

1. Détermination de la dose infectieuse optimale

Afin d'identifier une dose infectieuse optimale de *Brucella melitensis* pour l'infection des femelles gestantes, c'est à dire une dose permettant l'infection d'un nombre maximum de souriceaux (que nous nommerons F1) sans occasionner d'avortement, nous avons comparé l'impact de différentes doses infectantes. Sachant qu'une infection de 10^6-10^7 CFU de *Brucella melitensis* est critique pour les souris gestantes (Wang *et al*, 2014), nous avons fixé la dose maximale à $5x10^5$ CFU. Sur cette base, nous avons testé une dose "intermédiaire" de $5x10^4$ CFU et une "faible" dose de $5x10^3$ CFU.

Des groupes de souris C57BL/6 femelles à 14 jours de gestation ont été infectés en i.p. avec $5x10^3$, $5x10^4$ ou $5x10^5$ CFU de *Brucella melitensis* mCherry. Ce temps a été contrôlé en comptant le nombre de jours entre l'injection et la naissance de F1, tout en sachant que la gestation complète d'une souris est de 21 jours. Dix jours après la naissance, les F1 ont été euthanasiés. Leur rate et leur foie ont été analysés en CFU. Nous avons également sacrifié les mères et vérifié que celles-ci étaient bien infectées. Toutes les mères présentaient entre 10^3-10^4 CFU dans la rate. Le taux d'infection dans le foie augmentait avec la dose infectante (données non montrées).

Comme attendu, nous avons observé que le taux moyen de CFU dans la rate (**Figure 11.A**) et dans le foie (**Figure 11.B**) des F1 de mères infectées (F1 *Br*-M) augmente proportionnellement à la dose infectieuse administrée. La fréquence d'infection des F1 augmente également de manière très importante en fonction de la dose infectante. A basse dose, 33% (7/21) des F1 sont infectés, à dose intermédiaire 50% (6/12) et à haute dose 91% (10/11). On peut aussi noter que le nombre de F1 infectés au sein d'une portée est dépendant de la dose. 28 % de F1 infectés dans les portées lorsque les mères sont infectées avec $5x10^3$ CFU, 58 % pour la dose $5x10^4$ et 87,5 % pour la dose $5x10^5$. Il est également important de noter qu'il y a un fort taux d'infanticide chez les portées provenant de mères infectées avec une haute dose. Ce taux d'infanticide décroit avec la dose. Aucun infanticide n'a été observé à basse dose. En se basant sur ces résultats, nous avons choisi de ne pas utiliser la dose $5x10^5$ CFU dans la suite de notre étude car elle entraînait trop d'infanticides. **La dose $5x10^4$ CFU de *Brucella melitensis* a été sélectionnée comme dose infectieuse optimale dans notre modèle** car elle permet d'infecter un maximum de F1 tout en limitant les risques de pertes à la naissance.

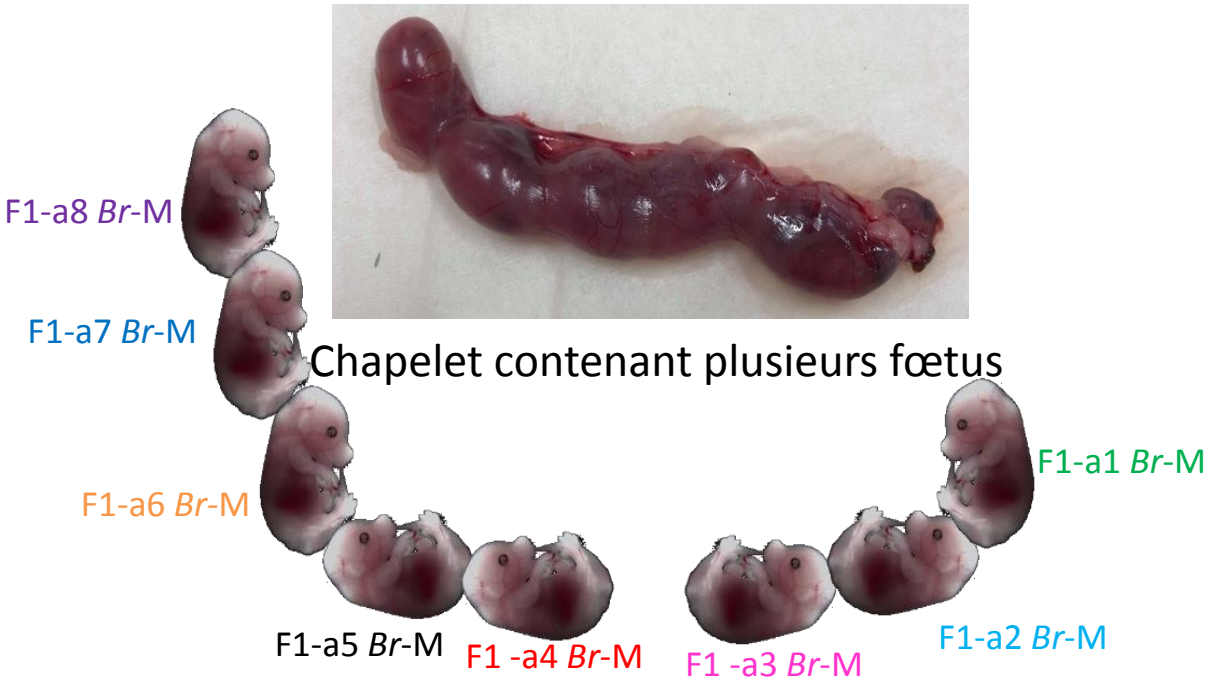


Figure 12 : Représentation schématique d'un chapelet de fœtus d'environs 18 jours. Le chapelet d'une mère gestante a été récupéré à environ 18 jours de gestation. Les fœtus sont répartis sur un chapelet séparé en deux branches.

2. Identification du mode d'infection des F1: oral versus in utero

Suite à l'infection maternelle, les F1 peuvent être infectés durant la gestion, *in utero*, ou au contact de la mère après la naissance. Deux types d'expériences ont été réalisés afin de déterminer le mode d'infection des F1.

Des souris C57BL/6 femelles, gestantes d'environ 18 jours, ont été infectées en i.p. avec $5x10^4$ CFU de *Brucella melitensis*. A 12 h post infection (p.i.), elles ont été euthanasiées. Les chapelets de fœtus et les rates des mères ont été récupérés. Comme le représente la **Figure 12**, les souriceaux sont répartis dans un chapelet qui se sépare en deux branches: trois fœtus dans la branche de droite, et 5 dans celle de gauche. La position des fœtus a été notée lors de la dissection pour permettre une potentielle corrélation avec le niveau d'infection. Pour chaque fœtus, une analyse CFU a été réalisée sur les enveloppes (membrane vitelline et membrane amniotique), le placenta, les poumons et le foie (**Figure 13**). Au total, les fœtus de deux mères infectées (a et b) ont été analysés. Les données de chaque mère sont présentées séparément. Le taux d'infection dans la rate des mères est semblable. Cependant l'infection des placentas et des enveloppes varie, entre les deux mères, d'un facteur 10 et d'un facteur 100, respectivement. Plusieurs foies et poumons des fœtus de la mère(-a) (**Figure 14 A**) sont infectés tandis que les fœtus de la mère(-b) (**Figure 14 B**) ne sont pas infectés. Ces résultats démontrent que **la transmission de *Brucella melitensis* de la mère aux F1 peut s'effectuer *in utero***. Ils suggèrent également que celle-ci peut présenter une grande variabilité, (tout comme on l'avait déjà remarqué sur la **Figure 11**). **Les infections de la mère et du placenta ne garantissent donc pas nécessairement celle des fœtus.**

Afin d'évaluer une possible transmission de *Brucella* après la naissance, par exemple via le lait maternel, nous avons également réalisé des échanges de portées entre des mères infectées par $5x10^4$ CFU de *Brucella melitensis* (M *Br*) et des mères contrôles, injectées avec du PBS (M PBS). Les portées ont été échangées dès la naissance pour éviter les premières tétées. Les F1 ont été sacrifiés à l'âge de 4 semaines et le foie et la rate récupérés. Les graphiques de la **Figure 15** représentent les taux de CFU dans le foie (**A**) et la rate (**B**) des F1 *Br*-M (rouge) et F1 PBS-M (bleu). Les mères infectées présentent des résultats positifs pour les CFU dans le foie et dans la rate tandis que les mères injectées avec du PBS ne possèdent aucune bactérie dans leurs organes (données non montrées). Les F1 *Br*-M nourris avec du lait de M PBS sont infectés. Par contre, les F1 PBS-M allaitées avec du lait de M *Br* ne présentent pas de bactéries dans leur rate et leur foie. Ces résultats suggèrent que **le lait n'est pas un moyen de transmission de l'infection chez la souris, du moins dans ce cas-ci**.

Ensemble, ces deux expériences confirment que les F1 peuvent être infectés *in utero*.

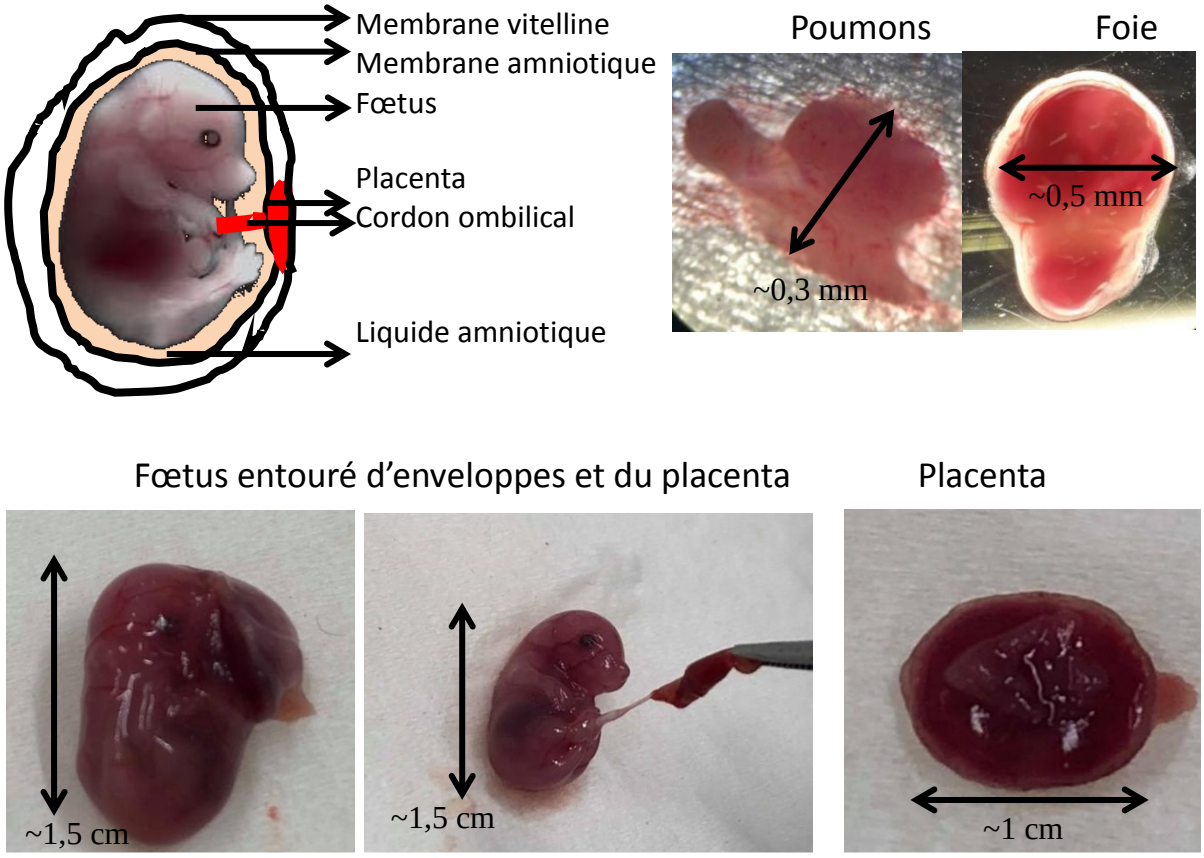
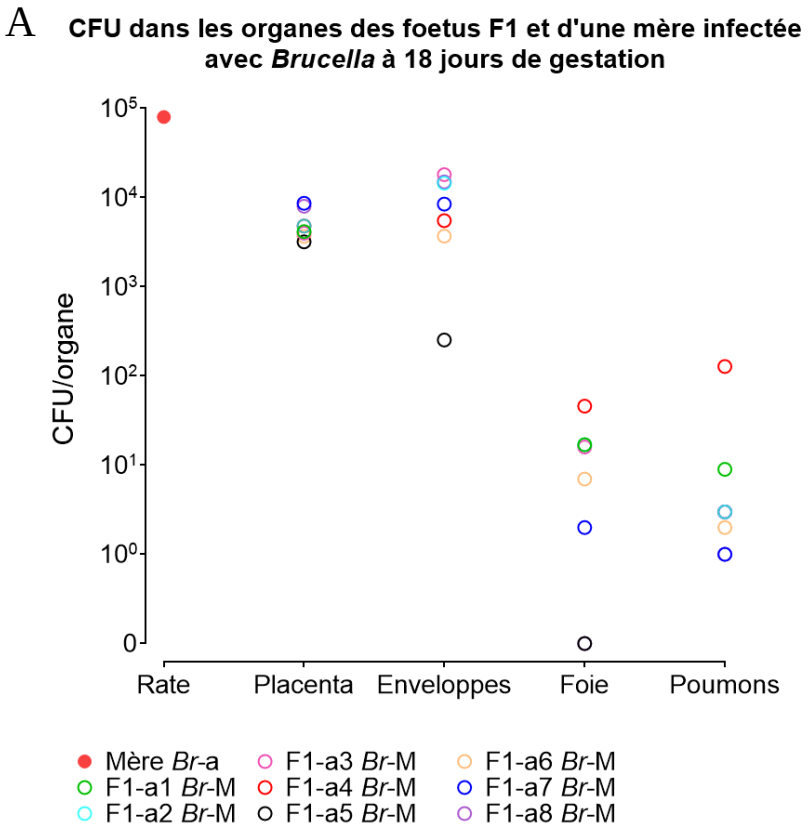


Figure 13 : Images d'organes de fœtus d'environs 18 jours. Chaque fœtus est entouré de deux enveloppes, une extérieure appelée membrane vitelline et une intérieure appelée membrane amniotique. Le fœtus baigne dans du liquide amniotique se trouvant dans l'enveloppe intérieure. Chaque fœtus est relié à un placenta personnel par le cordon ombilical. On distingue dans les fœtus âgés d'environ 18 jours le foie et les poumons.



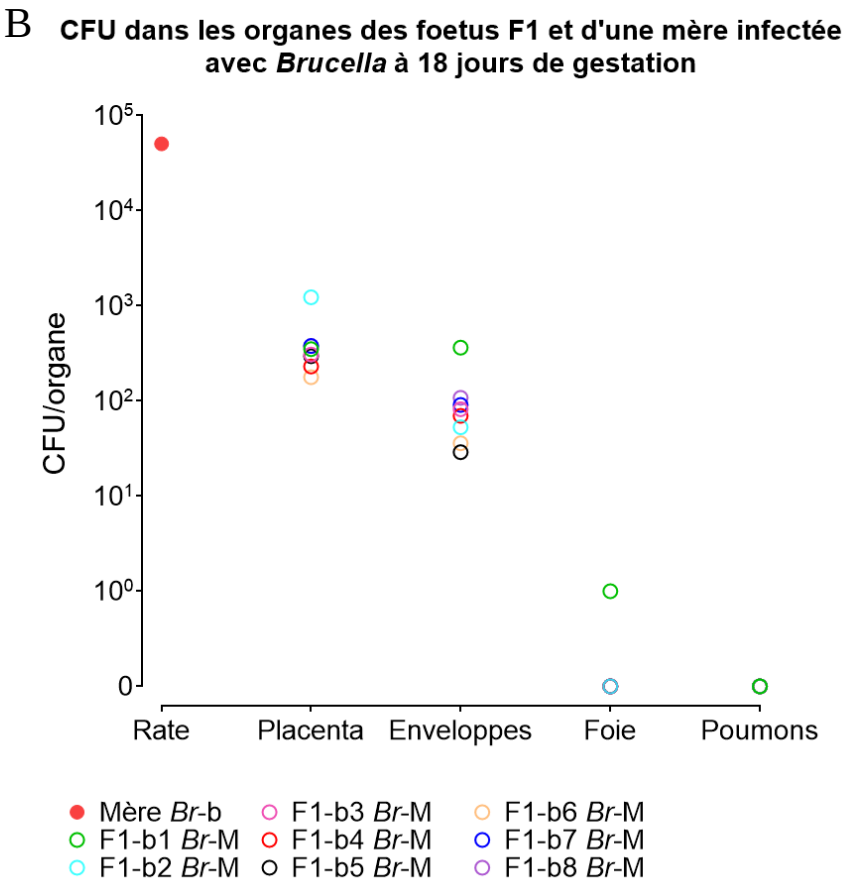


Figure 14 : Taux de bactéries *Brucella* dans les organes des embryons âgés de 18 jours et des mères gestantes infectées. Des souris C57BL/6 gestantes d'environ 18 jours ont été infectées en i.p. avec $5x10^4$ CFU de *Brucella melitensis*. A 12 h post infection, les souris ont été euthanasiées. Les rates des mères (rond rouge plein) ont été récupérées. Le placenta, les enveloppes, le foie et les poumons ont été analysés pour chaque fœtus. Les lettres a et b correspondent aux deux mères, le chiffre associé indique la position du fœtus au sein du chapelet.

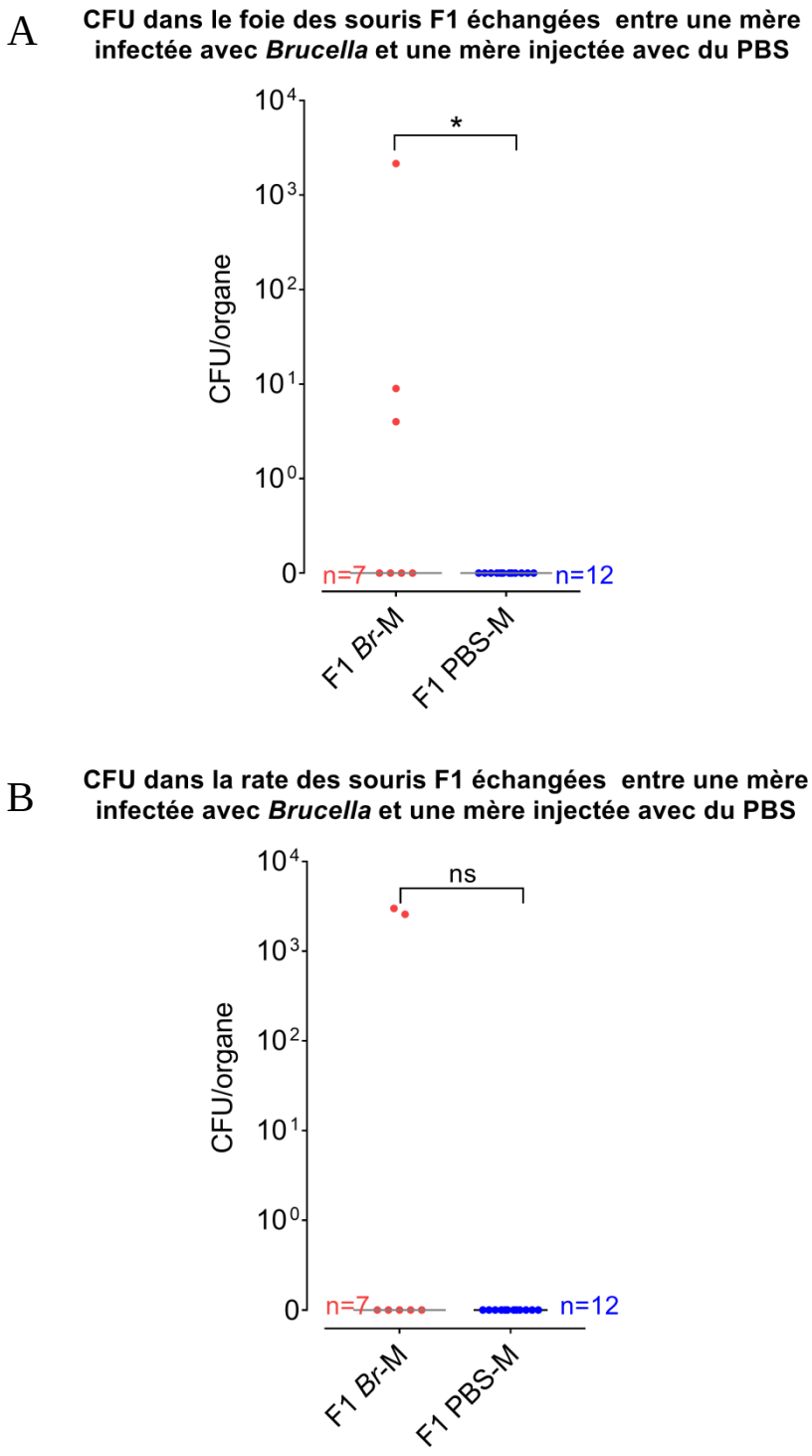


Figure 15 : Echanges de portées entre des mères infectées avec la bactérie *Brucella melitensis* et des mères injectées avec du PBS. Les souris gestantes BALB/c ont été infectées à 14 jours de gestation en i.p. avec $5x10^4$ CFU de *Brucella melitensis* mCherry ou avec du PBS. Les portées ont été échangées dès la naissance entre une mère infectée et une mère injectée avec du PBS. A l'âge de 4 semaines, le foie (A) et la rate (B) des souris F1 ont été récupérés. La couleur rouge représente les F1 *Br*-M et le bleu représente les F1 PBS-M.
Les barres grises représentent les médianes. Non significatif (ns) si p> 0,05 ; *, p <0,05.

3. Développement d'un modèle expérimental afin de mesurer l'impact d'une infection in utero par Brucella melitensis sur la croissance des F1 et leur résistance à une nouvelle infection par Brucella

Sur base des résultats obtenus lors de notre première expérience de variation de dose, nous avons sélectionné une dose infectante de $5x10^4$ CFU de *Brucella melitensis* 16M pour les souris gestantes d'environ 14 jours. Pour rappel, la dose de $5x10^4$ CFU permet d'infecter une majorité des F1, tout en évitant l'avortement et le taux élevé d'infanticide observé avec $5x10^5$ CFU.

Afin d'évaluer l'impact de l'infection maternelle par *Brucella* sur le développement des F1, ceux-ci ont été pesés individuellement tous les 15 jours à partir de 2 semaines jusqu'à l'âge de 6 semaines.

Dans le but d'établir la résistance des F1 *Br*-M à une réinfection par *Brucella melitensis*, nous avons effectué plusieurs tests.

Comme indiqué sur la **Figure 16**, à 4 semaines, la présence d'IgG3 spécifiques à *Brucella* dans le plasma a été évaluée par la technique ELISA. À 7 semaines, nous avons évalué la présence des IgM, IgG3 et IgG2a spécifiques à *Brucella*.

Après les 7 premières semaines, les souris F1 *Br*-M et F1 PBS-M ont été séparées en deux groupes sur lesquels des expériences distinctes ont été effectuées (voir **Figure 16**).

Sur le **premier groupe**, nous avons injecté en i.p. toutes les F1 avec 10^7 CFU de *Brucella melitensis* mCherry. A 2 heures post injection (p.i.), du sang a été prélevé et étalé sur des boîtes de Pétri contenant un milieu riche propice au développement de *Brucella melitensis*. A 6 jours p.i., les F1 ont été euthanasiés, les rates ont été recueillies et étalées sur boîtes. Cette expérience nous a permis de déterminer la capacité des souris F1 adultes à contrôler une nouvelle infection à *Brucella.*

Sur le **second groupe**, un challenge différent a été réalisé. Les souris ont été injectées en i.p. avec 10^5 CFU de *Brucella melitensis* mCherry. A 12h p.i., les cellules se trouvant dans la cavité péritonéale des souris ont été récupérées par lavage. Le taux d'IFN-γ synthétisé par ces cellules a ensuite été évalué en cytométrie en flux. Cette expérience nous a permis de déterminer la capacité des souris F1 adultes à produire de l'IFN-γ lorsqu'elles doivent faire face à une nouvelle infection à *Brucella* ainsi que le phénotype des cellules productrices d'IFN-γ.

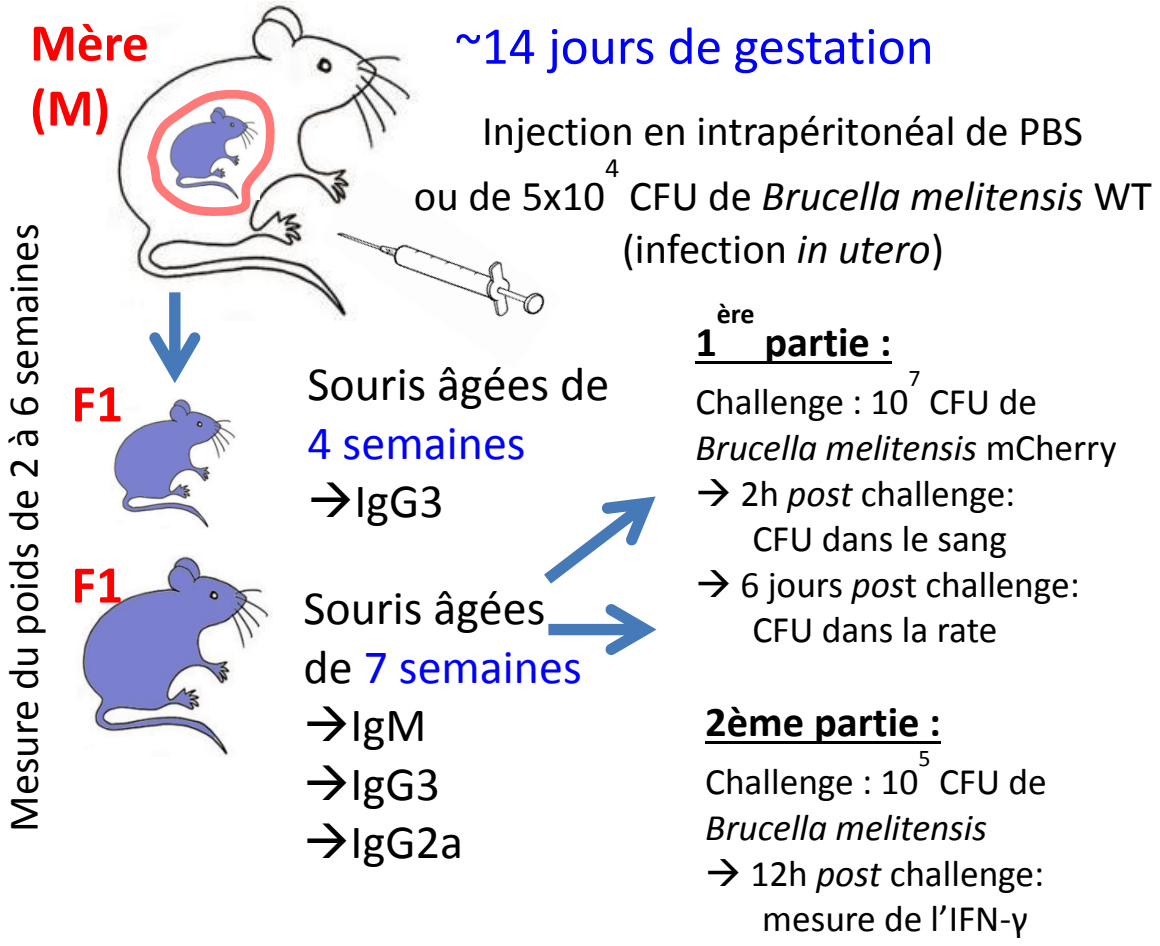


Figure 16 : Représentation schématique du modèle expérimental d'étude de l'infection *in utero* par *Brucella melitensis* chez les souris.

4. L'infection maternelle ne semble pas affecter la croissance des F1

Comme indiqué précédemment, afin d'évaluer l'impact de l'infection maternelle sur la croissance des F1, les F1 PBS-M et F1 *Br*-M ont été pesés individuellement toutes les deux semaines depuis leur naissance. La première pesée est une moyenne car les souriceaux sont trop petits pour être identifiés individuellement.
Sur la **Figure 17**, les moyennes des courbes de croissance sont représentées en fonction de la lignée et du sexe des souris: souris BALB/c femelles **(A)** et mâles **(B)**, souris C57BL/6 femelles **(C)** et mâles **(D)**.
Nous n'observons pas de différences significatives entre les courbes de croissance des souris F1 PBS-M et F1 *Br*-M, qu'elles soient de lignée C57BL/6 ou de souris BALB/c. **Les résultats obtenus suggèrent que l'infection maternelle par *Brucella* n'a pas d'impact détectable sur la croissance des F1 durant les 6 premières semaines.**

5. L'infection maternelle induit chez certains F1 une réponse humorale dominée par les IgG3

Pour déterminer si les souris F1 *Br*-M ont développé une réponse humorale suite à l'infection maternelle par *Brucella melitensis*, la présence d'anticorps spécifiques de *Brucella* dans le plasma des F1 *Br*-M et des F1 PBS-M (en tant que contrôle) âgés de 4 et 7 semaines a été évaluée: la présence d'IgG3 a été évaluée à 4 semaines et celle des IgG3, IgM et IgG2a à 7 semaines.

Nous n'avons pas détecté d'IgM et d'IgG2a chez les souris F1 *Br*-M et PBS-M. Ces données ne sont donc pas présentées.
A 4 semaines, on peut remarquer sur la **Figure 18** que certains F1 *Br*-M C57BL/6 développent déjà des IgG3 mais qu'elles ne sont par contre pas détectables pour les F1 *Br*-M BALB/c. A 7 semaines, les IgG3 sont détectées chez les F1 *Br*-M des deux lignées de souris.

Il existe une nette corrélation entre une infection maternelle et la présence d'IgG3 détectables spécifiques de *Brucella*. Cependant toutes les souris F1 *Br*-M ne développent pas d'IgG3 détectables.

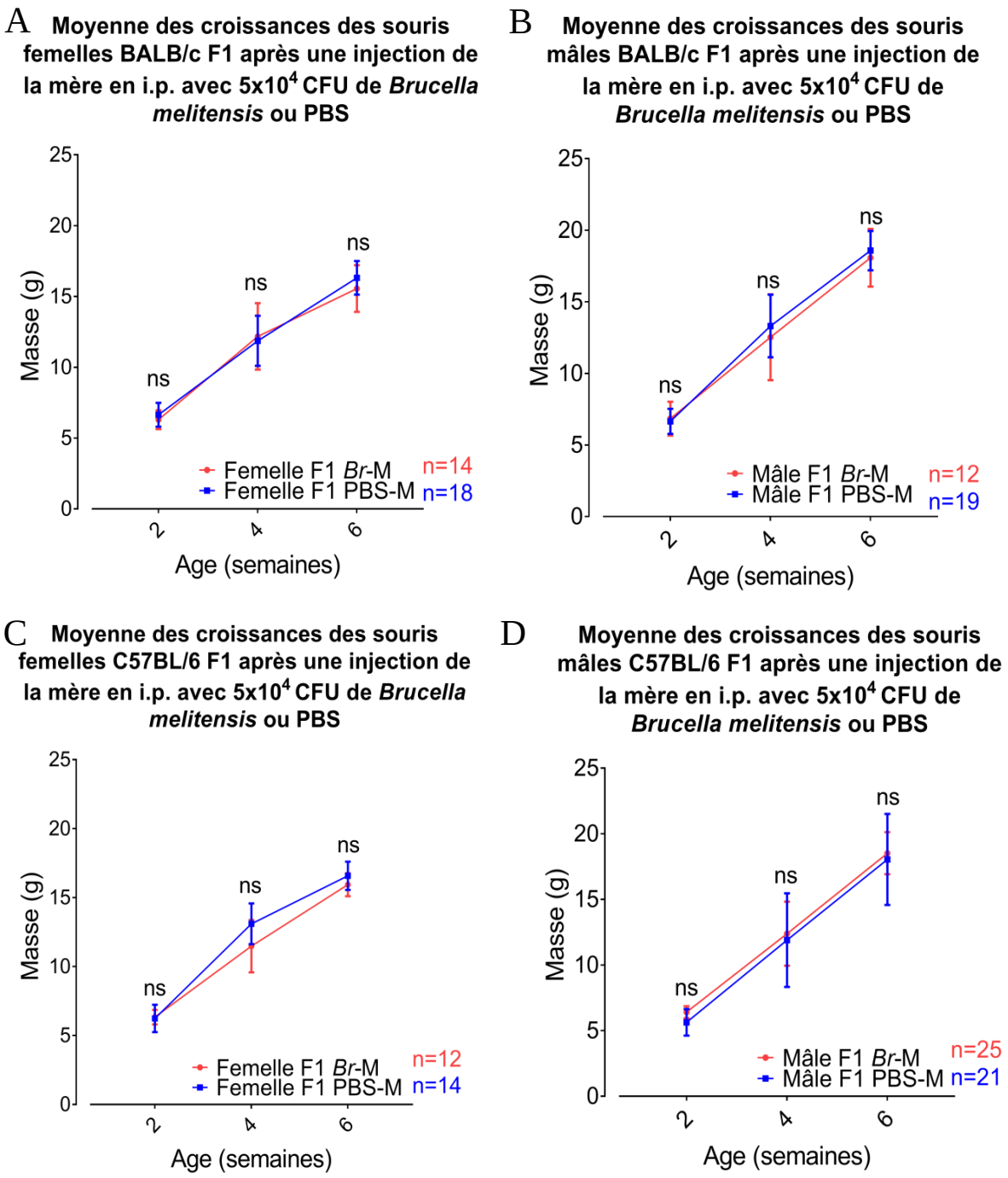


Figure 17 : Moyenne des courbes de croissance des souris F1 *Br*-M et F1 PBS-M. Les souris gestantes ont été infectées en i.p. avec $5x10^4$ CFU de *Brucella melitensis*. De 2 semaines à 6 semaines après leur naissance, les souris F1 ont été pesées toutes les deux semaines. Les moyennes des courbes de croissance sont représentées en fonction du sexe des souris F1 (les souris F1 *Br*-M en rouge et les souris F1 PBS-M en bleu). Les données représentent la moyenne des croissances de souris BALB/c femelles F1 par gramme (A) et de souris BALB/c mâles F1 (B). La moyenne des souris C57BL/6 femelles F1 est représentée sur le graphique C et celle des souris C57BL/6 mâles F1 est représentée sur le graphique D. n indique le nombre de souris F1 représentées sur les graphiques. Non significatif (ns) si p> 0,05.

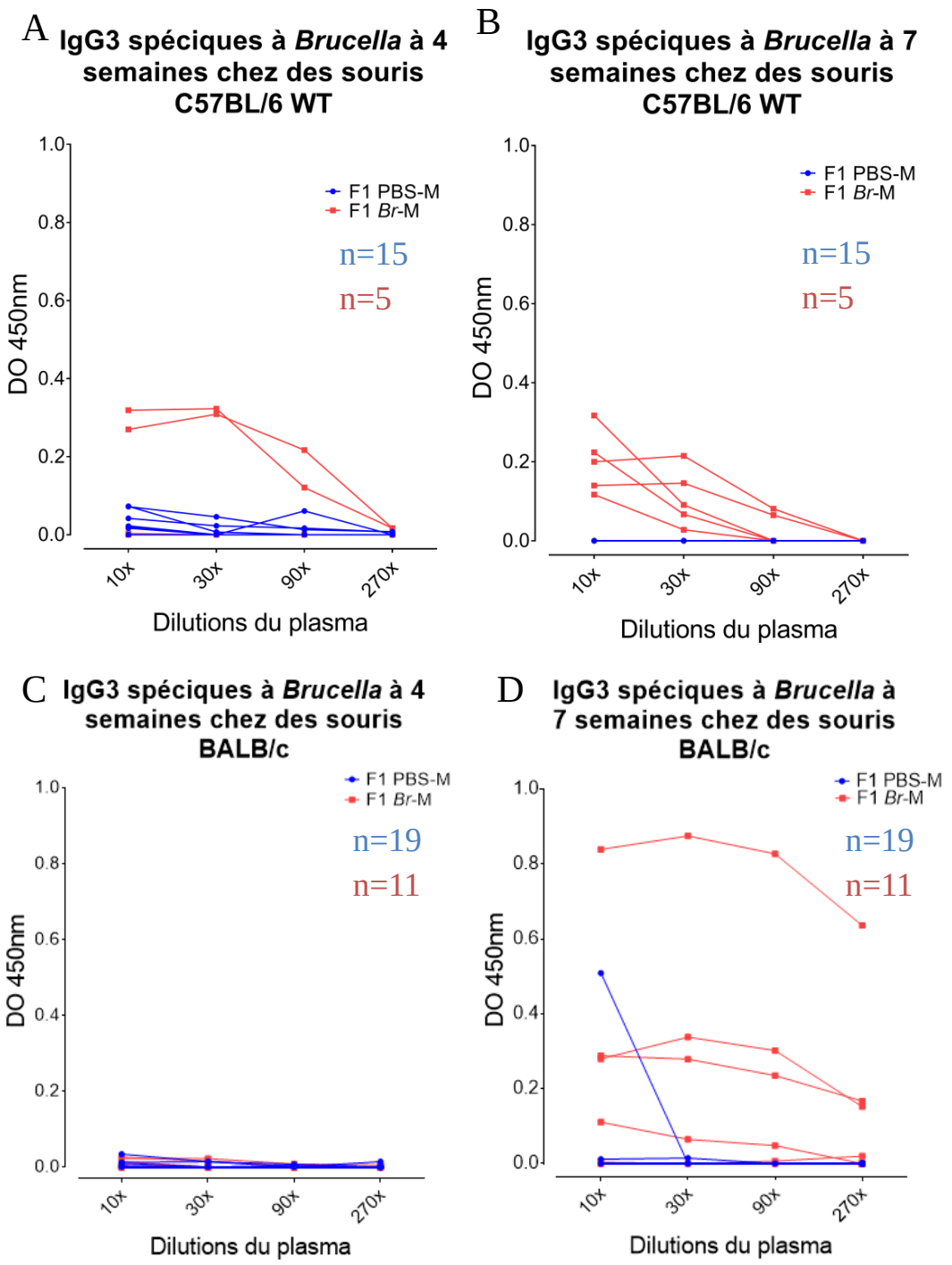


Figure 18 : Développement d'Ig spécifiques de *Brucella* suite à l'infection maternelle. Les souris gestantes ont été infectées en i.p. avec $5x10^4$ CFU de *Brucella melitensis*. La présence d'IgG3 a été analysée par la technique ELISA dans le plasma de souris F1 *Br*-M à 4 et 7 semaines. La densité optique (DO) à 450 nm est exprimée en fonction de la dilution du plasma. La couleur rouge indique les souris descendant d'une mère infectée par la bactérie durant la gestation (F1 *Br*-M). Lorsque les souris gestantes ont été injectées avec du PBS, les résultats sont représentés en bleu (F1 PBS-M). Chaque courbe sur les graphiques A, B, C et D représente une souris F1. Les données représentent la détection d'IgG3 spécifiques de *Brucella* à 4 semaines pour les souris F1 C57BL/6 WT **(A)**, d'IgG3 spécifiques de *Brucella* à 7 semaines pour les souris F1 C57BL/6 **(B)**, d'IgG3 spécifiques de *Brucella* à 4 semaines pour les souris F1 BALB/c **(C)** et d'IgG3 spécifiques de *Brucella* à 7 semaines pour les souris F1 BALB/c WT **(D)**. n indique le nombre de souris F1 représentées sur les graphiques.

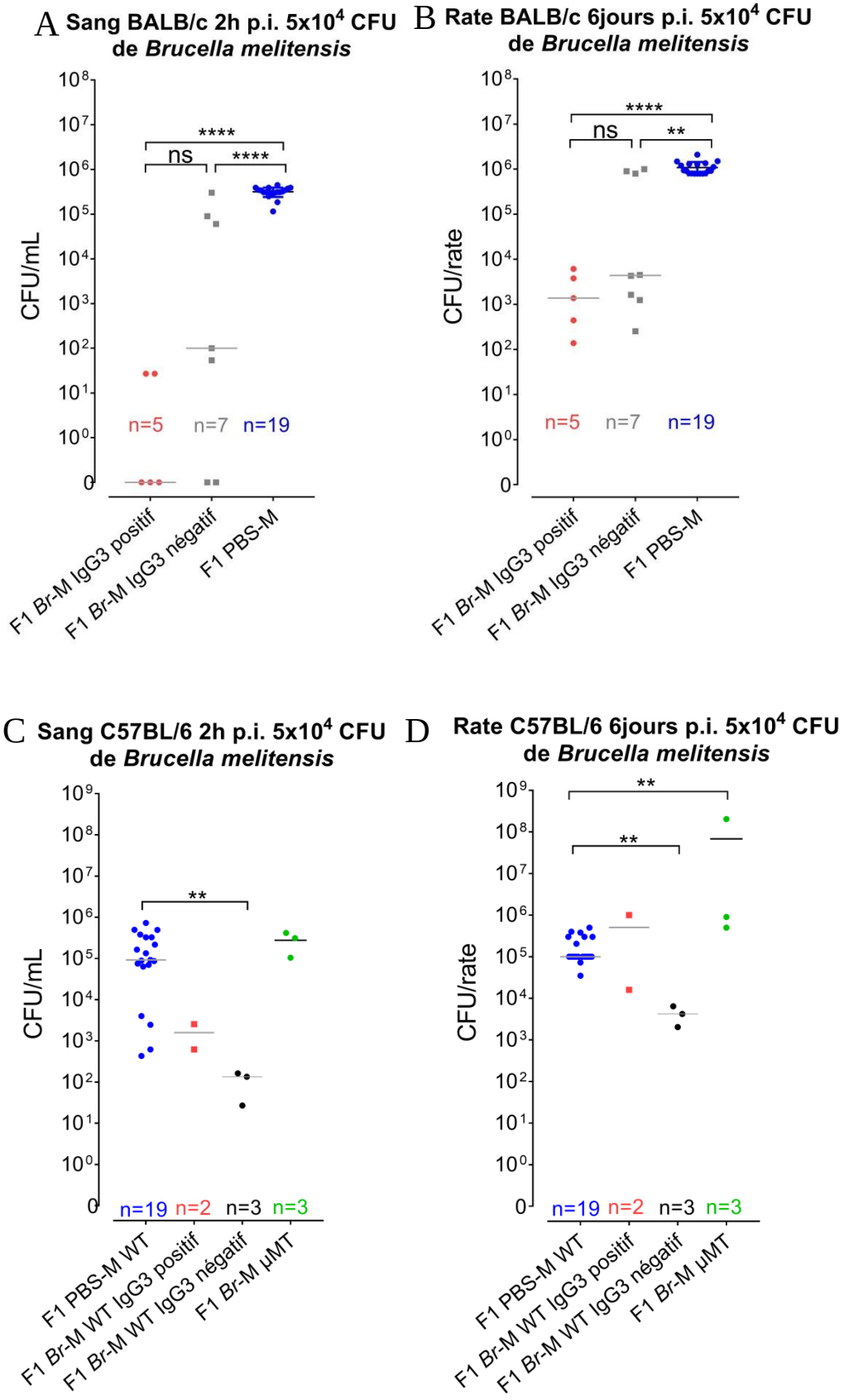


Figure 19 : Challenge haute dose avec *Brucella*: infection en i.p. avec 10^7 CFU de *Brucella melitensis* mCherry chez les F1 *Br*-M ou chez des F1 PBS-M. Les CFU ont été comptées dans 100 µL de sang 2 heures après le challenge (p.c.) et dans la rate 6 jours p.c.. Chaque point représente une souris F1. Les données représentent les CFU par mL de sang pour les souris F1 BALB/c WT 2 heures p.i. **(A)**, les CFU par rate pour les souris F1 BALB/c WT 6 jours p.i. **(B)**, les CFU par ml de sang pour les souris F1 C57BL/6 WT et µMT (MuMT) 2 heures p.i. **(C)**, les CFU par rate pour les souris F1 C57BL/6 WT et MuMT 6 jours p.i. **(D)**. Les barres grises représentent les médianes. *, p <0,05; **, p <0,01; ***, p <0,001; ****, p<0.0001.

6. L'infection maternelle par Brucella induit chez les F1 une meilleure résistance à une seconde infection par Brucella, dépendante de la réponse humorale

La présence d'IgG3 spécifiques de *Brucella* chez les F1 *Br*-M suggère que ceux-ci ont développé une mémoire immunitaire spécifique de *Brucella*. Nous avons donc tenté de corréler la présence d'Ig spécifiques avec une meilleure résistance à une nouvelle infection par *Brucella* (challenge).

Sur le premier groupe de F1 *Br*-M et F1 PBS-M de lignée C57BL/6 et BALB/c, le plasma a été récupéré à l'âge de 7 semaines et analysé pour déterminer la présence d'IgG3 anti-*Brucella*. Les mêmes F1 ont ensuite été infectés en i.p. avec 10^7 CFU (haute dose) de *Brucella melitensis* mCherry comme décrit par Vitry *et al*, 2014a. A 2 heures post infection, le sang a été récupéré afin d'évaluer le nombre de CFU. A 6 jours post infection, les F1 ont été sacrifiés et leur rate prélevée pour analyse des CFU.

La **Figure 19** montre que les F1 *Br*-M présentent une résistance plus élevée à une nouvelle infection par *Brucella* que les F1 PBS-M. Le taux de CFU dans le sang (**A** et **C**) et la rate (**B** et **D**) des F1 *Br*-M est significativement plus bas que celui des F1 PBS-M. De manière surprenante, le niveau de CFU, et donc le contrôle de l'infection, ne semble pas corrélé avec la détection d'Ig anti-*Brucella* chez les F1 puisque les souris F1 *Br*-M qui sont négatives pour la détection des IgG3 semblent contrôler l'infection tout comme les F1 *Br*-M positifs pour les IgG3.

Afin de déterminer le rôle des anticorps anti-*Brucella* dans le contrôle de l'infection par les F1 *Br*-M, nous avons utilisé des souris C57BL/6 µMT-déficientes. Ces souris possèdent une mutation au niveau du gène codant pour la chaine µ des anticorps. Cette mutation entraîne une incapacité à produire des anticorps fonctionnels, ce qui bloque le développement des lymphocytes B dans ces souris. Celles-ci ne présentent donc pas de réponse humorale. Nous observons sur la **Figure 19 C-D** que les F1 *Br*-M de souris µMT ne contrôlent pas le challenge *Brucella*. Le taux de CFU dans ces F1 est similaire à celui des F1 PBS-M.

Les résultats obtenus en souris C57BL/6 µMT suggèrent que la présence d'anticorps est indispensable au contrôle de l'infection par *Brucella* dans les F1 *Br*-M, en dépit de l'absence de corrélation entre anticorps détectables et protection dans les souris C57BL/6 WT.

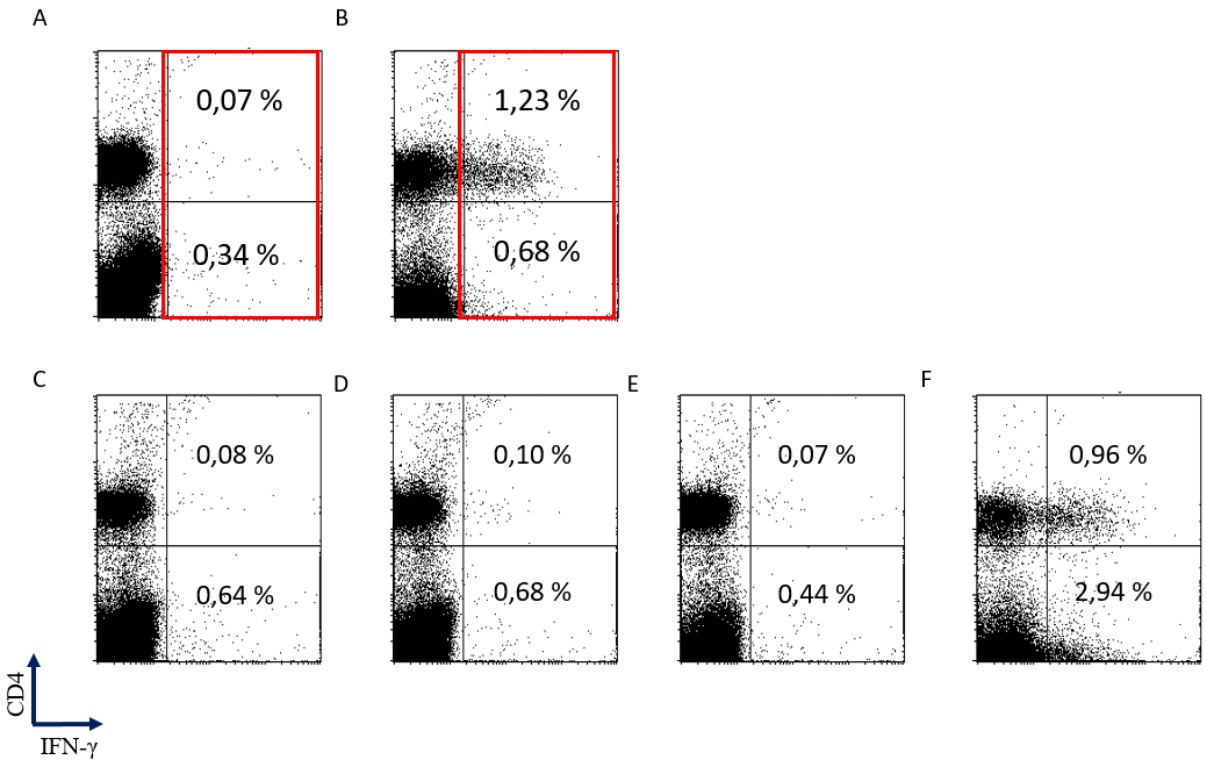


Figure 20 : Analyse par cytométrie en flux de la production d'IFN-γ par les cellules de la cavité péritonéale lors d'un challenge *Brucella*. Les souris gestantes C57BL/6 et BALB/c ont été injectées en i.p. avec $5x10^4$ CFU de *Brucella melitensis* 16M WT ou avec du PBS (témoin négatif). Les mères et les souris F1 âgées de 7 semaines ont été injectées en i.p. avec 10^5 CFU de *Brucella melitensis* mCherry. A 12h post infection, les souris ont été euthanasiées et les cellules de la cavité péritonéale ont été récupérées. Le taux d'IFN-γ synthétisé par les cellules a ensuite été évalué en cytométrie en flux.
Chaque graphique représente l'analyse pour une souris.
Les pourcentages indiquent le pourcentage de cellules IFN-γ^+ en fonction de l'expression du CD4.
(A) M PBS injectées avec du PBS. **(B)** M *Br* avec challenge. **(C)** F1 PBS-M injectées avec du PBS. **(D)** F1 *Br*-M injectées avec du PBS. **(E)** F1 *PBS*-M avec challenge. **(F)** F1 *Br*-M avec challenge.
Le cadre rouge représente le gate sur lequel les analyses des prochaines figures en cytométrie en flux se sont basées.

7. L'infection maternelle par Brucella augmente la capacité des F1 à produire une réponse Th1 lors d'une nouvelle infection par Brucella

L'IFN-γ est généré lors d'une réponse immunitaire de type Th1. Celle-ci est indispensable au contrôle de l'infection par *Brucella* chez la souris (Vitry *et al*, 2014a). Afin de caractériser la mémoire protective chez les souris F1 *Br*-M, nous avons mesuré la production d'IFN-γ par les cellules de la cavité péritonéale lors d'un challenge *Brucella* par voie i.p..

En pratique, les F1 *Br*-M et les F1 PBS-M du groupe 2 ont été challengés i.p. avec 10^5 CFU de *Brucella melitensis* mCherry. A 12h post infection, les souris ont été euthanasiées et les cellules se trouvant dans la cavité péritonéale récupérées par lavage. Le taux d'IFN-γ synthétisé par les cellules exprimant les marqueurs de surface CD3 et CD4 a ensuite été évalué en cytométrie en flux. Ce marquage permet d'identifier les cellules T CD4 ($CD3^+$ $CD4^+$), les cellules T CD8 ($CD3^+$ $CD4^-$) et les cellules non T ($CD3^-$ $CD4^-$), telles que les lymphocytes NK.

La **Figure 20** représente les contrôles sur lesquels les analyses des expériences suivantes se sont basées pour déterminer si la souris présente une réponse IFN-γ, Les cellules provenant des M *Br* et des F1 *Br*-M avec challenge produisent plus d'IFN-γ que les cellules de souris M PBS ou F1 PBS-M non infectées (**C**) ou avec challenge (**A**, **D** et **E**). Ce phénomène est observé à la fois chez les C57BL/6 (**Figure 22**) et les BALB/c (**Figure supplémentaire 1**).

La **Figure 21** reprend les résultats par individu pour les souris de l'expérience. Chez les M *Br* avec challenge, l'IFN-γ est majoritairement produit par les cellules $CD3^+$ $CD4^+$ et par conséquence par des lymphocytes T CD4 (**Figure 22**). A l'inverse, chez les F1 *Br*-M avec challenge, l'IFN-γ est majoritairement produit par les cellules $CD3^-$ $CD4^-$, ce qui suggère qu'il pourrait provenir de lymphocytes NK.

Il est important de noter que seules certaines F1 *Br*-M présentent une réponse IFN-γ détectable (**Figure 21**). Dans notre expérience, une F1 PBS-M C57BL/6 avec challenge présentait une forte production d'IFN-γ, ce qui est anormal. Nous n'avons pas d'explication à ce résultat si ce n'est une erreur de manipulation ou une contamination de l'animal par *Brucella* ou un autre pathogène.

Les Ig anti-*Brucella* mesurées chez les F1 avant le challenge ont été répertoriés (résultats non montrés). On observe une corrélation (non significative vu le trop petit nombre d'individus analysés) entre la présence des Ig et la capacité des souris F1 à produire de l'IFN-γ (**Figure 22**).

En conclusion, certaines souris F1 *Br*-M après un challenge sont capables de produire de l'IFN-γ, mais sa source cellulaire semble différente de celle des F1 *Br*-M avec challenge.

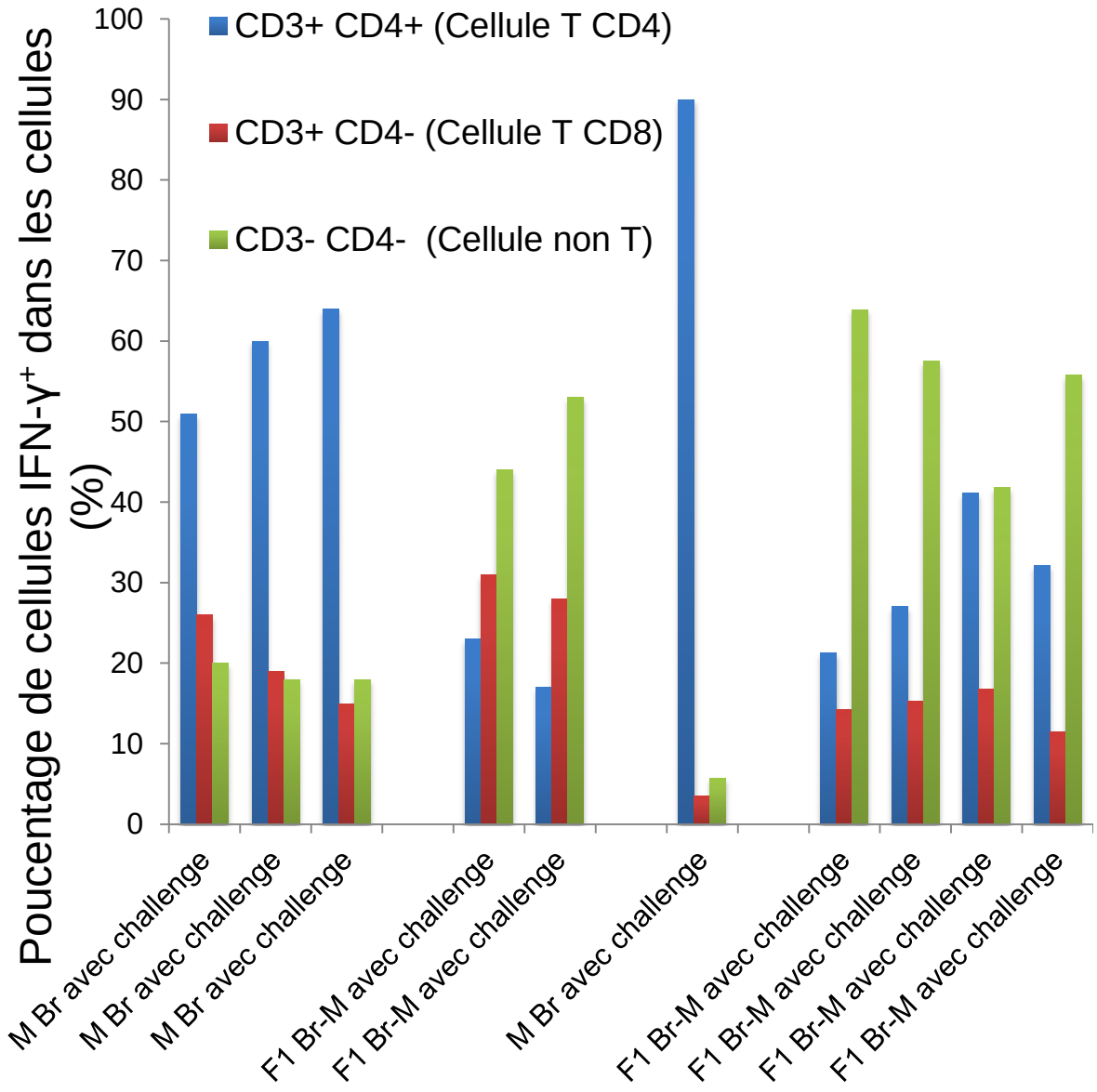
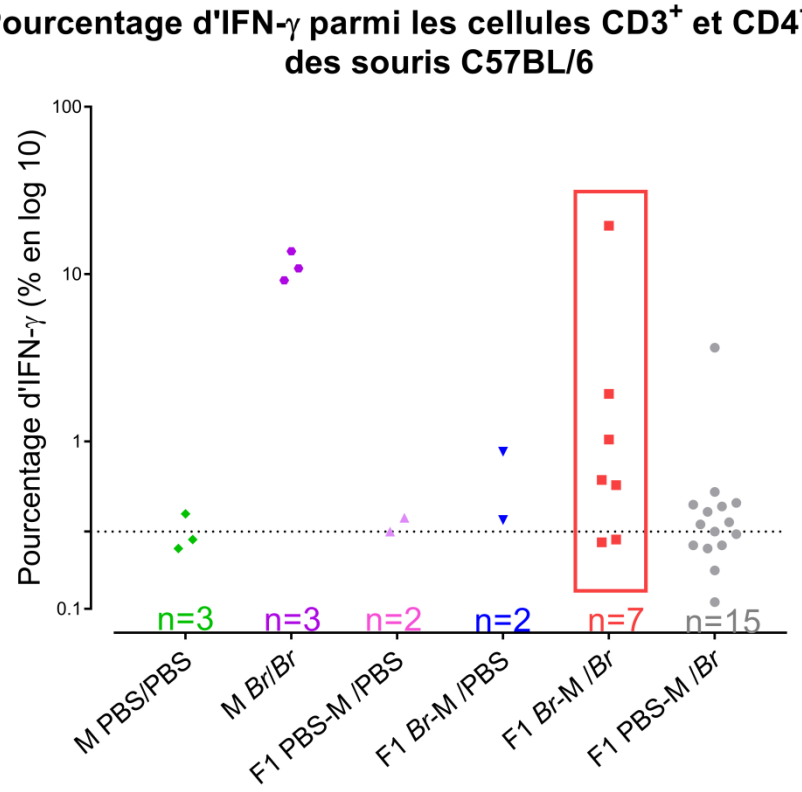


Figure 21 : Phénotype des cellules productrices d'IFN-γ. Même expérience que la **Figure 20**. Le pourcentage de cellules IFN-γ^+ exprimant les marqueurs CD3 et CD4 a été évalué chez des souris F1 C57BL/6 et BALB/c. Les résultats représentés correspondent à des mères infectées et challengées avec *Brucella melitensis* mCherry (M *Br* avec challenge) et des souris F1 *Br*-M avec challenge (F1 *Br*-M avec challenge).

A



B

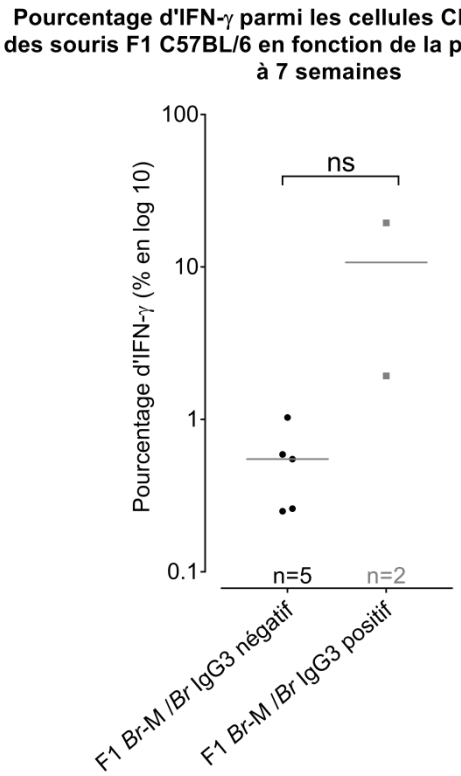
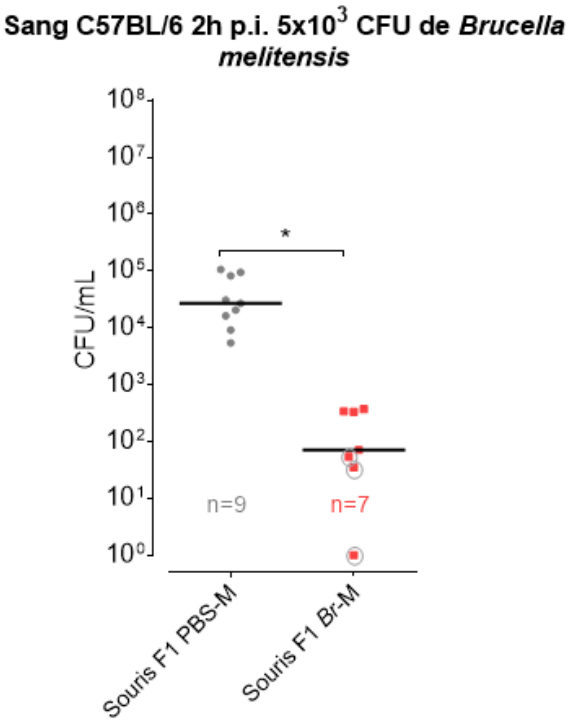


Figure 22 : Pourcentage de cellules IFN-γ$^+$ parmi les cellules T CD4. Même expérience que la **Figure 20**. Le pourcentage de cellules IFN-γ$^+$ est exprimé en logarithme. Le graphique **A** reprend l'ensemble des résultats obtenus pour les souris C57BL/6. Sur le graphique **B**, les souris F1 *Br*-M sont séparées en fonction de la présence d'IgG3 anti-*Brucella* à 7 semaines. Le pourcentage de cellules IFN-γ$^+$ est mesuré pour des M PBS injectée avec PBS (vert), des M *Br* avec challenge *Brucella* (violet), des F1 PBS-M injectées avec du PBS (rose), des F1 *Br*-M injectées avec du PBS (bleu), des F1 *Br*-M avec challenge *Brucella* (rouge), des F1 PBS-M avec challenge *Brucella* (gris). La ligne horizontale en pointillé **(A)** représente la moyenne des contrôles négatifs (M PBS injectées avec PBS). Sur le graphique **B**, les souris F1 *Br*-M qui possèdent des IgG3 sont représentées en noir et les souris F1 *Br*-M qui ne présentent pas d'IgG3 sont représentées en gris. La médiane est représentée par une ligne pleine grise. Non significatif (ns) si p> 0,05.

A



B

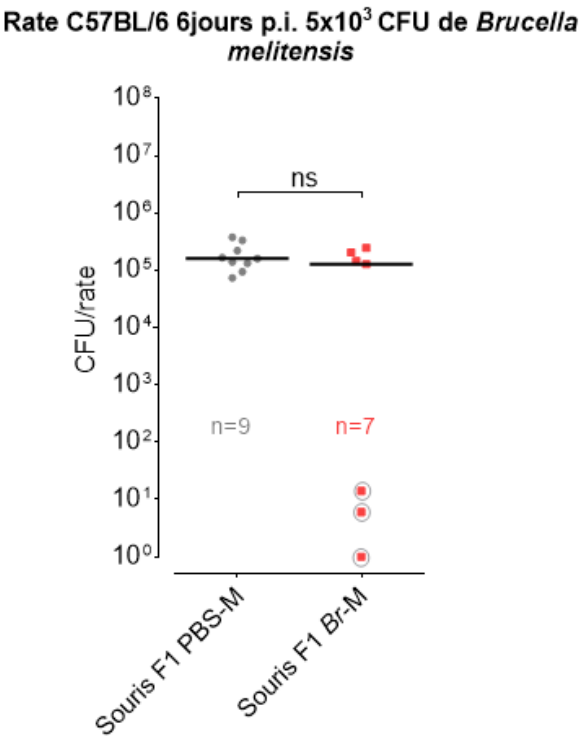


Figure 23 : Challenge: infection en i.p. avec 10^7 CFU de *Brucella melitensis* mCherry. Les souris gestantes C57BL/6 ont été injectées en i.p. avec $5x10^3$ CFU de *Brucella melitensis* 16M WT ou avec du PBS (témoin négatif). Les souris F1 âgées de 7 semaines ont été injectées i.p. avec 10^7 CFU de *Brucella melitensis* mCherry. Les CFU ont été comptées dans 1 mL de sang 2 heures après le challenge (p.c.) et dans la rate 6 jours p.c.. Les cercles gris indiquent les individus qui ont un nombre faible de CFU dans la rate et dans le sang. Chaque point représente une souris F1. Les données représentent les CFU par mL de sang pour les souris C57BL/6 F1 2 heures p.i. **(A)**, les CFU par rate pour les souris C57BL/6 F1 6 jours p.i. **(B)**. En gris sont représentées les souris F1 PBS-M et en rouge les souris F1 *Br*-M.
Les barres noires représentent les médianes. Non significatif (ns) si p> 0,05 ; *, p <0,05

8. L'infection maternelle à basse dose induit également une augmentation de la résistance à Brucella

Afin de déterminer l'importance de la dose de *Brucella* infectant la mère gestante sur la capacité des F1 à résister à une nouvelle infection par *Brucella*, nous avons réalisé une expérience d'infection maternelle avec une faible dose: $5x10^3$ CFU de *Brucella melitensis*.

Cette dose semble n'avoir que peu d'impact sur la croissance des souris C57BL/6 ou BALB/c (**Figure supplémentaire 2**). A cette dose, nous observons la présence d'anticorps IgG3 anti-*Brucella* dans le plasma de certains F1 *Br*-M (**Figure supplémentaire 3**). Ces anticorps peuvent être partiellement corrélés avec un contrôle accru de l'infection dans le sang lors d'un challenge avec 10^7 CFU de *Brucella* (**Tableau supplémentaire 1**).

Les F1 *Br*-M et les F1 PBS-M (en tant que contrôles) ont été infectées en i.p. avec 10^7 CFU (haute dose) de *Brucella melitensis* mCherry, comme décrit par Vitry *et al*, 2014a. Deux heures après le challenge, le sang a été récupéré et après six jours, les souris ont été sacrifiées et leur rate a été prélevée. Le sang a été étalé et la rate homogénéisée et étalée pour réaliser une analyse par CFU. Les CFU dans le sang 2h p.i. **(A)** et les CFU dans la rate 6 jours p.i. **(B)** sont représentées sur la **Figure 23**.

On peut noter que les souris F1 *Br*-M, provenant de mères infectées par une faible dose de *Brucella*, sont capables de contrôler l'infection par *Brucella melitensis* mCherry en réduisant le nombre de CFU dans le sang **(A)** et la rate **(B)**.

Discussion

Discussion

1. Etablissement d'un modèle d'infection in utero par la bactérie Brucella melitensis chez la souris

Durant ce travail de mémoire, nous avons développé un modèle d'infection *in utero* par la bactérie *Brucella melitensis* chez la souris. Différentes doses de *Brucella melitensis* ont été injectées en i.p. à des souris C57BL/6 gestantes afin de déterminer la dose optimale pour nos expériences. Idéalement, nous recherchions une dose permettant l'infection d'un maximum de fœtus tout en limitant les avortements. Ceux-ci ont été décrits suite à l'injection intrapéritonéale de 10^6-10^7 CFU de *Brucella melitensis* (Wang *et a*l, 2014). La dose $5x10^3$ n'a pas été sélectionnée car nous avons constaté qu'elle ne permettait l'infection que d'un faible pourcentage de fœtus. La dose $5x10^4$ nous a permis d'obtenir en moyenne 50% de fœtus infectés. La dose $5x10^5$, bien qu'elle permette un taux d'infection des fœtus de quasi 90%, n'a pas été sélectionnée car nous avons observé qu'elle était corrélée à un fort taux de cannibalisme des portées. Cette dose n'a donc pas été choisie pour poursuivre les expériences. En conséquence, **la dose $5x10^3$ n'assurant pas un taux d'infection suffisant et la dose $5x10^5$ induisant trop de pertes, nous avons décidé d'utiliser pour l'ensemble de nos expériences d'infection maternelle la dose $5x10^4$ CFU**.

Dans la littérature, différents articles discutent de l'infanticide induit par le stress chez les rongeurs. Chez les rats, les mères peuvent manger leur portée lorsqu'elles estiment l'environnement trop hostile pour sa survie. Une étude publiée en 2018 démontre qu'un simple changement de la température ambiante durant les premières 36 h suivant l'accouchement des souris peut les amener à développer un comportement d'infanticide et de cannibalisme (Zafar *et al*, 2018). La température ambiante ne peut cependant être une cause de cannibalisme dans notre modèle, celle-ci étant stable.

A la dose $5x10^4$ CFU, le placenta et la membrane vitelline de tous les fœtus de mères infectées présentent un taux élevé de bactéries. Cependant, 50% des fœtus de mères infectées n'ont pas d'infection détectable dans la rate et dans les poumons. Lorsque l'infection du fœtus est détectée, on peut remarquer que le taux de CFU évalué dans les organes est 10 à 100 x plus faible qu'au niveau du placenta. Ces résultats suggèrent que le placenta et la membrane vitelline jouent un rôle important en tant que barrières pour limiter l'infection *in utero* des fœtus par *Brucella melitensis*. Le professeur Bosseray et son équipe ont observé une distribution des placentas infectés par *Brucella abortus* en fonction des sites d'implantation dans l'utérus (Bosseray, 1980). Dans cette étude, la colonisation du placenta par *Brucella* varie à la fois en nombre de placentas chez la souris et en taux d'infection. En raison des problèmes inattendus d'infanticide, nous n'avons pas pu analyser un grand nombre de portées. Les résultats obtenus dans notre modèle ne mettent pas en évidence une distribution particulière des fœtus infectés au sein des cornes utérines des mères. L'infection *in utero* des fœtus est très variable d'une mère à une autre. Chez certaines mères infectées, tous les fœtus sont infectés tandis que dans d'autres portées, aucun fœtus n'est infecté. Enfin, nous avons aussi observé des mères infectées chez lesquelles seuls certains fœtus étaient infectés.

En réalisant des échanges de portées juste après l'accouchement entre des mères infectées par *Brucella* durant la gestation (**M *Br***) et des mères injectées PBS (**M PBS**), nous n'avons pas observé de transfert d'infection des M *Br* aux souris provenant de M PBS, ce qui suggère que l'allaitement n'est pas un mode de transmission de *Brucella* chez la souris, bien que *Brucella* soit présente dans le lait de souris en allaitement (W. Jansen, données non publiées).

A la dose $5x10^4$, nous n'avons pas observé d'impact significatif sur la croissance des nouveau-nés provenant de mères infectées entre 2 et 6 semaines après la naissance.

2. Les souris provenant de mères infectées par Brucella durant la gestation acquièrent une résistance face à une nouvelle infection par Brucella.

A notre connaissance, l'impact de l'infection *in utero* par *Brucella* sur les capacités du système immunitaire des nouveau-nés n'a jamais été étudié.

Dans notre modèle expérimental, nous avons observé que les souris provenant de mères BALB/c ou C57BL/6 infectées par *Brucella*, que nous nommerons **F1 *Br*-M**, présentent, à l'âge adulte, une résistance accrue face à une nouvelle infection par *Brucella melitensis.* Les F1 *Br*-M qui ont été challengés par une haute dose (10^7CFU) de *Brucella melitensis* présentent une réduction du nombre (10 à 100x moins) de CFU dans le sang à 2h post infection ainsi que 6 jours post infection dans la rate contrairement aux souris provenant de mère injectées PBS (**F1 PBS-M**). Cette résistance observée chez plus de 80% des F1 *Br*-M suggère qu'une partie des F1 *Br*-M non infectés *in utero* auraient quand même développé une résistance face à l'infection par *Brucella*. Les expériences réalisées durant ce mémoire ne nous ont pas permis de corréler l'infection *in utero* à la résistance à une réinfection à l'âge adulte.

Chez des souris adultes vaccinées par voie i.p. contre *Brucella*, notre groupe a démontré que le contrôle d'une infection secondaire i.p. nécessitait à la fois une immunité humorale et une immunité cellulaire produisant de l'IFN-γ (Vitry *et al*, 2014a). Afin de déterminer si les F1 *Br*-M développent une immunité adaptative similaire à celle des souris vaccinées à l'âge adulte avec *Brucella*, nous avons tenté de mettre en évidence chez celles-ci la présence d'anticorps spécifiques de *Brucella* et une capacité accrue à produire de l'IFN-γ lors d'un challenge i.p. *Brucella.*

Chez certains F1 *Br*-M C57BL/6 et BALB/c, des IgG3 ont pu être détectées à 7 semaines par ELISA, ce qui indique qu'ils sont capables de produire une réponse humorale spécifique à *Brucella*. Nous ne sommes pas parvenus à effectuer une corrélation entre la présence d'IgG3 et une résistante à l'infection par *Brucella*. Néanmoins, nous avons observé que les F1 *Br*-M provenant de mères C57BL/6 déficientes en lymphocytes B ($\mu MT^{-/-}$) infectées présentent un niveau de résistance semblable aux F1 PBS-M lors d'un challenge *Brucella*. Ce résultat suggère que **la production d'anticorps est indispensable au développement d'une résistance à *Brucella* chez les F1 *Br*-M**.

L'absence de détection d'IgG3 à 7 semaines chez les F1 *Br*-M qui présentent par la suite une résistance à l'infection pourrait provenir d'un manque de sensibilité de nos ELISA et donc du seuil de détection des anticorps. Les ELISA sont réalisés à l'aide de bactéries *Brucella* tuées par la chaleur et adsorbées sur plastique. Il est possible que le niveau d'anticorps dans le plasma des F1 *Br*-M soit trop faible pour être détecté de cette manière ou que ces anticorps reconnaissent des antigènes cryptiques dans les bactéries tuées.

Un challenge en i.p. avec 10^5 CFU de *Brucella melitensis* a été réalisé sur des F1 PBS-M et des F1 *Br*-M dans les lignées C57BL/6 et BALB/c. Une analyse en cytométrie en flux a permis de détecter des taux élevés d'IFN-γ dans les cellules de la cavité péritonéale de certains F1 *Br*-M. Certaines associations ont pu être faites entre les plus hauts taux d'IFN-γ et les niveaux d'IgG3 détectables. Cependant, le groupe de souris avec un taux élevé d'IFN-γ étant faible, il nous est impossible d'établir des corrélations statistiquement significatives à ce stade. Chez les souris vaccinées et challengées à l'âge adulte contre *Brucella,* l'IFN-γ est majoritairement produit par les lymphocytes T CD4 (Vitry *et al,* 2014a). A l'inverse, chez les F1 *Br*-M, l'IFN-γ est majoritairement produit par des cellules n'exprimant pas les marqueurs CD3 et CD4. L'origine inhabituelle de l'IFN-γ dans les F1 *Br*-M suggère que ceux-ci n'ont pas développé une mémoire conventionnelle contre *Brucella*. Des études récentes ont démontré chez la souris et l'humain que lors d'infections virales, certaines cellules de l'immunité innée, comme les lymphocytes *Natural Killer* qui sont connus pour produire de l'IFN-γ, étaient capables de se multiplier et de constituer une mémoire immunitaire innée (Peng *and* Tian, 2017). Il n'est donc pas exclus, à priori, que la mémoire protectrice des F1 *Br*-M soit constituée en partie de *Natural Killer*. Une analyse par cytométrie en flux en utilisant des marqueurs spécifiques aux NK de mémoire, comme les marqueurs DX5 et NK 1.1., permettrait de valider cette hypothèse. Au vu de ce profil atypique, il serait également important que nous établissions si la résistance accrue des F1 *Br*-M est limitée à *Brucella,* et donc spécifique de celle-ci, ou si elle peut concerner d'autres bactéries.

Globalement, notre étude suggère que les souris infectées *in utero* par *Brucella* sont capables de développer une résistance à *Brucella*. Ce résultat est original et surprenant. En effet, le système immunitaire des nouveau-nés est considéré comme immature et peu apte à développer des réponses immunitaires de type Th1 régulées par l'IFN-γ (Levy, 2007). Une caractérisation approfondie de notre modèle expérimental pourrait nous permettre de mieux comprendre le système immunitaire des nouveau-nés et l'impact des infections *in utero* sur celui-ci, ce qui pourrait aider à améliorer la conception de vaccins pour le nouveau-né.

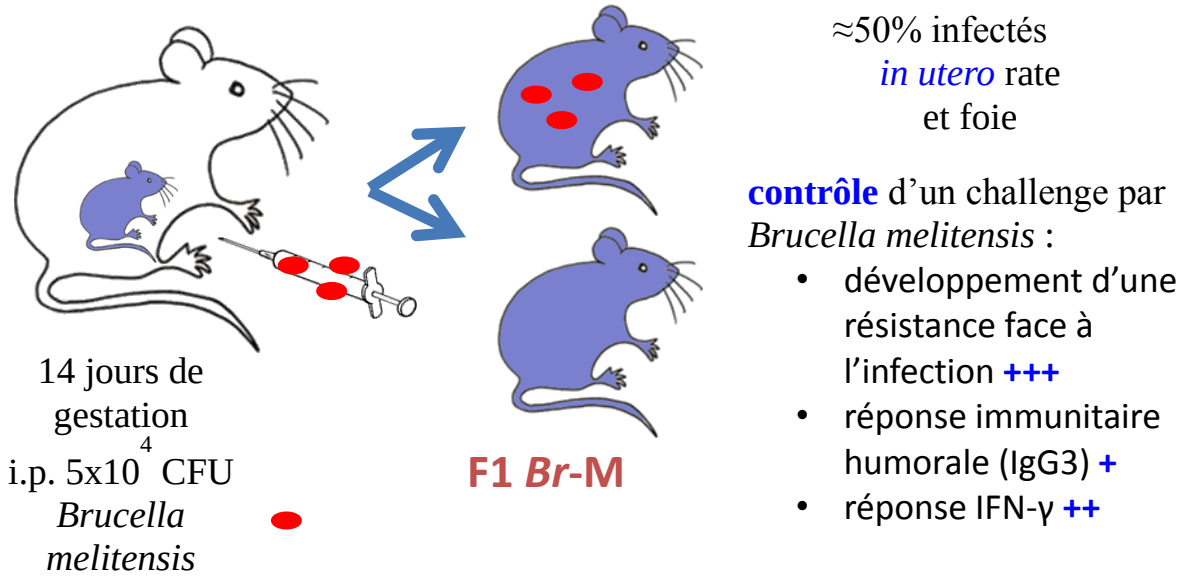


Figure 24 : Synthèse des résultats: Approximativement 50% des F1 provenant de souris gestantes infectées à 14 jours de gestation en i.p. avec $5x10^4$ CFU de la bactérie *Brucella melitensis* présentent une infection détectable de la rate et du foie. Une partie de ces F1 *Br*-M développent une résistance accrue à un challenge *Brucella*. Certaines F1 *Br*-M présentent également une réponse humorale spécifique de *Brucella* ainsi qu'une réponse IFN-γ lors du challenge *Brucella*.

Le symbole « + » représente la fréquence des résultats positifs parmi la population de souris F1 *Br*-M.

Perspectives

Perspectives

1. Reproduction des résultats

Les expériences de ce mémoire étant particulièrement longues et laborieuses, la plupart n'ont été réalisées qu'une seule fois. En conséquence, toutes les expériences réalisées au cours du mémoire sont à reproduire pour obtenir des réplicas et confirmer les résultats obtenus.

2. Injection de souris gestantes avec Brucella melitensis WT HK

Pour induire une réponse immunitaire chez les nouveau-nés et leurs permettre de développer une protection spécifique contre *Brucella*, une infection est-elle indispensable ? Les bactéries vivantes sont-elles nécessaires ou les signatures moléculaires de la bactérie pourraient-elles suffirent ? Une comparaison de la protection induite par l'injection de la mère avec des bactéries tuées par la chaleur (bactéries *heat-killed* (HK)) ou vivantes permettrait de répondre à ces questions.

3. Injection de souris gestantes avec Brucella melitensis ΔvirB

Si l'injection d'une bactérie vivante est indispensable à l'induction d'une protection spécifique, une prolifération bactérienne soutenue est-elle indispensable pour induire une réponse immunitaire de mémoire chez les nouveau-nés ? La présence de bactéries vivantes mais faiblement virulentes est-elle suffisante pour obtenir une protection spécifique ? Pour y répondre, les expériences seront répétées avec une souche de *Brucella melitensis* mutante pour l'opéron *virB*. Lorsque la bactérie est déficiente pour le système de sécrétion de type IV, *Brucella* est incapable de persister chez la souris adulte (Delrue *et al*, 2001). La bactérie infecte les cellules mais ne peut échapper à la fusion lysosome-endosome, de sorte que la bactérie est éliminée par le système immunitaire.

4. Infection par voie intranasale

La voie intrapéritonéale a été exclusivement utilisée pour infecter les mères gestantes dans ce mémoire. Etant proche de son système reproducteur, l'infection du fœtus est peut être favorisée. Il serait intéressant de tester une autre voie d'infection, plus physiologique, qui permettrait de déterminer si notre modèle est valable peu importe la voie empruntée. Au sein de notre équipe, la voie intranasale d'infection par *Brucella* a été bien caractérisée et représente l'un des modes le plus probable d'infection naturelle. C'est pourquoi il serait intéressant de caractériser le modèle expérimental d'une infection *in utero* des fœtus par *Brucella melitensis* chez la souris après une infection intranasale des mères gestantes.

5. F1 hétérozygotes pour la production d'Ig

Lors de l'analyse des ELISA réalisés sur le plasma des F1, il nous est difficile de complétement exclure que la présence d'Ig anti-*Brucella* n'est pas due à la présence d'Ig transmises par la mère. Les souris dont le gène codant pour la chaîne µ des Ig est muté (µMT) sont incapables de produire des lymphocytes B et ne produisent donc pas d'anticorps. En utilisant des croisements entre des mères homozygotes µMT et des pères WT, les F1 seront hétérozygotes. Les F1 seront donc capables de produire des Ig mais n'en recevront pas de la mère. Si des Ig sont détectées lors de la réponse immunitaire des F1, il ne pourrait s'agir que d'Ig produites par les F1.

6. Détermination de l'importance de l'IL-12 produit par les F1 pour contrôler l'infection

L'IL-12 est une cytokine indispensable au développement de la réponse Th1 permettant de lutter contre les pathogènes (virus, bactéries, protozoaires) intracellulaires. Les nouveau-nés sont capables de produire une réponse de type Th1 en réponse à un pathogène, mais celle-ci est généralement plus faible que celle des adultes. Lors de l'infection *in utero*, les F1 n'ont pas un système immunitaire mature et leur capacité à faire de l'IL-12 est considérée comme faible. L'IL-12 est-elle essentielle pour les nouveau-nés pour développer une réponse anti-*Brucella* ? En croisant des femelles hétérozygotes pour la mutation IL-12p35 et des mâles homozygotes pour la même mutation, dans la génération F1, 50% des F1 seront hétérozygotes et auront la capacité de produire de l'IL-12 et 50% seront homozygotes négatifs, c'est-à-dire qu'ils ne sauront pas produire de l'IL-12. En comparant ces deux groupes de souris F1 et la manière dont ils contrôlent l'infection, nous pourrons déterminer si le rôle de l'IL-12 est essentiel chez les nouveau-nés dans notre modèle.

7. Corrélation entre infection in utero (CFU), présence d'Ig spécifiques anti-Brucella et détection de l'IFN-γ

Nos expériences ne nous ont pas encore permis de déterminer si l'infection *in utero* des F1 était corrélée à la production d'IFN-γ par ceux-ci. Afin d'établir ce lien, nous proposons de tester à 7 semaines par la méthode ELISA la présence d'Ig dans le sang de F1 de mères infectées et d'ensuite de sacrifier ceux-ci et de prélever la rate. Nous pourrions mesurer la présence de CFU de *Brucella* dans la rate et en parallèle restimuler *in vitro* une partie de ces cellules avec des bactéries tuées pour mesurer par FACS la production d'IFN-γ. De cette manière, nous pourrions établir formellement la fréquence de F1 infectés capables de développer à la fois une réponse humorale (Ig spécifiques) et cellulaire (IFN-γ).

8. Evaluation de l'importance de la persistance de Brucella chez les F1 infectés in utero dans le développement d'une mémoire protectrice contre Brucella

Afin d'évaluer la protection contre *Brucella* de souris F1 sans persistance de bactéries endogènes, nous pourrions administrer à des souris F1 âgées de 4 semaines une association de deux antibiotiques (par voie orale) efficaces durant 2 semaines contre *Brucella*. La protection de ces F1 serait évaluée par un challenge après une phase de repos permettant l'élimination de l'antibiotique.

9. Evaluation du taux d'infanticide en fonction de l'injection

Au cours du mémoire, nous avons pu observer que les souris ayant été infectées durant la gestation semblaient manger leur portée en plus grand nombre que les souris ayant été injectées avec du PBS. Nous avons aussi eu l'impression que la dose infectante influence le taux d'infanticide. Cette observation demande à être confirmée. Pour cela, les différentes doses infectantes, $5x10^3$, $5x10^4$ et $5x10^5$ CFU, seront injectées aux souris. Le même nombre de souris sera injecté avec du PBS. Le taux d'infanticide et de mortalité sera relevé et l'infection vérifiée par l'évaluation de la charge bactérienne dans la rate chez les mères infectées et leur descendance.

10. Identification des cellules productrices d'IFN-γ chez les souris F1 âgées de 9 semaines

Nous avons observé que la production d'IFN-γ dans la cavité péritonéale après le challenge de souris F1 provenant de mères infectées était en grande partie due à des cellules $CD3^-$ $CD4^-$, qui ne seraient donc pas des cellules T. Il serait intéressant de déterminer si ces cellules sont des *Natural Killer*, NK1.1 positives. Nous prévoyons donc de reproduire cette expérience mais en réalisant des marquages de surface supplémentaires pour pouvoir identifier avec plus de précision les cellules productrice d'IFN-γ. Nous utiliserons au minimum les anticorps spécifiques des marqueurs membranaires suivants: CD3, CD4, CD8, NK1.1..

Bibliographie

Bibliographie

Abram, M., Schlüter, D., Vuckovic, D., Wraber, B., Doric, M., Deckert, M., 2003. Murine model of pregnancy-associated *Listeria monocytogenes* infection. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 35, 177–182.

Aderem, A., Underhill, D.M., 1999. MECHANISMS OF PHAGOCYTOSIS IN MACROPHAGES. Annual Review of Immunology 17, 593–623. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.593

Adkins, B., Leclerc, C., Marshall-Clarke, S., 2004. Neonatal adaptive immunity comes of age. Nature Reviews Immunology 4, 553–564. https://doi.org/10.1038/nri1394

Akçakuş, M., Esel, D., Cetin, N., Kisaarslan, A.P., Kurtoğlu, S., 2005. *Brucella melitensis* in blood cultures of two newborns due to exchange transfusion. Turk. J. Pediatr. 47, 272–274..

Anderson, T.D., Cheville, N.F., 1986. Ultrastructural morphometric analysis of *Brucella abortus*-infected trophoblasts in experimental placentitis. Bacterial replication occurs in rough endoplasmic reticulum. Am. J. Pathol. 124, 226–237.

Andrade, E.B., Alves, J., Madureira, P., Oliveira, L., Ribeiro, A., Cordeiro-da-Silva, A., Correia-Neves, M., Trieu-Cuot, P., Ferreira, P., 2013. TLR2-Induced IL-10 Production Impairs Neutrophil Recruitment to Infected Tissues during Neonatal Bacterial Sepsis. The Journal of Immunology 191, 4759–4768. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301752

Archambaud, C., Salcedo, S.P., Lelouard, H., Devilard, E., de Bovis, B., Van Rooijen, N., Gorvel, J.-P., Malissen, B., 2010. Contrasting roles of macrophages and dendritic cells in controlling initial pulmonary *Brucella* infection. European Journal of Immunology 40, 3458–3471. https://doi.org/10.1002/eji.201040497

Atluri, V.L., Xavier, M.N., de Jong, M.F., den Hartigh, A.B., Tsolis, R.M., 2011. Interactions of the Human Pathogenic *Brucella* Species with Their Hosts. Annual Review of Microbiology 65, 523–541. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102905

Aydın, B., Beken, S., Akansel, R., Dilli, D., Okumuş, N., Zenciroğlu, A., Tanır, G., 2013. Prematurity due to maternal *Brucella* infection and review of the literature. Turk. J. Pediatr. 55, 433–437.

Bancroft, G.J., 1993. The role of natural killer cells in innate resistance to infection. Current Opinion in Immunology 5, 503–510. https://doi.org/10.1016/0952-7915(93)90030-V

Barbier, T., Machelart, A., Zúñiga-Ripa, A., Plovier, H., Hougardy, C., Lobet, E., Willemart, K., Muraille, E., De Bolle, X., Van Schaftingen, E., Moriyón, I., Letesson, J.-J., 2017. Erythritol Availability in Bovine, Murine and Human Models Highlights a Potential Role for the Host Aldose Reductase during *Brucella* Infection. Frontiers in Microbiology 8. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01088

Barnes, P.J., 2008. Role of GATA-3 in allergic diseases. Curr. Mol. Med. 8, 330–334.

Barrionuevo, P., Cassataro, J., Delpino, M.V., Zwerdling, A., Pasquevich, K.A., Samartino, C.G., Wallach, J.C., Fossati, C.A., Giambartolomei, G.H., 2008. *Brucella abortus* Inhibits Major Histocompatibility Complex Class II Expression and Antigen Processing through Interleukin-6 Secretion via Toll-Like Receptor 2. Infection and Immunity 76, 250–262. https://doi.org/10.1128/IAI.00949-07

Bellaire, B.H., Roop, R.M., Cardelli, J.A., 2005. Opsonized Virulent *Brucella abortus* Replicates within Nonacidic, Endoplasmic Reticulum-Negative, LAMP-1-Positive Phagosomes in Human Monocytes. Infection and Immunity 73, 3702–3713. https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3702-3713.2005

Benshushan, A., Tsafrir, A., Arbel, R., Rahav, G., Ariel, I., Rojansky, N., 2002. *Listeria* infection during pregnancy: a 10 year experience. Isr. Med. Assoc. J. 4, 776–780.

Bernardini, R., Aufieri, R., Detcheva, A., Recchia, S., Cicconi, R., Amicosante, M., Montesano, C., Rossi, P., Tchidjou, H.K., Petrunov, B., Orefici, G., Mattei, M., 2017b. Neonatal protection and preterm birth reduction following maternal group B *streptococcus* vaccination in a mouse model. The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine 30, 2844–2850. https://doi.org/10.1080/14767058.2016.1265932

Boschiroli, M.L., Ouahrani-Bettache, S., Foulongne, V., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Allardet-Servent, A., Cazevieille, C., Liautard, J.P., Ramuz, M., O'Callaghan, D., 2002. The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages. Proceedings of the National Academy of Sciences 99, 1544–1549. https://doi.org/10.1073/pnas.032514299

Bosseray, N., 1983. Vaccine and serum-mediated protection against *brucella* infection of mouse placenta. Br J Exp Pathol 64, 617–625.

Bosseray, N., 1982. Mother to young transmission of *Brucella abortus* infection in mouse model. Ann. Rech. Vet. 13, 341–349.

Bosseray, N., 1980. Colonization of mouse placentas *by Brucella abortus* inoculated during pregnancy. Br J Exp Pathol 61, 361–368.

Brambell, F.W., 1969. The transmission of immune globulins from the mother to the foetal and newborn young. Proc Nutr Soc 28, 35–41.

Brucella Fever, 1928. . Can Med Assoc J 19, 219.

Cacace, M.L., Claros, E.A., Erazu, K.A., Escobar, G.I., Lucero, N.E., 2013. Congenital Brucellosis in an Infant. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 13, 513–515. https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1165

Cardoso, P.G., Macedo, G.C., Azevedo, V., Oliveira, S.C., 2006. *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. Microb. Cell Fact. 5, 13. https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-13

Carpenter, C.M., Boak, R., 1928. *Brucella Abortus* in Milk and Dairy Products. Am J Public Health Nations Health 18, 743–751.

Carr, R., 2000. Neutrophil production and function in newborn infants. Br. J. Haematol. 110, 18–28.

Chen, S.F., Tu, W., Sharp, M.A., Tongson, E.C., He, X., Greenberg, H.B., Holmes, T.H., Wang, Z., Kemble, G., Manganello, A., Adler, S.P., Dekker, C.L., Lewis, D.B., Arvin, A.M., 2004. Antiviral CD8 T Cells in the Control of Primary Human Cytomegalovirus Infection in Early Childhood. The Journal of Infectious Diseases 189, 1619–1627. https://doi.org/10.1086/383249

Chheda, S., Lopez, S.M., Sanderson, E.P., 1997. Congenital brucellosis in a premature infant. Pediatr. Infect. Dis. J. 16, 81–83.

Contractor, S.F., Davies, H., 1973. Effect of human chorionic somatomammotrophin and human chorionic gonadotrophin on phytohaemagglutinin-induced lymphocyte transformation. Nature New Biol. 243, 284–286.

Copin, R., De Baetselier, P., Carlier, Y., Letesson, J.-J., Muraille, E., 2007. MyD88-dependent activation of B220-CD11b+LY-6C+ dendritic cells during *Brucella melitensis* infection. J. Immunol. 178, 5182–5191.

Copin, R., Vitry, M.-A., Hanot Mambres, D., Machelart, A., De Trez, C., Vanderwinden, J.-M., Magez, S., Akira, S., Ryffel, B., Carlier, Y., Letesson, J.-J., Muraille, E., 2012. In Situ Microscopy Analysis Reveals Local Innate Immune Response Developed around *Brucella* Infected Cells in Resistant and Susceptible Mice. PLoS Pathogens 8, e1002575. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002575

Curno, O., Reader, T., McElligott, A.G., Behnke, J.M., Barnard, C.J., 2011. Infection before pregnancy affects immunity and response to social challenge in the next generation. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 366, 3364–3374. https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0110

Damon, S.R., Fagan, R., 1947. Isolation of *Brucella melitensis* from cow's milk. Public Health Rep 62, 1097.

Dauby, N., Alonso-Vega, C., Suarez, E., Flores, A., Hermann, E., Córdova, M., Tellez, T., Torrico, F., Truyens, C., Carlier, Y., 2009. Maternal Infection with *Trypanosoma cruzi* and Congenital Chagas Disease Induce a Trend to a Type 1 Polarization of Infant Immune Responses to Vaccines. PLoS Neglected Tropical Diseases 3, e571. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000571

Dauby, N., Goetghebuer, T., Kollmann, T.R., Levy, J., Marchant, A., 2012. Uninfected but not unaffected: chronic maternal infections during pregnancy, fetal immunity, and susceptibility to postnatal infections. The Lancet Infectious Diseases 12, 330–340. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70341-3

de Souza, T.D., de Carvalho, T.F., Mol, J.P. da S., Lopes, J.V.M., Silva, M.F., da Paixão, T.A., Santos, R.L., 2018. Tissue distribution and cell tropism of *Brucella canis* in naturally infected canine foetuses and neonates. Scientific Reports 8. https://doi.org/10.1038/s41598-018-25651-x

Delpino, M.V., Fossati, C.A., Baldi, P.C., 2009. Proinflammatory response of human osteoblastic cell lines and osteoblast-monocyte interaction upon infection with *Brucella* spp. Infect. Immun. 77, 984–995. https://doi.org/10.1128/IAI.01259-08

Delrue, R.M., Martinez-Lorenzo, M., Lestrate, P., Danese, I., Bielarz, V., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Gorvel, J.P., Letesson, J.J., 2001. Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. Cell. Microbiol. 3, 487–497.

Dudgeon, J.A., 1967. Maternal rubella and its effect on the foetus. Arch. Dis. Child. 42, 110–125.

Epstein, H.T., 1978. The Effect of Litter Size on Weight Gain in Mice. The Journal of Nutrition 108, 120–123. https://doi.org/10.1093/jn/108.1.120

Essenberg, R.C., Seshadri, R., Nelson, K., Paulsen, I., 2002. Sugar metabolism by *Brucellae*. Vet. Microbiol. 90, 249–261.

Firth, M.A., Shewen, P.E., Hodgins, D.C., 2005. Passive and active components of neonatal innate immune defenses. Anim Health Res Rev 6, 143–158.

Forestier, C., Moreno, E., Pizarro-Cerda, J., Gorvel, J.P., 1999. Lysosomal accumulation and recycling of lipopolysaccharide to the cell surface of murine macrophages, an *in vitro* and *in vivo* study. J. Immunol. 162, 6784–6791.

Georas, S.N., 2005. T-helper cell type-2 regulation in allergic disease. European Respiratory Journal 26, 1119–1137. https://doi.org/10.1183/09031936.05.00006005

Goenka, R., Parent, M.A., Elzer, P.H., Baldwin, C.L., 2011. B Cell–deficient Mice Display Markedly Enhanced Resistance to the Intracellular Bacterium *Brucella abortus*. The Journal of Infectious Diseases 203, 1136–1146. https://doi.org/10.1093/infdis/jiq171

Grilló, M.-J., Blasco, J., Gorvel, J., Moriyón, I., Moreno, E., 2012. What have we learned from brucellosis in the mouse model? Veterinary Research 43, 29. https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-29

Gross, A., Terraza, A., Ouahrani-Bettache, S., Liautard, J.P., Dornand, J., 2000. *In vitro Brucella suis* infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells. Infect. Immun. 68, 342–351.

Gulsun, S., Aslan, S., Satici, O., Gul, T., 2011. Brucellosis in pregnancy. Tropical Doctor 41, 82–84. https://doi.org/10.1258/td.2011.100386

Hanot Mambres, D., Machelart, A., Potemberg, G., De Trez, C., Ryffel, B., Letesson, J.-J., Muraille, E., 2016. Identification of Immune Effectors Essential to the Control of Primary and Secondary Intranasal Infection with *Brucella melitensis* in Mice. The Journal of Immunology 196, 3780–3793. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502265

Hashino, M., Kim, S., Tachibana, M., Shimizu, T., Watarai, M., 2012. Vertical transmission of *Brucella* abortus causes sterility in pregnant mice. J. Vet. Med. Sci. 74, 1075–1077.

Hebel, K., Weinert, S., Kuropka, B., Knolle, J., Kosak, B., Jorch, G., Arens, C., Krause, E., Braun-Dullaeus, R.C., Brunner-Weinzierl, M.C., 2014. CD4+ T Cells from Human Neonates and Infants Are Poised Spontaneously To Run a Nonclassical IL-4 Program. The Journal of Immunology 192, 5160–5170. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302539

Hermann, E., Truyens, C., Alonso-Vega, C., Even, J., Rodriguez, P., Berthe, A., Gonzalez-Merino, E., Torrico, F., Carlier, Y., 2002. Human fetuses are able to mount an adultlike CD8 T-cell response. Blood 100, 2153–2158.

Hofer, E., Hammerl, J.A., Zygmunt, M.S., Cloeckaert, A., Koylass, M., Whatmore, A.M., Blom, J., Revilla-Fernández, S., Witte, A., Scholz, H.C., Vergnaud, G., Al Dahouk, S., Aistleitner, K., 2016. *Brucella vulpis* sp. nov., a *novel Brucella* species isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Austria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000998

Hoffmann, E.M., Houle, J.J., 1983. Failure of *Brucella abortus* lipopolysaccharide (LPS) to activate the alternative pathway of complement. Vet. Immunol. Immunopathol. 5, 65–76.

Hofmann, D., Lai, J.R., 2017. Exploring Human Antimicrobial Antibody Responses on a Single B Cell Level. Clinical and Vaccine Immunology 24. https://doi.org/10.1128/CVI.00544-16

Holdsworth, S.R., Kitching, A.R., Tipping, P.G., 1999. Th1 and Th2T helper cell subsets affect patterns of injury and outcomes in glomerulonephritis. Kidney International 55, 1198–1216. https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.00369.x

Hong, M., Bertoletti, A., 2017. Tolerance and immunity to pathogens in early life: insights from HBV infection. Seminars in Immunopathology 39, 643–652. https://doi.org/10.1007/s00281-017-0641-1

Hong, M., Sandalova, E., Low, D., Gehring, A.J., Fieni, S., Amadei, B., Urbani, S., Chong, Y.-S., Guccione, E., Bertoletti, A., 2015. Trained immunity in newborn infants of HBV-infected mothers. Nat Commun 6, 6588. https://doi.org/10.1038/ncomms7588

Hurwitz, S.H., Meyer, K.F., 1916. STUDIES ON THE BLOOD PROTEINS : I. THE SERUM GLOBULINS IN BACTERIAL INFECTION AND IMMUNITY. J. Exp. Med. 24, 515–546.

Itell, H.L., Nelson, C.S., Martinez, D.R., Permar, S.R., 2017. Maternal immune correlates of protection against placental transmission of cytomegalovirus. Placenta 60, S73–S79. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.04.011

Iwasaki, A., Medzhitov, R., 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. Nature Immunology 5, 987–995. https://doi.org/10.1038/ni1112

Janssens, S., Beyaert, R., 2003. Role of Toll-Like Receptors in Pathogen Recognition. Clinical Microbiology Reviews 16, 637–646. https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.637-646.2003

Jones, C.A., Holloway, J.A., Warner, J.O., 2002. Phenotype of fetal monocytes and B lymphocytes during the third trimester of pregnancy. J. Reprod. Immunol. 56, 45–60.

Jordan, C.F., Borts, I.H., 1947. Brucellosis and infection caused by three species of *Brucella*; clinical, laboratory and epidemiological observations. Am. J. Med. 2, 156–167.

Joseph, A.M., Monticelli, L.A., Sonnenberg, G.F., 2018. Metabolic regulation of innate and adaptive lymphocyte effector responses. Immunological Reviews 286, 137–147. https://doi.org/10.1111/imr.12703

Kariminia, A., Kavoossy, G., Khatami, S., Zowghi, E., Ardestani, S.K., 2002. Study of interleukin-10 and interleukin-12 productions in response to lipopolysaccharides extracted from two different *Brucella* strains. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 25, 85–93.

Kato, H., Dokai, M., Katagiri, R., Arima, A., Ooshima, Y., 2013. Investigation for methods of anesthesia and euthanasia for rat fetuses in developmental toxicity studies: Anesthesia for rat fetuses. Congenital Anomalies 53, 46–48. https://doi.org/10.1111/j.1741-4520.2012.00389.x

Kempe, C.H., 1952. Passive immunity to vaccinia in newborns. I. Placental transmission of antibodies. Yale J Biol Med 24, 328–333.

Keppie, J., Williams, A.E., Witt, K., Smith, H., 1965. THE ROLE OF ERYTHRITOL IN THE TISSUE LOCALIZATION OF THE *BRUCELLAE*. Br J Exp Pathol 46, 104–108.

Kim, S., Lee, D.S., Watanabe, K., Furuoka, H., Suzuki, H., Watarai, M., 2005. Interferon-gamma promotes abortion due to *Brucella* infection in pregnant mice. BMC Microbiol. 5, 22. https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-22

Kim, S., Watarai, M., Suzuki, H., Makino, S., Kodama, T., Shirahata, T., 2004. Lipid raft microdomains mediate class A scavenger receptor-dependent infection of *Brucella abortus*. Microbial Pathogenesis 37, 11–19. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2004.04.002

Köse, Ş., Serin Senger, S., Akkoçlu, G., Kuzucu, L., Ulu, Y., Ersan, G., Oğuz, F., 2014. Clinical manifestations, complications, and treatment of brucellosis: evaluation of 72 cases. TURKISH JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES 44, 220–223. https://doi.org/10.3906/sag-1112-34

Krishnan, L., Nguyen, T., McComb, S., 2013. From mice to women: the conundrum of immunity to infection during pregnancy. Journal of Reproductive Immunology 97, 62–73. https://doi.org/10.1016/j.jri.2012.10.015

Lamond, N., Freitag, N., 2018. Vertical Transmission of *Listeria monocytogenes*: Probing the Balance between Protection from Pathogens and Fetal Tolerance. Pathogens 7, 52. https://doi.org/10.3390/pathogens7020052

Le Monnier, A., Join-Lambert, O.F., Jaubert, F., Berche, P., Kayal, S., 2006. Invasion of the placenta during murine *listeriosis*. Infect. Immun. 74, 663–672. https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.663-672.2006

Levy, O., 2007. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. Nature Reviews Immunology 7, 379–390. https://doi.org/10.1038/nri2075

Levy, O., Levy, O., 2015. Ready to benefit from training: heterologous effects of early life immunization. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 109, 3–4. https://doi.org/10.1093/trstmh/tru185

Levy, O., Wynn, J.L., 2014. A Prime Time for Trained Immunity: Innate Immune Memory in Newborns and Infants. Neonatology 105, 136–141. https://doi.org/10.1159/000356035

Lissner, M.M., Thomas, B.J., Wee, K., Tong, A.-J., Kollmann, T.R., Smale, S.T., 2015. Age-Related Gene Expression Differences in Monocytes from Human Neonates, Young Adults, and Older Adults. PLOS ONE 10, e0132061. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132061

Machelart, A., Khadrawi, A., Demars, A., Willemart, K., De Trez, C., Letesson, J.-J., Muraille, E., 2017a. Chronic *Brucella* Infection Induces Selective and Persistent Interferon Gamma-Dependent Alterations of Marginal Zone Macrophages in the Spleen. Infection and Immunity 85, e00115-17. https://doi.org/10.1128/IAI.00115-17

Machelart, A., Van Vyve, M., Potemberg, G., Demars, A., De Trez, C., Tima, H.G., Vanwalleghem, G., Romano, M., Truyens, C., Letesson, J.-J., Muraille, E., 2017b. *Trypanosoma* Infection Favors *Brucella* Elimination via IL-12/IFNγ-Dependent Pathways. Frontiers in Immunology 8. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00903

Malhotra, I., Mungai, P., Wamachi, A., Kioko, J., Ouma, J.H., Kazura, J.W., King, C.L., 1999. Helminth- and Bacillus Calmette-Guérin-induced immunity in children sensitized *in utero* to filariasis and schistosomiasis. J. Immunol. 162, 6843–6848.

Marchant, A., Appay, V., van der Sande, M., Dulphy, N., Liesnard, C., Kidd, M., Kaye, S., Ojuola, O., Gillespie, G.M.A., Vargas Cuero, A.L., Cerundolo, V., Callan, M., McAdam, K.P.W.J., Rowland-Jones, S.L., Donner, C., McMichael, A.J., Whittle, H., 2003. Mature CD8+ T lymphocyte response to viral infection during fetal life. Journal of Clinical Investigation 111, 1747–1755. https://doi.org/10.1172/JCI200317470

Marchant, E.A., Kan, B., Sharma, A.A., van Zanten, A., Kollmann, T.R., Brant, R., Lavoie, P.M., 2015. Attenuated innate immune defenses in very premature neonates during the neonatal period. Pediatric Research 78, 492–497. https://doi.org/10.1038/pr.2015.132

Maródi, L., 2006. Innate cellular immune responses in newborns. Clin. Immunol. 118, 137–144. https://doi.org/10.1016/j.clim.2005.10.012

Martirosyan, A., Moreno, E., Gorvel, J.-P., 2011. An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen: *Brucella* pathogenenesis. Immunological Reviews 240, 211–234. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00982.x

Metschnikoff, E., 1891. Lecture on Phagocytosis and Immunity. Br Med J 1, 213–217.

Pinto da Silva Mol, J., França, S. de A., Paixão, T.A. da, Santos, R.L., 2012. Laboratorial diagnosis of animal brucellosis. Revista Brasileira de Ciência Veterinária 19, 117–126. https://doi.org/10.4322/rbcv.2014.106

Moreno, E., 2014. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. Frontiers in Microbiology 5. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00213

Mosayebi, Z., Movahedian, A.H., Ghayomi, A., Kazemi, B., 2005. Congenital brucellosis in a preterm neonate. Indian Pediatr 42, 599–601.

Munroe, J.S., 1971. Progesteroids as immunosuppressive agents. J Reticuloendothel Soc 9, 361–375.

Murray, J., Calman, R.M., Dudley, J., 1953. Immunity of the newborn; a study of the transfer of anti-streptolysin from mother to foetus during pregnancy. Br Med J 1, 13–15.

Nakstad, B., Sonerud, T., Solevag, A.L., 2016. Early detection of neonatal group B *streptococcus* sepsis and the possible diagnostic utility of IL-6, IL-8, and CD11b in a human umbilical cord blood *in vitro* model. Infection and Drug Resistance Volume 9, 171–179. https://doi.org/10.2147/IDR.S106181

Naroeni, A., Porte, F., 2002. Role of cholesterol and the ganglioside GM(1) in entry and short-term survival of *Brucella suis* in murine macrophages. Infect. Immun. 70, 1640–1644.

Neta, A.V.C., Mol, J.P.S., Xavier, M.N., Paixão, T.A., Lage, A.P., Santos, R.L., 2010. Pathogenesis of bovine brucellosis. The Veterinary Journal 184, 146–155. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.04.010

Netea, M.G., Quintin, J., van der Meer, J.W.M., 2011. Trained Immunity: A Memory for Innate Host Defense. Cell Host & Microbe 9, 355–361. https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.04.006

O'Callaghan, D., Cazevieille, C., Allardet-Servent, A., Boschiroli, M.L., Bourg, G., Foulongne, V., Frutos, P., Kulakov, Y., Ramuz, M., 1999. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. Mol. Microbiol. 33, 1210–1220.

Odorizzi, P.M., Feeney, M.E., 2016. Impact of *In Utero* Exposure to Malaria on Fetal T Cell Immunity. Trends in Molecular Medicine 22, 877–888. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.08.005

Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L., Tsianos, E.V., 2006. The new global map of human brucellosis. The Lancet Infectious Diseases 6, 91–99. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70382-6

Pazos, M.A., Kraus, T.A., Muñoz-Fontela, C., Moran, T.M., 2012. Estrogen Mediates Innate and Adaptive Immune Alterations to Influenza Infection in Pregnant Mice. PLoS ONE 7, e40502. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040502

Pejcic-Karapetrovic, B., Gurnani, K., Russell, M.S., Finlay, B.B., Sad, S., Krishnan, L., 2007. Pregnancy Impairs the Innate Immune Resistance to *Salmonella typhimurium* Leading to Rapid Fatal Infection. The Journal of Immunology 179, 6088–6096. https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.9.6088

Peng, H., Tian, Z., 2017. Natural Killer Cell Memory: Progress and Implications. Frontiers in Immunology 8. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01143

Pitkin, D., Actor, P., 1972. Immunity to Vibrio cholerae in the mouse. I. Passive protection of newborn mice. Infect. Immun. 5, 428–432.

Pizarro-Cerdá, J., Méresse, S., Parton, R.G., van der Goot, G., Sola-Landa, A., Lopez-Goñi, I., Moreno, E., Gorvel, J.P., 1998. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. Infect. Immun. 66, 5711–5724.

Poirier, V., Av-gay, Y., 2016. Intracellular Growth of Bacterial Pathogens: The Role of Secreted Effector Proteins in the Control of Phagocytosed Microorganisms, in: Kudva, I.T., Cornick, N.A., Plummer, P.J., Zhang, Q., Nicholson, T.L., Bannantine, J.P., Bellaire, B.H. (Eds.), Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, Fifth Edition. American Society of Microbiology, pp. 693–713. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0003-2014

Prince, H.E., Lapé-Nixon, M., 2014. Role of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity testing in diagnosing primary CMV infection during pregnancy. Clin. Vaccine Immunol. 21, 1377–1384. https://doi.org/10.1128/CVI.00487-14

Quelch, V., Reed, K.R., Erdos, G.W., Nicoletti, P.L., Hoffmann, E.M., 1984. Enhanced uptake of liposomes by bovine macrophages after opsonization with antibodies to *Brucella abortus*. Am. J. Vet. Res. 45, 1409–1412.

Quintin, T.J., Stalker, M.R., 1946. Endocarditis due to *Brucella abortus*. Can Med Assoc J 55, 50–52.

Raghupathy, R., 1997. Maternal anti-placental cell-mediated reactivity and spontaneous abortions. Am. J. Reprod. Immunol. 37, 478–484.

Riley, L.K., Robertson, D.C., 1984. Ingestion and intracellular survival of *Brucella abortus* in human and bovine polymorphonuclear leukocytes. Infect. Immun. 46, 224–230.

Ross, S.A., Novak, Z., Pati, S., Boppana, S.B., 2011. Overview of the diagnosis of cytomegalovirus infection. Infect Disord Drug Targets 11, 466–474.

Salcedo, S.P., Chevrier, N., Lacerda, T.L.S., Ben Amara, A., Gerart, S., Gorvel, V.A., de Chastellier, C., Blasco, J.M., Mege, J.-L., Gorvel, J.-P., 2013. Pathogenic *brucellae* replicate in human trophoblasts. J. Infect. Dis. 207, 1075–1083. https://doi.org/10.1093/infdis/jit007

Salcedo, S.P., Marchesini, M.I., Lelouard, H., Fugier, E., Jolly, G., Balor, S., Muller, A., Lapaque, N., Demaria, O., Alexopoulou, L., Comerci, D.J., Ugalde, R.A., Pierre, P., Gorvel, J.-P., 2008. *Brucella* Control of Dendritic Cell Maturation Is Dependent on the TIR-Containing Protein Btp1. PLoS Pathogens 4, e21. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040021

Santis, M., Cavaliere, A., Straface, G., Caruso, A., 2006. Rubella infection in pregnancy. Reproductive Toxicology 21, 390–398. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.01.014

Sarzotti, M., Robbins, D.S., Hoffman, P.M., 1996a. Induction of protective CTL responses in newborn mice by a murine retrovirus. Science 271, 1726–1728.

Sathiyaseelan, J., Goenka, R., Parent, M., Benson, R.M., Murphy, E.A., Fernandes, D.M., Foulkes, A.S., Baldwin, C.L., 2006. Treatment of *Brucella*-susceptible mice with IL-12 increases primary and secondary immunity. Cellular Immunology 243, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2006.10.003

Scozzafave, I., Warner, W.P., 1928. *Brucella Abortus* Infection in Man. Can Med Assoc J 19, 177–180.

Sethi, S., Gautam, V., Gupta, K., Suri, V., Angrup, A., 2017. Vertical transmission of *Salmonella enterica* serotype Paratyphi A leading to abortion. JMM Case Reports 4. https://doi.org/10.1099/jmmcr.0.005127

Skendros, P., Sarantopoulos, A., Tselios, K., Boura, P., 2008. Chronic Brucellosis Patients Retain Low Frequency of CD4+ T-Lymphocytes Expressing CD25 and CD28 after *Escherichia coli* LPS Stimulation of PHA-Cultured PBMCs. Clinical and Developmental Immunology 2008, 1–8. https://doi.org/10.1155/2008/327346

Smith, H., Williams, A.E., Pearce, J.H., Keppie, J., Harris-Smith, P.W., Fitz-George, R.B., Witt, K., 1962. Foetal erythritol: a cause of the localization of *Brucella abortus* in bovine contagious abortion. Nature 193, 47–49.

Terwagne, M., Ferooz, J., Rolán, H.G., Sun, Y.-H., Atluri, V., Xavier, M.N., Franchi, L., Núñez, G., Legrand, T., Flavell, R.A., De Bolle, X., Letesson, J.-J., Tsolis, R.M., 2013. Innate immune recognition of flagellin limits systemic persistence of *B rucella*: *B rucella* flagellin as innate immune signal. Cellular Microbiology 15, 942–960. https://doi.org/10.1111/cmi.12088

Tobias, L., Cordes, D.O., Schurig, G.G., 1993. Placental pathology of the pregnant mouse inoculated with Brucella abortus strain 2308. Vet. Pathol. 30, 119–129. https://doi.org/10.1177/030098589303000204

Topham, N.J., Hewitt, E.W., 2009. Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? Immunology 128, 7–15. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03123.x

Traum, J., 1930. Animal Infections with Bacteria of Genus *Brucella* and Their Relation to Undulant Fever of Man. Am J Public Health Nations Health 20, 935–942.

UNC-IACUC(Basic MOUSE Handling and Technique Guide) UNC Chapel Hill Revised 2/2017

Underhill, D.M., Goodridge, H.S., 2012. Information processing during phagocytosis. Nature Reviews Immunology 12, 492–502. https://doi.org/10.1038/nri3244

van Straten, M., Bardenstein, S., Keningswald, G., Banai, M., 2016. *Brucella abortus* S19 vaccine protects dairy cattle against natural infection with *Brucella melitensis*. Vaccine 34, 5837–5839. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.10.011

Velásquez, L.N., Delpino, M.V., Ibañez, A.E., Coria, L.M., Miraglia, M.C., Scian, R., Cassataro, J., Giambartolomei, G.H., Barrionuevo, P., 2012. *Brucella abortus* induces apoptosis of human T lymphocytes. Microbes and Infection 14, 639–650. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.02.004

Vijay, K., 2018. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. International Immunopharmacology 59, 391–412. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.03.002

Vitry, M.-A., Hanot Mambres, D., De Trez, C., Akira, S., Ryffel, B., Letesson, J.-J., Muraille, E., 2014a. Humoral Immunity and CD4+ Th1 Cells Are Both Necessary for a Fully Protective Immune Response upon Secondary Infection with *Brucella melitensis*. The Journal of Immunology 192, 3740–3752. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302561

Vitry, Marie-Alice, Hanot Mambres, D., Deghelt, M., Hack, K., Machelart, A., Lhomme, F., Vanderwinden, J.-M., Vermeersch, M., De Trez, C., Pérez-Morga, D., Letesson, J.-J., Muraille, E., 2014b. *Brucella melitensis* invades murine erythrocytes during infection. Infect. Immun. 82, 3927–3938. https://doi.org/10.1128/IAI.01779-14

Wang, Z., Wang, S.S., Wang, G.L., Wu, T.L., Lv, Y.L., Wu, Q.M., 2014. A pregnant mouse model for the vertical transmission of *Brucella melitensis*. The Veterinary Journal 200, 116–121. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.12.021

Wegmann, T.G., Lin, H., Guilbert, L., Mosmann, T.R., 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? Immunol. Today 14, 353–356. https://doi.org/10.1016/0167-5699(93)90235-D

Xu, Y., Mahmood, I., Zhong, L., Zhang, P., Struble, E.B., 2017. Passive Immunoprophylaxis for the Protection of the Mother and Her Baby: Insights from *In Vivo* Models of Antibody Transport. Journal of Immunology Research 2017, 1–8. https://doi.org/10.1155/2017/7373196

Zafar, T., Naik, A.Q., Shrivastava, V.K., 2018. Effect of cold stress on infanticide by female Swiss albino mice Mus musculus: a pilot study. Journal of Animal Science and Technology 60. https://doi.org/10.1186/s40781-018-0168-6

Zhang, J., Dunk, C., Croy, A.B., Lye, S.J., 2016. To serve and to protect: the role of decidual innate immune cells on human pregnancy. Cell and Tissue Research 363, 249–265. https://doi.org/10.1007/s00441-015-2315-4

Zhang, X., Mozeleski, B., Lemoine, S., Deriaud, E., Lim, A., Zhivaki, D., Azria, E., Le Ray, C., Roguet, G., Launay, O., Vanet, A., Leclerc, C., Lo-Man, R., 2014. CD4 T Cells with Effector Memory Phenotype and Function Develop in the Sterile Environment of the Fetus. Science Translational Medicine 6, 238ra72-238ra72. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008748

Zhang, X., Zhivaki, D., Lo-Man, R., 2017. Unique aspects of the perinatal immune system. Nature Reviews Immunology 17, 495–507. https://doi.org/10.1038/nri.2017.54

Zygmunt, M.S., Debbarh, H.S., Cloeckaert, A., Dubray, G., 1994. Antibody response to *Brucella melitensis* outer membrane antigens in naturally infected and Rev1 vaccinated sheep. Vet. Microbiol. 39, 33–46.

Figures supplémentaires

Figures supplémentaires

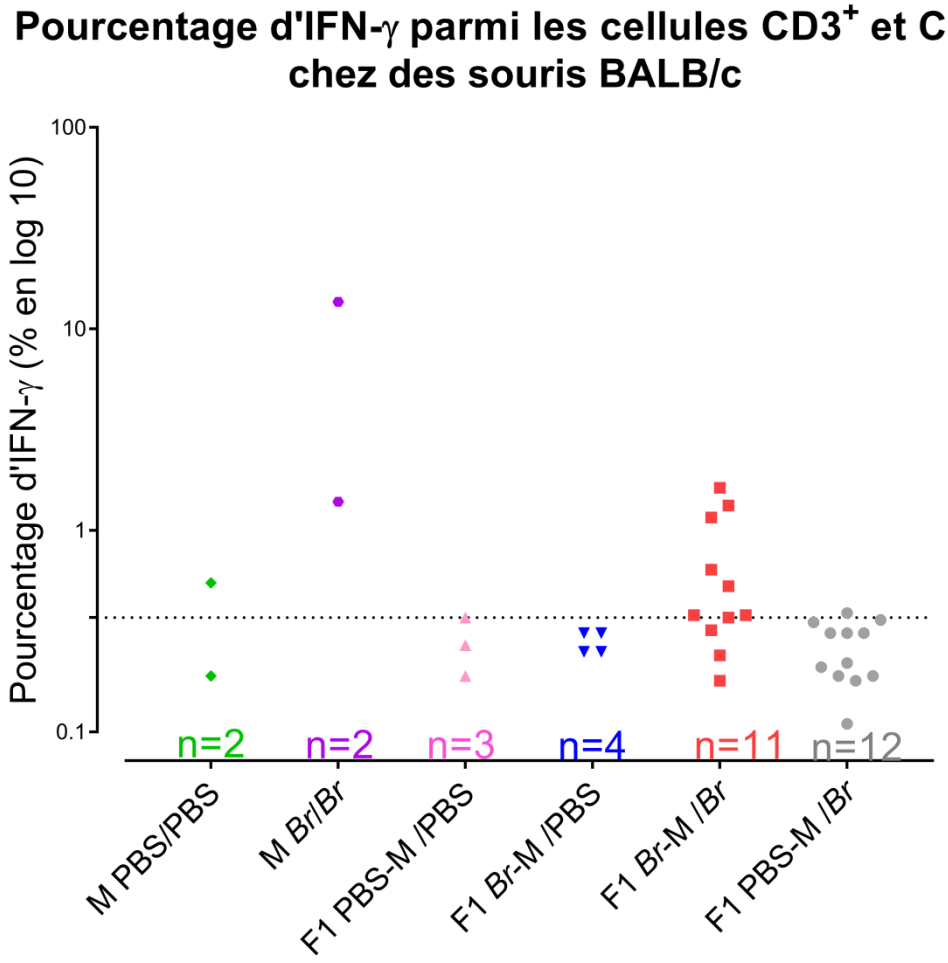


Figure supplémentaire 1 : Pourcentage de cellules IFN-γ$^+$ parmi les cellules T CD4· Même expérience que la **Figure 20**. Le pourcentage **de cellules IFN-γ$^+$** est exprimé en logarithme. Le graphique reprend l'ensemble des résultats obtenus pour les souris BALB/c. Le pourcentage **de cellules IFN-γ$^+$** est mesuré pour des M PBS injectée avec PBS (vert), des M *Br* avec challenge *Brucella* (violet), des F1 PBS-M injectées avec du PBS (rose), des F1 *Br*-M injectées avec du PBS (bleu), des F1 *Br*-M avec challenge *Brucella* (rouge), des F1 PBS-M avec challenge *Brucella* (gris). La ligne horizontale en pointillé représente la moyenne des contrôles négatifs (M PBS injectée avec du PBS).

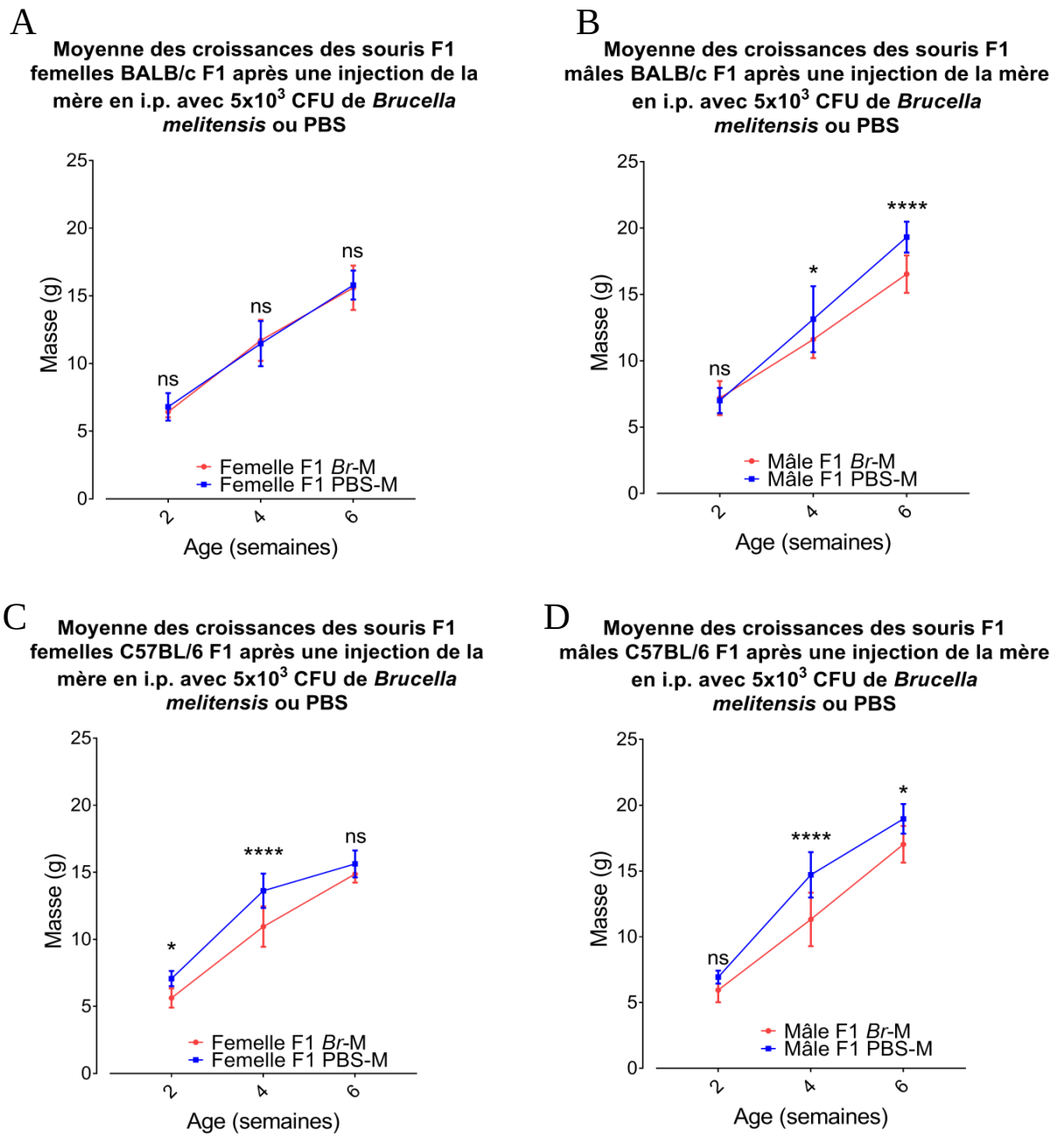


Figure supplémentaire 2 : Moyenne des courbes de croissance des souris F1 *Br*-M et F1 PBS-M. Les souris gestantes ont été infectées en i.p. avec 5x10^3 CFU de *Brucella melitensis* 16M WT. De 2 semaines à 6 semaines, les souris F1 ont été pesées toutes les deux semaines. Les moyennes des courbes de croissance ont été représentées en fonction du sexe des souris F1 (les souris F1 *Br*-M en rouge et les souris F1 PBS-M en bleu). Les données représentent la moyenne des croissances de souris BALB/c femelles F1 par gramme (A) et de souris BALB/c mâles F1 (B). La moyenne des souris C57BL/6 femelles F1 est représentée sur le graphique C et celle des souris C57BL/6 mâles F1 est représentée sur le graphique D. n indique le nombre de souris F1 représentées sur les graphiques. Non significatif (ns) si p> 0,05; *, p <0,05; ****, p<0.0001.

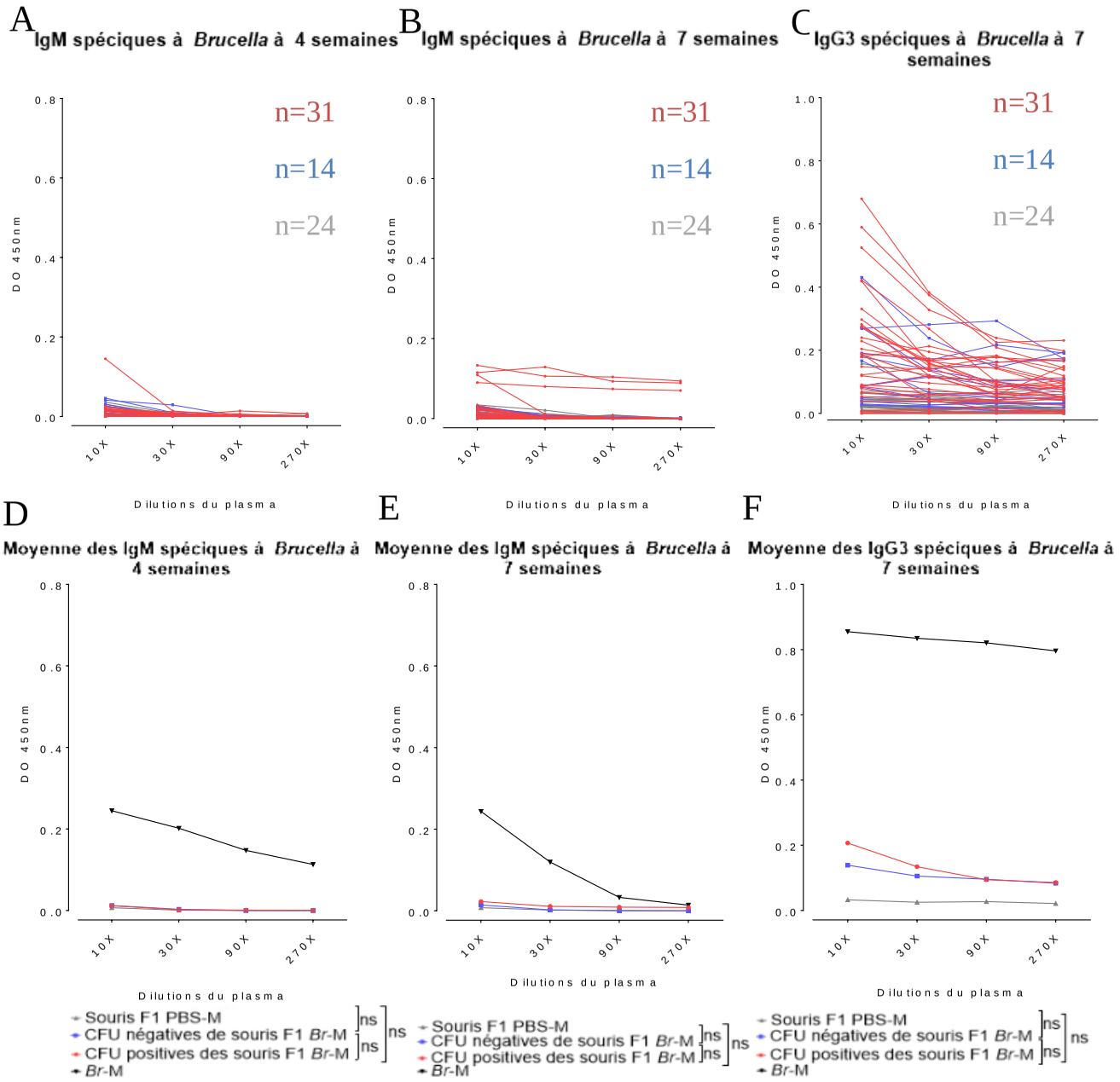

A
IgM spéciques à Brucella à 4 semaines
n=31
n=14
n=24
DO 450nm
Dilutions du plasma
B
IgM spéciques à Brucella à 7 semaines
n=31
n=14
n=24
DO 450nm
Dilutions du plasma
C
IgG3 spéciques à Brucella à 7 semaines
n=31
n=14
n=24
DO 450nm
Dilutions du plasma
D
Moyenne des IgM spéciques à Brucella à 4 semaines
DO 450nm
Dilutions du plasma
Souris F1 PBS-M
CFU négatives de souris F1 Br-M
CFU positives des souris F1 Br-M
Br-M
ns
ns
ns
E
Moyenne des IgM spéciques à Brucella à 7 semaines
DO 450nm
Dilutions du plasma
Souris F1 PBS-M
CFU négatives de souris F1 Br-M
CFU positives des souris F1 Br-M
Br-M
ns
ns
ns
F
Moyenne des IgG3 spéciques à Brucella à 7 semaines
DO 450nm
Dilutions du plasma
Souris F1 PBS-M
CFU négatives de souris F1 Br-M
CFU positives des souris F1 Br-M
Br-M
ns
ns
ns

Figure supplémentaire 3 : Corrélation entre les Ig anti-*Brucella* chez les F1 et l'infection maternelle. Les souris gestantes ont été infectées en i.p. avec $5x10^3$ CFU de *Brucella melitensis*. La présence d'IgM a été analysée par la technique ELISA dans le plasma de souris F1 *Br*-M à 4 et les IgM, IgG3 à 7 semaines. La densité optique (DO) à 450 nm est exprimée en fonction de la dilution du plasma. La couleur rouge indique les souris F1 qui sont positives pour les CFU et/ou PCR. Lorsque les résultats des CFU et/ou des PCR sont négatifs, ils sont représentés en bleu. La couleur grise correspond aux Ig des souris provenant d'une mère ayant reçu une injection de PBS (souris F1 PBS-M). Chaque courbe sur les graphiques A, B, C représente une souris F1, mais sur les graphiques D, E, F, les courbes représentent la moyenne des souris F1. Les moyennes des détections des Ig représentées en noir correspondent aux Ig des mères. Les données représentent la détection pour chaque souris F1 d'IgM spécifiques de *Brucella* à 4 semaines (A), d'IgM à 7 semaines. (B), IgG3 à 7 semaines (C) et moyenne de détection des IgM spécifiques de *Brucella* chez la souris F1 à 4 semaines (D), IgM à 7 semaines (E), IgG3 à 7 semaines (F). n indique le nombre de souris F1 représentées sur les graphiques. Non significatif (ns) si $p > 0,05$.

Challenge : infection i.p.10^7 CFU de *Brucella melitensis*
après une infection primaire *in utero* de 5x10^3 CFU de *Brucella melitensis*

	Souris C57BL/6				
		Détection des Ig		CFU	
	F1	IgM 7 semaines	IgG3 7 semaines	Rate 6jours p.i.	Sang 2h p.i.
Souris F1 PBS-M	C1			94400	16356
	C2			166400	31040
	C3			73600	9174
	D1			376000	20622
	D2			159200	82464
	D3			132800	5440
	D4			332800	27093
	D5			139200	95000
	D6			219200	106666
Souris F1 *Br* -M	G4		XX	144800	40
	G6		X	127200	373
	H2		XX	204800	334
	H3		XX	245600	71
	I1	XX	XX	0	35
	I2	XX		6	0
	I3	XX		14	54

	Souris BALB/c				
		Détection des Ig		CFU	
	F1	IgM 7 semaines	IgG3 7 semaines	Rate 6jours p.i.	Sang 2h p.i.
Souris F1 PBS-M	a1			601600	27520
	a2			420800	15253
	b1			96000	73760
	b2			58400	450000
	b3			108800	46506
	b4			88000	400000
Souris F1 Br-M	e2		XX	654400	32214
	e3	XX	X	784000	N/A
	e5		XX	704000	16000
	e7		X	428800	181394
	f2		XX	523200	198613
	f4		XX	648000	33280
	f7			395200	90000
	f8	XX	X	213600	178880
	g2			305600	135253
	g4			340000	48000
	g6		X	298000	90026
	h4		X	351000	199680
	h5		XX	350000	358400

Tableau supplémentaire 1 : Challenge haute dose avec *Brucella* : corrélation entre la résistance face à la bactérie et la détection d'Ig avant le challenge. Les souris gestantes ont été infectées en i.p. avec $5x10^3$ CFU de *Brucella melitensis*. La présence d'IgM a été détectée dans le plasma des souris F1 *Br*-M et F1 PBS-M à 4 semaines et à 7 semaines et celle des IgG3 chez les mêmes souris à 7 semaines. Les souris F1 *Br*-M et PBS-M ont été infectées en i.p. avec 10^7 CFU de *Brucella melitensis* mCherry. Les CFU ont été comptées dans 100 µL de sang 2 heures après le challenge (p.c.) et dans la rate 6 jours post challenge. Le tableau est séparé en deux groupes: les souris C57BL/6 WT (représentées par une lettre majuscule) et les souris BALB/c WT (représentées par une lettre minuscule). La lettre indique la correspondance avec la mère et le numéro correspond à une identification individuelle. Chaque groupe est ensuite séparé en deux sous-groupes: les souris F1 *Br*-M en rouge dans le tableau et les souris F1 PBS-M représentées en gris. Les CFU indiquées en vert sont celles pour lesquelles il y a eu une protection et en bleu sont celles pour lesquelles il n'y a pas de corrélation avec les Ig. Les résultats de détection des Ig sont représentés par une croix si la DO à 450 nm est entre 0,1-0,2 et par deux croix si elle est > 0,2. Quand aucun symbole n'est représenté cela indique que le résultat est négatif.