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

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Contribution à l'étude de la réponse immunitaire murine lors d'une infection primaire ou secondaire par Brucella melitensis

Vitry, Marie-Alice

Award date:
2007

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

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX

NAMUR

Faculté des Sciences

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA REPONSE IMMUNITAIRE MURINE LORS D'UNE INFECTION PRIMAIRE OU SECONDAIRE PAR *BRUCELLA MELITENSIS*

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de

licencié en Sciences biologiques

Marie-Alice VITRY

Juin 2007

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
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@fundp.ac.be - http://www.fundp.ac.be/fundp.html

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA REPONSE IMMUNITAIRE MURINE LORS D'UNE INFECTION PRIMAIRE OU SECONDAIRE PAR *BRUCELLA MELITENSIS*

VITRY Marie-Alice

Résumé:

La brucellose est une maladie infectieuse causée par des bactéries Gram négatives du genre *Brucella* (intracellulaire facultative) et qui touche l'homme et l'animal. Dans le modèle expérimental murin, la réponse immunitaire anti-*Brucella* est régulée par les lymphocytes $TCD4^+$ producteurs d'IFNγ. Bien que cette réponse permette un contrôle de l'infection, elle échoue à éradiquer la bactérie. A ce titre, *Brucella* constitue un modèle expérimental très intéressant d'infection chronique par une bactérie intracellulaire.
Au cours de ce travail, nous avons tenté de comprendre la complexité de la relation existant entre *Brucella* et le système immunitaire de l'hôte en caractérisant certains acteurs de la réponse immune :

• *Identification des mécanismes effecteurs de la réponse immune secondaire contre Brucella melitensis chez la souris.* Pour ce faire, nous avons comparé des souris primo-infectées à des souris préalablement vaccinées par la bactérie vivante ou la bactérie morte. Nous avons confirmé l'observation qu'un vaccin vivant protège plus efficacement de l'infection par *Brucella* qu'un vaccin mort. Dans les deux cas, le pic de production de l'IFNγ apparaît beaucoup plus rapidement que lors d'une réponse primaire. Toutefois, l'origine cellulaire de cette cytokine reste à identifier car elle ne semble pas produite par les lymphocytes $TCD4^+$, comme c'est le cas dans la réponse primaire. L'expression de l'enzyme iNOS, responsable de la production d'oxyde nitrique par les cellules phagocytaires, semble moins importante en réponse secondaire. La cinétique de recrutement et d'activation des mécanismes effecteurs semble donc nettement différente en réponse primaire et secondaire.

• *Caractérisation du rôle des cellules $TCD4^+CD25^+$ régulatrices et d'une cytokine immunosuppressive, l'IL-10, dans la persistance de B. melitensis.* Ces mécanismes de rétrocontrôle du système immunitaire peuvent, dans certains cas, agir au détriment de l'hôte en permettant la persistance du pathogène. Nous avons observé que la neutralisation de l'IL-10, mais pas des cellules $TCD4^+CD25^+$, augmentait significativement l'élimination de la bactérie par le système immunitaire. Cette meilleure élimination est associée à une augmentation du recrutement des cellules TipDC productrices d'iNOS dans la rate.

Mémoire de licence en Sciences biologiques
Juin 2007

Promoteur : Prof. J.-J. Letesson

Co-promoteur : Prof. E. Muraille

REMERCIEMENTS

On ne peut avancer dans la vie sans les mains qui nous sont tendues à chacune des étapes de ce long parcours. C'est pourquoi je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont permis d'avancer durant mes études, et particulièrement ces derniers mois.

Un merci tout particulier au Pr. J-J. Letesson pour m'avoir accueillie dans son laboratoire où j'ai découvert une équipe de chercheurs sympathiques et prêts à nous aider du mieux possible, nous, petits mémorants projetés dans la vie laborantine parfois difficile. Merci de m'avoir ouvert les yeux sur le monde fascinant de la microbiologie et de l'immunologie, merci de m'avoir soutenue tout au long de ce travail.

Merci également au Pr E. Muraille d'avoir accepté de m'initier au monde complexe mais captivant de l'immunologie. Merci pour ses heures de travail où vous m'avez supervisée et aidée.

Je tiens également à dire un tout grand MERCI à la sous-unité IMMUNO de l'URBM… elle ne comprend que deux chercheurs, mais non des moindres ! Richard, merci pour ton aide, ton soutien quotidien et ton terrible humour ! Matthieu, merci d'avoir été présent, toujours prêt à rendre service !

Merci à chaque membre du labo qui a d'une façon ou d'une autre contribué à ce mémoire… que ce soit par quelques paroles échangées, un conseil donné ou un sourire rassurant, vous m'avez beaucoup apporté ! Merci aux « messieurs EndNote », Julien et Johann, qui ont su venir à bout du plus récalcitrant des programmes rencontrés par mon ordinateur. Merci à Caro, pour ces longues heures passées au BL3 où, entre deux centri, on papotait de la vie et ses aléas. Merci Christian, le délégué FACS de l'URBM, d'avoir été là et de m'avoir donné des bons conseils et des renseignements judicieux… Merci à Etienne, pour son savoir informatique et « Kyocérien »… Merci à Benoît pour son aide statistique.

Merci à tous les mémorants pour ces derniers mois passés côtes à côtes… que ce soit sur nos paillasses (tout en veillant à un partage équitable de l'espace personnel, n'est-ce pas Charles !), à la beer hour lors d'une dégustation d'un délicieux tiramisu (merci Mira !!!)… ou de crêpes (merci à vous tous !), ou le nez devant notre ordinateur…

Enfin, la vie ne m'aurait jamais amenée jusque là sans le soutien inconditionnel de mes parents et mes quatre formidables grandes sœurs, Vinciane, Isabelle et Véronique ! Je n'oublierai pas non plus Jean-Yves, Prosper et Ludo qui, grâce à leur expérience, m'ont soutenue et rassurée. Je terminerai par remercier tout particulièrement Charles, qui m'a soutenue tout au long de ce travail et sans qui la tâche aurait certainement paru beaucoup plus difficile.

… Et bien sûr, je ne voudrais pas oublier de remercier les nombreuses petites souris qui m'ont permis de réaliser ce mémoire !

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 1

A. LE SYSTEME IMMUNITAIRE 1

1. Généralités *1*

2. Réponse immunitaire innée *1*

2.1. Reconnaissance du pathogène par le système immunitaire inné 2

2.2. Traitement de l'information 2

2.3. Réponse effectrice 3

3. Réponse immunitaire adaptative *6*

3.1. Spécificité de la réponse 6

3.2. Temps de latence 7

3.3. Création d'une mémoire immunologique 10

3.4. Régulation de la réponse immunitaire 11

B. LE GENRE *BRUCELLA* 13

1. Généralités *13*

1.1. Historique 13

1.2. Taxonomie 13

2. Pathologie *14*

2.1. Mode d'infection 14

2.2. Symptômes 14

2.3. Traitements 14

3. Modèle expérimental *14*

C. BRUCELLA ET SON HOTE…IMMUNOEVASION 15

1. Ce que les études in vitro nous ont appris… *15*

1.1. Pénétration incognito grâce à son LPS 15

1.2. Désarmer les activités bactéricides du macrophage 16

1.3. Modifier l'apparence de son véhicule pour dévier le trafic intracellulaire 17

1.4. Etablissement de Brucella dans une niche favorable 17

2. In vivo… une toute autre histoire *17*

2.1. Avant d'atteindre la cellule hôte… l'environnement extracellulaire 18

2.2. Au sein de la cellule hôte… mais au cœur d'un système immunitaire adaptaté 19

D. L'HOTE ET *BRUCELLA*, QUELLE RELATION ? 20

1. Les acteurs de la réponse anti-Brucella *20*

1.1. L'IFNγ, la cytokine clé 20

1.2. Les lymphocytes TCD4$^+$, principaux producteurs d'IFNγ 20

1.3. L'iNOS, un mécanisme effecteur important 20

OBJECTIFS DU MÉMOIRE 21

RÉSULTATS 22

A. ETUDE DE LA REPONSE IMMUNE SECONDAIRE CONTRE *BRUCELLA MELITENSIS* 22

1. Validation du traitement antibiotique contre Brucella melitensis *22*

1.1. Choix du traitement antibiotique 22
1.2. Confirmation de l'efficacité des traitements choisis 23
2. Etude de la réponse immune secondaire *24*
2.1. Procédure 24
2.2. Résultats du comptage des CFU 26
2.3. Résultats de l'analyse FACS 26
2.4. En résumé 29
B. MISE EN EVIDENCE DE LA CONTRIBUTION DES CELLULES T REGULATRICES LORS D'UNE INFECTION PAR *BRUCELLA MELITENSIS* 30
1. Comment étudier le rôle des cellules T régulatrices ? *30*
2. Déroulement du traitement *30*
3. Résultats *32*
3.1. Résultats du comptage des CFU 32
3.2. Résultats de l'analyse au FACS 32
3.3. En résumé 34

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 36

A. REPONSE IMMUNE SECONDAIRE LORS D'UNE INFECTION PAR *B. MELITENSIS* 36
1. Pourquoi étudier la réponse immune secondaire développée à l'encontre de B. melitensis ? *36*
2. Caractérisation de la réponse immune secondaire envers B. melitensis ? *37*
2.1. Les souris vaccinées présentent un meilleur contrôle de l'infection 37
2.2. Un rôle précoce pour l'IFNγ 38
2.3. Une faible production d'iNOS et une contribution fort réduite des TipDC 38
3. Perspectives expérimentales *39*
3.1. Quels sont les mécanismes effecteurs qui diffèrent de la réponse immune primaire ? 39
3.2. L'absence de traitement antibiotique et donc la persistance de B. melitensis permettrait-elle de conférer une meilleure résistance à une nouvelle infection ? 40
3.3. Combien de temps est-il nécessaire au développement d'une mémoire immunologique envers B. melitensis ? 40
3.4. Quel élément du cycle infectieux de B. melitensis est requis pour l'établissement d'une mémoire protectrice à long terme ? 41
B. LES CELLULES T REGULATRICES PARTICIPENT-ELLES A LA REPONSE IMMUNITAIRE ANTI-*BRUCELLA* ? L'IL-10 EST-IL IMPLIQUE ? 42
1. Le rôle controversé des cellules T régulatrices lors d'une infection ? *42*
2. Quel(s) rôle(s) pour les cellules Tregs lors d'une infection par B. melitensis ? *43*
2.1. Aucune contribution des cellules Tregs $CD4^+CD25^+$ démontrée dans la persistance de B. melitensis..... 43
2.2. ... mais un rôle probable pour l'IL-10 dans cette persistance 43
2.3. Peu d'impact sur la production d'IFNγ 44
2.4. Un rôle immunosuppresseur sur la production de NO et sur le recrutement des TipDC 44
2.5. En conclusion 45

MATÉRIEL ET MÉTHODES 46

A. BACTERIES, SOURIS, REACTIFS 46

1. Souche bactérienne *46*

2. Souris *46*

3. Milieux, tampons, solutions et anticorps *46*

3.1. Milieux 46

3.2. Tampons 47

3.3. Solutions 47

3.4. Anticorps 48

4. Traitements antibiotiques *48*

5. Traitements anticorps *48*

B. METHODES 49

1. Infection de souris par Brucella melitensis (vivante ou tuée) *49*

2. Sacrifice des souris en vue du comptage des CFUs *49*

3. Coloration des cellules spléniques et analyse au cytomètre de flux *50*

4. Analyse statistique *52*

BIBLIOGRAPHIE 53

TABLE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
APC	Allophycocyanine
ARN	Acide Ribonucléique
BCR	B Cell Receptor
BCV	Brucella Containing Vacuole
CCL21	Chimiokine lymphoïde
CCR7	Récepteur de chimiokine
CFU	Colony Forming Unit
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CRP	Protéine C-réactive
DC	Cellule Dendritique
Fc	Fragment cristallisable (portion C-terminale des anticorps)
FITC	Fluoresceine isothyocyanate
FoxP3	Forkhead box protein 3
GITR	Glucocorticoid-induced TNF receptor family related-gene
HSP60	Heat Shock Protein 60
IFN	Interféron
IL	Interleukine
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase (équivalent à NOS2)
KO	Knock Out
LBP	LPS Binding Protein
LPS	Lipopolysaccharide
MBL	Mannan Binding Lectin
MHC	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
NK	Natural Killer
NO	Oxyde Nitrique
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAMPS	Pathogen Associated Molecular Patterns
PE	Phycoerythrine
PrPc	Protéine prion cellulaire
PRRs	Pattern Recognition Receptors
RAG-1 et RAG-2	Recombination Activating Gene 1 et 2
RE	Réticulum Endoplasmique
SAP	Protéine Amyloïde Sérique

S-LPS, R-LPS	Smooth or Rough LPS
SOD	Superoxyde Dismutase
SP-A et SP-D	Surfactant pulmonaire A et D
SR-A	Scavenger Receptor A
T_{CM}, T_{EM}	Central Memory T cell – Effector Memory T cell
TCR	T Cell Receptor
TGF-β	Transforming Growth Factor β
Th1, Th2, Th17	lymphocytes T helper 1, 2 ou 17
TipDC	TNF/iNOS producing Dendritic Cell
TLRs	Toll Like Receptors
TNF	Tumor Necrosis Factor
Tr1	Cellules T régulatrices 1
Tregs	cellules T régulatrices

En l'an 79 après JC, durant la nuit du 24 au 29 août, une terrible éruption volcanique a détruit toute la vie autour du Mont Vésuve. Deux villes célèbres, Pompeii et Herculaneum, ont été complètement ensevelies sous les cendres volcaniques. A Herculaneum, 25 mètres de boue volcanique ont tué près de 250 personnes. Une étude anthropologique des squelettes de ces victimes a révélé des lésions osseuses typiques de la brucellose chez 17,4% des adultes.

Ce texte, extrait et traduit de *Capasso et al, 2002*, illustre l'ancienneté de *Brucella* en tant que pathogène chez l'homme. Les lésions osseuses caractérisent la phase chronique de maladie, qui repose sur la capacité de *Brucella* à s'établir chez son hôte, notamment en échappant à la réponse immunitaire développée à son égard.

Introduction

INTRODUCTION

A. LE SYSTEME IMMUNITAIRE

1. Généralités

Le système immunitaire est constitué de tissus, organes, cellules et molécules disséminées au sein de l'organisme. En agissant de manière coordonnée, les constituants de ce système ont pour but de protéger l'organisme contre les agents pathogènes, les substances étrangères et les cellules anormales. Ceci est réalisé grâce à des mécanismes assurant la discrimination entre le soi et le non soi infectieux, de manière à assurer la tolérance du premier tout en permettant l'élimination du second. Lorsque le système immunitaire est sollicité, il développe une réponse immunitaire que l'on divise généralement en deux catégories : la réponse innée et la réponse adaptative. Cette distinction trouve son origine dans le fait que tous les organismes vivants ne bénéficient pas de ces deux types de réponses. Du point de vue évolutif, la réponse immunitaire innée est un mécanisme de défense ancien, présent chez tous les métazoaires, et permettant la reconnaissance des pathogènes par des récepteurs, dits non ou peu spécifiques, encodés dans le génome. La réponse immunitaire adaptative serait apparue chez les vertébrés il y a environ 450 millions d'années. Elle est assurée par des cellules spécialisées et hautement spécifiques pour la reconnaissance du pathogène. Chez les vertébrés, la réponse immunitaire innée n'a pas été supprimée, mais en plus de son rôle essentiel dans le contrôle précoce de l'infection, elle a été mise à profit pour stimuler et orienter la réponse adaptative qui apparaît plusieurs jours après le début de l'infection (Hoffmann *et al.*, 1999, Janeway, 2001). En retour, la réponse adaptative renforce les mécanismes effecteurs de l'immunité innée. Les principaux éléments caractérisant ces deux types de réponses sont repris dans le tableau 1.

2. Réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée se développe selon la même stratégie chez tous les organismes multicellulaires. Dès l'entrée du pathogène dans l'organisme hôte, la réponse innée est rapidement activée sur le site de l'infection. Bien que peu spécifiques aux pathogènes, les mécanismes de reconnaissance et d'élimination développés par le système immunitaire inné parviennent généralement à limiter l'infection en attendant l'activation de la réponse adaptative (Medzhitov *et al.*, 1997).

La réponse immunitaire innée fait intervenir des cellules provenant de la moelle osseuse et des facteurs solubles produits par le foie. Les cellules de l'immunité innée sont formées durant le processus de l'hématopoïèse (fig 1). On retrouve les granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles), les monocytes qui se différencieront en deux types de cellules phagocytaires dans les tissus : les macrophages et les cellules dendritiques, ainsi que des cellules cytotoxiques appelées « Natural Killer » (NK). Les macrophages, les cellules dendritiques et les mastocytes (basophiles différenciés) résident dans la plupart des tissus, et particulièrement au niveau des surfaces muqueuses, voies d'entrée courantes des pathogènes. Le foie sécrète quant à lui des protéines plasmatiques contribuant directement à l'élimination du pathogène, il s'agit du complément et des protéines de la phase aigue (Fearon *et al.*, 1996, Saalmuller, 2006). La réponse immunitaire est initiée par la reconnaissance du pathogène qui,

REPONSE IMMUNITAIRE INNEE	**REPONSE IMMUNITAIRE ADAPTATIVE**
Macrophages, granulocytes, cellules Natural Killer (NK), cellules dendritiques, complément, protéines de la phase aigue	Lymphocytes T, lymphocytes B
Récepteurs encodés dans le génome	Récepteurs issus d'une recombinaison génétique
Non spécifique	spécifique
Préexistant	Nécessite une sélection et une amplification clonale
Action immédiate	Temps de latence
Pas de mémoire	Mémoire à long terme

Tableau 1. Caractéristiques principales des deux types de réponse immunitaire.

après le traitement de l'information, donnera lieu à une réponse. Ces différentes étapes sont reprises ci-dessous.

2.1. Reconnaissance du pathogène par le système immunitaire inné

Bien que souvent caractérisé par son manque de spécificité, le système immunitaire inné est capable de discriminer le « soi » ainsi que des classes distinctes de pathogènes. Les différentes cellules et facteurs solubles qui le constituent reconnaissent, en effet, des motifs structuraux hautement conservés chez les pathogènes. Ces motifs sont appelés des PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) et sont essentiels pour la survie des pathogènes (Akira *et al.*, 2006). On y retrouve le lipopolysaccharide (LPS), présent à la surface de la membrane externe des bactéries gram négatives, les acides lipoteichoïques caractéristiques du peptidoglycan des bactéries gram positives, l'ARN double brin typique de certains virus, les glycolipides des mycobacterium, etc. (fig. 2).

Le système immunitaire inné détecte les PAMPs grâce à des récepteurs désignés par le terme PRRs (Pattern Recognition Receptors). Ces récepteurs peuvent être membranaires (TLRs, Scavenger receptors, récepteurs au mannose, etc.), cytoplasmiques (NOD-like Receptors, ADN-PKc, etc.) ou encore circulants (protéines du complément et de la phase aigue). Les TLRs sont les PRRs les mieux caractérisés à ce jour. Chez les mammifères, 13 TLRs sont connus, dont 9 sont conservés chez l'homme et la souris (Takeda *et al.*, 2005). Par exemple, le TLR3 reconnaît l'ARN double brin et le TLR5 la flagelline, constituant du flagelle de certaines bactéries. Les TLRs sont également exprimés par des cellules n'appartenant pas au système immunitaire, telles que les cellules endothéliales, épithéliales et musculaires (Parker *et al.*, 2007).

2.2. Traitement de l'information

La reconnaissance du pathogène par les PRRs fournit une information qui renseigne la cellule sur la nature de celui-ci. En effet, cette reconnaissance déclenche une séquence d'évènements dont l'aboutissement est l'initiation d'une cascade de transduction du signal. Les mécanismes qui découleront de ces évènements dépendront du PRR déclencheur, autrement dit de la nature du pathogène (Akira, *et al.*, 2006).

Dans le cas où l'infection n'est pas contrôlée, ce message est également transmis aux cellules du système immunitaire adaptatif.

La cascade de transduction du signal conduit à l'activation de facteurs de transcription qui mène à l'expression de facteurs de croissance et de cytokines pro-inflammatoires, une batterie de messagers protéiques du système immunitaire.

Par exemple, le LPS est reconnu par une protéine plasmatique, la LBP (LPS Binding Protein) qui s'associe ensuite au CD14, un récepteur protéique exprimé à la surface cellulaire. Ce complexe est ensuite reconnu par le TLR4 qui initie alors une voie de signalisation conduisant à l'activation du facteur de transcription NF-κB (fig. 3). Il en résulte l'expression de cytokines pro-inflammatoires (interleukine-1 (IL-1), l'IL-6, l'IL-12, l'IL-8 et le tumor necrosis factor (TNF)-α) et d'interférons de type I (IFNα et β) (Akira, *et al.*, 2006, Parker, *et al.*, 2007). Diffusant à travers les tissus ou via la circulation sanguine, ces messagers vont moduler la réponse immunitaire.

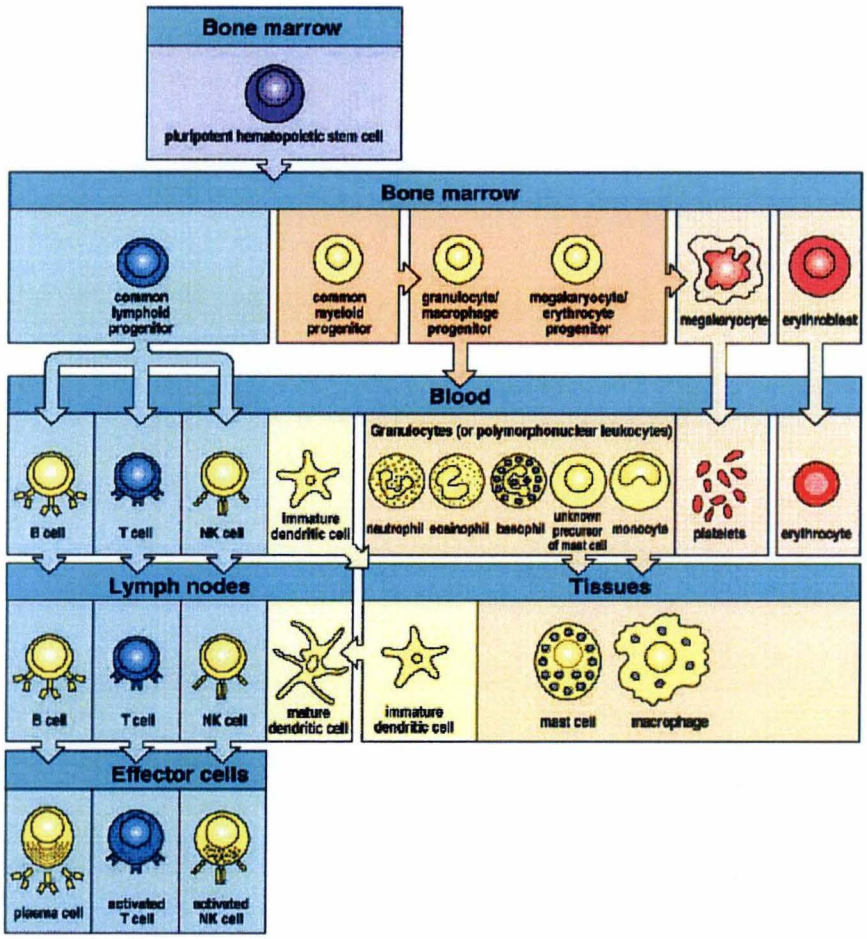


Figure 1 : L'hématopoïèse donne naissance aux diverses cellules du système immunitaire (Janeway *et al.*, 2003). Dans la moelle osseuse, une cellule souche hématopoïétique se différencie en deux précurseurs, le progéniteur lymphoïde et le progéniteur myéloïde, donnant naissance aux lymphocytes T, B, cellules NK et aux granulocytes, monocytes respectivement. L'origine des cellules dendritiques est plus confuse. Certaines proviennent de la lignée lymphocytaire, tandis que d'autres sont issues des monocytes.

2.3. Réponse effectrice

Après avoir traité l'information, la cellule va communiquer l'état de la situation aux autres constituants du système immunitaire. Différents mécanismes sont alors mis en place. Des effecteurs cellulaires (cellules phagocytaires, granulocytes et cellules NK) et solubles (complément et protéines de la phase aigue) vont être recrutés dans un premier temps pour assurer l'élimination directe du pathogène. Dans le cas où l'infection n'est pas contrôlée, des messagers protéiques (les cytokines) et cellulaires (cellules dendritiques) vont se charger de transmettre l'information aux autres constituants du système immunitaire. Les cytokines produites par les cellules phagocytaires induisent l'inflammation, processus assurant entre autre le recrutement des effecteurs de l'immunité. Les cellules dendritiques sont des messagers cellulaires reliant l'immunité innée à l'immunité adaptative. En effet, ces cellules se chargent de présenter des constituants antigéniques aux cellules de l'immunité adaptative et sont donc qualifiées de « cellules présentatrices d'antigènes professionnelles » (CPA).

2.3.1. Activation des effecteurs de l'immunité innée

Les effecteurs cellulaires ou solubles de l'immunité innée permettent de détruire le pathogène dès les premiers jours de l'infection. Cependant, étant peu spécifiques des pathogènes, ils ne sont pas toujours suffisants pour assurer leur élimination.

Cellules phagocytaires

Les cellules phagocytaires comprennent les monocytes et les neutrophiles. Issus des monocytes, les macrophages résident dans les tissus et constituent la première ligne de défense face aux pathogènes. Grâce à l'inflammation, ils obtiennent du renfort suite au recrutement des neutrophiles et de nouveaux monocytes dans le foyer infectieux (fig. 4).

Les cellules phagocytaires sont capables d'internaliser le pathogène suite à sa reconnaissance par les récepteurs membranaires de la cellule. Ce processus désigné par le terme phagocytose, assure le confinement du pathogène au sein d'une vacuole appelée phagosome. Cette vacuole fusionne ensuite avec un ou plusieurs granules cytoplasmiques, les lysosomes, qui contiennent de nombreuses enzymes hydrolytiques dans un milieu acide, mais également des peptides antimicrobiens et autres agents bactéricides. Le pH acide de ce nouveau compartiment nommé phagolysosome fournit un environnement propice pour l'activation d'enzymes lytiques telles que les lipases, protéases et le lysozyme qui conduisent à la destruction du pathogène.

D'autres mécanismes se développent également au sein du phagolysosome, à savoir la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), d'anions superoxyde (O_2^-) et d'oxyde nitrique (NO) (fig.5).

- Les dérivés toxiques de l'oxygène (H_2O_2, O_2^-) sont générés par les NADPH-oxydases et par d'autres enzymes au cours d'un processus dit « stress oxydatif » ou bouffée respiratoire car il s'accompagne d'une augmentation transitoire de la consommation d'oxygène (Radtke *et al.*, 2006).
- L'oxyde nitrique est quant à lui synthétisé par diverses enzymes dont l'iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase ou NOS2). Cette enzyme serait induite par diverses cytokines et composants bactériens tels que le LPS ou les acides lipoteichoïques. Une fois formé, le NO peut diffuser à travers les membranes et agir sur les bactéries aussi bien dans les vacuoles que dans le cytosol, et ce durant une période prolongée dépassant même la durée du stress oxydatif. C'est la forme radicalaire de l'oxyde nitrique, le NO°, qui est toxique. Le NO° est capable d'inhiber ou d'inactiver les

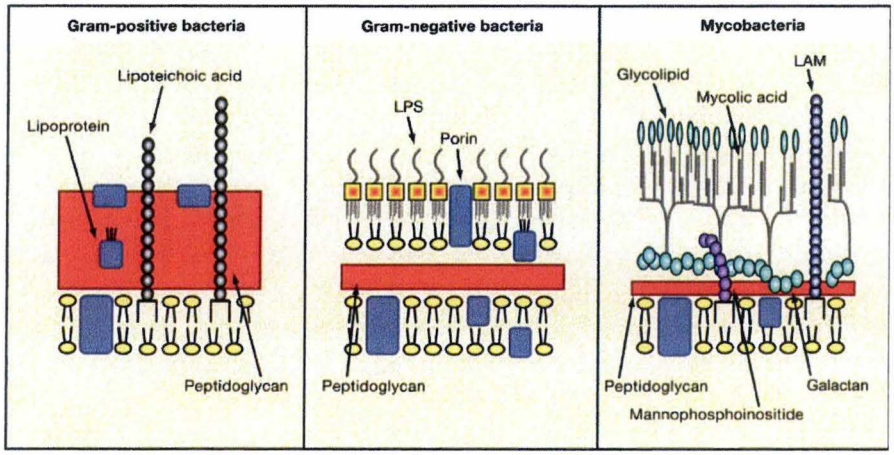


Figure 2 : Représentation schématique de quelques PAMPs caractéristiques des parois cellulaires bactériennes (Akira *et al.*, 2006).
Les bactéries Gram-positives ont une épaisse couche de peptidoglycan dans lequel s'insèrent l'acide lipotéichoïque et les lipoprotéines. La paroi cellulaire des bactéries Gram-négatives est caractérisée par la présence de lipopolysaccharides (LPS). Enfin, les mycobactéries se distinguent par une couche hydrophobe constituée d'acides mycoliques auxquels sont associés des glycolipides. Le lipoarabinomannane (LAM) s'insère également dans cette couche.

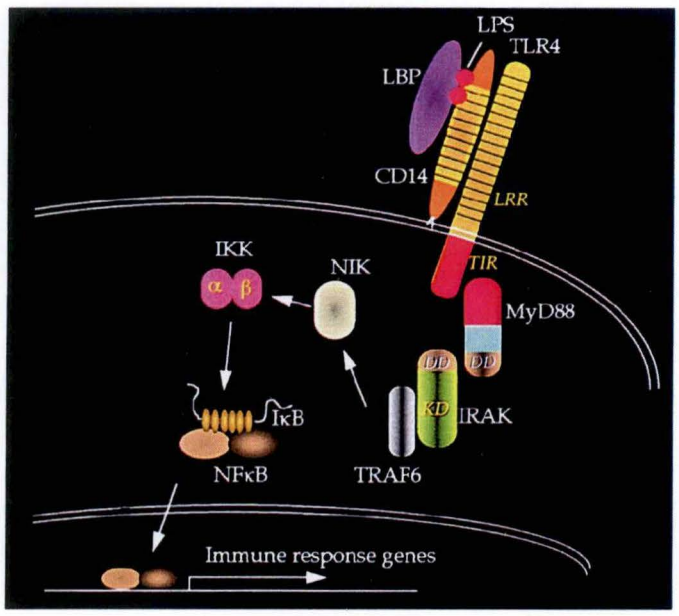


Figure 3 : Traitement de l'information : voie de signalisation associée à la reconnaissance du LPS (Hoffmann *et al.*, 1999). La liaison du complexe LPS-LBP-CD14 au TLR4 initie une voie de signalisation conduisant à l'activation du facteur de transcription NF-κB. Cette voie implique plusieurs acteurs : le domaine intracytoplasmique TIR (Toll-IL-1 Receptor) du TLR interagit avec une protéine adaptatrice, MyD88. Celle-ci active une sérine/thréonine kinase, IRAK (IL-1 Receptor-Associated Kinase) qui recrute TRAF6 (Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 6). TRAF6 active la NF-κB inducing kinase (NIK), ce qui conduit à l'activation de l'IκB kinase qui, par phosphorylation d'IκB, libère le facteur de transcription NF-κB. Ce dernier induit l'expression de plusieurs gènes essentiels au développement d'une réponse immunitaire.

enzymes du cycle de Krebs telles que l'aconitase, mais peut également endommager l'ADN. De plus, le NO° peut agir en synergie avec les dérivés de l'oxygène et mener à la formation de peroxynitrite ($ONOO^-$), un oxydant puissant pouvant attaquer les groupements thiols, les lipides et l'ADN (Chakravortty *et al.*, 2003).

Le complément et les protéines de la phase aigue, deux mécanismes effecteurs solubles

Le complément est un système de défense complexe et varié contre les infections (fig.6). Il s'agit d'un ensemble de protéines plasmatiques produites par le foie et dont l'activation aboutit à l'opsonisation[1] et à la destruction du pathogène, ainsi qu'à la production de médiateurs proinflammatoires (Frank *et al.*, 1991, Tomlinson, 1993).

Produites également par le foie, les protéines de la phase aigue sont des molécules dont les taux plasmatiques sont modifiés sous l'influence du TNF-α, de l'IL-1 et de l'IL-6, trois cytokines proinflammatoires sécrétées en cas d'infection. Ainsi, en une journée ou deux, la réponse de phase aigue fournit à l'organisme de nombreuses protéines capables de se fixer aux pathogènes, facilitant de la sorte leur phagocytose (opsonisation) et pouvant activer le complément. Les principales protéines effectrices sont la protéine C-réactive (CRP), la protéine amyloïde sérique (SAP), la lectine liant le mannose (MBL) et les surfactants pulmonaires A et D (SP-A et SP-D, deux collectines présentes dans le liquide alvéolaire des poumons) (Baumann *et al.*, 1994).

2.3.2. Information du système immunitaire adaptatif

Lorsque l'infection ne peut être contrôlée par la réponse immunitaire innée, des messagers protéiques et cellulaires alertent les constituants du système immunitaire adaptatif. Ceux-ci pourront dès lors assurer une attaque spécifique du pathogène.

Les cytokines, messagers protéiques

Les cytokines sont produites par les cellules de l'immunité innée, suite à la reconnaissance d'un pathogène par leurs récepteurs de surface. Parmi celles-ci, on retrouve l'IL-1, l'IL-6, l'IL-12, l'IL-8 et le TNF-α (tableau 2). Ces cytokines induisent principalement le processus inflammatoire qui assure entre autre le recrutement de monocytes, neutrophiles et autres granulocytes. La migration de ces cellules jusqu'au site de l'infection est finement régulée par une classe de cytokines responsables du chimiotactisme des cellules immunitaires, les chimiokines (Esche *et al.*, 2005, Parker, *et al.*, 2007). Celles-ci se répartissent en gradient au sein des tissus et guident de la sorte les cellules recrutées.

Les cytokines peuvent exercer un effet autocrine, modifiant le comportement de la cellule sécrétrice, ou paracrine, modifiant le comportement des cellules adjacentes. Certaines cytokines peuvent agir de manière endocrine en rejoignant la circulation sanguine, permettant dès lors de modifier le comportement des cellules à distance. Par exemple, le TNF-α, l'IL-1 et l'IL-6 agissent de concert pour initier la production des protéines de la phase aigue par le foie. L'IL-12 et le TNF-α activent les cellules NK. L'IL-12 joue également le rôle de

---

[1] **Opsonisation :** processus se caractérisant par la fixation d'opsonines à la surface d'un pathogène et conduisant à une meilleure reconnaissance par les cellules phagocytaires. L'opsonisation rend le pathogène vulnérable à la phagocytose. Le complément et les anticorps sont des opsonines (voir aussi figure 15).

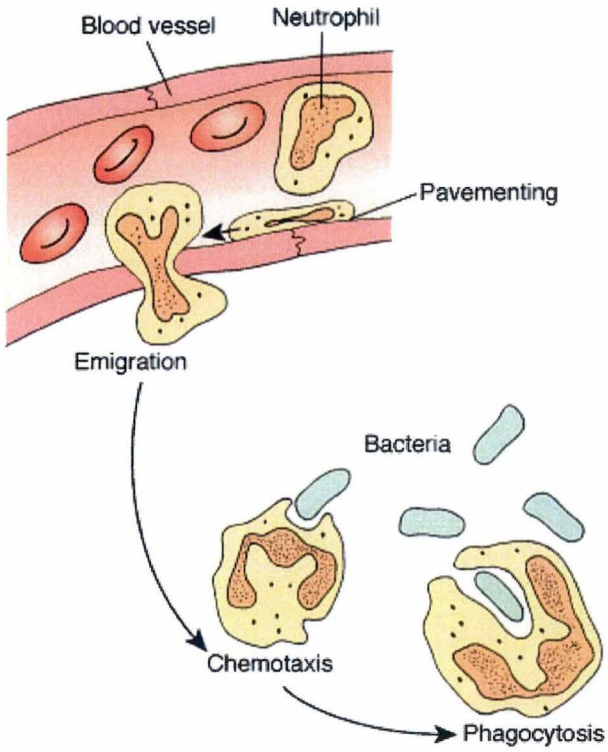


Figure 4. Recrutement des neutrophiles et monocytes grâce au processus inflammatoire. Les cellules phagocytaires, recrutées sur le site de l'infection, reconnaissent la pathogène et le phagocytent (d'après (Lippincott *et al.*, 2005)).

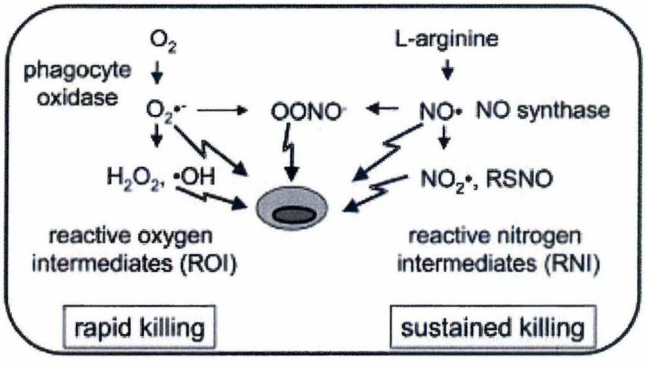


Figure 5. Production des dérivés toxiques de l'oxygène (ROIs) et de l'azote (RNIs) au sein de la cellule phagocytaire (Chakravortty *et al.*, 2003). Chaque produit est généré par une voie enzymatique différente. L'oxyde nitrique (NO°) et les anions superoxyde (O_2^-) peuvent former du peroxynitrite ($OONO^-$), un oxydant puissant. Ces dérivés toxiques oxydent les groupements thiol, lipides et ADN du pathogène confiné dans le phagosome. Contrairement aux ROIs, les RNIs agissent de manière prolongée, diffusant à travers les membranes pour agir sur les bactéries autant dans le cytosol que dans les vacuoles.

messager dans l'immunité adaptative en orientant le type de réponse qui sera mise en place. Quant à l'IL-8, il s'agit d'une chimiokine assurant le recrutement des neutrophiles, basophiles et autres cellules de l'immunité adaptative (Svanborg *et al.*, 1999).

Les cellules dendritiques, sentinelles de l'organisme

Les cellules dendritiques (DCs) sont des cellules présentatrices d'antigènes, c'est-à-dire qu'elles capturent ou sont infectées par les pathogènes, dégradent les antigènes de ces pathogènes et les présentent à leur surface. Ces antigènes sont reconnus par les récepteurs spécifiques de l'immunité adaptative (fig. 7). Issues de la moelle osseuse, les DCs résident dans les tissus périphériques à l'état immature. A ce stade, elles agissent comme des sentinelles et ingèrent continuellement les différents composants présents dans leur environnement. La reconnaissance du pathogène constitue un signal de maturation. La cellule dendritique quitte alors le site de l'infection et rejoint le ganglion lymphatique le plus proche par les vaisseaux lymphatiques. Les ganglions lymphatiques sont les lieux de résidence des cellules de l'immunité adaptative, et constituent donc un rendez-vous propice pour les cellules dendritiques (Banchereau *et al.*, 1998).

Les cellules dendritiques furent observées pour la première fois dans la peau, en 1868, et furent désignées comme étant des « cellules de Langerhans ». Ces dernières années, de nouvelles populations de DCs ont été identifiées. Les cellules dendritiques apparaissent dès lors comme une population hautement hétérogène et complexe (fig. 8). On différencie ainsi plusieurs groupes de DCs, sur base d'une combinaison exclusive des marqueurs protéiques membranaires. D'une manière non exhaustive, on distingue les cellules dendritiques classiques (cDCs), plasmacytoïdes (pDCs), natural killer (NKDC) et productrices d'IFNγ (IKDC), et enfin productrices d'iNOS et de TNF-α (TipDC). En plus de leur rôle de présentatrice d'antigène, les DCs sont donc spécialisées dans la production de cytokines régulatrices (IFN-α, β, γ, IL-12) et peuvent exercer des fonctions effectrices (production d'iNOS et cytotoxicité) (Iwasaki *et al.*, 2004).

- Les cellules dendritiques classiques (cDCs), issues des monocytes, jouent le rôle de sentinelles dans les tissus périphériques. Elles reconnaissent les bactéries, virus et champignons, et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12, le TNF et l'IL-6 (Banchereau, *et al.*, 1998). Leur phénotype de surface est le suivant : $B220^-$, $LY\text{-}6C^-$, $NK.1^-$.
- D'origine moins claire, les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) circulent dans le sang et rejoignent les ganglions lymphatiques lors d'un stimulus inflammatoire. Elles sont spécialisées dans la production d'interféron de type I (IFN-α et β) et donc dans la réponse anti-virale (Colonna *et al.*, 2004). Elles expriment les protéines $B220^+$ et $LY6C^+$.
- Deux autres populations de cellules dendritiques dont les fonctions s'apparentent aux cellules NK ont récemment été découvertes : les natural killer DC (NKDC) et les IFN producing killer DC (IKDC). Les NKDC sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) capables d'exercer une fonction cytotoxique (Pillarisetty *et al.*, 2005). On les caractérise par le phénotype $CD11b^-DX5^+$ $NK1.1^+$. Les IKDC sont également des CPA douées de cytotoxicité. De plus, elles produisent de l'IFN-γ (Chan *et al.*, 2006).
- Enfin, des cellules dendritiques productrices d'oxyde nitrique et de TNF-α ont dernièrement été identifiées lors d'une infection par *Listeria monocytogenes* (Serbina *et al.*, 2003a, Serbina *et al.*, 2003b) ou *Brucella melitensis* (Copin *et al.*, 2007). Ces

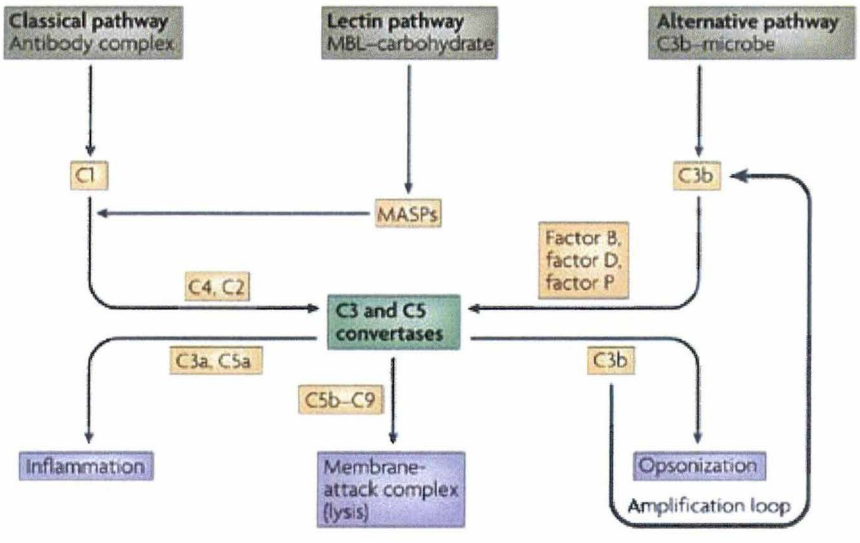


Figure 6. Le système du complément est constitué d'un ensemble de protéines plasmatiques produites par le foie. La plupart sont des protéases qui sont activées sur le site de l'infection par clivage protéolytique. Le complément est activé à la surface du pathogène selon trois voies distinctes. La voie classique, activée dans la plupart des cas par la liaison d'une lectine (C1q) à un complexe antigène/anticorps ; la voie de la lectine, activée par la liaison de la MBL (mannan binding lectin) aux résidus mannose à la surface du pathogène (Takahashi *et al.*, 2006) ; et la voie alternative, activée spontanément au contact du pathogène. Ces trois voies convergent lors de la formation des C3 et C5 convertases, deux enzymes assurant la production de médiateurs pro-inflammatoires, d'opsonines et la formation du complexe d'attaque membranaire (Kemper *et al.*, 2007).

cellules dendritiques, appelées TipDC (TNF/iNOS producing DC), présentent des similarités avec les macrophages activés qui produisent eux aussi ces deux molécules. Elles proviennent d'ailleurs du même précurseur dans la moelle osseuse et expriment les marqueurs $CD11b^+$ $CD11c^+$ $LY\text{-}6C^+$.

3. Réponse immunitaire adaptative

Unique aux vertébrés, le système immunitaire adaptatif est un « réseau cellulaire » dont les effecteurs sont les lymphocytes. On distingue les lymphocytes T et B, issus tous deux du même précurseur dans la moelle osseuse (fig 1). Ces deux types cellulaires subissent une maturation dans les organes lymphoïdes tels que le thymus pour les lymphocytes T et la moelle osseuse pour les lymphocytes B. Ils se distribuent ensuite dans les organes lymphoïdes secondaires : les ganglions lymphatiques et la rate.

Les lymphocytes B fournissent un mécanisme de défense en sécrétant des anticorps spécifiques aux pathogènes. Ces effecteurs protéiques permettent de neutraliser les toxines bactériennes et les virus, facilitent la phagocytose en opsonisant le pathogène, et activent la cascade du complément par la voie classique.

Les lymphocytes T se subdivisent en plusieurs sous-populations, caractérisées chacune par ses protéines de surface et ses mécanismes effecteurs. Les lymphocytes T cytotoxiques ($CD8^+$) induisent la lyse des cellules infectées, tandis que les lymphocytes T helper ($CD4^+$), au centre du réseau, orchestrent la mise en place de la réponse immunitaire. Ils activent et/ou recrutent les autres lymphocytes mais également les cellules de l'immunité innée et les cellules non immunitaires (cellules épithéliales, etc.) (Reiner, 2007). Une autre sous-population de lymphocytes T, les cellules T régulatrices ($CD4^+CD25^+$), maintient la tolérance au « soi » et empêche une réponse immunitaire excessive et destructrice pour l'organisme (Sutmuller *et al.*, 2006).

La mise en place de la réponse immunitaire adaptative nécessite l'activation d'une réponse immunitaire innée. En effet, les effecteurs de cette première réponse informent les lymphocytes T helper sur la nature et la localisation du pathogène, ce qui assure une réponse adaptée et spécifique à celui-ci. On comprend dès lors pourquoi l'établissement de la réponse adaptative nécessite plusieurs jours. Après l'élimination de l'infection, une partie des lymphocytes activés survit et se différencie en cellules mémoires spécifiques de l'antigène. Cette population de lymphocytes fournit une réponse plus rapide et plus efficace lors d'une seconde exposition à l'antigène (Saalmuller, 2006).

3.1. Spécificité de la réponse

Les systèmes de défense de l'immunité innée sont efficaces contre de nombreux pathogènes car ils reconnaissent des structures communes, conservées au cours de l'évolution. A l'opposé de ce système relativement peu flexible, le système immunitaire adaptatif a l'avantage de pouvoir distinguer chaque pathogène grâce à un répertoire de récepteurs antigéniques dont chacun a une spécificité unique. Cette spécificité est déterminée par des réarrangements de l'ADN survenant au cours de la maturation des lymphocytes. Ces processus aboutissent à la production de près de 10^{11} lymphocytes T et B exprimant des récepteurs antigéniques distincts (Fearon, *et al.*, 1996).

Les récepteurs des lymphocytes B (BCR) reconnaissent la conformation native de l'antigène, qui peut être une protéine, un sucre, un lipide ou un simple groupement chimique. Par contre, les récepteurs des lymphocytes T (TCR) ne peuvent reconnaître que des fragments

Nom	Sources	Cellules cibles	Fonctions
IL-1	Macrophages, cellules épithéliales	Macrophages, lymphocytes T	Activation des macrophages et des lymphocytes T
IL-6	Monocytes activés, fibroblastes, cellules endothéliales, cellules stromales de la moelle osseuse, lymphocytes B et T	Monocytes circulants (sang), lymphocytes T et B	Inflammation, médiateur de la réponse de phase aigue, croissance des lymphocytes T, maturation des lymphocytes B
IL-8	Monocytes activés, fibroblastes, cellules endothéliales	Neutrophiles, lymphocytes	Chimiotactisme, activation des neutrophiles, anti-inflammatoire
IL-12	Monocytes, macrophages et cellules dendritiques	Lymphocytes T, cellules NK	Stimule l'activité des cellules NK, induit la production d'IFN-γ, la prolifération cellulaire, induit la réponse Th1
TNF-α	Monocytes, macrophages, neutrophiles, lymphocytes TCD4+, cellules NK	Macrophages, cellules endothéliales	Activation des macrophages, pro-inflammatoire
IFN-α	Toutes les cellules, surtout les cellules dendritiques plasmacytoïdes	Toutes les cellules	Activité antivirale, activation des cellules NK, stimule l'expression du MHCI, module l'expression d'IFNγ et la maturation des cellules dendritiques
IFN-β			
IFN-γ	Lymphocytes T, B et cellules NK	Lymphocytes T, macrophages	Activité antivirale, antiparasitaire, immunomodulateur pour les lymphocytes T, active les macrophages

Tableau 2. Récapitulatif des principales cytokines citées dans cette introduction.

de l'antigène, présentés à la surface des cellules dendritiques (fig. 9). Issus d'une dégradation de l'antigène dans la cellule, ces fragments sont transportés, puis maintenus en membrane par un complexe protéique particulier, le MHC (complexe majeur d'histocompatibilité). Lorsque l'infection se solde par la présence d'antigènes dans le cytosol d'une cellule nuclée (par exemple lors d'une infection virale), la dégradation de ces antigènes génère des fragments qui sont présentés par un MHC dit de classe I. Par contre, lorsque l'antigène se retrouve dans une vésicule suite à son internalisation par une cellule phagocytaire, les fragments issus de sa dégradation sont présentés par un MHC dit de classe II (voir aussi encadré « *Polymorphisme du MHC* »).

3.2. Temps de latence

Activée par les composants de l'immunité innée, la réponse adaptative n'apparaît que plusieurs jours après le début de l'infection. Durant cette période, les cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules dendritiques capturent les antigènes en périphérie et migrent jusqu'aux ganglions lymphatiques où elles permettent l'activation des lymphocytes T et B. Ces populations lymphocytaires prolifèrent et rejoignent le site de l'infection par la lymphe et le système sanguin (Banchereau, *et al.*, 1998). Précédées par les étapes de maturation des cellules dendritiques, d'activation et de différenciation des lymphocytes T et B, le développement de la réponse immunitaire adaptative nécessite donc un certain temps (fig.10).

3.2.1. Maturation des cellules dendritiques

Durant leur migration jusqu'aux ganglions lymphatiques, les cellules dendritiques subissent un processus de maturation : elles perdent leur capacité de phagocytose et présentent l'antigène capturé en association avec le complexe du MHC. De plus, elles augmentent leur expression de molécules d'adhésion, assurant les interactions avec les autres cellules, et de molécules de costimulation, impliquées dans l'activation des lymphocytes T. Les récepteurs de cytokines sont eux aussi surexprimés durant cette maturation (Banchereau, *et al.*, 1998, Saalmuller, 2006).

3.2.2. Activation des lymphocytes T et B

Dans le ganglion lymphatique, lorsque la cellule dendritique porteuse de l'antigène rencontre un lymphocyte T, les deux cellules adhèrent l'une à l'autre, créant ce que l'on appelle une « synapse immunologique ». L'activation des lymphocytes T naïfs nécessite trois signaux essentiels (fig. 11) :

- Le premier est fourni par la reconnaissance spécifique du peptide présenté par le MHC par le récepteur du lymphocyte T et ses co-récepteurs (CD4 ou CD8).
- Le second est une molécule de costimulation exprimée à la surface de la cellule dendritique. En absence de ce second signal, le lymphocyte T est provisoirement inactivé et se trouve dans un état d'anergie, caractérisé par son incapacité à répondre à un nouveau signal. Ces deux signaux ne permettent cependant qu'une faible amplification clonale du lymphocyte T et celui-ci est dépourvu de fonctions effectrices.
- Un troisième signal est nécessaire pour stimuler la différenciation cellulaire adaptée à l'élimination du pathogène, il s'agit des cytokines produites par les cellules dendritiques (Abbas *et al.*, 2000).

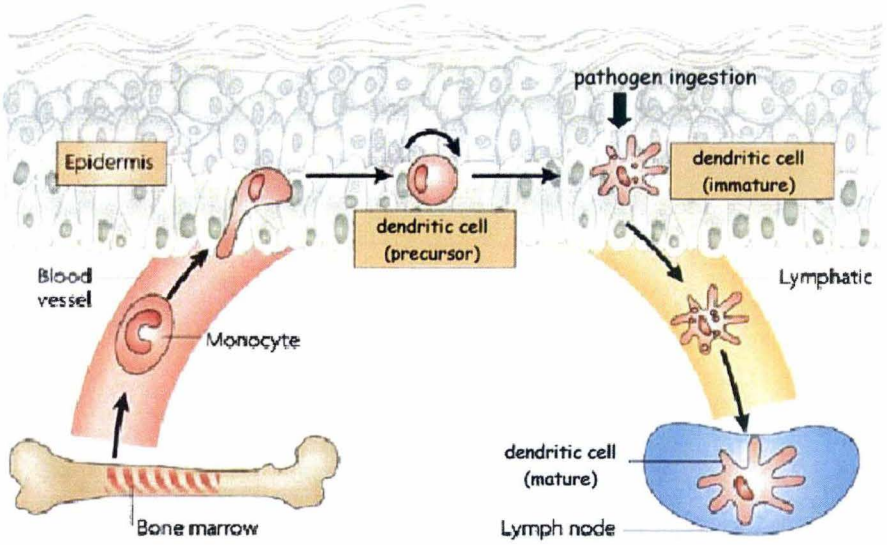
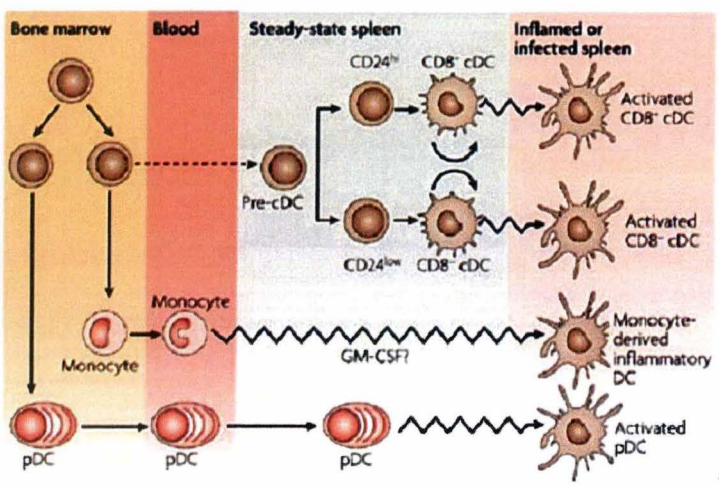


Figure 7. Développement et activation des cellules dendritiques. Les cellules dendritiques sont issues d'un précurseur commun dans la moelle osseuse. Elles résident dans les tissus périphériques (l'épiderme par exemple) et, lors de leur rencontre avec un pathogène, entament un processus de maturation durant lequel elles migrent vers les ganglions lymphatiques locaux. A cet endroit, elles pourront transférer leur « message » aux cellules du système immunitaire adaptatif (d'après Shortman *et al.*, 2007).



	CD8α	CD11b	CD11c	LY-6C	B220	iNOS
	+	−	+	−	−	−
	−	+	+	−	−	−
	−	++	+	+	−	+
	+	−	+	+	+	−

Figure 8. Les différentes sous-classes de cellules dendritiques. Issues des monocytes, les cellules dendritiques classiques reconnaissent les bactéries, virus, champignons, et sécrètent des cytokines proinflammatoires. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes détectent les virus et synthétisent de l'interféron de type I (α et β). Les NKDC (natural killer DC) sont des cellules dendritiques douées de cytotoxicité, tout comme les IKDC (IFN producing killer DC) qui produisent également de l'IFNγ. Enfin, les TipDC (TNF/iNOS producing DC) sont semblables aux macrophages activés qui produisent du TNF-α et expriment l'iNOS (d'après (Iwasaki *et al.*, 2004)).

Les lymphocytes B sont activés dans les ganglions lymphatiques de deux manières différentes. Certains antigènes possèdent la capacité intrinsèque d'activer les lymphocytes B par l'intermédiaire de leur récepteur (BCR), mais la plupart du temps, l'activation nécessite un second signal fournit par un lymphocyte T activé. Plusieurs autres signaux sont également requis. Ainsi, par l'intermédiaire de son BCR, le lymphocyte B doit avoir rencontré et phagocyté l'antigène. La présentation de ce dernier en MHC II permet l'interaction avec un lymphocyte T activé qui fournit à son tour un signal de costimulation. Les cytokines sécrétées par le lymphocyte T induisent la différenciation et la prolifération des lymphocytes B, ainsi que leur production d'anticorps de haute affinité suite à des processus de switch isotypique et d'hypermutations somatiques (McHeyzer-Williams *et al.*, 2005, Okada *et al.*, 2006).

3.2.3. Différenciation des lymphocytes T

La différenciation des lymphocytes T est en grande partie dictée par les informations fournies par la cellule dendritique. Comme dit précédemment, selon la localisation de l'antigène rencontré, l'information sera présentée en MHC I ou II.

Le MHC I est typiquement reconnu par les lymphocytes T $CD8^+$ (via leur TCR). En présence des signaux adéquats (voir ci-dessus), cette interaction induit la différenciation du lymphocyte en cellule cytotoxique provoquant soit l'apoptose de la cellule infectée, soit sa lyse par libération du contenu de ses granules cytoplasmiques (perforine, granzyme, granulysine) (Henkart, 1994).

Le MHC II est quant à lui reconnu par les lymphocytes T $CD4^+$ et, en fonction des molécules de costimulation et des cytokines produites par la cellule présentatrice de l'antigène, induit leur différenciation en lymphocyte T helper (Abbas, *et al.*, 2000). Les lymphocytes T helper peuvent se différencier en plusieurs lignées cellulaires, chacune dotée de fonctions effectrices différentes (fig. 12). Dans les années 1980, deux lignées de lymphocytes T helper furent identifiées sur base de leur production de cytokines : les cellules Thelper (Th)1 et Th2. C'est à cette époque que l'on prit conscience que la nature variée de la réponse immunitaire était liée à la maturation des lymphocytes T (Mosmann *et al.*, 1986). Récemment, on a également découvert une troisième lignée de lymphocytes Thelper, les Th17 (Cua *et al.*, 2003).

- Les cellules Th1 assurent la défense contre les pathogènes intracellulaires (virus, bactéries, protozoaires) et sont caractérisées par leur production d'IFNγ. Cette cytokine est notamment un puissant activateur des macrophages.
- A l'opposé des cellules Th1, les cellules Th2 permettent l'élimination des infections parasitaires grâce à leur production d'IL-4, IL-5 et IL-13. Ces cytokines proinflammatoires recrutent les éosinophiles et les mastocytes, induisent la production de mucus (qui facilite l'expulsion du parasite) et activent la production d'anticorps IgE par les lymphocytes B (Prussin *et al.*, 2006).
- De récentes études ont identifié une troisième lignée de lymphocytes T helper, les cellules Th17 (Cua, *et al.*, 2003, Murphy *et al.*, 2003). Leur rôle serait de réguler la réponse immunitaire envers les bactéries extracellulaires par leur production de cytokines pro-inflammatoires : l'IL-17, IL-6 et TNF-α. L'IL-17, qui a donné son nom à cette troisième lignée cellulaire, stimule la production d'autres cytokines proinflammatoires et chimiokines (IL-6, IL-8, etc.) par les cellules épithéliales, endothéliales et les fibroblastes. Elle permet également le recrutement des neutrophiles (Aggarwal *et al.*, 2003). Ces cellules agiraient donc au niveau des

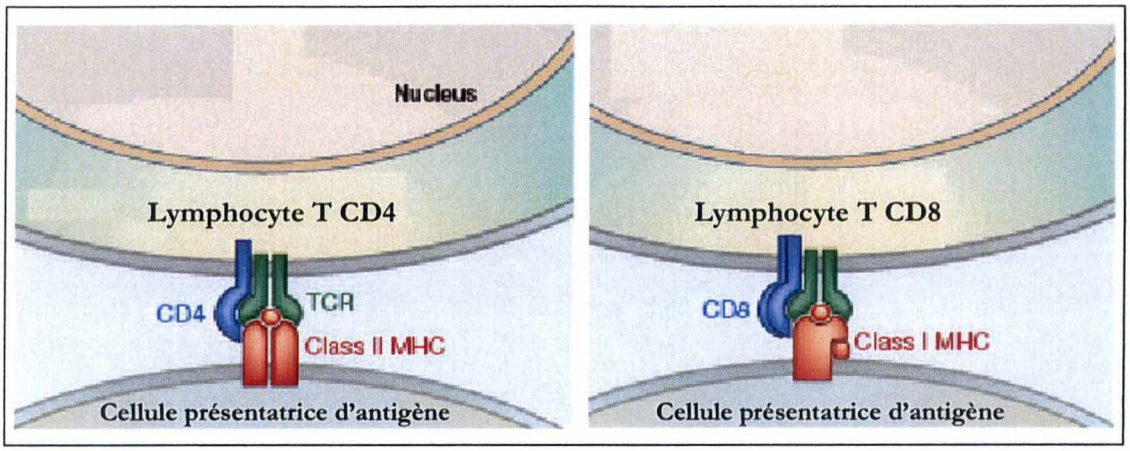


Figure 9. Les lymphocytes T reconnaissent des fragments peptidiques présentés par les molécules du MHC I ou II à la surface d'une cellule présentatrice d'antigène (CPA). Ces fragments peptidiques sont issus de la dégradation de l'antigène dans l'CPA. Ils sont présentés par un MHC I lorsque les antigènes sont présents dans le cytosol de la cellule nuclée, ou par un MHC II lorsque l'antigène est confiné dans une vésicule suite à son internalisation par une cellule phagocytaire. Cette présentation distincte des antigènes informe l'immunité adaptative sur la nature des pathogènes (TCR : T Cell Receptor, lymphocyte TCD4 : helper, lymphocytes TCD8 : cytotoxique).

Polymorphisme du MHC

Chaque MHC peut reconnaître et fixer un nombre limité de fragments antigéniques, en fonction de leurs caractéristiques structurales. De ce fait, chaque individu synthétise plusieurs complexes MHC différents, chacun capable de reconnaître une série de peptides. Les protéines du MHC sont encodées dans une région du génome du même nom, composée d'environ 15 gènes différents, dont la plupart sont très polymorphes. A ce jour, on a identifié plus de 500 allèles différents des gènes du MHC. Il est donc peu probable que deux individus possèdent la même combinaison d'allèles du MHC. De plus, personne ne peut exposer efficacement tous les peptides possibles, c'est sans doute la principale raison de la sensibilité variable des individus aux maladies infectieuses.

surfaces épithéliales où elles fourniraient un mécanisme de défense envers les bactéries extracellulaires (Reiner, 2007).

Un dysfonctionnement de ces réponses peut mener à des inflammations chroniques ou à des allergies et de l'asthme (Harrington *et al.*, 2006, Reiner, 2007).

L'information apportée par le système immunitaire inné joue un rôle essentiel dans la différenciation de ces types cellulaires. L'IL-12 produit par les cellules présentatrices d'antigène induit la différenciation en cellules Th1, tandis que l'IL-4, dont l'origine est moins claire, induit une réponse de type Th2. Enfin, la différenciation des cellules Th17 serait induite par la présence d'IL-6 et de TGF-β (Mangan *et al.*, 2006).

Théoriquement, ces différentes réponses s'excluent mutuellement (fig. 13). Ainsi, le TGF-β supprime la différenciation des cellules Th1 et Th2, tandis que l'IFNγ produit par les cellules Th1 inhibe la différenciation des cellules Th2 et Th17. Enfin, l'IL-4 empêche la formation des cellules Th17 et Th1 (Harrington, *et al.*, 2006). Cependant la réponse immunitaire qui est mise en place n'est pas aussi exclusive. On observe souvent une coexistence des différents types de lymphocytes Thelper.

3.2.4. Elimination du pathogène : l'adaptatif renforce l'inné

Durant les premiers jours suivant l'infection, la réponse immunitaire innée joue un rôle crucial dans le contrôle de l'agent pathogène. Ses mécanismes effecteurs, bien que peu spécifiques aux pathogènes, assurent généralement l'élimination de ceux-ci. La réponse immunitaire adaptative est mise en place lorsque le contrôle des pathogènes a échappé au système immunitaire inné. Cette réponse, dirigée spécifiquement contre le pathogène, permet non seulement sa destruction, mais également l'établissement d'une mémoire immunologique conférant une solide protection lors d'une réinfection (fig. 14).

Outre les lymphocytes T cytotoxiques capables de tuer directement les cellules infectées, la majorité des effecteurs du système immunitaire adaptatif agissent en renforçant la réponse immunitaire innée.

- Les cytokines produites par les lymphocytes T activés renforcent les mécanismes destructeurs de l'immunité innée. Par exemple l'IFNγ, produit par les lymphocytes Th1 lors d'une infection intracellulaire, active les mécanismes bactéricides des macrophages, stimule la présentation des antigènes en MHC I et II, participent au recrutement des autres lymphocytes, etc. (Boehm *et al.*, 1997).
- Les cellules de l'immunité innée possèdent des récepteurs membranaires reconnaissant une portion protéique (Fc) des anticorps. Ainsi, la reconnaissance des pathogènes par les cellules phagocytaires est facilitée lorsque ceux-ci sont recouverts d'anticorps (fig.15). De plus, les anticorps fixés aux pathogènes sont reconnus par la lectine C1q (voie classique du complément), ce qui active la cascade du complément. Enfin, bien que dépourvues de spécificité pour l'antigène, les cellules NK peuvent détruire spécifiquement les cellules infectées par un virus. En effet, les cellules infectées expriment des protéines virales en membrane qui sont les cibles des anticorps. La cellule recouverte d'anticorps est finalement détectée via le récepteur Fc des cellules NK puis détruite. On appelle ce phénomène la « cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps » (Janeway *et al.*, 2003).

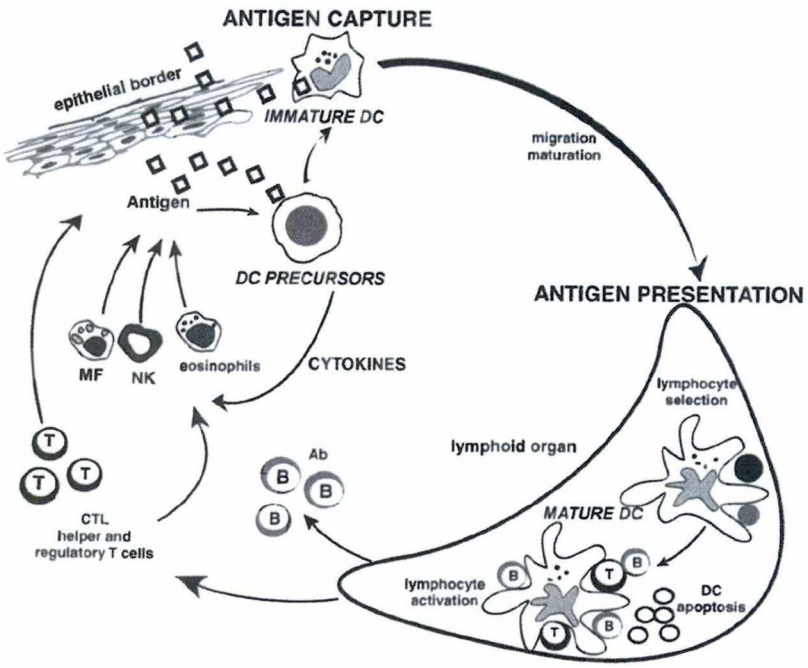


Figure 10. La mise en place d'une réponse immunitaire adaptative prend du temps (Banchereau *et al.*, 2000). Après la capture de l'antigène dans les tissus périphériques, la cellule dendritique migre jusqu'aux ganglions lymphatiques où elle présente les antigènes aux lymphocytes T. Une fois activés, les lymphocytes Thelper rejoignent le site d'infection où ils sécrètent des cytokines permettant l'activation des macrophages, cellules NK et éosinophiles. Les lymphocytes T cytotoxiques lysent quant à eux les cellules infectées. Les lymphocytes B sont activés dans le ganglion lymphatique au contact des lymphocytes T activés. Ils migrent ensuite dans les tissus où ils se transforment en cellules productrices d'anticorps, les plasmocytes.

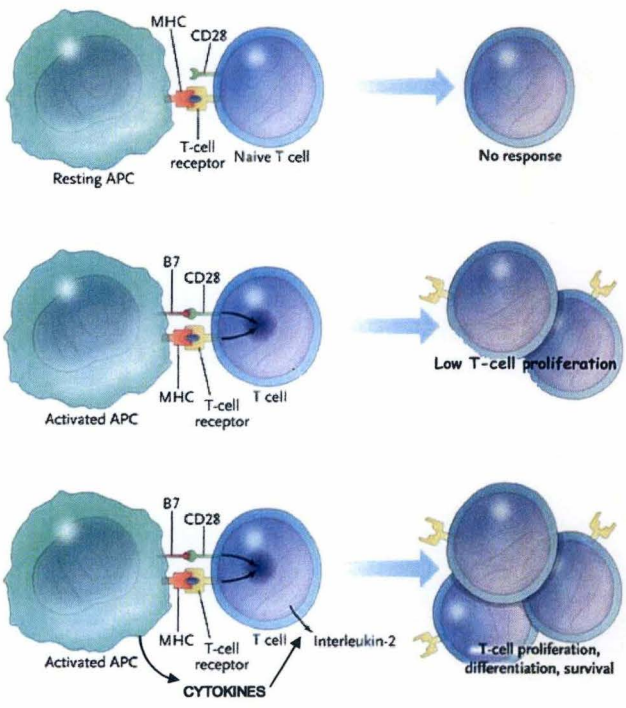


Figure 11. L'activation des lymphocytes T requiert trois signaux. En présence du seul signal antigénique (MHC/T-cell receptor), le lymphocyte T ne peut être activé et entre dans un état d'anergie, c'est-à-dire qu'il est temporairement réfractaire à toute nouvelle activation. Si un signal costimulateur (B7/CD28) est également perçu, le lymphocyte T présente une faible amplification clonale, mais est dépourvu de fonction effectrice. L'activation réelle n'aura lieu que si un signal de différenciation (les cytokines) est fourni.

3.3. Création d'une mémoire immunologique

Le système immunitaire adaptatif est caractérisé par sa capacité à développer une mémoire immunologique. Cette mémoire est protectrice lorsqu'elle permet au système immunitaire de répondre avec une efficacité accrue lors d'un contact ultérieur avec le même pathogène. La réponse développée, dite secondaire, bénéficie de mécanismes effecteurs hautement spécifiques et ne requiert plus la différenciation et l'expansion clonale des cellules immunitaires. Les lymphocytes T et B mémoires sont issus des lymphocytes activés et résident dans les tissus, les ganglions lymphatiques ou la moelle osseuse.

3.3.1. Lymphocytes T mémoire

Sur base des récepteurs exprimés par les lymphocytes T mémoire, on subdivise cette population en deux groupes distincts, l'un assurant une mémoire centrale dans les ganglions lymphatiques (T_{CM}), l'autre maintenant une mémoire périphérique dans les tissus (T_{EM}) (Sallusto *et al.*, 1999) (fig. 16).

- Au sein des ganglions lymphatiques, une partie des lymphocytes T activés acquiert les caractéristiques des cellules mémoire et exprime le récepteur CCR7 (CCR7+). Ce récepteur reconnaît la chimiokine CCL21 sécrétée par les cellules endothéliales des veinules post-capillaires dans les ganglions lymphatiques. Etant piégés dans les organes lymphoïdes, ces lymphocytes T constituent la mémoire centrale et sont désignés par le terme T_{CM} (central memory T cell). Les cellules T_{CM} n'exercent pas de fonctions inflammatoire ou cytotoxique mais, lors d'une seconde exposition à l'antigène, elles stimulent efficacement les cellules dendritiques et les lymphocytes B, générant ainsi une nouvelle vague de cellules effectrices.
- Parmi les lymphocytes T effecteurs qui ont migré dans les tissus (CCR7-), une fraction de cellules se différencie en lymphocytes T mémoire, tandis que les autres cellules sont détruites par apoptose après l'infection. On parle alors de mémoire périphérique. Ces cellules peuvent rapidement initier une réponse inflammatoire ou cytotoxique et sont dès lors désignées par le terme T_{EM} (effector memory T cells) (Sallusto, *et al.*, 1999).

3.3.2. Lymphocytes B mémoire

Au cours de la réponse immunitaire, les lymphocytes B subissent un remaniement complet de leur récepteur (BCR) par des processus appelés « hypermutations somatiques ». Seuls les lymphocytes dont le BCR présente un gain d'affinité pour l'antigène sont sélectionnés positivement, les autres sont éliminés par apoptose. Capables de sécréter des anticorps de haute affinité, ces lymphocytes sont conservés pour former une population distincte de lymphocytes B mémoire. Une partie de ces cellules resteront à l'état quiescent, prêtes à répondre lors d'une réinfection, tandis qu'une autre partie continuera à produire continuellement des anticorps de haute affinité. L'existence de précurseurs de lymphocytes B et la présence continue d'anticorps de haute affinité dans le sérum fournit une protection immunitaire à long terme envers un antigène particulier (McHeyzer-Williams *et al.*, 2006).

3.3.3. Comment tirer profit de la mémoire immunologique ? ... la vaccination

La vaccination utilise la propriété du système immunitaire à développer une mémoire immunologique. En effet, par l'administration d'un agent extérieur, la vaccination a pour but

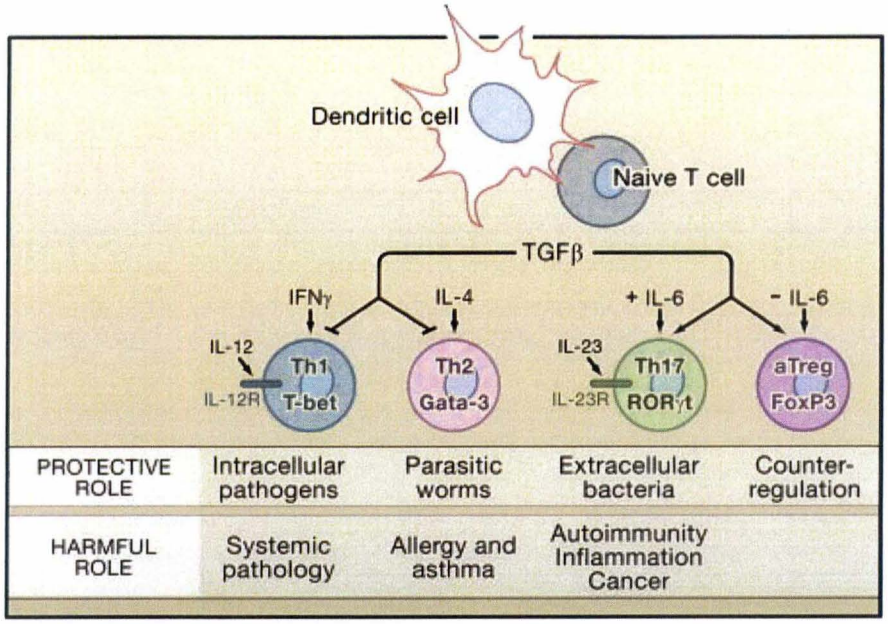


Figure 12. Différenciation des lymphocytes Thelper (Reiner, 2007). La différenciation du lymphocyte Thelper est initiée par le signal délivré par la cellule dendritique dans les ganglions lymphatiques. Les cytokines produites par ces cellules dendritiques jouent un rôle important dans le destin des lymphocytes Thelper. L'IL-12 induit la différenciation des cellules Th1 et l'IL-4 celle des Th2. Enfin, la différenciation des cellules Th17 serait induite par le TGF-β et l'IL-6. En absence d'IL-6, le TGF-β induit la différenciation des cellules T régulatrices induites (aTreg). Chaque type cellulaire peut être caractérisé par l'expression d'un facteur de transcription particulier : T-bet, Gata-3 et RORγt sont exprimés par les cellules Th1, Th2 et Th17 respectivement. Ces différentes lignées cellulaires jouent des rôles distincts dans la protection immunitaire, et leur disfonctionnement peut être à l'origine d'une pathologie plus ou moins grave.

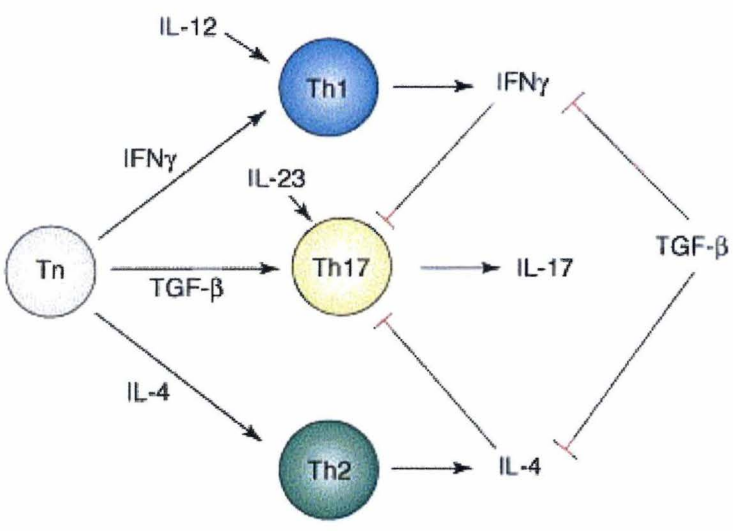


Figure 13. Les différentes réponses lymphocytaires s'excluent mutuellement (Harrington *et al.*, 2006). Les cytokines effectrices sécrétées par les cellules Th1 et Th2, l'IFNγ et l'IL-4 respectivement, inhibent le développement des cellules Th17. Le TGF-β, requis pour la différenciation des cellules Th17, bloque la production d'IFNγ et d'IL-4 par les lymphocytes Th1 et Th2 respectivement.

de conférer une protection contre un agent infectieux spécifique en induisant le développement d'une mémoire immunitaire. L'agent extérieur qu'on inocule, c'est-à-dire le vaccin, existe sous différentes formes. Il peut s'agir d'un vaccin vivant atténué, mort (ou inactivé) ou sous-unitaire (Janeway, *et al.*, 2003) :

- Les vaccins vivants atténués proviennent de souches vivantes ayant perdu leur caractère infectieux suite à divers traitements. Le développement de ce type de vaccin est généralement réalisé en induisant des mutations ou des délétions de gènes clés dans la virulence, ou en cultivant le pathogène sur les cellules d'une espèce différente. Ces procédés n'excluent donc pas que le pathogène puisse retrouver sa virulence. De plus, les individus immunodéprimés présentent un risque accru à ce type de vaccin.

  Cependant, il s'agit du seul moyen pour fournir des informations complètes au système immunitaire. En effet, la localisation physiologique du pathogène chez son hôte, sa multiplication naturelle, la réponse inflammatoire induite et la persistance des antigènes sont des éléments clés pour le développement d'une réponse immunitaire complète, comprenant l'établissement d'une mémoire immunitaire.

- Les vaccins morts, développés à partir de pathogènes vivants que l'on tue à la chaleur ou au formol, permettent d'éviter les risques de virulence tout en conservant l'ensemble des antigènes. Cependant, ce type de vaccin est moins efficace, car il ne renseigne pas le système immunitaire sur la localisation physiologique normale du pathogène et son cycle infectieux. De plus, l'absence de multiplication du pathogène conduit à la disparition rapide des antigènes. Il est donc nécessaire d'administrer des doses supérieures de vaccin, menant à une toxicité et une réponse inflammatoire locale importante. Dans certains cas, les vaccins morts doivent être accompagnés d'un adjuvant, c'est-à-dire une substance capable d'augmenter l'immunogénicité des antigènes.

- Les vaccins sous-unitaires ne présentent aucun risque infectieux car ils sont constitués de diverses sous-unités du pathogène, obtenues par purification ou génie génétique (vaccin recombinant). Cependant, le choix des antigènes capables d'induire une protection immunologique s'avère souvent complexe. En général, les antigènes seuls n'induisent pas une réponse immunitaire suffisante, on dit qu'ils sont peu immunogènes. Ils doivent donc être accompagnés d'un adjuvant. Enfin, comme aucune information n'est fournie au système immunitaire par le cycle infectieux, certaines méthodes permettent de cibler l'antigène dans un environnement précis. Ainsi, la vaccination ADN permet l'expression d'antigènes dans le cytoplasme cellulaire par exemple.

3.4. Régulation de la réponse immunitaire

Le système immunitaire des organismes vivants a évolué de manière à pouvoir faire la distinction entre le « soi » et le « non soi ». En effet, la tolérance au soi est une condition essentielle pour éviter les phénomènes d'auto-immunité. Les mécanismes de reconnaissance utilisés par le système immunitaire inné posent peu de problèmes de tolérance car les motifs reconnus (PAMPs) sont uniques aux pathogènes. Cependant, le répertoire de récepteurs utilisé par le système adaptatif est généré de façon aléatoire et peut de ce fait reconnaître une large variété d'antigènes, dont certains appartiennent au soi. Dès lors, il existe des mécanismes de sélection des lymphocytes pour éviter le développement de réactions auto-immunes (Jiang *et al.*, 2006).

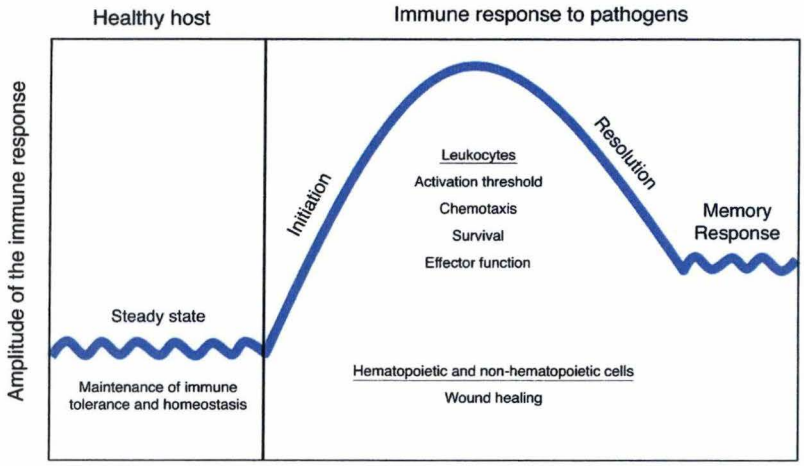


Figure 14. Déroulement de la réponse immunitaire. Lors d'un premier contact avec un pathogène donné, la réponse immunitaire initiée est caractérisée par une certaine amplitude. Elle inclut l'activation des divers effecteurs de l'immunité innée et adaptative, permettant de la sorte la résolution de l'infection. Durant cette première réponse, une mémoire immunologique est mise en place et permet, lors d'une exposition ultérieure au même pathogène, une élimination quantitativement et qualitativement plus efficace de ce dernier. La réponse immunitaire passe donc bien souvent inaperçue.

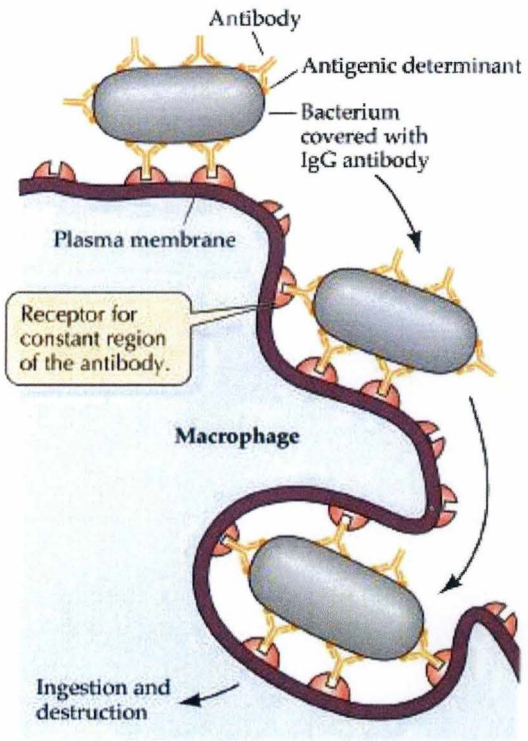


Figure 15. L'opsonisation du pathogène par les anticorps facilite sa phagocytose et sa destruction (Sinauer Associates, Inc., 1998). Les cellules de l'immunité innée possèdent des récepteurs membranaires reconnaissant la portion protéique Fc des anticorps. Les bactéries opsonisées par des anticorps sont donc détectées et phagocytées plus efficacement.

3.4.1. Tolérance centrale

Le premier mécanisme permettant la tolérance au soi s'opère dans la moelle osseuse et le thymus et élimine près de 95% des lymphocytes T immatures. On parle de la « tolérance centrale ». Durant ce processus, des cellules dendritiques particulières présentent des antigènes du soi aux lymphocytes immatures dans le thymus. Les lymphocytes dont le récepteur (TCR) reconnaît faiblement l'antigène du soi présenté par la cellule dendritique sont sélectionnés positivement. Par contre, ceux qui reconnaissent le soi avec une forte affinité sont éliminés par apoptose (Medzhitov *et al.*, 2002).

3.4.2. Tolérance périphérique

La délétion des lymphocytes immatures spécifiques du soi est insuffisante pour prévenir le développement de réactions auto-immunes. Il existe donc des mécanismes de « tolérance périphérique » agissant sur les lymphocytes matures : les signaux costimulateurs dont il a déjà été question ci-dessus (*3.2.2.*), les cellules T régulatrices et la production de cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10.

Cellules T régulatrices

Les cellules T régulatrices (Tregs) représentent 5 à 15% des lymphocytes T $CD4^+$ circulants. Sur base de leur développement, on distingue deux types de Tregs : les cellules Tregs naturelles et les cellules Tregs induites ou adaptatives (fig 17.).

- Les cellules Tregs naturelles sont produites dans le thymus et représentent une population distincte des autres lymphocytes. Ces cellules sont caractérisées par l'expression du récepteur de l'IL-2 (CD25) en membrane, du facteur de transcription forkhead box protein 3 (FoxP3) ainsi que par la production d'IL-10 (Miyara *et al.*, 2007). Contrairement aux lymphocytes T conventionnels, qui induisent l'expression de CD25 de façon transitoire après leur activation, les cellules Tregs naturelles maintiennent continuellement cette expression (Bluestone *et al.*, 2003). Elles sont présentes en permanence et assurent le maintien de la tolérance au soi.
- Les cellules Tregs induites sont produites à partir d'un lymphocyte T naïf, dans un environnement de cytokines particulier. Le niveau d'expression de CD25 par ces cellules est variable (Bluestone, *et al.*, 2003). Il en existe plusieurs sous-populations, dont les principales sont les cellules T régulatrices 1 (Tr1), sécrétrices d'IL-10 et les cellules T helper (Th)3, sécrétrices de transforming growth factor (TGF)-β. Cette cytokine régule le recrutement, l'activation et la survie des lymphocytes, cellules NK, monocytes et granulocytes (Li *et al.*, 2006). De nombreuses études suggèrent qu'il serait également capable d'induire la conversion des lymphocytes T naïfs en cellules T régulatrices FoxP3+ (Chen *et al.*, 2003).

Par le biais de la sécrétion d'IL-10 et de TGF-β, l'activité immunosuppressive des cellules Tregs assure le maintien de la tolérance périphérique, mais permet également de moduler l'amplitude de l'inflammation induite lors d'une infection. Un autre mécanisme, faisant intervenir la molécule CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4) exprimée par les cellules Tregs, pourrait inhiber les lymphocytes T effecteurs de manière « contact-dépendant ». Ces cellules sont donc impliquées dans le contrôle d'un large spectre de réponses immunitaires, comprenant celles dirigées contre les pathogènes, les cellules tumorales, les allergènes, les organes transplantés, ainsi que le fœtus durant la grossesse (pour revue :(Miyara, *et al.*, 2007)). En supprimant la sécrétion de cytokines et la prolifération des cellules T effectrices, les cellules Tregs empêchent le développement d'une réponse

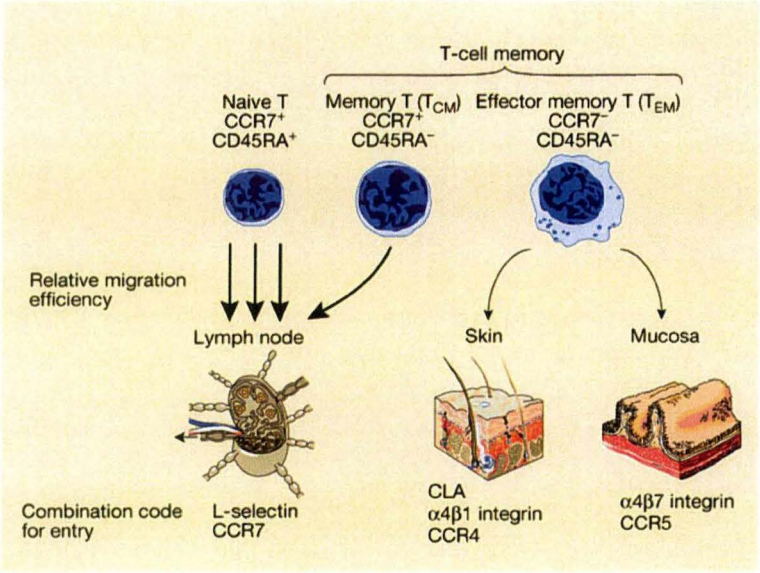


Figure 16. Les lymphocytes T mémoires se subdivisent en deux populations cellulaires : les cellules T_{CM} (mémoire centrale) et T_{EM} (mémoire périphérique) (Sallusto *et al.*, 1999). Les lymphocytes T naïfs ($CCR7^+$ $CD45RA^+$) et T_{CM} migrent vers les ganglions lymphatiques où ils pénètrent efficacement grâce à la liaison d'une de leur molécule d'adhésion, la L-sélectine, à un récepteur présent sur l'endothélium des veinules post-capillaire du ganglion. Les lymphocytes T naïfs et T_{CM} demeurent dans le ganglion car ils expriment le récepteur (CCR7) d'une chimiokine hautement concentrée dans le ganglion (CCL21). La perte de ce récepteur les autorise à migrer dans les tissus périphériques (cas des lymphocytes T_{EM}).

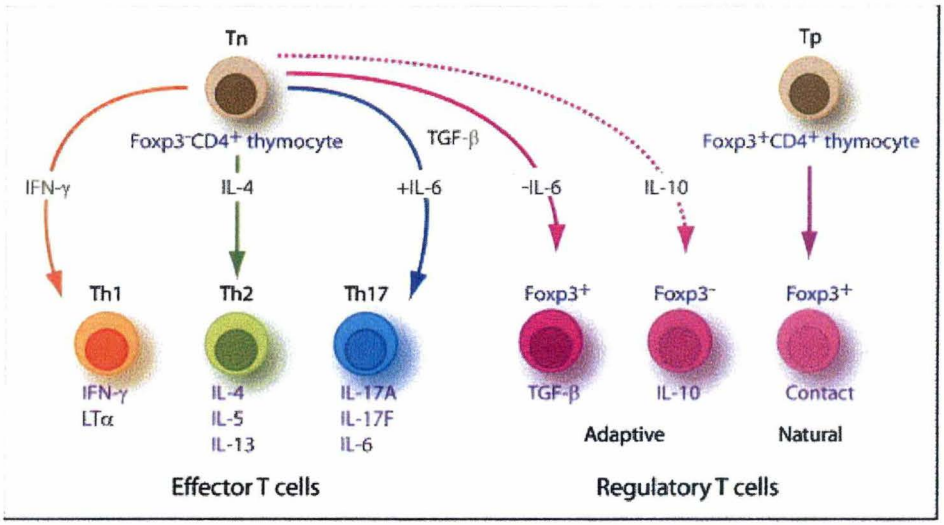


Figure 17. Les cellules T régulatrices proviennent de précurseurs distincts (Weaver *et al.*, 2006). Les cellules Tregs naturelles proviennent du thymus (Tp) et forment une population distincte. Elles exerceraient leur activité suppressive selon un mécanisme contact-dépendant. Les cellules Tregs adaptatives sont issues d'un lymphocyte T naïf (Tn) et se différencient en fonction des cytokines présentent dans leur environnement. Celles qui sécrètent de l'IL-10 sont appelées Trégulatrices 1, tandis que celles qui produisent du TGF-β portent le nom de cellules Th3.

inflammatoire exacerbée, dont les effets pourraient causer de graves dommages. En effet, il a été observé que lorsqu'on supprimait leur activité, des maladies auto-immunes se développaient (Sutmuller, *et al.*, 2006). De récentes études sur *Leishmania major* suggèrent que la modulation de la réponse inflammatoire par les Tregs permettrait de prolonger la persistance de l'infection (Belkaid *et al.*, 2002).

L'IL-10, cytokine immunosuppressive

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire exerçant ses effets sur la majorité des cellules hématopoïétiques (fig.18). Produite par les cellules Tregs, lymphocytes T effecteurs, macrophages, etc., elle supprime indirectement la production de cytokines et la prolifération des lymphocytes $TCD4^+$ en inhibant la présentation des antigènes par les cellules dendritiques et les macrophages. Cette cytokine interfère également avec les activités bactéricides des macrophages en empêchant l'expression de certains gènes induits par la stimulation des PRRs. Malgré ces effets suppresseurs, l'IL-10 peut stimuler la prolifération et l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8+. Enfin, cette cytokine a un effet anti-apoptotique sur les lymphocytes B et est impliqué dans le switch isotypique[1] (Moore et al., 2001).

B. LE GENRE *BRUCELLA*

1. Généralités

1.1. Historique

La brucellose a été décrite pour la première fois en 1861, sur l'île de Malte, par un médecin anglais nommé Marston. En 1887, David Bruce isola la bactérie responsable de la maladie (*Micrococcus melitensis*) à partir de la rate d'un soldat décédé. Le germe reçut le nom de *Brucella melitensis* en son honneur. De par son origine, la brucellose est également appelée fièvre de Malte (Godfroid *et al.*, 2005). Touchant plus de 500 000 personnes chaque année de par le monde (fig 19), cette maladie est une des cinq zoonoses[2] bactériennes les plus communes (Cutler *et al.*, 2005, Pappas *et al.*, 2006).

1.2. Taxonomie

La brucellose est une maladie infectieuse causée par des bactéries du genre *Brucella*. Celles-ci sont des microorganismes de type coccobacilles à Gram négatif, appartenant à la sous-classe α-2 des protéobactéries. Cette sous-classe regroupe des bactéries qui ont co-évolué avec leurs hôtes animaux ou végétaux, aussi bien dans une relation symbiotique (*Sinorhizobium meliloti*) que pathogène (*Brucella spp., Agrobacterium tumefaciens, Rickettsia spp., Bartonella spp.*). *Brucella*, en tant que pathogène des cellules mammaliennes,

---

[1] **Switch isotypique :** les premiers anticorps produits durant la réponse immune sont les IgM, mais les cellules B activées subissent ensuite le switch isotypique pour sécréter des anticorps de différentes classes : IgG, IgA, IgE. Ce switch se produit par recombinaison de l'ADN et change les fonctions effectrices des anticorps.

[2] **Zoonose :** Maladie infectieuse ou parasitaire, qui se transmet naturellement des animaux vertébrés à l'homme.

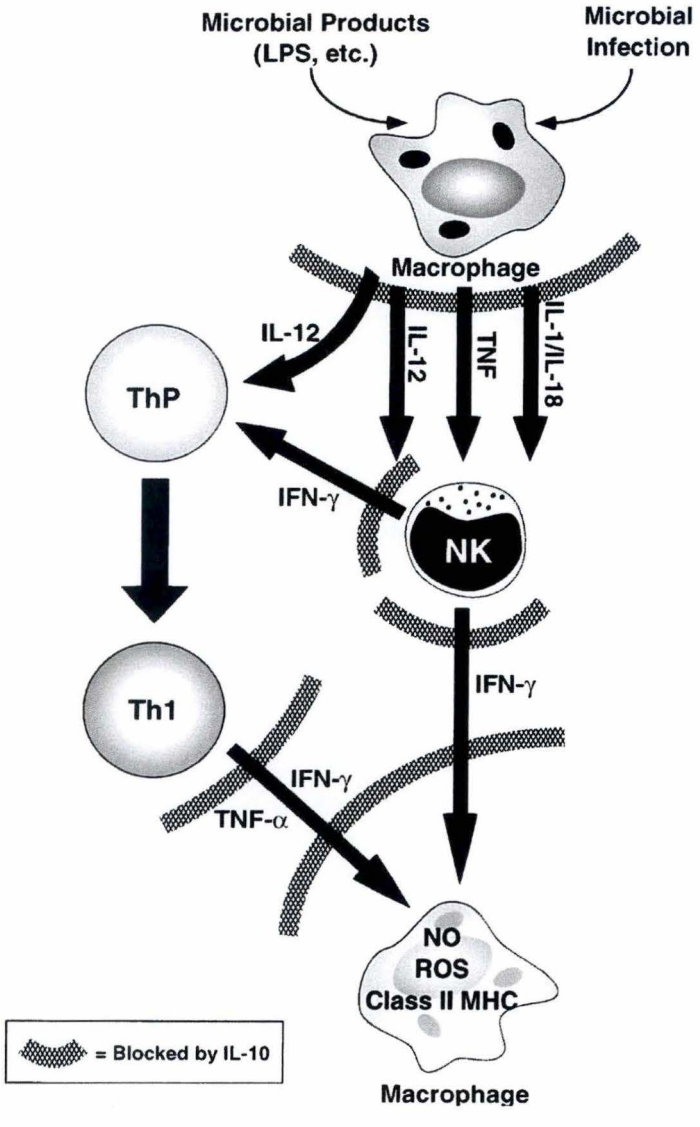


Figure 18. L'IL-10, produite par les cellules T régulatrices, Th1, Th2 et d'autres cellules non lymphoïdes telles que les macrophages est une cytokine anti-inflammatoire (Moore *et al.*, 2001). Lorsque le macrophage détecte la présence de pathogènes, il envoie des signaux solubles aux autres composants de l'immunité innée (ici les cellules NK) et aux effecteurs de l'immunité adaptative (les lymphocytes Thelper, ici le précurseur ThP). En retour, les effecteurs nouvellement activés renforcent les activités bactéricides des macrophages infectés par leur production d'IFNγ. L'IL-10 intervient à plusieurs niveaux de ce processus. Il inhibe la production d'IL-1, IL-18, IL-12 et TNF par le macrophage infecté, mais également la production de chimiokines pro-inflammatoires impliquées dans le recrutement des monocytes, cellules dendritiques, neutrophiles et lymphocytes T. Enfin, en inhibant la synthèse d'IFNγ et de TNF, il diminue la production d'oxyde nitrique (NO) et des dérivés toxiques de l'oxygène (ROS). Il inhibe également la présentation des antigènes en MHC II, ce qui affecte de manière significative l'activation des lymphocytes Thelper.

représente un bon exemple de cette co-évolution, comme le démontre son excellente adaptation à l'environnement intracellulaire (Celli, 2006).

Selon la pathogénicité, la préférence d'hôte et les caractéristiques biochimiques de la bactérie, le genre *Brucella* peut être divisé en six espèces. *Brucella melitensis*, la plus virulente pour l'homme, présente un tropisme pour les chèvres et les moutons, *B. abortus* pour les bœufs, *B. suis* pour les porcs, *B. ovis* pour les moutons, *B. canis* pour les chiens et *B. neotomae* pour les rats du désert (Cutler, *et al.*, 2005). Cette classification n'inclut pas *B. maris*, découverte il y a dix ans chez les mammifères marins (Jahans *et al.*, 1997).

2. Pathologie

2.1. Mode d'infection

Brucella peut infecter son hôte par différentes voies. Chez l'homme, l'infection se produit généralement via l'ingestion de lait non pasteurisé ou de produits laitiers provenant d'animaux infectés. *Brucella* peut également pénétrer par les muqueuses ou par une lésion de la peau. Elle peut aussi être inhalée lors de la production d'aérosols par exemple. A cause de sa grande infectivité, *Brucella* est considérée comme un agent potentiel de bioterrorisme (Godfroid, *et al.*, 2005). En effet, il suffit de moins de cinq bactéries de l'espèce *B. melitensis* pour infecter l'homme (Moreno *et al.*, 2006).(pour la brucellose animale, voir (Godefroid *et al.*, 2003)).

2.2. Symptômes

La brucellose humaine est une maladie multiphasique. Après une première phase aigue, caractérisée par une asthénie et une fièvre ondulante, on observe la formation de foyers infectieux pouvant être ostéo-articulaires, neurologiques, hépatiques, génitaux ou cardiaques. En absence de traitements, la maladie devient chronique et se caractérise par des complications (ostéomyélite, endocardite valvulaire, etc.) et la persistance de la bactérie dans les cellules du système réticulo-endothélial (foie, rate, tissus osseux, organes génitaux, etc.) (Alp *et al.*, 2006). *Brucella* présente un tropisme particulier pour les cellules trophoblastiques et peut donc causer l'avortement chez la femme enceinte (Ariza *et al.*, 1995).

2.3. Traitements

La brucellose humaine est généralement traitée par une combinaison de deux antibiotiques afin d'éviter l'apparition de mécanismes de résistance. La combinaison doxycycline/rifampicine est recommandée par l'OMS depuis 1986. Cependant de nombreuses études sont en cours, visant à améliorer l'efficacité du traitement en combinant d'autres antibiotiques tels que la streptomycine ou la gentamycine (Ariza, *et al.*, 1995, Karabay *et al.*, 2004, Solera *et al.*, 1997, Solera *et al.*, 1995). Il n'existe à ce jour aucune prophylaxie vaccinale acceptée.

3. Modèle expérimental

Le caractère chronique de la brucellose provient de l'aptitude de *Brucella* à gagner l'environnement intracellulaire des cellules mammaliennes pour s'y multiplier, ceci sans perturber le fonctionnement normal la cellule hôte ni même induire son apoptose (Celli,

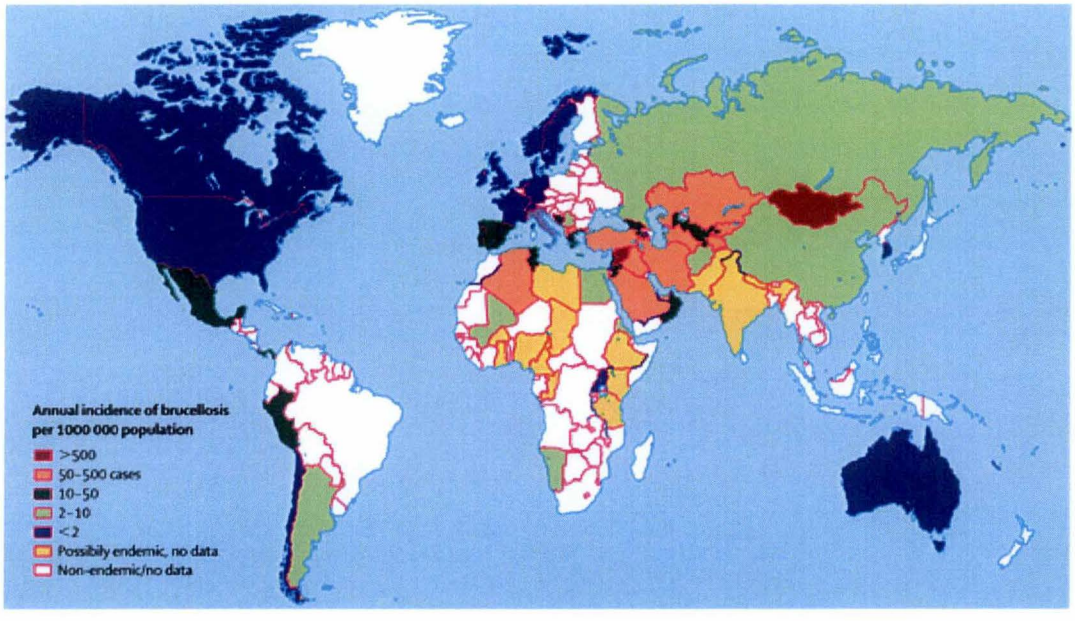


Figure 19. La brucellose est une des cinq zoonoses bactériennes les plus communes de par le monde (Pappas *et al.*, 2006). Les régions les plus touchées sont le Moyen-Orient, le Bassin Méditerranéen, l'Amérique du sud et centrale, le Sud-Est de l'Europe, l'Asie, l'Afrique et les Caraïbes. A ce jour, seuls 17 pays prétendent avoir éradiqué la brucellose, mais de nombreux investissements dans la surveillance sont essentiels pour maintenir ce statut (Cutler *et al.*, 2005). Remarquons que ce graphique ne reprend que les cas déclarés officiellement, la réalité est donc de loin plus importante.

2006). Ces caractéristiques font de *Brucella* un bon modèle expérimental de bactéries intracellulaires causant une maladie chronique.

Actuellement, la majorité des recherches sont réalisées sur *Brucella melitensis*, *B. abortus* et *B. suis*. Ces études sont souvent menées sur des macrophages ou des cellules HeLa (épithéliales) in vitro. Les études in vivo, bien que rarement réalisées dans l'hôte naturel, apportent des informations cruciales sur le cycle infectieux de *Brucella*. Le modèle murin est le plus utilisé pour ce type d'étude. Bien que les souris présentent une résistance élevée à la brucellose, elles constituent un modèle pratique en raison de leur faible coût, du grand nombre de souches disponibles, de la facilité des manipulations génétiques mais également de la connaissance approfondie que l'on dispose sur leur système immunitaire. La souris ne manifeste pas de maladie aiguë facilement quantifiable mais une infection chronique principalement du foie et de la rate. L'infection splénique est considérée comme représentative de l'infection générale et est mesurée par numération des bactéries vivantes. Le modèle murin est souvent utilisé pour détecter des différences de virulence entre des souches de *Brucella*, dans le cadre d'études vaccinales ou de pathogénicité. En effet, la cinétique d'infection diffère selon l'espèce, *B. melitensis* étant par exemple caractérisée par le pic de croissance le plus élevé (figure 20, (Kahl-McDonagh *et al.*, 2006)).

C. *BRUCELLA* ET SON HOTE...IMMUNOEVASION

1. Ce que les études in vitro nous ont appris...

L'infection par *Brucella* est caractérisée par sa nature chronique, qui repose sur sa capacité à persister à long terme dans un compartiment intracellulaire particulier, parfois appelé « brucellosome » (Kohler *et al.*, 2003). Les stratégies employées par *Brucella* pour atteindre ce compartiment restent encore floues. Cependant, les études menées in vitro sur des macrophages ont apporté de nombreuses pistes d'explication. Après son entrée dans la cellule hôte, *Brucella* est confinée dans une vacuole dont elle dévie le trafic intracellulaire pour éviter la fusion phago-lysosomale. Cette stratégie lui permet d'atteindre sa niche de réplication, à savoir un compartiment dérivé du réticulum endoplasmique (fig 21).

1.1. Pénétration incognito grâce à son LPS

Comme de nombreuses bactéries, *Brucella* peut être internalisée par le macrophage via la phagocytose. Cependant, cette voie d'entrée ne lui est pas bénéfique car elle conduit bien souvent à la fusion phago-lysosomale et donc à sa propre destruction. Récemment, il a été mis en évidence que *Brucella* pénétrait à l'intérieur de la cellule hôte selon un mécanisme de type zipper[1], via une interaction entre son LPS et les lipid rafts des cellules eucaryotes (assemblages de cholestérol et gangliosides au sein de la membrane plasmique). Cette voie d'entrée joue un rôle essentiel dans la survie de *Brucella* au sein du macrophage, car elle

[1] **Mécanisme de type zipper :** cette technique d'invasion de la cellule hôte implique un contact directe entre les ligands bactériens et des récepteurs cellulaires qui encerclent progressivement la bactérie, par opposition au mécanisme de type trigger impliquant un déploiement membranaire et un réarrangement du cytosquelette de la cellule hôte, induit par un signal envoyé par la bactérie.

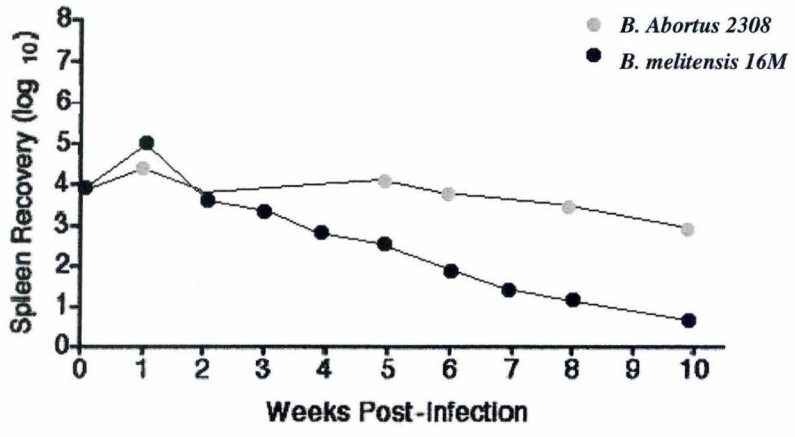


Figure 20. Courbes de croissance de *Brucella mélitensis* (noir) et *B. abortus* (gris), lors d'une infection chez des souris BALB/c (10^4 CFU/souris), d'après (Kahl-McDonagh *et al.*, 2006). L'infection des souris est généralement réalisée par une inoculation intra-péritonéale, loin du mode d'infection naturel. Les bactéries sont rapidement internalisées par les cellules phagocytaires résidant dans la cavité péritonéale, puis transportées par celles-ci jusqu'aux ganglions lymphatiques, la rate et le foie. Après une première phase de réplication, le nombre de bactérie atteint une phase plateau avant de décroître jusqu'à atteindre un équilibre avec la réponse immunitaire.

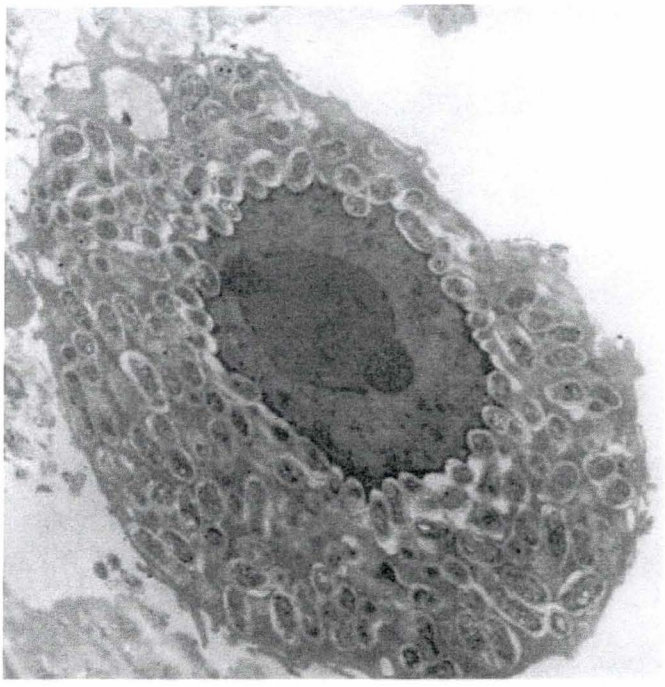


Fig 21. Observation d'un macrophage par microscopie électronique, 48 heures après l'infection in vitro par *B. abortus* (d'après Jiang *et al.*, 1993). Le cytoplasme de la cellule est chargé de vacuoles contenant brucella. A ce stade, les bactéries sont en phase de réplication et ont donc échappé aux activités bactéricides du macrophage.

semble empêcher la fusion phago-lysosomale durant les première heures de l'infection (Lapaque *et al.*, 2005, Naroeni *et al.*, 2002). L'interaction LPS-lipid rafts serait médiée par la chaîne O du LPS, car les souches qui en sont dépourvues ne bénéficient pas de ce type d'internalisation et sont rapidement dégradées dans le phagolysosome (fig 22 et 23) (Porte *et al.*, 2003). L'entrée de *Brucella* dans la cellule hôte impliquerait également une interaction entre son lipide A et un scavenger receptor de classe A (SR-A) issu des lipid rafts (Kim *et al.*, 2004) ainsi qu'entre une des ses protéines de choc thermique (HSP60) et une protéine prion cellulaire (PrPc) (Watarai *et al.*, 2003). Ce dernier point porte cependant à controverse (Fontes *et al.*, 2005). De par son rôle dans l'infection, le LPS est aujourd'hui reconnu en tant que facteur de virulence (Lapaque, *et al.*, 2005). La structure peu classique de son lipide A est particulièrement peu stimulante (fig. 22). Le LPS de *Brucella* est donc considéré comme un mauvais PAMP.

1.2. Désarmer les activités bactéricides du macrophage

Après son internalisation, *Brucella* se trouve confinée dans une vacuole où elle doit faire face à une multitude d'activités bactéricides, comprenant notamment les dérivés toxiques de l'oxygène et de l'azote et les peptides cationiques.

1.2.1. Neutralisation des dérivés toxiques de l'oxygène et de l'azote

De nombreuses études ont apporté la preuve que les dérivés toxiques de l'oxygène et de l'azote produits dans le phagosome lors du stress oxydatif participaient au contrôle de l'infection par *Brucella* (Jiang *et al.*, 1993, Ko *et al.*, 2002). Cependant, *Brucella* est bien équipée pour résister à ces dérivés toxiques. Non seulement, son LPS semble être un faible inducteur de ce processus (Kreutzer *et al.*, 1979, Rasool *et al.*, 1992), mais en plus *Brucella* possède un arsenal de mécanismes protecteurs. Parmi ceux-ci, la production de superoxyde dismutase (SOD) et de catalase assure la détoxification de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène (Beck *et al.*, 1990, Jiang, *et al.*, 1993).

1.2.2. Camouflage pour résister à l'attaque des peptides cationiques

Au sein du phagosome, les constituants anioniques de la membrane externe des bactéries sont ciblés par des peptides cationiques qui s'y lient et perturbent l'intégrité membranaire. Chez les bactéries Gram-négatives, le LPS, chargé négativement, est une cible privilégiée pour ces peptides cationiques. *Brucella* est un cas à part : c'est son LPS qui permet la résistance à ces peptides. En effet, la chaîne O semble masquer les groupements anioniques du lipide A, et celui-ci est exceptionnellement dépourvu de groupements phosphates (Martinez de Tejada *et al.*, 1995).

Les propriétés de surfaces particulières de *Brucella* ainsi que la composition inhabituelle de son lipide A seraient sous le contrôle de l'opéron bvrRS, codant pour un système de régulation à deux composants. Ce système régule l'expression de gènes impliqués dans la maintenance et l'intégrité de l'enveloppe cellulaire (Guzman-Verri *et al.*, 2002). Les mutants bvrR et bvrS présentent une sensibilité accrue aux peptides cationiques, sont moins invasifs, moins résistants aux conditions acides du phagosome et n'atteignent pas leur niche de réplication (Rasool, *et al.*, 1992, Roop *et al.*, 2004, Sola-Landa *et al.*, 1998).

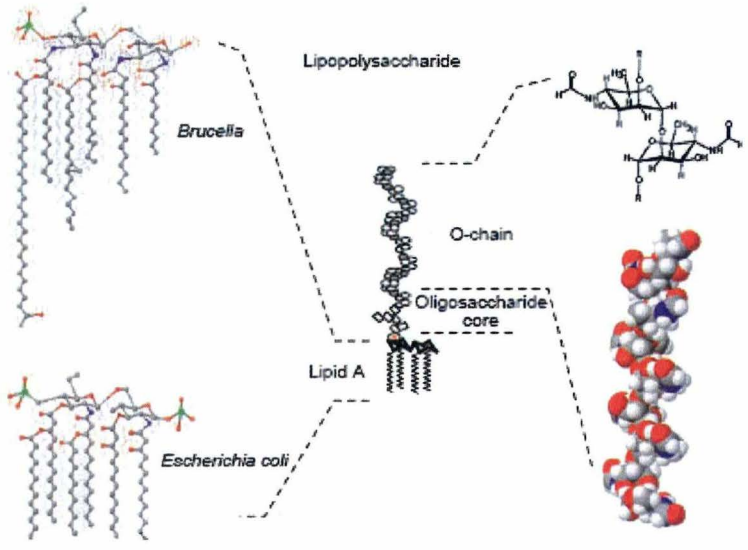


Figure 22. *Brucella* est unique parmi les bactéries Gram-négatives, en ceci que certaines espèces possèdent un LPS lisse (Smooth, S-LPS) tandis que d'autres présentent naturellement un LPS rugueux (rough, R-LPS). Ces deux types de LPS diffèrent principalement par la chaîne polysaccharidique O, absente chez les souches rugueuses. Le lipide A est, quant à lui, similaire dans les deux cas. On observe cependant une forte différence par rapport au LPS classique de *Escherichia coli*. En effet, il présente un squelette de diaminoglucose (au lieu de glucosamine) et des chaînes acylées plus longues (C18-C19, C28) (d'après (Lapaque *et al.*, 2005).

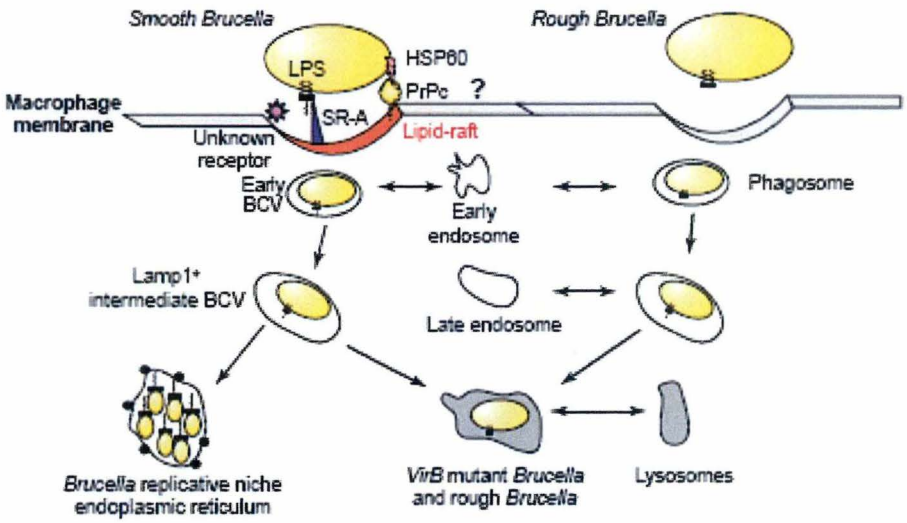


Figure 23. L'entrée et le trafic intracellulaire de *Brucella* dépendent de l'interaction de son LPS avec les lipid rafts de la cellule hôte. Cette interaction impliquerait la chaîne O, mais également le lipide A, via une interaction avec un scavenger receptor de classe A (SR-A) présent dans les lipid rafts, et une protéine de choc thermique, l'HSP60, par une interaction avec une protéine prion cellulaire (PrPc). L'implication de cette dernière protéine porte cependant à controverse (Fontes *et al.*, 2005). Après son entrée, *Brucella* s'échappe rapidement de la voie classique d'endocytose et se localise dans une vacuole LAMP-positive. Elle atteint ensuite sa niche de réplication, dérivée du réticulum endoplasmique, d'une manière VirB-dépendante. Les souches rugueuses ne pénètrent pas par les lipid rafts, et sont dégradées dans les phago-lysosomes (d'après (Lapaque, *et al.*, 2005)

1.3. Modifier l'apparence de son véhicule pour dévier le trafic intracellulaire

Au cours de sa maturation, la vacuole contenant *Brucella* (BCV) interagit d'abord avec les endosomes primaires puis, tout en évitant la voie endosomale classique, elle atteint le réticulum endoplasmique. Les mécanismes moléculaires expliquant comment *Brucella* quitte cette voie endosomale sont encore peu connus. Un constituant périplasmique de *Brucella*, le β-1,2 glucan cyclique, et l'expression des facteurs de virulence encodés par l'opéron VirB semblent participer à cet échappement.

1.3.1. Le β-1,2 glucan cyclique soustrait la BCV de la voie classique d'endocytose

Le β-1,2 glucan cyclique est un constituant périplasmique produit par les α-2 protéobactéries. Sa fonction dans la survie intracellulaire serait liée à sa capacité d'extraire le cholestérol des membranes eucaryotes. Le β-1,2 glucan cyclique serait sécrété par *Brucella* et disrupterait les lipid rafts, riches en cholestérol, présents à la surface du phagosome, permettant ainsi d'éviter sa fusion avec le lysosome (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005).

1.3.2. L'opéron VirB code pour un système de sécrétion de type IV

De nombreuses études ont apporté la preuve du rôle essentiel de l'opéron VirB dans le trafic intracellulaire de *Brucella*, notamment dans les dernières étapes (fig 24). Cet opéron serait impliqué dans le contrôle de la maturation de la BCV en une organelle associée au réticulum endoplasmique et permissive pour la réplication de la bactérie. L'opéron VirB encode un système de sécrétion de type IV qui transporterait des molécules effectrices dans le cytoplasme de la cellule hôte. Ces molécules sont susceptibles de contrôler le trafic vacuolaire et de moduler l'apoptose ou encore la perception des signaux pro-inflammatoires (Celli *et al.*, 2003, Celli *et al.*, 2005).

1.4. Etablissement de Brucella dans une niche favorable

Suite à des interactions soutenues et à une fusion limitée avec le réticulum endoplasmique, la BCV est modifiée et offre une niche de réplication pour *Brucella*, lui permettant une survie à long terme (Celli, *et al.*, 2003). L'intérêt de la BCV à s'associer avec le RE de la cellule hôte n'a pas encore été identifié. Il pourrait s'agir d'une stratégie pour obtenir les métabolites synthétisés et transloqués dans ce compartiment. Il est probable que le RE fournisse les membranes nécessaires à la synthèse de nouvelles BCVs. En effet, lorsque *Brucella* se réplique, elle s'individualise dans une vacuole. L'analyse de ces vacuoles au microscope confocal et électronique révèle non seulement que ces nouveaux compartiments portent des marqueurs propres au RE, mais en plus qu'ils présentent des propriétés membranaires typiques du RE. Ces observations démontrent que *Brucella* se réplique dans un compartiment dérivé du RE (Celli, 2006). D'autres pathogènes intracellulaires se répliquent dans des vacuoles dérivées du RE (pour revue, voir (Roy, 2002)). C'est le cas de Legionella pneumophila qui tire profit de cette interaction pour générer une niche de réplication séparée de la voie d'endocytose (Kagan *et al.*, 2002).

2. In vivo... une toute autre histoire

Les études menées *in vitro* ont omis une caractéristique importante du système immunitaire, à savoir son aspect « communautaire ». Avant d'atteindre sa niche de

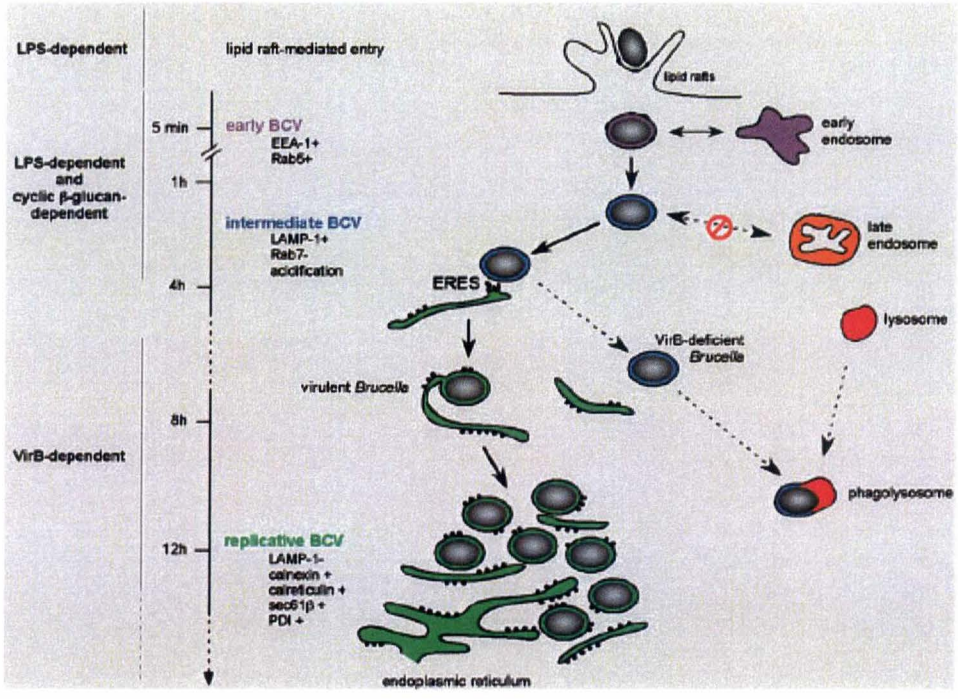


Fig 24. Trafic intracellulaire de *Brucella* au sein du macrophage : la maturation de la BCV nécessite la présence de l'opéron VirB (Celli *et al.*, 2006). Après avoir échappé à la fusion phago-lysosomale selon un mécanisme dépendant du β-1,2-glucan cyclique et du LPS, la BCV rejoint le réticulum endoplasmique (RE) avec lequel elle entretient des contacts étroits par l'intermédiaire des sites ERES (Endoplasmic Reticulum Exit Sites). Ces interactions requièrent la présence du système de sécrétion de type IV encodé par l'opéron VirB. Il en résulte la création d'une organelle dérivée du RE et constituant la niche de réplication de *Brucella*. Chez un mutant VirB, la BCV n'atteint pas une maturation complète et finit par fusionner avec les lysosomes, conduisant ainsi à la dégradation des bactéries.

réplication, *Brucella* est prise d'assaut par les effecteurs de l'immunité présents dans les liquides corporels et les tissus. Ce n'est qu'après avoir échappé à ces mécanismes effecteurs que *Brucella* peut atteindre sa cellule hôte. Cependant, *Brucella* n'est pas encore arrivée au bout de ses peines... La cellule infectée est ciblée par une pléthore de mécanismes destructeurs.

2.1. Avant d'atteindre la cellule hôte... l'environnement extracellulaire

2.1.1. Infecter l'organisme... le parcours du combattant

En fonction du mode d'infection, *Brucella* se retrouve au préalable dans le sang ou les fluides corporels. Or le plasma, la salive, les sécrétions pulmonaires, les fluides intestinaux, etc. contiennent de nombreuses substances bactéricides auxquelles elle devra faire face.

Dans la plupart des cas, *Brucella* infecte son hôte par voie orale et est susceptible de se retrouver dans la lumière intestinale. Pour la traversée de l'épithélium intestinal, il semblerait que *Brucella* cible spécifiquement les cellules M de la muqueuse afin d'être ingérée par celles-ci selon un mécanisme de type zipper (fig. 25) (Ackermann *et al.*, 1988). La bactérie est ensuite transférée jusque dans l'espace lymphatique sous-jacent, où elle rencontre les macrophages et les cellules dendritiques. Ces cellules lui servent de véhicule pour atteindre les ganglions lymphatiques voisins, la rate et le foie.

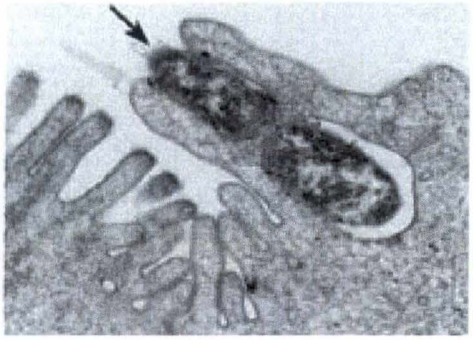
2.1.2. Le LPS, un manteau protecteur contre le complément et les neutrophiles

Dans les fluides corporels, *Brucella* est notamment confrontée à l'arsenal des protéines du complément ainsi qu'aux substances bactéricides libérées par les neutrophiles.

Le S-LPS de *Brucella* semble encore une fois jouer un rôle essentiel. En effet, la chaîne O pourrait créer une couche protectrice masquant les protéines de la membrane externe qui ne sont autres que les sites de fixation du complément. Privées de cette chaîne O, les espèces rugueuses (R-LPS) sont beaucoup plus sensibles à l'attaque du complément (fig 26) (Eisenschenk *et al.*, 1999). Il semblerait que seules la voie classique et celle de la MBL puissent être activées lors d'une infection par *Brucella* (Corbeil *et al.*, 1988, Fernandez-Prada *et al.*, 2001).

Contrairement à d'autres bactéries, le LPS de *Brucella* stimule peu la dégranulation des neutrophiles (Canning *et al.*, 1986, Rasool, *et al.*, 1992). De même, sa flagelline ne serait pas reconnue par le TLR5. Le cas échéant, *Brucella*, présente une forte résistance aux protéines bactéricides trouvées dans ces sécrétions et parmi lesquelles on retrouve le lysozyme, la lactoferrine, les enzymes protéolytiques, les défensines, etc. Cette résistance est probablement liée à la structure de sa membrane externe et, notamment, au S-LPS.

Cependant, le LPS particulier de *Brucella* constitue aussi sa signature la plus marquante. La chaîne O est donc la cible d'anticorps qui, par opsonisation, facilitent la phagocytose de la bactérie. Cette voie d'entrée, différente de celle induite par *Brucella*, conduirait à la fusion phagolysosomale et donc à la destruction de la bactérie. Il a été montré que les anticorps dirigés contre la chaîne O du LPS étaient capables de conférer une protection contre *Brucella* lors d'expériences de transfert passif (Montaraz *et al.*, 1986)



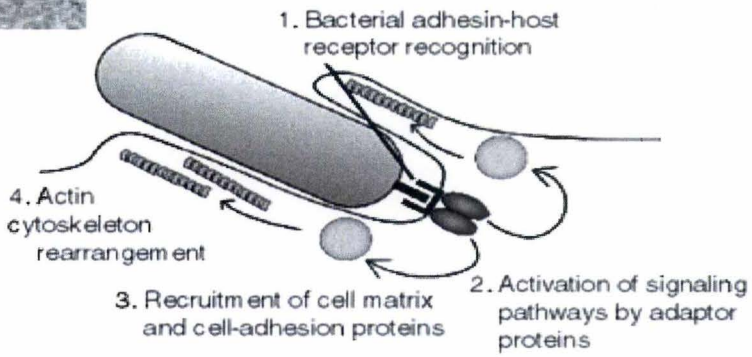


Figure 25. *Brucella* est ingérée par les cellules M selon un mécanisme de type zipper. Après sont transit dans ces cellules, la bactérie atteint l'espace lymphatique sous-jacent (Moreno *et al.*, 2006). L'internalisation de la bactérie est facilitée par l'interaction entre des adhésines bactériennes et des récepteurs de la cellule hôte. Cette interaction active une voie de signalisation au sein de la cellule hôte qui conduit à des réarrangements du cytosquelette et à l'internalisation de Brucella (Alonso *et al.*, 2004).

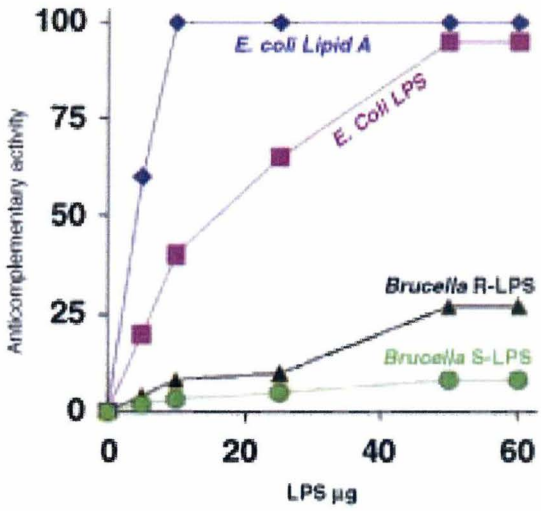


Figure 26. Le LPS de Brucella présente une activité biologique beaucoup plus faible que celui d'Escherichia coli. Cette activité réduite, traduite ici par la faible activation du complément est liée à la structure atypique du lipide A, mais également à la présence de la chaîne O (souches S-LPS). On remarque qu'en absence de cette chaîne, l'activation du complément est supérieure (Moreno, *et al.*, 2006).

2.2. Au sein de la cellule hôte... mais au cœur d'un système immunitaire adaptaté

Lorsque *Brucella* atteint la cellule hôte, elle utilise de multiples stratégies pour empêcher sa dégradation et dévier son trafic intracellulaire dans le but d'atteindre sa niche de réplication (voir ci dessus). Cependant, la voie d'entrée de *Brucella* (phagocytose versus mécanisme zipper) déterminera son devenir au sein de la cellule hôte. Ainsi, lorsqu'elle est phagocytée par les macrophages et neutrophiles, jusqu'à 80% des bactéries sont éliminées dans les heures qui suivent (Jiang, *et al.*, 1993). Les survivantes peuvent ensuite se répliquer au sein de la cellule hôte, devenue un véhicule pour le transport des bactéries dans d'autres tissus. Cependant, le mode de vie intracellulaire de *Brucella* induit la différenciation des lymphocytes Thelper en cellules Th1, productrices d'un puissant activateur des macrophages, l'IFNγ. *Brucella* possède toutefois plusieurs stratégies pour moduler la réponse immunitaire.

2.2.1. Interférer avec l'activation des lymphocytes Th1

Une fois dans le macrophage, *Brucella* semble capable d'altérer la voie de présentation des antigènes en MHC II. Contrairement aux autres antigènes, le LPS de *Brucella* n'est pas dégradé et est exporté à la surface du macrophage où il forme des macrodomaines avec les molécules du MHC II. La formation de ces complexes semble altérer la reconnaissance de la cellule infectée par les lymphocytes Thelper, ce qui pourrait expliquer en partie le caractère chronique de la brucellose (Fernandez-Prada *et al.*, 2003, Forestier *et al.*, 2000, Forestier *et al.*, 1999a).

2.2.2. Empêcher les messagers protéiques d'activer les macrophages

Les macrophages infectés par *Brucella* produisent principalement deux cytokines proinflammatoires, le TNF-α et l'IL-12 (fig 27).

Le TNF-α exerce non seulement une action autocrine, stimulant de la sorte les activités bactéricides du macrophage et leur expression d'IL-12 (Zhan *et al.*, 1998), mais aussi une action paracrine en agissant en synergie avec l'IL-12 pour activer les cellules NK à produire de l'IFNγ. L'IL-12 induit quant à lui la différenciation des lymphocytes T helper en cellules Th1.

Brucella présente une excellente adaptation à son environnement intracellulaire en ce sens qu'elle est capable de contrôler l'activation des cellules phagocytaires afin de pouvoir y survivre et s'y multiplier. En effet, *Brucella* n'induit pas la production de TNF-α par les macrophages infectés, ce qui contribue à limiter la réponse inflammatoire. Il a été montré que cet effet provenait de la structure particulière du lipide A du LPS de *Brucella* (Lapaque *et al.*, 2006). D'autres études ont également suggéré qu'une protéine de la membrane externe de *Brucella suis,* l'Omp25, était impliquée dans la régulation négative de la production de TNF-α sur des macrophages humains (Jubier-Maurin *et al.*, 2001).

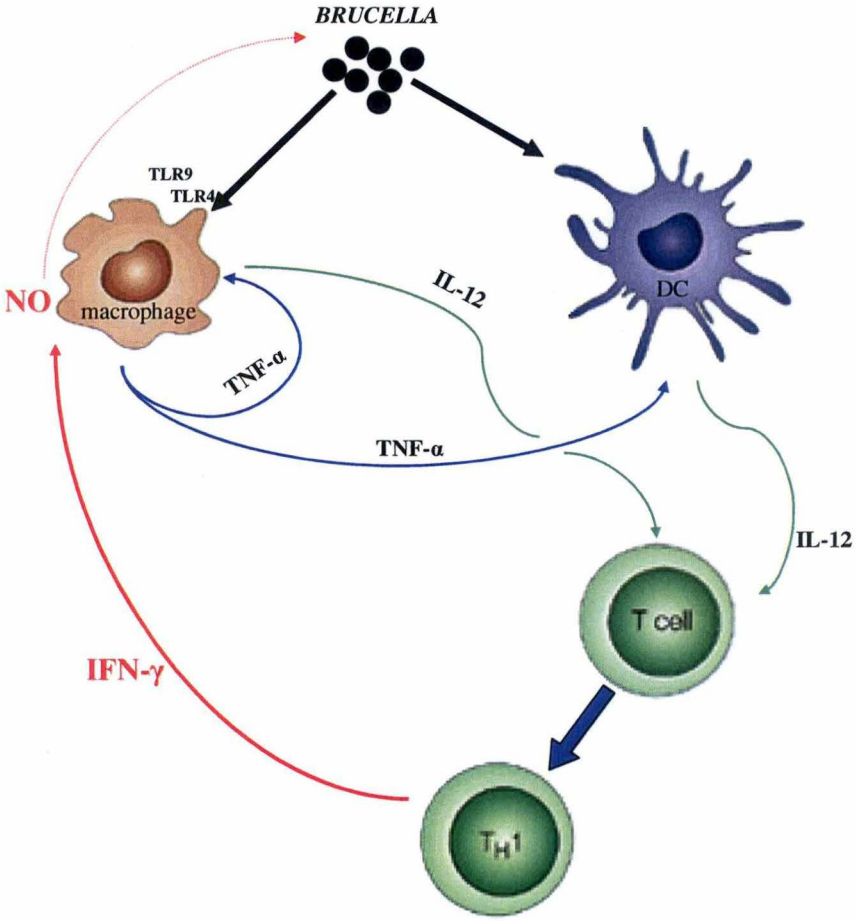


Figure 27. Trois cytokines jouent un rôle essentiel lors d'une infection par *Brucella* : le TNF-α, l'IL-12 et l'IFNγ. *B. melitensis* serait détectée par le système immunitaire via les TLR4 et TLR9. Cette reconnaissance activerait une voie de transduction du signal impliquant MYD88 et aboutissant à l'expression de cytokines pro-inflammatoires (Copin *et al.*, 2007). Le TNF-α, produit par les macrophages, induit la production d'IL-12 par les cellules phagocytaires. L'IL-12 induit quant à lui la différenciation des lymphocytes T en cellules Th1, productrices d'IFNγ. Enfin, l'IFNγ active les macrophages à produire les dérivés toxiques de l'oxygène et de l'azote. L'oxyde nitrique (NO) jouerait un rôle majeur dans l'élimination de *Brucella*. Il existerait donc une boucle TNF- α , IL-12 et IFNγ.

D. L'HOTE ET *BRUCELLA*, QUELLE RELATION ?

1. Les acteurs de la réponse anti-Brucella

Comme d'autres organismes intracellulaires, *Brucella* est ciblée par divers effecteurs immunitaires particuliers. De nombreuses études ont mis en évidence les principaux mécanismes immunitaires développés lors d'une infection par *Brucella spp.*

1.1. L'IFNγ, la cytokine clé

L'IFNγ est la cytokine clé dans le contrôle de l'infection par *Brucella*. Ce rôle fut d'abord observé dans les années 1990. En neutralisant l'IFNγ par l'administration d'anticorps monoclonaux, le nombre de bactéries augmente d'un facteur 10 une semaine après l'infection (Zhan *et al.*, 1993a). Le même résultat fut observé chez des souris IFNγ$^{-/-}$(Murphy *et al.*, 2001). A l'inverse, l'administration d'IFNγ recombinant augmente la résistance de souris infectées, il en résulte une diminution du nombre de bactéries d'un facteur 10 une semaine post-infection (Stevens *et al.*, 1992).

1.2. Les lymphocytes TCD4$^+$, principaux producteurs d'IFNγ

Plusieurs types cellulaires produisent l'IFNγ : les lymphocytes TCD4$^+$, TCD8$^+$, les cellules NK ainsi qu'une classe peu connue de lymphocytes : les Tγδ (voir encadré « *Lymphocytes Tγδ, une nouvelle recrue chez l'homme* »). La contribution respective de chacun d'entre eux lors de la réponse anti-*Brucella* porte encore à controverse. De nombreuses études se concentrent sur cette question.

Les cellules NK ne semblent pas participer à l'élimination de *Brucella*, car leur production précoce d'IFNγ n'apparaît pas cruciale pour le contrôle de l'infection dans les premiers jours (Fernandes *et al.*, 1995b).

Quant aux lymphocytes TCD4$^+$ et TCD8$^+$, ils pourraient jouer un rôle équivalent lors des premiers jours de l'infection, mais les lymphocytes TCD4$^+$ deviendraient les principaux producteurs d'IFNγ lorsque le nombre de bactéries atteint une phase plateau (Copin, *et al.*, 2007). Le rôle joué par les lymphocytes TCD8$^+$ serait plus lié à leurs activités bactéricides qu'à leur production d'IFNγ (Murphy, *et al.*, 2001).

1.3. L'iNOS, un mécanisme effecteur important

L'IFNγ produit lors de l'infection par *Brucella* permet notamment l'activation des mécanismes bactéricides des macrophages, telle que la production d'oxyde nitrique (NO) et de dérivés toxiques de l'oxygène. Il a récemment été confirmé in vivo que la production de NO dépendait de l'IFNγ (Copin, *et al.*, 2007). L'utilisation de souris knock-out pour les enzymes assurant la synthèse de ces deux composés suggère un rôle important de l'oxyde nitrique dans l'élimination de *Brucella*. En effet, les souris iNOS$^{-/-}$ sont plus sensibles à l'infection que des souris gp91$^{phox-/-}$, déficientes pour l'oxydase produisant les dérivés toxiques de l'oxygène (Ko, *et al.*, 2002). Outre les macrophages, d'autres cellules expriment l'iNOS. Parmi celles-ci, il semblerait que les TipDC soient les principales cellules productrices d'iNOS 10 à 15 jours après l'infection par *B. melitensis* (Copin, *et al.*, 2007).

Lymphocytes Tγδ, une nouvelle recrue chez l'homme…

Chez les humains, il a été montré que les macrophages infectés par *Brucella* recrutaient et activaient les lymphocytes Tγδ (Bertotto *et al.*, 1993). En effet, le nombre de ces lymphocytes T augmente significativement dans le sang des patients infectés. Ces cellules, dont le rôle est encore peu connu, représentent 0,5 à 4% des lymphocytes T circulant dans le sang périphérique (Haas *et al.*, 1993). L'activation des lymphocytes Tγδ serait réalisée par des facteurs solubles sécrétés par les macrophages infectés, mais dont l'identité est encore inconnue. Il semblerait également que certains antigènes non peptidiques, libérés suite à la lyse des cellules infectées, puissent jouer le rôle d'activateur (Ottones *et al*, 2000). Suite à leur activation, les lymphocytes Tγδ sécrètent de l'IFNγ ainsi que du TNF-α qui activent les mécanismes bactéricides des macrophages infectés.

OBJECTIFS DU MEMOIRE

Brucella est une bactérie intracellulaire Gram négative responsable d'une maladie, la brucellose, affectant les animaux vertébrés et pouvant se transmettre à l'homme. Principalement étudiée en modèle murin, la réponse immune contre *Brucella* est de type Th1, impliquant majoritairement les lymphocytes $TCD4^+$ produisant l'IFNγ. Cette cytokine activerait les mécanismes bactéricides des cellules phagocytaires, tels que la production d'oxyde nitrique. Toutefois, l'ensemble de ces mécanismes n'empêche pas *Brucella* d'échapper à la réponse immune et de s'installer de manière chronique chez son hôte. A ce titre, *Brucella* constitue un modèle expérimental très intéressant d'infection chronique par une bactérie intracellulaire. Notre objectif est de mieux comprendre la réponse immunitaire contre *B. melitensis* chez la souris.

En pratique, nous nous sommes fixé deux objectifs durant ce travail :

- *Développer un modèle d'étude de la réponse immune secondaire contre B. melitensis chez la souris, et comparer les mécanismes effecteurs de la réponse primaire et secondaire.*

Il est bien connu que les vaccins vivants sont beaucoup plus efficaces que les vaccins morts (bactéries inactivées) pour protéger contre l'infection des pathogènes intracellulaires en général et de *Brucella* en particulier. Les raisons précises de cette différence d'efficacité sont encore largement méconnues. Nous avons l'intention de comparer les effecteurs mobilisés par la réponse immunitaire dans ces deux cas de vaccination. Nous espérons de la sorte identifier les effecteurs typiques d'une réponse immunitaire protectrice envers *Brucella*. Une meilleure connaissance de ceux-ci et de leur régulation pourrait améliorer notre capacité à générer des vaccins protecteurs contre *Brucella* et les pathogènes intracellulaires en général.

- *Déterminer le rôle des cellules $TCD4^+CD25^+$ régulatrices et de l'IL-10, une cytokine immunosuppressive, dans la persistance de B. melitensis.*

Dans la plupart des maladies infectieuses, la réponse immunitaire développée à l'encontre du pathogène peut être à l'origine de dommages collatéraux pour les tissus de l'hôte. Cette réponse est donc régulée par plusieurs mécanismes immunosuppresseurs dont les cellules $TCD4^+CD25^+$ régulatrices et l'IL-10. Ce rétrocontrôle peut toutefois agir au détriment de l'hôte en permettant la persistance du pathogène. Nous avons l'intention d'analyser l'impact de la neutralisation de ces mécanismes immunosuppresseurs sur la persistance de *Brucella* chez la souris.

Résultats

RÉSULTATS

A. ETUDE DE LA REPONSE IMMUNE SECONDAIRE CONTRE *BRUCELLA MELITENSIS*

Lors d'une primo-infection, l'organisme développe une réponse immunitaire impliquant l'activation des effecteurs de l'immunité innée et adaptative. Cette réponse est dite primaire. Si l'organisme entre une deuxième fois en contact avec ce même pathogène, la réponse développée sera dite secondaire et présentera des caractéristiques différentes. Dans ce travail, nous avons voulu comprendre ce qu'il advenait des mécanismes effecteurs mis en place dans la réponse primaire suite à un nouveau contact avec *B. melitensis*. En pratique, l'étude expérimentale de la réponse secondaire lors d'une infection par *B. melitensis* comprend trois étapes :

- L'infection d'un modèle animal, ici la souris, par *B. melitensis 16M* (traitement vaccinal),
- Un traitement antibiotique visant à éliminer les bactéries et permettant un retour du système immunitaire à l'état de repos. En effet, la réponse développée sera différente si les effecteurs de l'immunité sont encore actifs lors de la réinfection (Mackaness, 1967).
- Une réinfection par *B. melitensis* (souche challenge)

1. Validation du traitement antibiotique contre Brucella melitensis

1.1. Choix du traitement antibiotique

Il existe plusieurs antibiothérapies pour traiter la brucellose. Dans la littérature, on renseigne généralement la combinaison de tétracyclines[1] avec un aminoglycoside[2] ou de la rifampicine[3]. Ces antibiotiques sont actifs sur *Brucella* et capables de pénétrer dans les cellules pour atteindre la niche intracellulaire de cette bactérie. Une combinaison de deux antibiotiques permet de réduire le risque de rechutes (Ariza, *et al.*, 1995). Sur base de ces

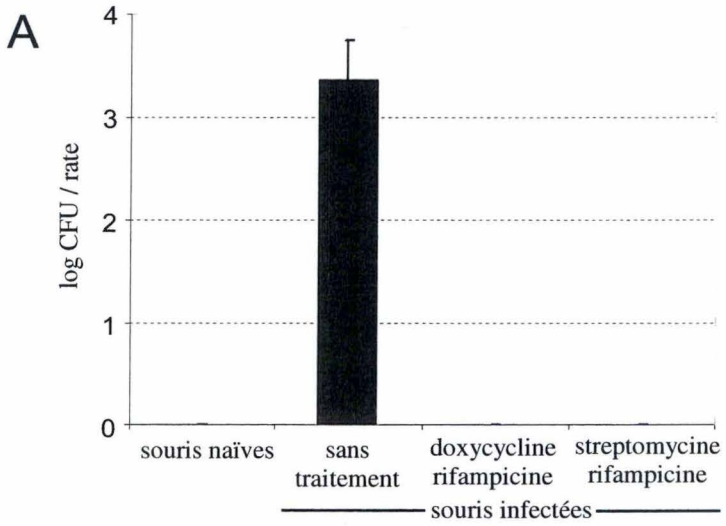
---

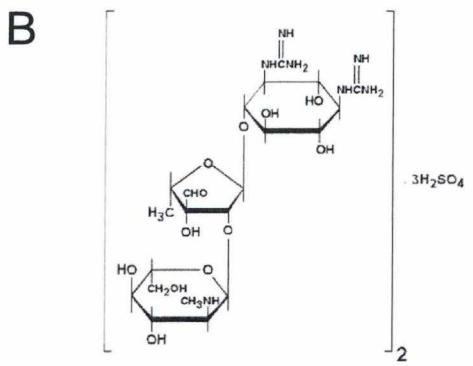
[1] **Tétracyclines :** famille d'antibiotiques à action bactériostatique, actifs contre les bactéries gram$^+$ et gram$^-$. Les tétracyclines sont capables de pénétrer les cellules eucaryotes et constituent donc un traitement de choix pour les pathogènes intracellulaires. Elles inhibent la synthèse protéique en empêchant la fixation de l'aminoacyl-ARNt à la sous-unité 30S du ribosome bactérien. La doxycycline appartient à cette famille d'antibiotiques et agit contre un large éventail de bactéries gram$^-$ et gram$^+$ (*Brucella spp., Staphylocoques, Streptocoques*, etc.)

[2] **Aminoglycosides :** famille d'antibiotiques à action bactériostatique, actifs principalement contre les bactéries gram$^-$ (*Brucella spp., Escherichia coli, Salmonella, etc.*) et *Mycobacterium tuberculosis*. Les aminoglycosides se lient à la sous-unité 30S du ribosome et perturbent ainsi la synthèse protéique. La streptomycine appartient à cette famille d'antibiotiques et exerce une activité bactéricide ou bactériostatique selon sa concentration.

[3] **Rifampicine :** antibiotique de la famille des rifamycines. Il s'agit d'un agent bactéricide, inhibant l'activité de l'ARN polymérase ADN-dépendante chez les bactéries gram$^-$ et gram$^+$ (*Brucella spp., Mycobacterium tuberculosis, Staphylococcus aureus*, etc.). Par la formation d'un complexe avec cette enzyme, l'antibiotique empêche l'initiation de la transcription (Martindale, 1973 ; Compendium 2006)

Fig 1. Mise au point d'un traitement antibiotique envers *Brucella melitensis* sur un modèle murin





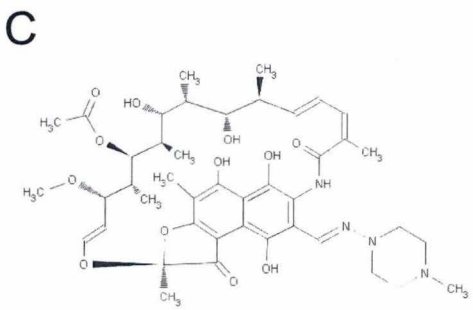


FIGURE 1A : Résultat des traitements antibiotiques testés contre *B. melitensis*. Le graphique représente en ordonnée les CFU en logarithme et en abscisse les différents traitements administrés. Trois groupes de souris C57BL/6 ont été infectées par *B. melitensis* (4.10^4 bactéries). Quatorze jours après l'infection, un premier groupe a reçu le traitement doxycycline (160 mg/kg/jour)-rifampicine (40 mg/kg/jour) et un second groupe a reçu le traitement streptomycine (300 mg/kg/jour)-rifampicine (3mg/kg/jour). Après un traitement de 14 jours et un temps de repos de 3 jours, on constate que les deux traitements administrés se sont montrés efficaces, par comparaison au groupe de souris infectées non traitées dont les CFU s'élèvent à 3,36 log (31 jours post-infection). La barre d'erreur représente l'intervalle de confiance de la moyenne (95%) qui correspond à +/- 2SEM.

FIGURE 1B : La streptomycine sulfate a été utilisée en association avec la rifampicine comme traitement de choix durant cette étude. Cet antibiotique appartient à la famille des aminoglycosides et exerce une activité bactériostatique en se liant à la sous-unité 30S du ribosome bactérien.

FIGURE 1C : La rifampicine est un antibiotique appartenant à la famille des rifamycines. Il empêche l'initiation de la transcription en se liant à l'ARN polymérase ADN-dépendante.

références, le choix de l'antibiothérapie s'est porté sur deux traitements différents, administrés via l'eau de boisson :

- Rifampicine et doxycycline (Grillo *et al.*, 2006),
- Rifampicine et streptomycine (Sathiyaseelan *et al.*, 2006)

1.2. Confirmation de l'efficacité des traitements choisis

Les traitements antibiotiques ont été administrés à des souris C57BL/6 infectées par injection intra-péritonéale (IP) de *B. melitensis* (4.10^4 bactéries). Quatorze jours après l'infection, les souris ont été réparties en 3 groupes :

- 5 souris infectées non traitées
- 13 souris infectées et traitées par la combinaison rifampicine (3mg/kg/jour), streptomycine (300 mg/kg/jour).
- 9 souris infectées et traitées par la combinaison rifampicine (40mg/kg/jour), doxycycline (160 mg/kg/jour).

Préparés extemporanément, les traitements ont été administrés quotidiennement via l'eau de boisson durant une période de 14 jours. Au terme de cette période, les souris ont été laissées 3 jours au repos pour permettre l'élimination totale des antibiotiques de leur organisme.

L'efficacité des traitements a été vérifiée individuellement par l'étalement des bactéries extraites des cellules spléniques sur un milieu de culture 2YT (voir matériel et méthode). Le comptage bactérien a été réalisé après 4 jours de croissance à 37°C par l'estimation des colony forming unit (CFU). Les résultats obtenus sont montrés en figure 1A et confirment l'efficacité des deux traitements administrés. Aucune bactérie n'est détectée chez les souris traitées. Les souris non traitées présentent quant à elles un nombre de bactéries équivalent à ce que l'on observe habituellement 31 jours post-infection (environ 2300 bactéries/rate, soit 3,36 log).

Pour sa meilleure solubilité dans l'eau, le traitement rifampicine-streptomycine (fig. 1B et 1C) fut choisi pour la suite des expériences.

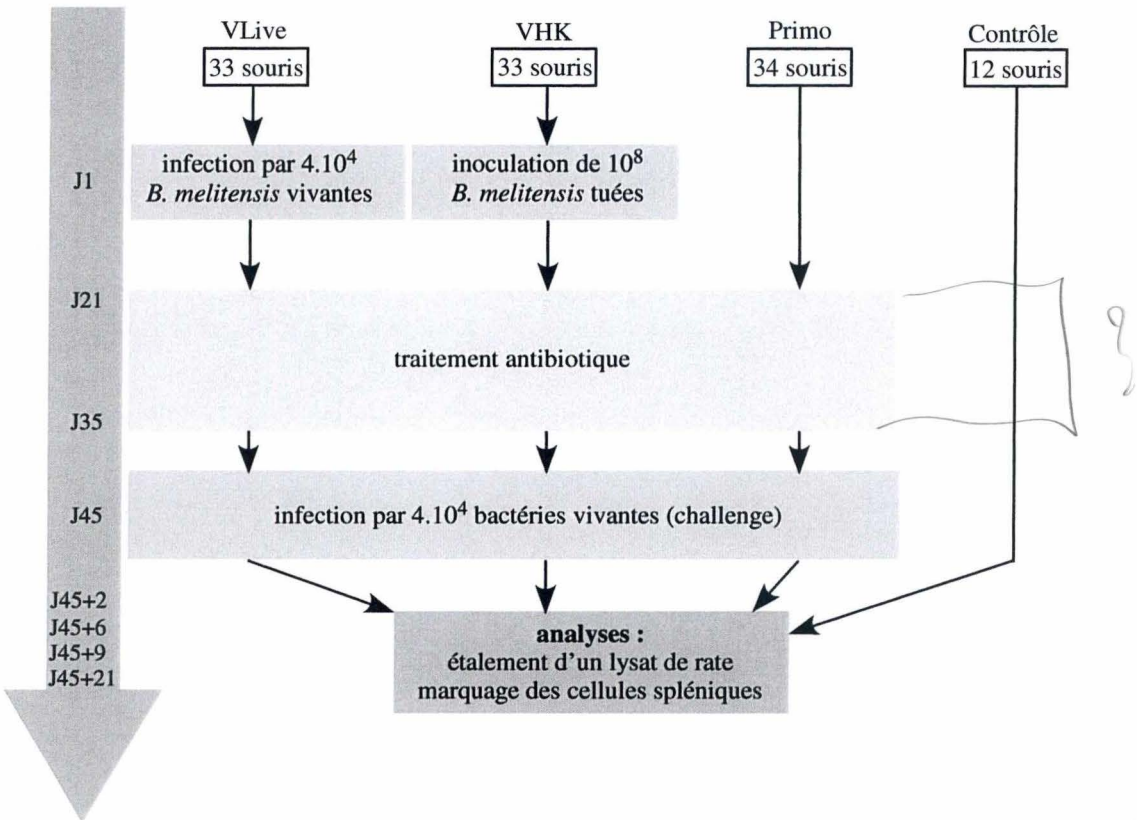


FIGURE 2. Etude de la réponse immunitaire secondaire : procédure. Une centaine de souris C57BL/6 ont été réparties en quatre groupes différents. Un premier groupe ("VLive") a été infecté par une souche vaccinale vivante puis, après un traitement antibiotique de 15 jours, réinfecté par la souche challenge. Le deuxième groupe ("VHK") a été inoculé par la souche vaccinale tuée puis, après traitement antibiotique, infecté par la souche de challenge. Le troisième groupe ("Primo") a été infecté une seule fois, mais a reçu un traitement antibiotique comme les deux premiers groupes. Le dernier groupe, constitué de 12 souris naïves et non traitées, constitue le contrôle. Après l'infection challenge, 7 à 8 souris de chaque groupe (3 dans le cas du contrôle) ont été sacrifiées à différents temps (2, 6, 9 et 21 jours) dans le but d'étudier l'évolution de la charge bactérienne et de la réponse immunitaire (comptage des CFU et analyse au FACS).

2. Etude de la réponse immune secondaire

2.1. Procédure

L'étude de la réponse immune secondaire a été réalisée selon deux schémas, l'un utilisant comme traitement vaccinal des bactéries vivantes, l'autre des bactéries tuées par la chaleur (60 minutes à 80°C), dans l'optique de comparer la réponse secondaire développée dans ces deux situations. Nous avons également utilisé deux groupes contrôle. Le premier n'a été infecté qu'une seule fois et nous permet de comparer la réponse secondaire d'intérêt à la réponse primaire précédemment caractérisée (Copin, *et al.*, 2007). Le second contrôle constitue le groupe de souris naïves (ce groupe a reçu une injection de PBS stérile). Une centaine de souris âgées en moyenne de 16 semaines a donc été répartie en quatre groupes différents (fig. 2):

- 33 souris, infectées dans un premier temps par la souche vaccinale vivante, puis réinfectées par la souche challenge. Pour une meilleure clarté de cet exposé, nous appellerons ce groupe « VLive ».
- 33 souris, inoculées dans un premier temps par la souche vaccinale tuée, puis infectées par la souche challenge. Ce groupe sera dénommé « VHK » (pour *heat killed*).
- 34 souris, infectées une seule fois. Ce groupe est donc caractérisé par une réponse primaire et sera appelé « Primo ». Il est à noter que, pour permettre une étude comparative, ces souris seront infectées au moment de l'infection des groupes VLive et VHK par la souche challenge.
- 12 souris contrôle (naïves)

Dans la suite de cet exposé, nous présenterons les différentes étapes de l'expérimentation de manière chronologique.

Infection du groupe VLive et inoculation du groupe VHK par un vaccin vivant ou tué, respectivement

Le traitement des deux groupes VLive et VHK consiste en une injection intra-péritonéale de 4.10^4 bactéries vivantes et 10^8 bactéries tuées respectivement. Cette dernière dose plus élevée assure une stimulation du système immunitaire par les bactéries tuées qui soit suffisamment forte pour lui permettre d'induire une réponse immunitaire d'amplitude comparable à celle issue des bactéries vivantes (Huang *et al.*, 2005). Les deux préparations vaccinales ont été contrôlées par l'étalement de plusieurs dilutions de l'inoculum sur du milieu 2YT, mise en culture à 37°C et comptage des CFU 4 jours après.

Traitement antibiotique des groupes VLive, VHK et Primo

Le traitement antibiotique (rifampicine-streptomycine) a été administré aux groupes de souris VLive, VHK et Primo dans l'eau de boisson, 21 jours après l'infection et durant une période de 15 jours. Il est à noter que le groupe de souris Primo (non infecté) a reçu le traitement antibiotique au même titre que les groupes de souris infectées, VLive et VHK. Ceci nous autorise par la suite à réaliser une comparaison pertinente des réponses secondaires et primaire qui ne soit pas influencée par le traitement antibiotique de l'un ou l'autre groupe.

Au terme du traitement, les souris ont été laissées au repos 10 jours pour permettre non seulement l'élimination totale de l'antibiotique mais surtout pour s'assurer que toute réponse immunitaire a cessé. Deux souris de chaque groupe ont été sacrifiées pour vérifier l'efficacité du traitement antibiotique.

Infection des groupes VLive, VHK et Primo par *B. melitensis* (challenge)

Les deux groupes VLive et VHK, déjà immunisés par leur premier contact avec *B. melitensis*, mais également le groupe Primo (naïf à ce stade) ont reçu une injection intra-péritonéale de 4.10^4 bactéries (challenge). La dose infectante a été vérifiée par l'étalement de plusieurs dilutions de l'inoculum sur du milieu 2YT, mise en culture à 37°C et comptage des CFU 4 jours après.

Traitement des cellules spléniques en vue d'un comptage des CFU et d'une analyse au cytomètre de flux (FACS)

Le suivi de la réponse secondaire induite lors de la réinfection par la souche challenge s'est étalé sur 21 jours. A 2, 6, 9 et 21 jours après l'injection de la souche challenge, 7 à 8 souris de chaque groupe (3 souris pour le groupe contrôle naïf) ont été sacrifiées par dislocation cervicale. La rate de chacune de ces souris a été prélevée et divisée en deux pour réaliser des étalements et des marquages cellulaires :

- Dans un premier temps, nous avons évalué la protection conférée par les souches vaccinales vivantes ou tuées par une estimation des CFU. Les bactéries issues d'une demi rate par souris ont été libérées par un broyage mécanique de l'organe et lyse des cellules spléniques dans du PBS Triton 0,1%, puis étalées sur du milieu 2YT. Le comptage des CFU a été réalisé après 4 jours de croissance à 37°C.
- Par la suite, nous avons porté notre étude sur divers paramètres de la réponse immunitaire dont l'importance avait été remarquée lors de l'analyse de la réponse primaire envers *B. melitensis* (Copin, *et al.*, 2007). Ces paramètres seront analysés au cytomètre de flux. Les résultats qui suivent porteront donc sur l'évolution de la production d'IFNγ par les cellules spléniques au cours de l'infection et principalement sur la contribution des lymphocytes $TCD4^+$ dans cette production. Il sera également question de l'expression de l'enzyme iNOS et du rôle joué par les cellules TipDC (TNF/iNOS producing dendritic cells). Pour cette analyse, nous avons réalisé des marquages de surface et intracellulaires des cellules spléniques. Dans le but d'avoir suffisamment de cellules pour l'analyse, nous avons été contraints de regrouper les demi rates par deux. Trois colorations combinant plusieurs anticorps nous ont permis de mettre en évidence les différentes populations cellulaires d'intérêt et les cytokines et enzymes produites :
  - La combinaison fluorescein isothyocyanate (FITC)-coupled M1/70 (dirigé contre CD11b[1]), phycoerythrin (PE)-coupled HL3 (dirigé contre CD11c[2]) et M-19 (dirigé contre l'iNOS) a permis notamment d'isoler les TipDC et les cellules productrices d'iNOS,
  - La combinaison FITC-M1/70 (dirigé contre CD11b), PE-M5/114.15.2 (dirigé contre le MHC II[3]) et M-19 a permis de confirmer la présence des TipDC,

---

[1] **CD11b :** chaîne α_M de l'intégrine CD11b/CD18 également connue sous le nom de macrophage-1 antigen (Mac-1), ou récepteur 3 du complément (CR3). Mac-1 est exprimé sur les granulocytes, macrophages, cellules dendritiques d'origine myéloïde, cellules NK, lymphocytes activés, etc

[2] **CD11c :** chaîne α_x de l'intégrine CD11c/CD18. CD11c est exprimé sur les cellules dendritiques, certaines sous-populations de lymphocytes dans l'épithélium intestinal et quelques lymphocytes T activés.

[3] **MHC II :** Le phénotype des TipDC comprend aussi l'expression élevée du MHC II qui, pour rappel, permet de présenter les antigènes aux lymphocytes $TCD4^+$.

Fig 3. Charge bactérienne (logCFU) résultant d'une infection primaire ou secondaire (vaccin vivant ou mort) par *B. melitensis*

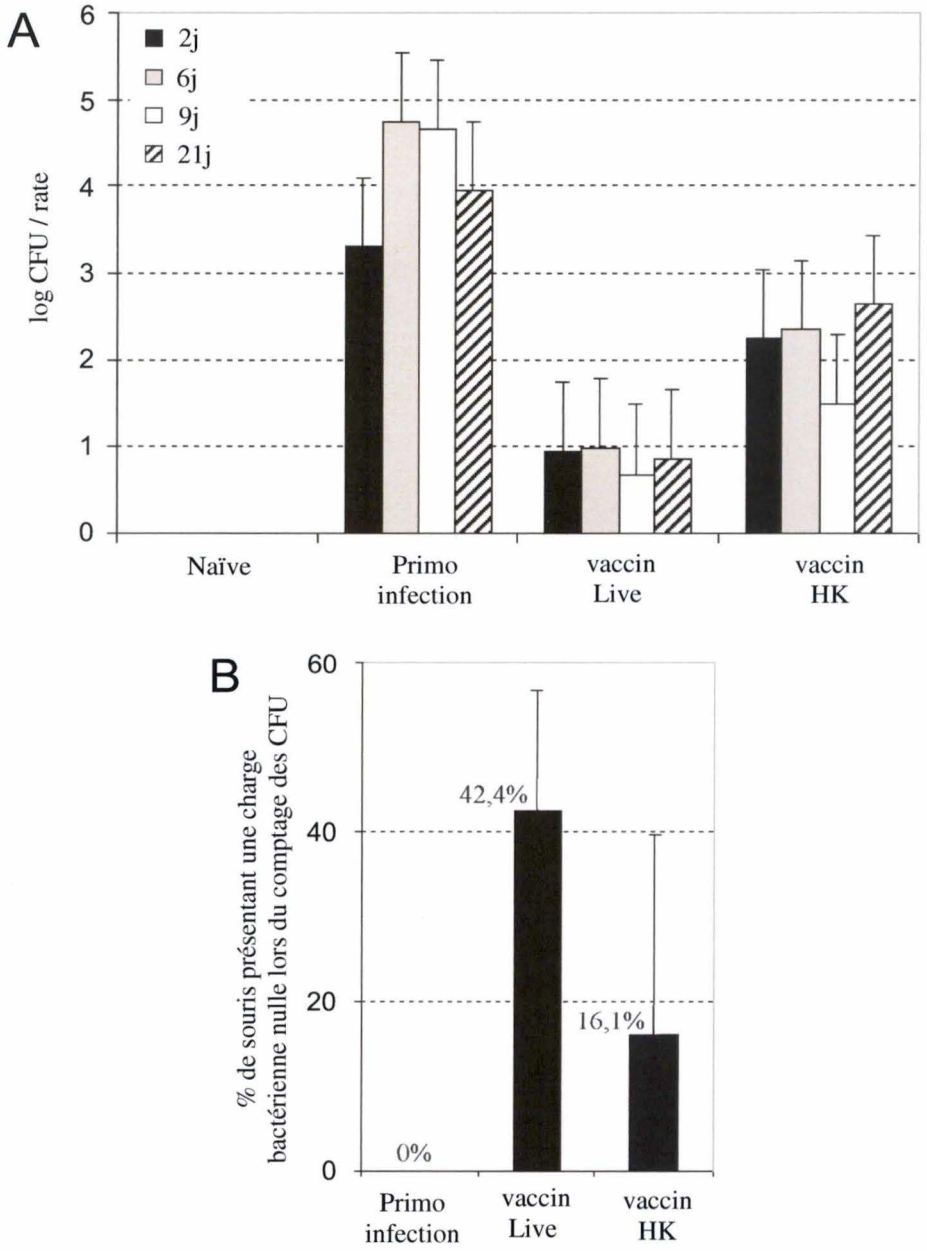


FIGURE 3A : Charge bactérienne observée suite à une infection primaire (Primo) ou secondaire (vaccin Live ou HK) par *B. melitensis*. Le graphique présente en ordonnée les CFU en logarithme et en abscisse les différents groupes de souris : le groupe contrôle (souris naïves), le groupe Primo qui a reçu une seule injection de *B. melitensis*, le groupe VLive qui a été infecté dans un premier temps par un vaccin vivant, puis réinfecté par la souche challenge, le groupe VHK ayant d'abord reçu une injection de vaccin tué avant d'être infecté par la souche challenge. Ces trois derniers groupes ont subi un traitement antibiotique de 15 jours avant de recevoir la deuxième injection de *B. melitensis*. Les résultats obtenus à chaque temps du suivi (2, 6, 9 et 21 jours) sont représentés pour chacun des groupes. On peut considérer que l'inoculation d'un vaccin vivant ou tué confère une protection significative lors d'une infection ultérieure par *B. melitensis*, de minimun 2 logarithmes pour le groupe VLive et 1 logarithme pour le groupe VHK. Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance de la moyenne (95%) qui correspond à +/- 2 SEM (Standard Error of the Mean).

FIGURE 3B : Proportion de souris présentant une charge bactérienne nulle lors du comptage des CFU. Le graphe présente en ordonnée le pourcentage de souris supposées guéries et en abscisse les différents groupes renseignés en figure 3A. On observe que 42,4% des souris infectées par la souche vaccinale vivante semblent avoir réussi à contrôler l'infection, contre 16,1% chez les souris inoculées par la souche vaccinale tuée. Les barres d'erreurs correspondent à 1 écart-type.

- La combinaison FITC-H57-597 (dirigé contre TCRβ[1]), PE-RM4-5 (dirigé contre CD4[2]) et allophycocyanin (APC)-coupled XMG1.2 (dirigé contre l'IFNγ) a permis de mettre en évidence les lymphocytes $TCD4^+$ et les cellules productrices d' IFNγ.

2.2. Résultats du comptage des CFU

La figure 3A présente en logarithme les CFU par rate pour chacun des quatre groupes et pour chaque temps du suivi. On observe que le nombre de bactéries présentes dans les rates issues des groupes VLive et VHK est significativement inférieur à celui du groupe Primo. On peut donc considérer que l'inoculation de souches vaccinales vivantes ou tuées confère une protection significative lors d'une infection ultérieure par *B. melitensis*. Par comparaison avec le groupe Primo, cette protection s'élève à minimum 2 et 1 log pour les groupes VLive et VHK respectivement. Remarquons que, dans chacun des groupes VLive et VHK, par opposition au groupe Primo où l'infection progresse entre le jour 2 et 21, aucune évolution significative du nombre de bactéries n'est observée entre les différents temps du suivi (2, 6, 9 et 21 jours). La figure 3B présente une moyenne sur tous les temps (en pourcentage) du nombre de souris supposées guéries. En effet, à chaque temps du suivi, dans les groupes VLive et VHK, certains étalements étaient négatifs. On constate que 42,41 % des souris infectées par la souche vaccinale vivante semblent avoir réussi à neutraliser l'infection, contre 16 % chez les souris inoculées par la souche vaccinale tuée. Il est à noter que l'observation de souris négatives lors du comptage des CFU commença dès le deuxième jour après l'infection.

2.3. Résultats de l'analyse FACS

L'expression d'IFNγ et d'iNOS ont été mesurées chacune sur la population splénique totale ($1{,}5.10^6$ cellules acquises), puis sur les lymphocytes T $CD4^+$ ou les TipDC respectivement. Les cellules ont été sélectionnées selon leur taille (FSC) et leur granulosité (SSC) pour éliminer les cellules mortes et les débris cellulaires de l'analyse.

2.3.1. Production d'IFNγ

- *Fréquence des cellules positives pour l'IFNγ dans la population splénique totale*

Une étude récente a montré que le nombre de cellules produisant de l'IFNγ augmentait graduellement jusqu'à 15 jours lors d'une infection primaire par *B. melitensis* puis diminuait (Copin, *et al.*, 2007). Pour mettre en évidence les cellules productrices d'IFNγ ($IFN\gamma^+$) parmi la population splénique totale, nous avons sélectionné ces cellules (fig. 4A, cadre R1). Le nombre de cellules $IFN\gamma^+$ mesuré sur la population splénique totale de chaque groupe est représenté selon une échelle de temps correspondant à chaque étape du suivi (fig. 4B). Le profil obtenu lors de la réponse secondaire des groupes VLive et VHK se distingue significativement de celui observé dans le cas d'une réponse primaire (Primo). A 2 jours, on

---

[1] **TCRβ :** chaîne β du récepteur des lymphocytes T (TCR), qui interagit avec les molécules du MHC I ou II exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigène (APCs).

[2] **CD4 :** corécepteur membranaire exprimé majoritairement par les lymphocytes Thelper et les cellules T régulatrices, qui interagit avec les molécules du MHC II présentes à la surface des APCs. Associé au TCR, il participe à l'activation de cette cellule.

Fig 4. Production d'IFNγ mesurée sur la population splénique totale lors d'une infection primaire ou secondaire (vaccin vivant ou tué) par *B. melitensis*

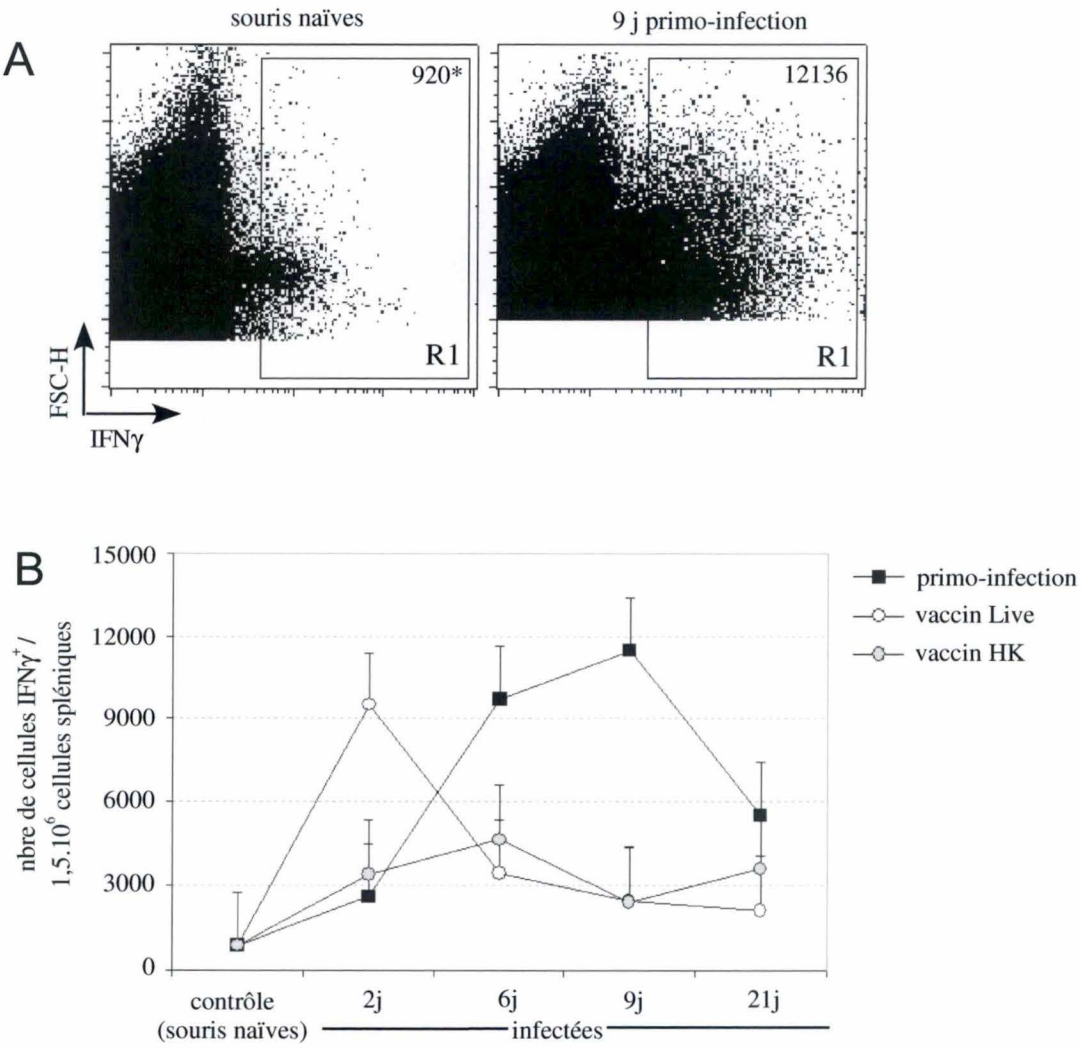


FIGURE 4A : Sélection des cellules exprimant l'IFNγ (IFNγ⁺)parmi les cellules spléniques (1,5.10⁶ cellules acquises), selon un critère de taille (FSC-H). Ces deux dot plots ont été choisis à titre d'exemple pour représenter l'augmentation du nombre de cellules exprimant l'IFNγ apparaissant entre une souris naïve et une souris infectée (9 jours post-infection, ce qui correspond au pic d'expression de l'IFNγ). Chacun des dot plots reprend les cellules issues des demi-rates de deux souris et sont représentatifs de 4 groupes de souris (pour l'infection primaire à 9 jours) ou de 2 groupes (pour les souris naïves).

*nombre de cellules IFNγ⁺ / 1,5.10⁶ cellules spléniques

FIGURE 4B : Nombre de cellules exprimant l'IFNγ parmi les cellules spléniques suite à une infection primaire (Primo) ou secondaire (vaccin Live ou HK) par *B. melitensis*. Le graphique représente, pour chacun des 3 groupes (Primo, VLive et VHK), le nombre de cellules IFNγ⁺ en ordonnée et les différents temps du suivi (2, 6, 9 et 21 jours) en abscisse. Le groupe VLive présente un pic de cellules IFNγ⁺ nettement plus précoce que le groupe Primo. On observe également une augmentation de ces cellules dans le groupe VHK, mais ce nombre reste relativement bas et n'augmente pas de manière significative au cours de l'infection. Chacune des analyses a été réalisée sur 4 groupes de cellules spléniques, regroupant chacun les demi-rates de deux souris. Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance de la moyenne (95%) qui correspond à +/- 2 SEM (Standard Error of the Mean).

Fig 5. Production d'IFNγ mesurée sur la population splénique TCRβ⁺CD4⁺ lors d'une infection primaire ou secondaire (vaccin vivant ou tué) par *B. melitensis*

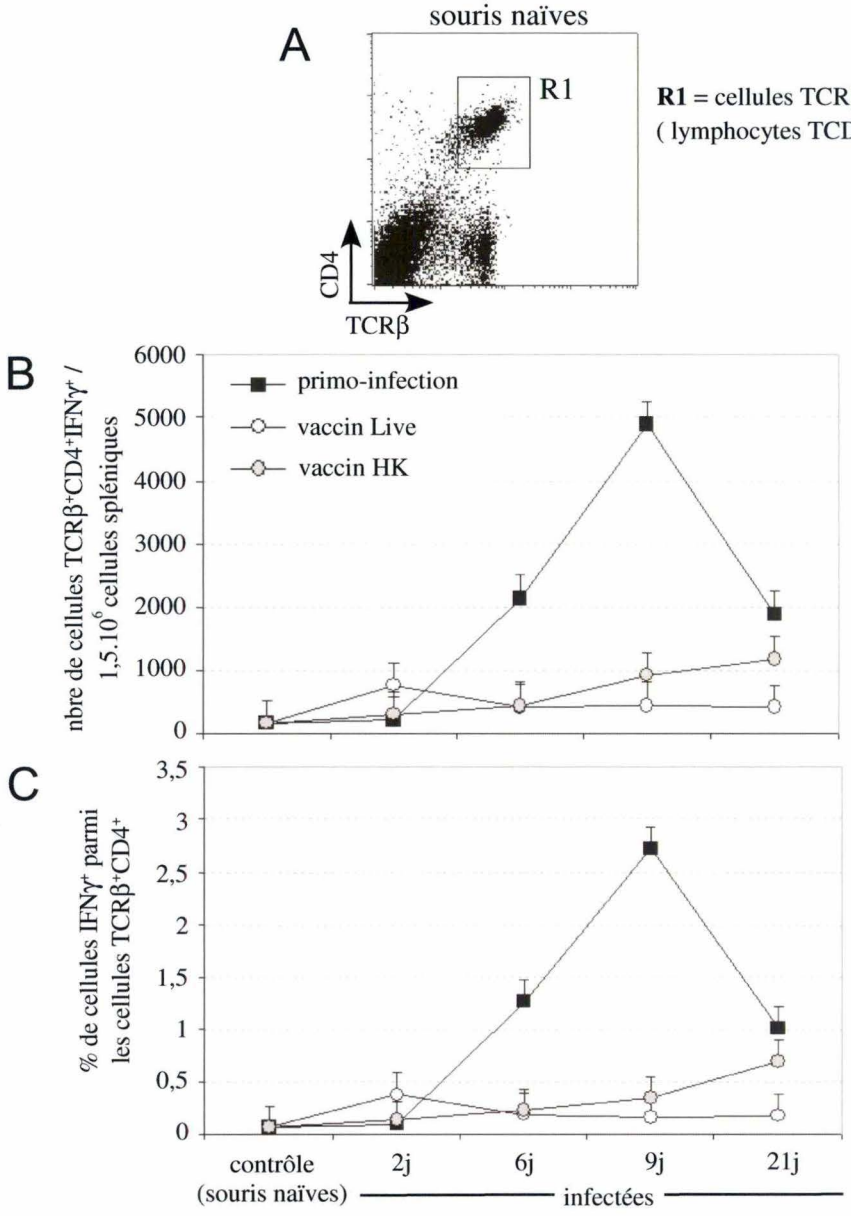


FIGURE 5A : Sélection des lymphocytes T CD4⁺ en fonction de leurs marqueurs de surface TCRβ et CD4 (cadre R1) parmi la population splénique totale (1,5.10⁶ cellules acquises). Cette sélection nous a permis d'analyser l'expression d'IFNγ dans la population TCRβ⁺CD4⁺. Ce dot plot est représentatif de 2 groupes de souris naïves, regroupant chacun les demi-rates d'1 ou 2 souris.

FIGURE 5B : Nombre de lymphocytes TCD4⁺ exprimant l'IFNγ, mesuré sur la population splénique totale. Pour chacun des 3 groupes (Primo, VLive et VHK), le graphique représente en ordonnée le nombre de cellules TCRβ⁺CD4⁺IFNγ⁺ et en abscisse les différents temps du suivi (2, 6, 9, 21 jours). Lors d'une infection primaire, les lymphocytes TCD4⁺ contribuent largement à la production d'IFNγ. Par contre, lors d'une réponse secondaire, cette contribution est beaucoup plus faible. Dans le groupe VLive, un pic est observé dès 2 jours, tandis que dans le groupe VHK, le nombre de lymphocytes TCRβ⁺CD4⁺IFNγ⁺ augmente continuellement jusqu'à 21 jours.

FIGURE 5C : Pourcentage de cellules exprimant l'IFNγ, mesuré sur la population de lymphocytes TCRβ⁺CD4⁺. La présentation est la même qu'en figure 5B. Par comparaison au groupe Primo, le pourcentage de cellules IFNγ⁺ par les lymphocytes TCRβ⁺CD4⁺ demeure faible dans les deux groupes VLive et VHK. Un pic précoce (faible) est observé dans le groupe VLive tandis que le pourcentage de cellules IFNγ⁺ augmente continuellement dans le groupe VHK.
Graphes 5B et 5C : les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance de la moyenne (95%) qui correspond à +/- 2 SEM (Standard Error of the Mean).

Fig 6. Production d'IFNγ mesurée sur la population splénique TCRβ⁺CD4⁺ lors d'une infection primaire ou secondaire (vaccin vivant ou tué) par *B. melitensis*

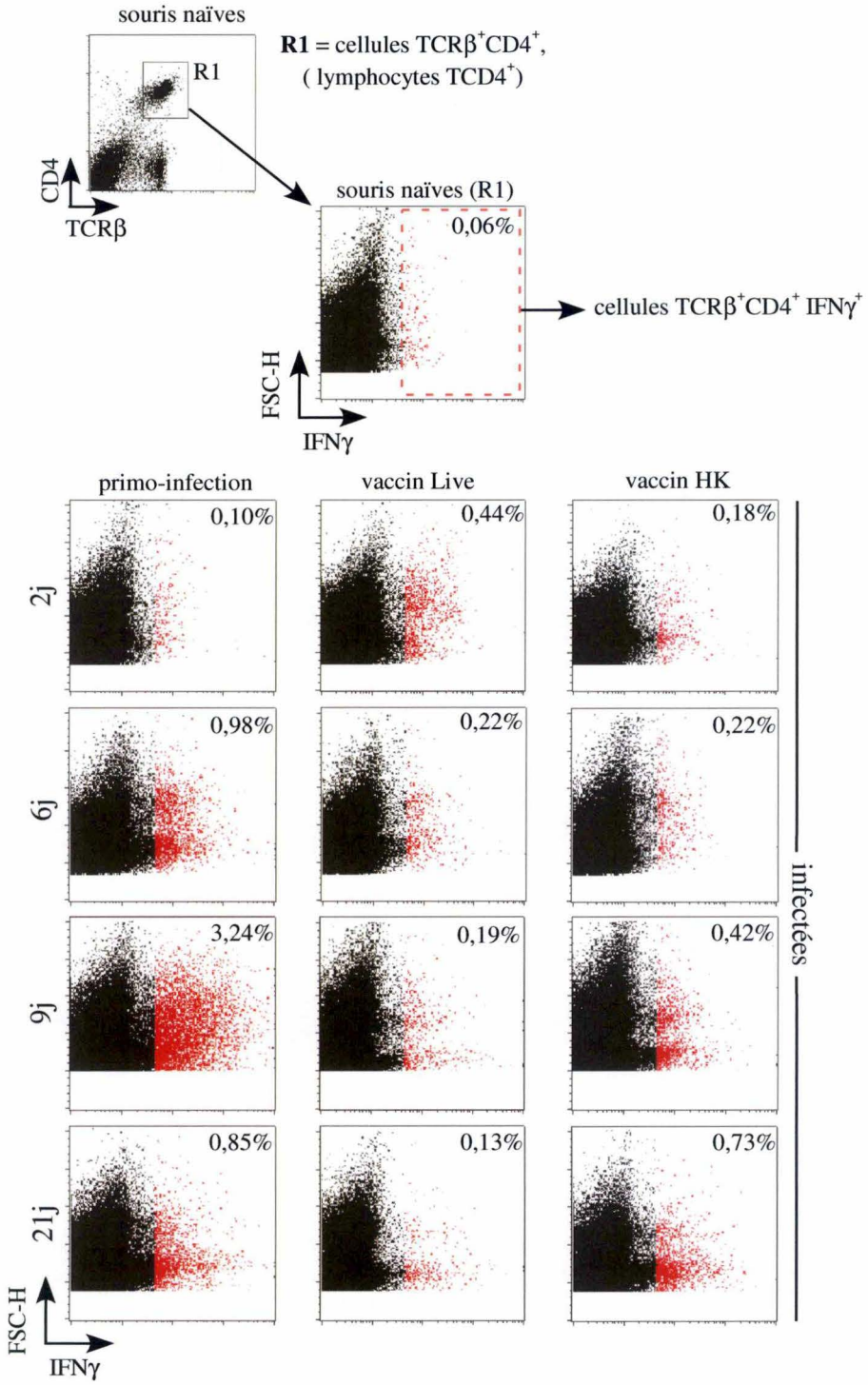


FIGURE 6 : Représentation en dot plots du pourcentage de cellules exprimant l'IFNγ parmi les cellules TCRβ⁺CD4⁺. Le cadre R1 nous permet de sélectionner les lymphocytes TCD4⁺. Parmi ces lymphocytes, nous avons analysé la population cellulaire exprimant l'IFNγ (fenêtre en pointillés rouges). Les cellules spléniques qui expriment l'IFNγ sont représentées en rouge et leur pourcentage parmi les cellules TCRβ⁺CD4⁺ (R1) est indiqué pour chaque dot plot. Chacun de ces dot plots correspond à l'analyse d'un échantillon, soit les demi-rates de 2 souris, et est représentatif de 4 analyses individuelles.

observe un pic de cellules IFNγ$^+$ (9488 cellules) chez le groupe VLive. Cette augmentation importante est précoce par comparaison à la situation observée lors d'une réponse primaire (pic à 9 jours chez le groupe Primo, 11505 cellules). Dans le groupe VHK, on observe également une augmentation du nombre de cellules IFNγ$^+$, mais ce nombre reste relativement bas (entre 2400 et 4700 cellules) et ne présente pas de pic bien accentué (le nombre maximum de cellules est observé à 6 jours).

- *Fréquence des cellules IFNγ$^+$ au sein des lymphocytes TCD4$^+$ de la rate*

Plusieurs types cellulaires produisent de l'IFNγ (lymphocytes TCD4, TCD8, cellules NK). Nous avons porté notre étude sur les lymphocytes TCD4$^+$ dont le rôle majeur a déjà été remarqué lors d'une réponse primaire (Copin, *et al.*, 2007). Les lymphocytes TCD4$^+$ (fig. 5A, cadre R1) ont pu être mis en évidence grâce à la combinaison de marqueurs des molécules TCRβ et CD4 présentes à la surface de ces cellules. Le nombre de lymphocytes TCRβ$^+$CD4$^+$ produisant de l'IFNγ dans chacun des groupes est représenté dans la figure 5B. Dans le cas d'une infection primaire (Primo), le nombre de ces cellules augmente lentement au cours de l'infection et atteint un pic de 4898 cellules à 9 jours avant de décroître. Lors d'une infection secondaire, on observe également une légère augmentation du nombre de cellules TCRβ$^+$ CD4$^+$ IFNγ$^+$, dont le pic apparaît plus tôt chez le groupe VLive (à 2 jours). Ces cellules ne représentent que 8% des cellules spléniques IFNγ$^+$ à 2 jours, ce qui suggère que les lymphocytes TCD4$^+$ ne constituent pas la source principale d'IFNγ. Les marquages cellulaires utilisés dans ces expérimentations nous ont permis d'analyser une autre population cellulaire productrice d'IFNγ, à savoir les lymphocytes TCD8 qui présentent le phénotype TCRβ$^+$CD4$^-$. L'analyse de cette population cellulaire a révélé que leur production d'IFNγ était presque inexistante.

Dans le groupe VHK, le léger pic de cellules TCRβ$^+$CD4$^+$ IFNγ$^+$ observé dans le groupe VLive n'apparaît pas : le nombre de lymphocytes TCRβ$^+$CD4$^+$ IFNγ$^+$ augmente de manière continue jusqu'à 21 jours. A ce moment, près d'un tiers de la production d'IFNγ est réalisée par les lymphocytes TCD4$^+$.

La figure 5C représente le pourcentage des cellules productrices d'IFNγ dans la population splénique de lymphocytes TCD4$^+$. La même tendance est observée : le pourcentage de lymphocytes TCD4$^+$IFNγ$^+$ demeure faible et ne présente aucune évolution significative dans le groupe VLive, tandis que ce pourcentage semble augmenter dans le groupe VHK (de 0,14% à 2 jours à 0,70% à 21 jours).

La figure 6 présente à titre d'exemple les mêmes données, sous la forme de dot plot. Pour cette représentation, chaque dot plot correspond à l'analyse d'un échantillon (soit deux demi rates réunies), représentatif de son groupe.

2.3.2. Expression d'iNOS

- *Expression d'iNOS mesurée sur la population splénique totale*

Dans le but de mettre en évidence les cellules exprimant l'enzyme iNOS (iNOS$^+$) dans la population splénique totale, nous avons utilisé la même approche que celle suivie pour l'étude de la production d'IFNγ (fig. 7A). Le nombre de cellules iNOS$^+$ mesuré sur la population splénique totale de chaque groupe est représenté selon une échelle de temps correspondant à chaque étape du suivi (fig. 7B). Ce nombre semble évoluer de la même manière entre les trois groupes Primo, VLive et VHK. Cependant, la réponse secondaire développée par les groupes VLive et VHK semble être caractérisée par une expression moindre d'iNOS. Dans le groupe VLive, celle-ci semble atteindre son maximum un peu plus tôt que dans les groupes Primo et VHK (6 jours au lieu de 9 jours).

Fig 7. Expression d'iNOS mesurée sur la population splénique totale
lors d'une infection primaire ou secondaire (vaccin vivant ou tué) par *B. melitensis*

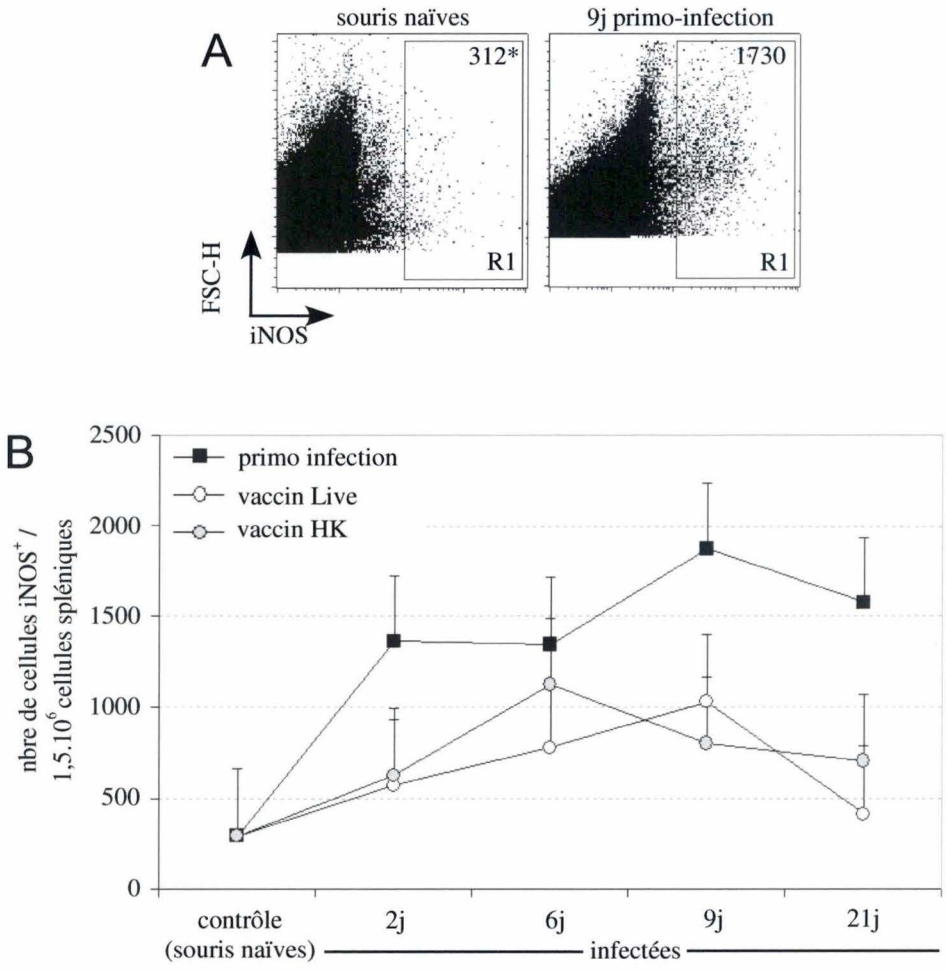


FIGURE 7A : Sélection des cellules exprimant l'iNOS (iNOS$^+$) parmi les cellules spléniques (1,5.10^6 cellules acquises), selon un critère de taille (FSC-H). Ces deux dot plots ont été choisis à titre d'exemple pour illustrer l'augmentation du nombre de cellules exprimant l'iNOS (cadre R1) apparaissant entre une souris naïve et une souris infectée (9 jours post-infection, ce qui correspond au pic d'expression de l'iNOS). Chacun des dot plots reprend les cellules issues des demi-rates de 2 souris et sont représentatifs de 4 groupes de souris (pour l'infection primaire à 9 jours) ou de 2 groupes (pour les souris naïves).

*nombre de cellules iNOS$^+$ / 1,5.10^6 cellules spléniques

FIGURE 7B : Nombre de cellules exprimant l'iNOS parmi les cellules spléniques suite à une infection primaire (Primo) ou secondaire (vaccin Live ou HK) par *B. melitensis*. Le graphique représente, pour chacun des 3 groupes (Primo, VLive et VHK), le nombre de cellules iNOS$^+$ en ordonnée et les différents temps du suivi (2, 6, 9 et 21 jours) en abscisse. Le nombre de cellules iNOS$^+$, bien que moins élevé dans les groupes VLive et VHK, semble évoluer de la même manière parmi les 3 groupes. Dans le groupe VHK, il semblerait cependant que ce nombre atteigne son maximum plus tôt, à 6 jours. Chacune des analyses a été réalisée sur 4 groupes de cellules spléniques, regroupant chacun les demi-rates de 2 souris. Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance de la moyenne (95%) qui correspond à +/- 2 SEM (Standard Error of the Mean).

Plusieurs populations cellulaires expriment l'iNOS, parmi celles-ci, on distingue les macrophages, neutrophiles, TipDC et autres cellules dont on ne connaît pas encore l'identité (Chakravortty, *et al.*, 2003). Nous nous intéresserons ici aux TipDC, principales productrices d'iNOS durant la deuxième semaine de la réponse primaire envers *Brucella* (Copin, *et al.*, 2007).

- *Expression d'iNOS mesurée sur les TipDC de la rate*

Les TipDC sont des cellules dendritiques spécialisées caractérisées par le phénotype $CD11b^+CD11c^+LY\text{-}6C^+$ et exposent de nombreuses molécules de MHC II à leur surface. Ces cellules dendritiques sont particulières en ce sens qu'elles produisent du TNF-α et expriment l'iNOS durant l'infection (Serbina, *et al.*, 2003b, Tam *et al.*, 2004). Pour identifier ces cellules dans la population splénique totale, nous avons utilisé plusieurs combinaisons de marqueurs, tels que CD11b, CD11c ainsi que MHCII. En parallèle, nous avons cherché à détecter l'expression d'iNOS (fig. 8A, le cadre R1 représente les cellules $iNOS^+$). La coloration CD11b/CD11c (fig. 8B) révèle une forte augmentation de cellules doublement positives à 9 jours (3297 cellules $CD11c^{high}CD11b^{high}$). Près de la moitié de ces cellules expriment l'iNOS, ce qui suggère qu'il pourrait s'agir de TipDC. La coloration CD11b/MHCII (fig. 8C) confirme le recrutement de ce type cellulaire. A 9 jours, il apparaît que la majorité de cellules exprimant l'iNOS sont $CD11c^{high}CD11b^{high}MHCII^{high}$.

Nous avons ensuite voulu savoir si ces TipDC étaient recrutées de la même façon lors d'une réponse secondaire. L'analyse du nombre de cellules $CD11b^+CD11c^+$ dans la rate nous apporte quelques informations intéressantes (fig. 9A, cadre R2). Lors d'une réponse primaire (Primo), le nombre de cellules $CD11b^+CD11c^+$ augmente graduellement jusqu'à 9 jours, puis décroît rapidement. Dans le cas des réponses secondaires développées chez les groupes VLive et VHK, on observe également un léger recrutement de ce type cellulaire. Cependant, ce recrutement apparaît plus tôt que dans la réponse primaire (à 6 jours au lieu de 9), et le nombre de cellules est significativement plus faible (environ 400 cellules dans les groupes VLive et VHK à 6 jours contre 1637 cellules dans le groupe Primo à 9 jours). L'évolution du nombre de cellules $CD11b^+CD11c^+$ est semblable entre les groupes VLive et VHK. Cependant on constate une diminution beaucoup plus rapide de ces cellules dans le groupe VLive (à 21 jours), par comparaison au groupe VHK où ce chiffre tend à se stabiliser.

Nous nous sommes ensuite intéressés au pourcentage de cellules $iNOS^+$ parmi les cellules $CD11b^+CD11c^+$ (fig. 9B). Lors de la réponse primaire (Primo), on constate que le pourcentage des cellules $iNOS^+$ augmente continuellement jusqu'à 21 jours où il s'élève à plus de 50%. Le profil observé lors de la réponse secondaire est quelque peu différent. Il semblerait que la tendance évolutive soit la même qu'en réponse primaire entre le $6^{ème}$ et le $21^{ème}$ jour, avec un pourcentage de cellules $iNOS^+$ plus faible pour les groupes VLive et VHK. Curieusement, ces deux groupes présentent un pourcentage plus élevé à 2 jours. L'analyse statistique ne révèle cependant aucune différence significative. Ceci peut s'expliquer par le fait que ce pourcentage est mesuré sur le nombre de cellules $CD11b^+CD11c^+$ qui est en réalité très faible à 2 jours (105 et 87 cellules pour les groupes VLive et VHK respectivement), d'où ce résultat peu précis.

Une autre analyse suggère un rôle peu important des TipDC dans la réponse secondaire, qu'elle ait lieu après une vaccination avec une souche vivante ou tuée. En effet, la comparaison du nombre de cellules $CD11b^+CD11c^+$ exprimant l'iNOS (fig. 9B, deuxième graphe) entre les différents groupes nous informe que le recrutement de ces cellules observé dans la réponse primaire est quasi inexistant lors de la réponse secondaire. A 9 jours post-infection, on passe d'une moyenne de 612 cellules dans le groupe Primo à un peu moins de 20

Fig 8. Expression d'iNOS mesurée sur la population splénique totale lors d'une primo-infection par B. melitensis

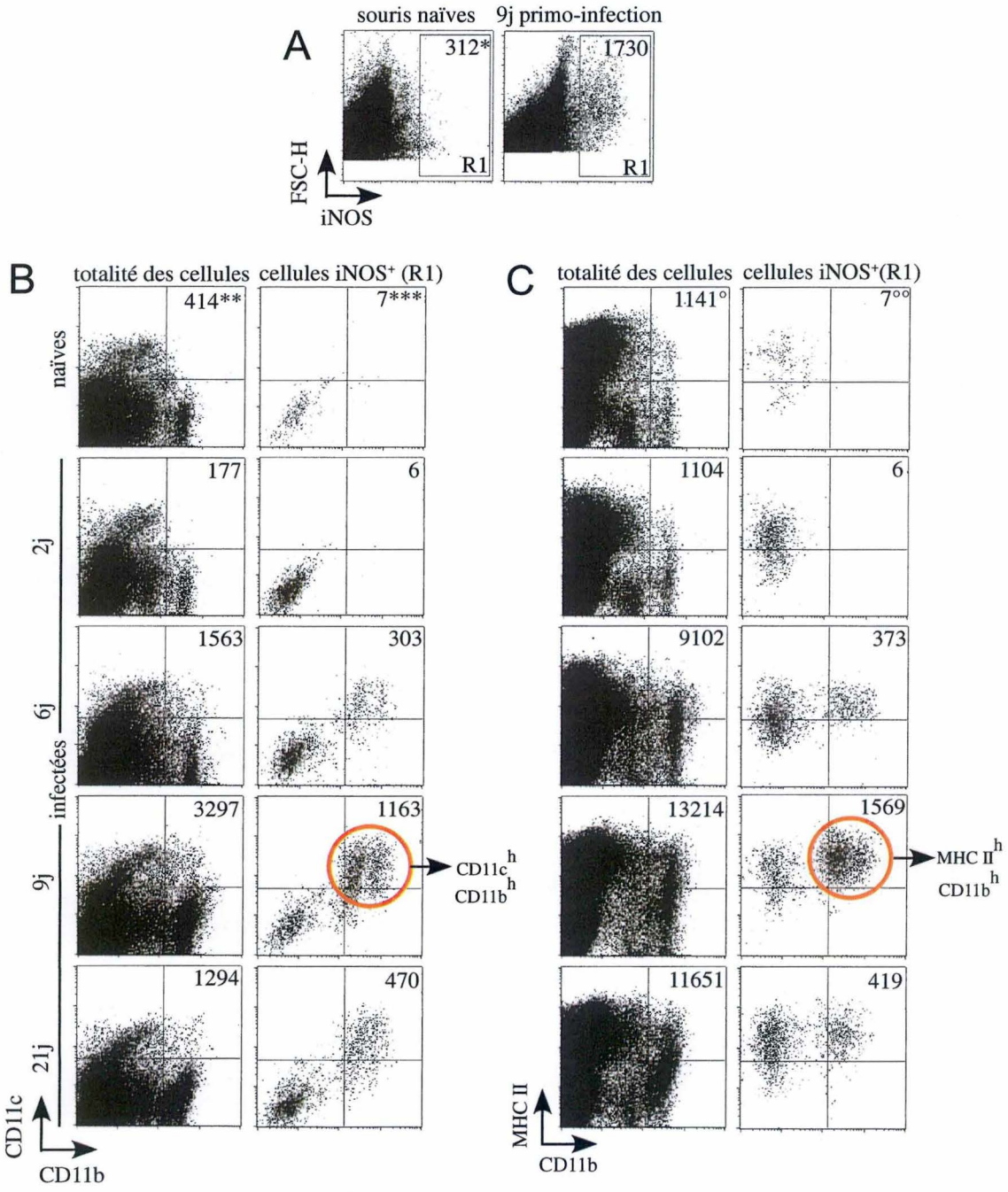


FIGURE 8 : Détection des TipDC (TNF/iNOS producing cells) parmi les cellules spléniques lors d'une infection primaire. Les TipDC sont caractérisées par le phénotype $CD11b^+CD11c^+MHCII^+$. La coloration des cellules spléniques par des anticorps dirigés contre CD11b ou CD11c (B) ou par une autre combinaison dirigés contre CD11b ou MHCII (C) a permis la détection des TipDC dans le groupe Primo, à chaque temps du suivi. Parmi les TipDC, il est possible de détecter celles qui produisent de l'iNOS grâce à un marquage intracellulaire visant cette enzyme puis par une sélection de ces cellules lors de l'analyse (A, cadre R1). A 9 jours, on observe un recrutement important de TipDC exprimant l'iNOS. Chacun de ces dot plots correspond à l'analyse d'un échantillon, soit les demi-rates de 2 souris, et est représentatif de 4 analyses individuelles.

*nombre de cellules $iNOS^+$ / $1{,}5.10^6$ cellules spléniques

**nombre de cellules $CD11b^+CD11c^+$ / $1{,}5.10^6$ cellules spléniques

***nombre de cellules $CD11b^+CD11c^+iNOS^+$

°nombre de cellules $CD11b^+MHCII^+$ / $1{,}5.10^6$ cellules spléniques

°°nombre de cellules $CD11b^+MHCII^+iNOS^+$

cellules dans les groupes VLive et VHK. Lors de la réponse primaire, le nombre de TipDC iNOS$^+$ augmente jusqu'à 9 jours puis décroît de près de 30% à 21 jours.

2.4. En résumé

La réponse immune secondaire développée à l'encontre de *Brucella* ne semble pas faire intervenir les mêmes mécanismes effecteurs que la réponse primaire. La différence observée entre les groupes VLive et VHK nous enseigne que cette réponse immune dépend du type d'antigène inoculé lors du traitement vaccinal. Le comptage des CFU, reflet de l'évolution de l'infection bactérienne, nous informe que les souris ayant déjà rencontré *B. melitensis* présentent une meilleure capacité à neutraliser l'infection lors d'une seconde exposition. Cette compétence semble plus efficace chez les souris ayant rencontré *B. melitensis* vivante. Lors de la réponse secondaire, l'IFNγ, puissant activateur des mécanismes bactéricides des cellules phagocytaires, est produit beaucoup plus tôt qu'en réponse primaire. Cette observation ne s'applique qu'au groupe VLive, le groupe VHK se caractérisant par une faible production d'IFNγ sans pic apparent. Contrairement à ce qui est observé lors d'une réponse primaire, les lymphocytes TCD4$^+$ n'apparaissent pas comme les principaux producteurs d'IFNγ. Concernant l'enzyme iNOS, son expression semble moins importante lors de la réponse secondaire et les TipDC contribuent peu à cette expression. Cependant, dans le groupe VHK, l'expression d'iNOS par ces cellules semble plus importante, surtout aux temps plus tardifs de l'infection (21 jours).

	Log CFU au pic (6 jours)	**souris guéries (%)**	**IFNγ**	**iNOS (TipDC)**
Réponse primaire	4,76	0	+++ (9jours)	+++ (9 jours)
Réponse secondaire VLive	0,99	42,4	++ (2 jours)	+
Réponse secondaire VHK	2,34	16,1	+	++ (21 jours)

Tableau 1 : Résumé des résultats obtenus lors de l'étude de la réponse secondaire développée à l'encontre de *B. melitensis*. La production d'IFNγ et l'expression d'iNOS sont représentées qualitativement par un ou plusieurs « + ».

Fig 9. Expression d'iNOS mesurée sur la population splénique $CD11b^+CD11c^+$ lors d'une infection primaire ou secondaire (vaccin vivant ou tué) par *B. melitensis*

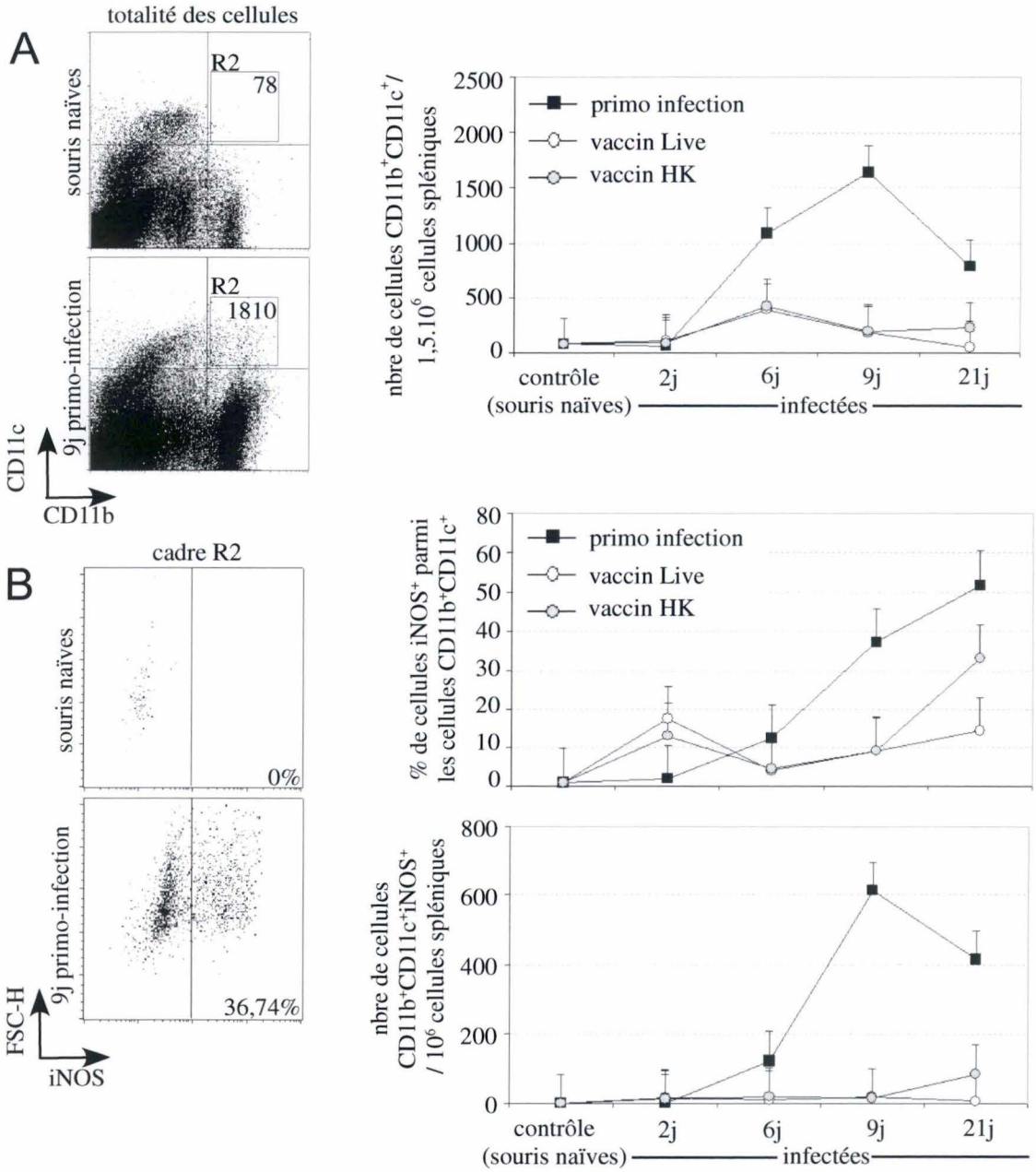


FIGURE 9A : Nombre de cellules $CD11b^+CD11c^+$ mesuré sur la population splénique totale. Deux dot plots ont été choisis à titre d'exemple pour illustrer l'augmentation du nombre de cellules $CD11b^+CD11c^+$ (TipDC, voir cadre R2) entre une souris naïve et une souris infectée. Chacun des dot plots reprend les cellules issues des demi-rates de 2 souris et sont représentatifs de 4 groupes de souris (pour l'infection primaire à 9 jours) ou de 2 groupes (pour les souris naïves). Le graphique représente, pour chacun des 3 groupes (Primo, VLive, VHK), en ordonnée le nombre de cellules $CD11b^+CD11c^+$ et en abscisse le temps (2, 6, 9, 21 jours). Lors d'une réponse primaire, les TipDC sont fortement recrutées (Primo). Ce recrutement est nettement moins important en réponse secondaire (VLive et VHK) et apparaît un peu plus tôt. Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance de la moyenne (95%) qui correspond à +/- 2 SEM (Standard Error of the Mean).

FIGURE 9B : Expression d'iNOS par les TipDC. Les 2 dot plots illustrent l'expression d'iNOS par les TipDC (cellules sélectionnées par le cadre R2), chez une souris naïve ou infectée. Le pourcentage de cellules exprimant l'iNOS ($iNOS^+$) est indiqué dans le quadrant. Deux graphiques représentent l'expression d'iNOS, soit sous la forme d'un pourcentage de cellules $iNOS^+$ parmi les cellules $CD11b^+CD11c^+$, soit en tant que nombre de cellules $CD11b^+CD11c^+iNOS^+$ mesuré sur la population splénique totale. Le premier nous informe que le pourcentage de cellules $iNOS^+$ parmi les cellules $CD11b^+CD11c^+$ augmente jusqu'à 21 jours, mais apparaît moins élevé en réponse secondaire (VLive et VHK). Le deuxième nous indique que le nombre de cellules $CD11b^+CD11c^+$ exprimant l'iNOS est extrêmement faible chez les groupes VLive et VHK, comparé au groupe Primo, ce qui suggère que les TipDC ont une très faible contribution dans la production d'iNOS. Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance de la moyenne (95%) qui correspond à +/- 2 SEM (Standard Error of the Mean).

B. MISE EN EVIDENCE DE LA CONTRIBUTION DES CELLULES T REGULATRICES LORS D'UNE INFECTION PAR *BRUCELLA MELITENSIS*

Le système immunitaire est une arme puissante envers les divers pathogènes qui assaillent l'organisme quotidiennement. Un tel système, de par la complexité qui le caractérise, doit être soumis à des mécanismes régulateurs. En effet, une réponse immunitaire trop intense ou trop longue peut devenir dangereuse pour l'organisme. Ces mécanismes régulateurs doivent empêcher le développement d'une réponse immunitaire excessive tout en permettant l'élimination du pathogène. Cet équilibre fragile est déterminé par les proportions respectives en mécanismes effecteurs de l'immunité et en mécanismes régulateurs. Parmi ceux-ci, nous nous intéresserons principalement aux lymphocytes T $CD4^+$ et TipDC (effecteurs envers *B. melitensis*) ainsi qu'aux cellules T régulatrices (Tregs) et à l'IL-10 (régulateurs).

1. Comment étudier le rôle des cellules T régulatrices ?

La meilleure façon d'étudier le rôle des cellules Tregs lors d'une infection in vivo est de supprimer ces cellules ou de bloquer leurs mécanismes régulateurs. En étudiant le déséquilibre du système immunitaire résultant de cette suppression, il devient possible de comprendre la place occupée par de telles cellules dans l'infection. Les cellules Tregs sont connues pour exprimer le récepteur CD25 et pour sécréter de l'IL-10 (cytokine immunosuppressive). Cependant, le seul marqueur connu à ce jour qui est unique aux cellules Tregs est le facteur de transcription FoxP3 (forkhead box protein 3). L'utilisation de souris knock-out pour CD25, FoxP3 ou l'IL-10 est déconseillée car ces souris présentent des syndromes auto-immunitaires sévères (Sutmuller, *et al.*, 2006). Dans le cadre de ce travail, nous avons réalisé des traitements utilisant des anticorps qui visent la protéine membranaire CD25 et le récepteur de l'IL-10 (IL-10R). Ceux-ci ont été administrés à des souris C57BL/6 par injection intra-péritonéale.

- le traitement par les anticorps PC61 (dirigés contre CD25) conduit à une élimination partielle (environ 50%) des cellules Tregs (subset $CD4^+CD69^{low}FoxP3^+$) et à une inactivation fonctionnelle des Tregs restantes (McNeill *et al.*, 2007). La dose administrée est de 500µg par souris.
- Le traitement par les anticorps 1B1.2 (dirigés contre l'IL-10R) conduit à l'inactivation de la voie de transduction du signal issue du récepteur (100µg par souris).

Pour une meilleure fluidité de notre exposé, nous appellerons les anticorps PC61 : αCD25, et les anticorps 1B1.2 : αIL-10R.

2. Déroulement du traitement

Dans le but d'étudier l'impact des traitements cités ci-dessus sur l'évolution de l'infection par *B. melitensis*, nous avons divisé l'expérimentation en deux temps. Un premier lot de souris a reçu le traitement pendant une période de 20 jours, tandis qu'un deuxième lot n'a subit que 5 jours de traitement. Une cinquantaine de souris C57BL/6 âgées de 7 à 9 semaines a été divisée en 10 groupes (fig. 10) :

- 3 groupes de 7 souris ont été infectés par *B. melitensis* et traités 20 jours avec soit de l'αCD25 soit de l'αIL-10R ou encore des anticorps de rat (que nous appellerons IgC,

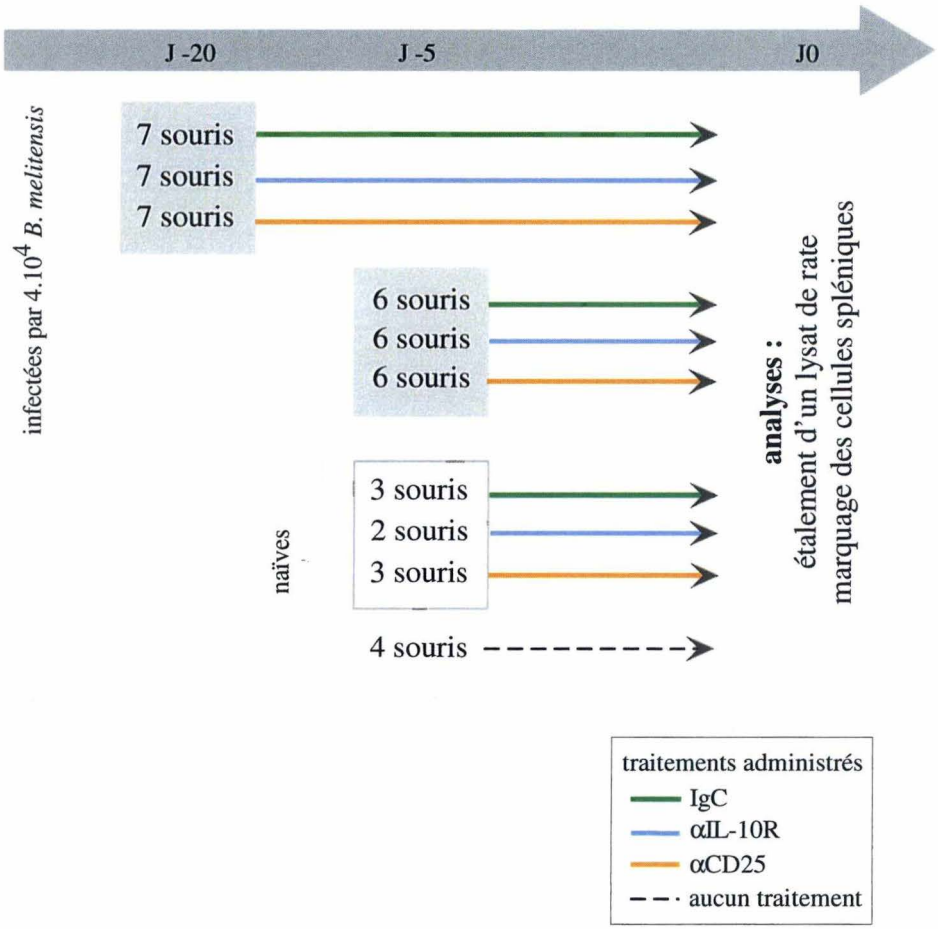


FIGURE 10. Etude du rôle des cellules T régulatrices et de l'IL-10 lors d'une infection par *B. melitensis* : déroulement des traitements. Une cinquantaine de souris a été divisée en 10 groupes. Trois groupes ont été infectés par *B. melitensis* puis traités pendant une période de 20 jours par l'IgC, l'αIL-10R ou l'αCD25. Trois autres groupes ont également été infectés et traités de la même façon, mais durant 5 jours seulement. Enfin, 3 groupes ont reçu les mêmes traitements mais n'ont pas été infectés tandis qu'un dernier groupe n'a subi ni infection ni traitement. L'ensemble des souris a été sacrifié à la fin des traitements dans le but d'étudier l'évolution de l'infection (comptage des CFU) et de la réponse immunitaire (analyses au FACS).

500µg/souris). Ce dernier traitement fera office de contrôle car ces anticorps ne reconnaissent pas les constituants murins.

- 3 groupes de 6 souris ont été infectés et traités 5 jours selon le même schéma,
- 3 groupes de 2 à 3 souris ont reçu les mêmes traitements, mais n'ont pas été infectés,
- 1 groupe contrôle (4 souris) n'a subi ni infection ni traitement.

Les étapes qui suivent sont décrites chronologiquement :

Infection des souris J-20 par *Brucella melitensis* et traitement anticorps

Quelques heures avant l'infection (2-3h), un prétraitement (αCD25, αIL-10R et IgC) a été administrés aux 3 groupes de souris. Les anticorps ont été administrés par injection intra-péritonéale, à raison de 200µl par souris. L'infection des 3 groupes a été réalisée par injection intra-péritonéale de 4.10^4 bactéries. La dose infectante a été contrôlée par l'étalement de plusieurs dilutions de l'inoculum sur du milieu 2YT, puis comptage des CFU après 4 jours de croissance à 37°C. Dans le but d'améliorer leur efficacité, les traitements ont été administrés quotidiennement et à la même heure les deux premiers jours. Par la suite, les injections ont été réalisées tous les deux jours. Sur la période de 20 jours, chaque souris a reçu 11 injections.

Infection des souris J-5 et traitement

La même procédure a été utilisée. Après un prétraitement (αCD25, αIL-10R et IgC), chacun des 3 groupes a été infecté par injection intra-péritonéale ($4 .10^4$ bactéries). Durant les 3 premiers jours, les traitements ont été administrés quotidiennement. La quatrième dose a été administrée le $5^{ème}$ jour.

Traitement des cellules spléniques en vue d'un comptage des CFU et d'une analyse au cytomètre de flux

Les souris de chacun des groupes ont été sacrifiées au $5^{ème}$ ou $20^{ème}$ jour du traitement selon les groupes. La rate de chacune des souris a été prélevée et divisée en deux, une moitié étant destinée au comptage des CFU et l'autre à l'analyse au cytomètre de flux :

- Le comptage des CFU nous a permis d'évaluer l'impact des traitements administrés sur l'évolution de l'infection par *B. melitensis* à 5 et 20 jours. Les bactéries issues de chaque demi rate ont été libérées par un broyage mécanique de l'organe et une lyse des cellules dans du PBS Triton 0,1%, puis étalées sur du milieu 2YT. Le comptage des CFU a été réalisé après 4 jours de croissance à 37°C.
- L'analyse au cytomètre de flux nous a permis quant à elle d'étudier l'impact des traitements administrés sur les cellules T régulatrices ainsi que sur les lymphocytes $TCD4^+$ et les TipDC dont le rôle est reconnu lors d'une réponse primaire envers *B. melitensis*. Nous avons également mesuré l'expression de l'iNOS et la production d'IFNγ. Dans cette optique, nous avons réalisé 4 colorations cellulaires sur les cellules spléniques. D'un point de vue pratique, nous avons choisi de réunir les demi-rates des souris de chacun des 10 groupes de souris plutôt que de faire une étude individuelle (51 souris). Les 4 colorations suivantes ont donc été réalisées sur chacun des 10 groupes :

Fig 11. Impact de la neutralisation des cellules T régulatrices ou de l'IL-10R sur les CFU mesurés dans la rate

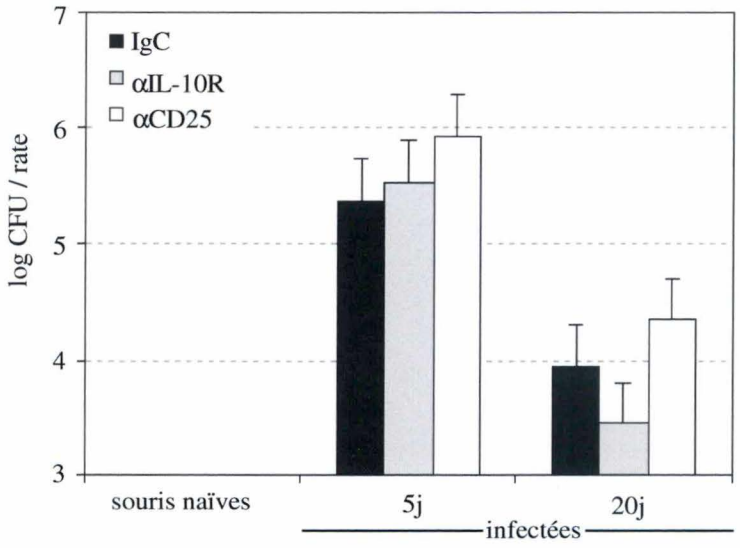


FIGURE 11 : Charge bactérienne observée dans la rate suite à l'administration des traitements αCD25 ou αIL-10R à des souris C57BL/6 infectées par *B. melitensis*. Le graphique présente en ordonnée les CFU en logarithme et en abscisse le temps, pour chacun des groupes de souris traités. Le groupe IgC a été traité par des anticorps de rat et constitue donc le contrôle, le groupe αIL-10R a été traité par des anticorps dirigés contre le récepteur de l'IL-10 et le groupe αCD25 par des anticorps dirigés contre le récepteur CD25. Ces 3 groupes ont été infectés par *B. melitensis* et traités, un groupe de souris naïves n'a pas été infecté ni traité. A 20 jours, les souris ayant reçu le traitement αIL-10R présentent un nombre de bactéries 5 fois inférieur au groupe contrôle (IgC), tandis qu'aucun effet n'apparaît chez les souris traitées par l'αCD25. L'étude a été réalisée sur des groupes de 6 à 7 souris (2 ou 3 pour les naïves). Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance de la moyenne (95%) qui correspond à +/- 2 SEM (Standard Error of the Mean).

- La combinaison FITC-H57-597 (dirigé contre TCRβ), PE-7D4 (dirigé contre CD25[1]) et APC-RM4-5 (dirigé contre CD4) a permis d'isoler les lymphocytes $TCRC\beta^+CD4^+CD25^+$,
- La combinaison FITC-M1/70 (dirigé contre CD11b), PE-HL3 (dirigé contre CD11c) et M-19 (dirigé contre l'iNOS) a permis notamment d'isoler les TipDC et les cellules productrices d'iNOS,
- La combinaison FITC-M1/70 (dirigé contre CD11b), PE-M5/114.15.2 (dirigé contre le MHC II) et M-19 a permis de confirmer la présence des TipDC,
- La combinaison FITC-H57-597 (dirigé contre TCRβ), PE-RM4-5 (dirigé contre CD4) et APC-XMG1.2 (dirigé contre l'IFNγ) a permis de mettre en évidence les lymphocytes $TCD4^+$ et les cellules productrices d' IFNγ.

3. Résultats

3.1. Résultats du comptage des CFU

La figure 11 représente en logarithme les CFU par rate pour chacun des groupes traités pendant 5 ou 20 jours. Les groupes IgC (en noir) constituent le contrôle utilisé pour la comparaison avec les groupes traités par l'αCD25 et l'αIL-10R. A 5 jours, les traitements ne semblent pas avoir d'impact sur le nombre de bactéries : aucune différence significative n'est observée entre les groupes traités par l'IgC, l'αCD25 ou l'αIL-10R. Cependant, à 20 jours, on constate un impact important. Les souris ayant reçu le traitement αIL-10R présentent un nombre de bactéries cinq fois inférieur au contrôle (IgC). Il apparaît donc que la neutralisation du récepteur de l'IL-10, cytokine anti-inflammatoire, pourrait contribuer à un meilleur contrôle de l'infection. Par contre, les souris ayant reçu le traitement αCD25 ne présentent aucune diminution du nombre de bactéries lorsqu'elles sont comparées au contrôle (IgC). L'altération du nombre de cellules Tregs actives suite à 20 jours de traitement avec l'αCD25 ne semble pas affecter significativement le contrôle de l'infection.

3.2. Résultats de l'analyse au FACS

Dans un premier temps, l'analyse au cytomètre de flux nous a permis de vérifier l'élimination partielle des cellules Tregs suite au traitement par l'αCD25. Dans un deuxième temps, nous avons mesuré les divers paramètres caractéristiques de la réponse immunitaire envers *B. melitensis*, à savoir la production d'IFNγ par les lymphocytes $TCD4^+$ et l'expression d'iNOS par les TipDC. Pour rappel, les résultats qui suivent ne sont pas issus d'une analyse individuelle de chaque souris, toutes les demi-rates d'un même groupe ayant systématiquement été réunies pour les colorations.

---

[1] **CD25 :** sous-unité α du récepteur de l'IL-2. L'IL-2Rα est un récepteur de basse affinité exprimé sur les lymphocytes T et B activés. Il peut s'associer avec l'IL-2Rβ et γ pour former un récepteur de haute affinité. Il est à noter que l'anticorps 7D4 utilisé pour la coloration ne reconnaît pas le même épitope que l'anticorps PC61 utilisé pour le traitement des souris.

Fig 12 : Elimination des cellules T CD25⁺ in vivo

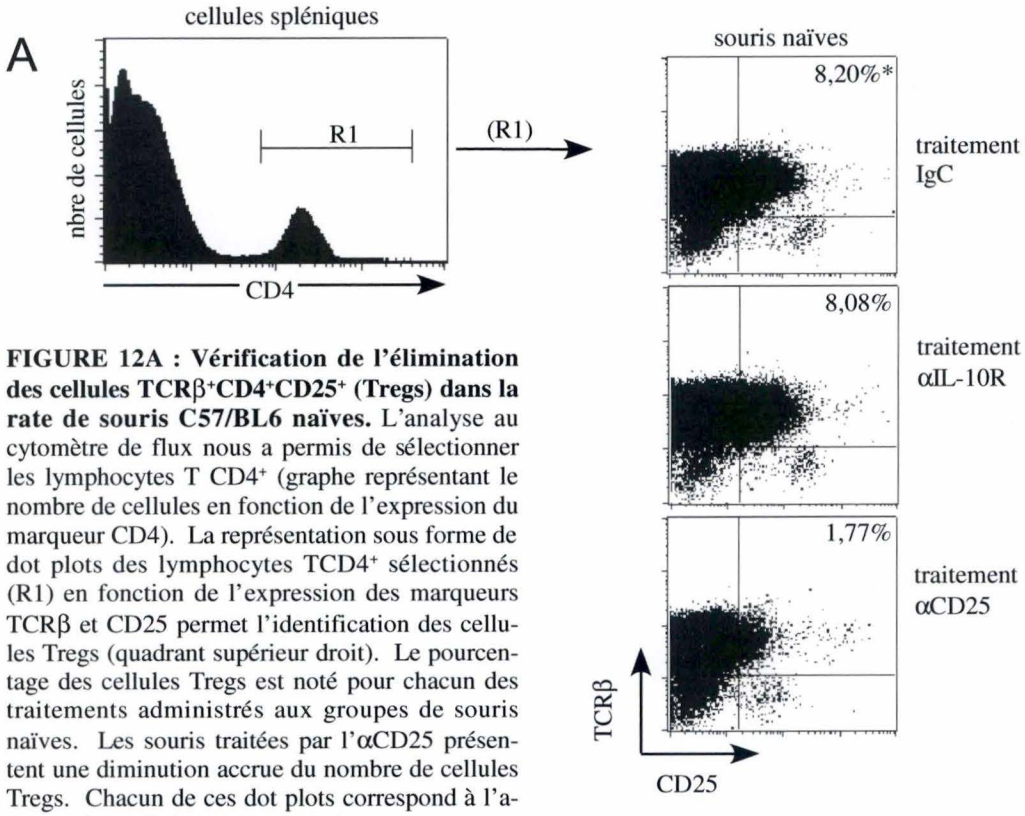


FIGURE 12A : Vérification de l'élimination des cellules TCRβ⁺CD4⁺CD25⁺ (Tregs) dans la rate de souris C57/BL6 naïves. L'analyse au cytomètre de flux nous a permis de sélectionner les lymphocytes T CD4⁺ (graphe représentant le nombre de cellules en fonction de l'expression du marqueur CD4). La représentation sous forme de dot plots des lymphocytes TCD4⁺ sélectionnés (R1) en fonction de l'expression des marqueurs TCRβ et CD25 permet l'identification des cellules Tregs (quadrant supérieur droit). Le pourcentage des cellules Tregs est noté pour chacun des traitements administrés aux groupes de souris naïves. Les souris traitées par l'αCD25 présentent une diminution accrue du nombre de cellules Tregs. Chacun de ces dot plots correspond à l'analyse des cellules issues de 3 demi-rates regroupées. Aucune analyse individuelle n'a été réalisée.

* % de cellules TCRβ⁺CD25⁺ parmi les CD4⁺

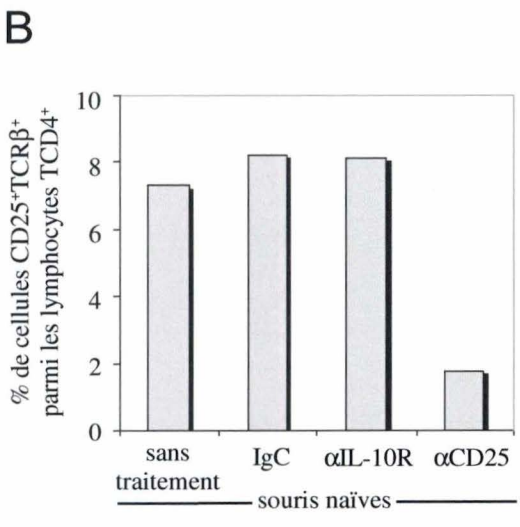


FIGURE 12B : Graphique confirmant l'élimination des cellules Tregs suite au traitement αCD25 administré à des souris C57BL/6 naïves. Ce graphique illustre sous la forme d'un histogramme les résultats présentés par les dot plots en figure 12A. Le pourcentage de cellules Tregs (% TCRβ⁺CD4⁺CD25⁺, en ordonnée) est représenté en fonction du traitement administré.

Fig 13. Impact de la neutralisation des cellules T régulatrices ou de l'IL-10R sur la production d'IFNγ (mesurée sur la population splénique totale)

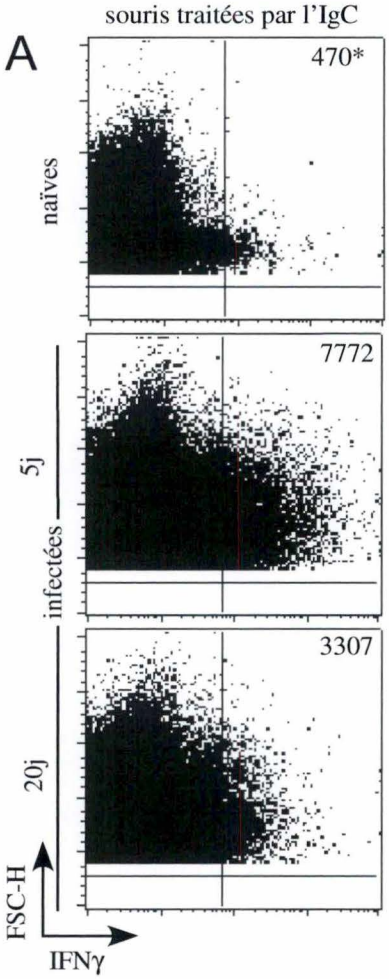


FIGURE 13A : Sélection des cellules exprimant l'IFNγ (IFNγ⁺) parmi les cellules spléniques (1,5.10⁶ cellules acquises), selon un critère de taille (FSC-H). Ces 3 dot plots ont été choisis à titre d'exemple pour illustrer l'augmentation du nombre de cellules exprimant l'IFNγ apparaissant entre une souris naïve et des souris infectées après 5 et 20 jours. Bien que le nombre maximum de cellules IFNγ⁺ soit observé au 5ème jour post-infection, le pic réel apparaît normalement entre 10 et 15 jours (Copin *et al*, 2007). Chacun des dot plots reprend les cellules issues du regroupement des demi-rates de 6 à 7 souris C57BL/6 traitées par l'IgC (groupe contrôle).

*nombre de cellules IFNγ⁺ / 1,5.10⁶ cellules spléniques

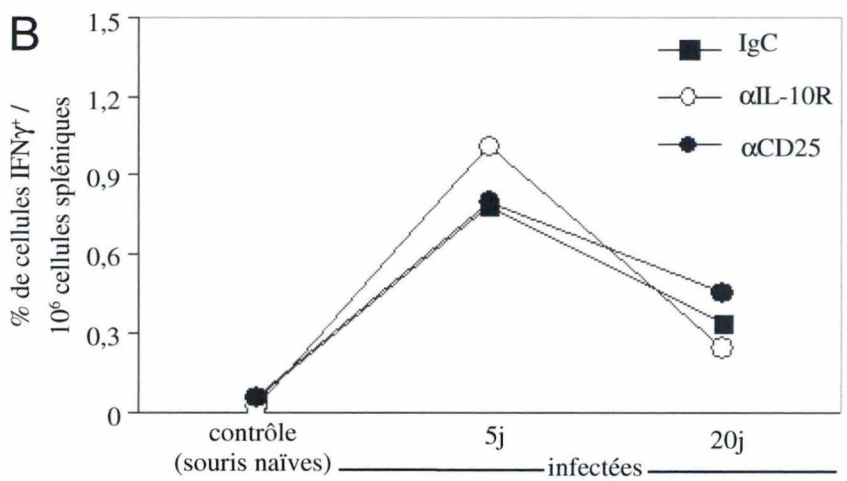


FIGURE 13B : Pourcentage de cellules exprimant l'IFNγ (IFNγ⁺) parmi les cellules spléniques (1,5.10⁶ cellules acquises). Ce graphique représente, pour chacun des traitements administrés, le pourcentage de cellules IFNγ⁺ (ordonnée) en fonction du temps (en abscisse). Les souris naïves correspondent au temps zéro. Chaque traitement a été réalisé sur des groupes de 6 à 7 souris infectées ou naïves, pendant 5 ou 20 jours. Le nombre de cellules IFNγ⁺ atteint son maximum au 5ème jour. La différence existant entre les différents groupes (IgC, αCD25, αIL-10R) est très faible (maximum 0,2 %).

Fig 14. Impact de la neutralisation des cellules T régulatrices ou de l'IL-10R sur la production d'IFNγ (mesurée sur la population splénique TCRβ⁺ CD4⁺)

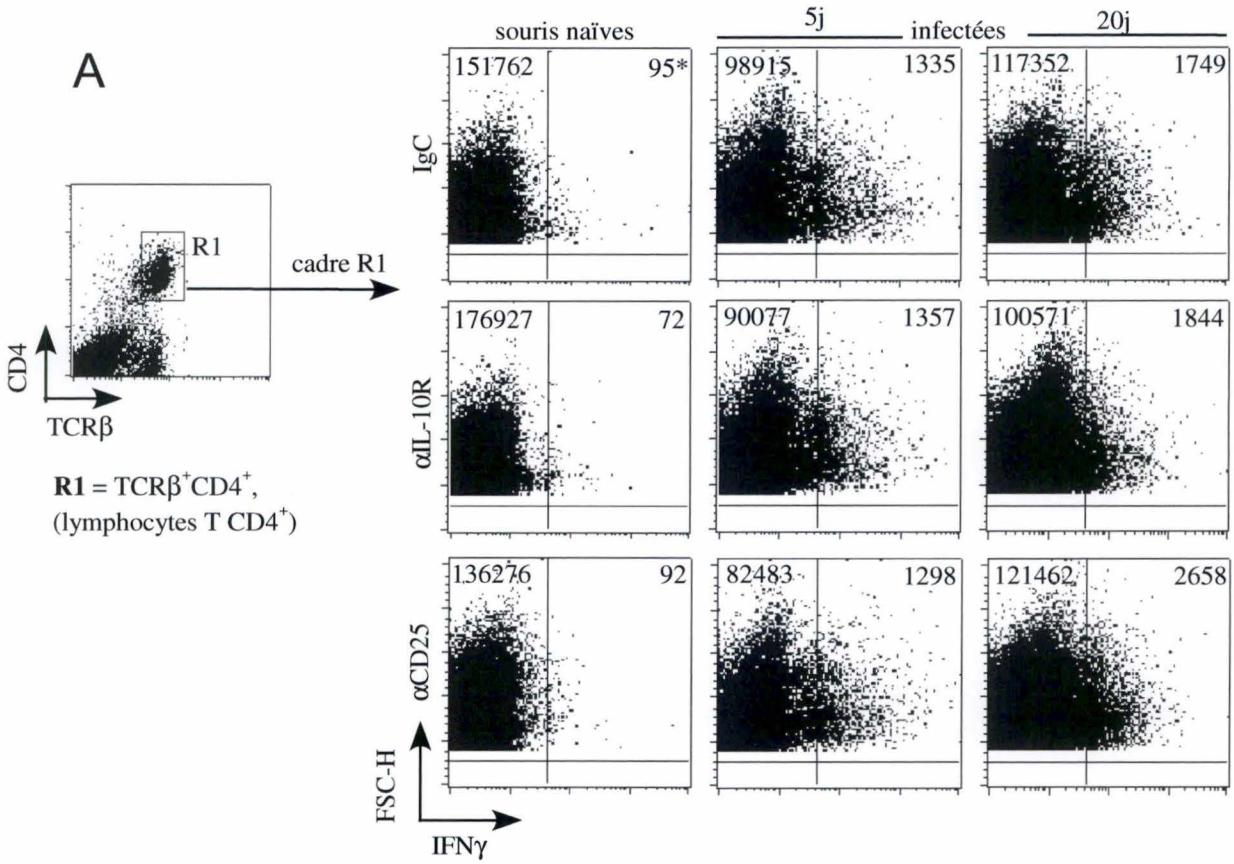
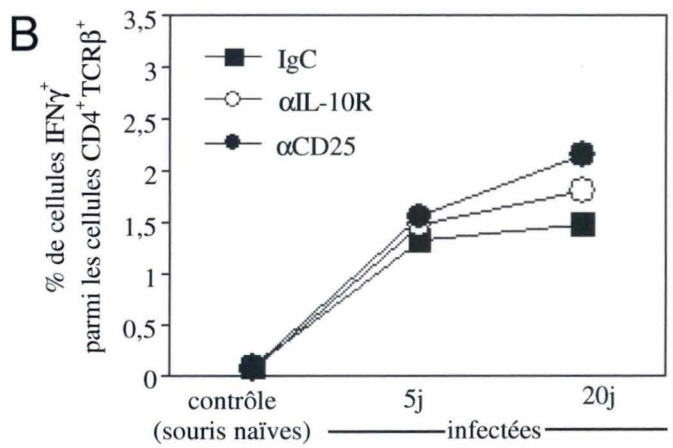


FIGURE 14A : Représentation schématique du nombre de cellules exprimant l'IFNγ parmi les lymphocytes TCD4⁺ (cadre R1) chez des souris C57BL/6 naïves ou infectées, en fonction du traitement administré. La sélection des lymphocytes T CD4⁺ en fonction de leurs marqueurs de surface TCRβ et CD4 (cadre R1) permet d'analyser la production d'IFNγ par ces cellules. Les lymphocytes TCD4⁺ issus de chaque groupe de souris sont représentés sous la forme de dot plots, selon le traitement administré (IgC, αIL-10R, αCD25) ou le temps (5 ou 20 jours). Le nombre de cellules IFNγ⁺ ou IFNγ⁻ est repris dans chaque dot plot. Quelque soit le traitement administré, le nombre de cellules IFNγ⁺ est semblable au contrôle (IgC) à 5 jours, mais augmente légèrement à 20 jours chez les souris traitées par l'αIL-10R ou l'αCD25. Chacun des dot plots reprend les cellules issues du regroupement des demi-rates de 6 souris C57BL/6.

* nombre de cellules TCRβCD4⁺IFNγ⁺

FIGURE 14B : Pourcentage de cellules produisant l'IFNγ parmi les lymphocytes TCD4⁺ de la rate. Le graphe représente les données issues des dot plots (fig. 14A) sous la forme de pourcentage de cellules IFNγ⁺ (en ordonnée) par rapport au temps (en abscisse). L'évolution de ce pourcentage est semblable pour les 3 groupes (IgC, αCD25 et αIL-10R) à 5 jours. A 20 jours, on observe une augmentation de ce pourcentage de 1,4x entre le groupe IgC et αCD25, et de 1,2x entre le groupe IgC et αIL-10R.



3.2.1. Vérification de l'efficacité des traitements αCD25 et αIL-10R sur les cellules T régulatrices

Avant toute analyse, il était nécessaire de vérifier l'efficacité des traitements administrés. Grâce aux colorations visant les protéines membranaires spécifiques des cellules Tregs ($TCR\beta^+CD4^+CD25^+$), nous avons pu confirmer la déplétion de ces cellules suite au traitement αCD25 (fig. 12 A et B). Cette déplétion partielle (on passe de 8,20% cellules $TCR\beta^+CD4^+CD25^+$ dans le contrôle IgC à 1,77% lors du traitement αCD25) est liée à l'action double de l'anticorps PC61 (αCD25) (McNeill, *et al.*, 2007). Le pourcentage de cellules $TCR\beta^+CD4^+CD25^+$ restant correspondrait aux cellules Tregs inactivées par l'anticorps. La figure 12B présente sous la forme d'un histogramme le pourcentage de cellules $TCR\beta^+CD4^+CD25^+$ en fonction du traitement administré.

3.2.2. Impact des traitements sur la production d'IFNγ

- *Production d'IFNγ mesurée sur la population splénique totale*

Lors d'une infection par *B. melitensis*, le nombre de cellules productrices d'IFNγ augmente graduellement durant les 15 premiers jours puis diminue parallèlement à l'élimination des bactéries (Copin, *et al.*, 2007). Ce type d'évolution est observé dans le groupe contrôle (IgC), comme le montre la représentation en dot plot de la figure 13A et le graphe de la figure 13B. Dans le cas des souris traitées par l'αCD25 et l'αIL-10R, on observe la même tendance (fig. 13B).

- *Production d'IFNγ mesurée sur les lymphocytes $TCD4^+$ de la rate*

Comme précédemment, les lymphocytes $TCD4^+$ ont pu être mis en évidence grâce à la combinaison de marqueurs des molécules CD4 et TCRβ. Parmi ces lymphocytes, nous avons mesuré la fraction cellulaire produisant l'IFNγ ($IFN\gamma^+$) dans chaque groupe traité, à 5 et 20 jours (fig. 14A). On constate une même tendance évolutive pour les trois groupes, à savoir une augmentation graduelle des lymphocytes $TCR\beta^+CD4^+$ $IFN\gamma^+$ au cours de l'infection (fig. 14B). Cette augmentation nous indique que la contribution des lymphocytes $TCD4^+$ dans la production d'IFNγ s'accroît durant l'infection. Cependant, à 20 jours, le groupe de souris traitées par l'αCD25 et, dans une moindre mesure, celui traité par l'αIL-10R présente une légère augmentation du nombre de lymphocytes $TCR\beta^+CD4^+$ $IFN\gamma^+$, à savoir 1,46x et 1,2x respectivement. Ces deux traitements pourraient donc accroître la contribution des lymphocytes $TCD4^+$ dans la production d'IFNγ.

3.2.3. Impact des traitements sur l'expression de l'iNOS

- *Expression d'iNOS mesurée sur la population splénique totale*

Lors d'une infection par *B. melitensis*, il a été montré que l'expression d'iNOS augmentait graduellement au cours du temps, jusqu'à atteindre un pic vers 15 jours, puis une brusque diminution à 20 jours (Copin, *et al.*, 2007). Dans notre cas, seuls deux temps ont été analysés, 5 et 20 jours, ce qui ne nous permet pas d'observer le pic de cellules $iNOS^+$ à 15 jours. Cependant, nous pouvons constater qu'après une période de 20 jours, les groupes de souris traités par l'αCD25 et l'αIL-10R présentent un pourcentage de cellules $iNOS^+$ (parmi la population splénique) respectivement 4 fois et 7,5 fois plus grand que le groupe traité par l'IgC (fig.15 A et B). Aucun impact du traitement sur la production d'iNOS n'est observé à 5 jours.

Fig 15. Impact de la neutralisation des cellules T régulatrices ou de l'IL-10R sur l'expression de l'iNOS (mesurée sur la population splénique totale)

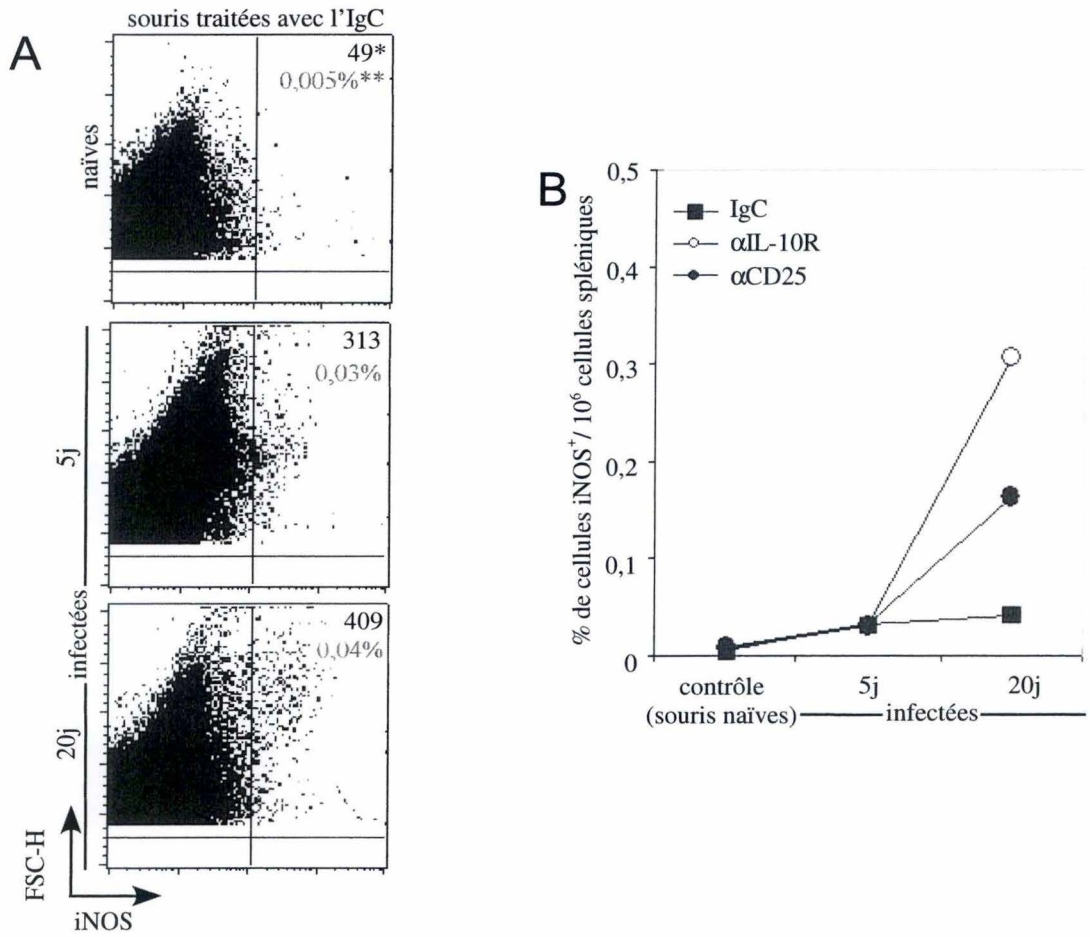


FIGURE 15A : Sélection des cellules exprimant l'iNOS (iNOS⁺) parmi les cellules spléniques ($1{,}5.10^6$ cellules acquises), selon un critère de taille (FSC-H). Ces trois dot plots ont été choisis à titre d'exemple pour illustrer l'augmentation du nombre de cellules exprimant l'iNOS apparaissant entre une souris naïve et des souris infectées après 5 et 20 jours. Bien que le nombre maximum de cellules iNOS⁺ soit observé au 20ème jour post-infection, le pic réel apparaît normalement après 15 jours (Copin *et al*, 2007). Chacun des dot plots reprend les cellules issues du regroupement des demi-rates de 6 souris C57BL/6 traitées par l'IgC (groupe contrôle).

* nombre de cellules iNOS⁺ / $1{,}5.10^6$ cellules spléniques

** % de cellules iNOS⁺ / $1{,}5.10^6$ cellules spléniques

FIGURE 15B : Pourcentage de cellules exprimant l'iNOS (iNOS⁺) parmi les cellules spléniques ($1{,}5.10^6$ cellules acquises). Ce graphique représente, pour chacun des traitements administrés, le pourcentage de cellules iNOS⁺ (ordonnée) en fonction du temps (en abscisse). Le contrôle (souris naïves) correspond au temps zéro. Chaque traitement a été réalisé sur des groupes de 6 à 7 souris, infectées ou naïves, pendant 5 ou 20 jours. Le nombre de cellules iNOS⁺ augmente graduellement jusqu'à 20 jours. Après 20 jours, on constate que les groupes de souris traitées avec l'αIL-10Ret l'αCD25 présentent un pourcentage de cellules iNOS⁺ respectivement 4x et 7,5x plus grand que le groupe traité avec l'IgC.

- *Expression d'iNOS mesurée sur les TipDC de la rate*

La coloration des cellules spléniques nous a permis de mettre en évidence les cellules $CD11b^+CD11c^+$, considérées comme des TipDC potentielles. La figure 16A présente l'analyse des cellules spléniques du groupe contrôle (IgC) en fonction des marqueurs dirigés contre CD11b et CD11c. La comparaison entre des souris naïves et infectées confirme le recrutement de TipDC à 20 jours (cadre R1), déjà observé lors d'une précédente étude (Copin, *et al.*, 2007). La représentation des cellules $iNOS^+$ parmi la population splénique totale révèle que 53,91% des cellules $iNOS^+$ sont également $CD11b^+CD11c^+$. Ce résultat montre l'importance des TipDC dans la production d'iNOS.

Dans un second temps, nous avons analysé l'impact des traitements administrés (αCD25 et αIL-10R) sur le recrutement des TipDC. La figure 16B nous montre qu'à 20 jours un recrutement important de TipDC est observé dans les groupes traités par l'αCD25 et l'αIL-10R, par rapport à ce qui est observé dans la situation contrôle :

- Lors du traitement avec l'αCD25, on observe une augmentation du nombre de cellules $CD11b^+CD11c^+$ de 5x par rapport au groupe contrôle (3159 cellules $CD11b^+CD11c^+$ contre 602 cellules)
- Lors du traitement avec l'αIL-10R, l'augmentation du nombre de cellules $CD11b^+CD11c^+$ est de 11x par rapport au groupe contrôle (6910 cellules $CD11b^+CD11c^+$contre 602 cellules)

Pour savoir si les TipDC recrutées exprimaient également l'iNOS, nous avons analysé la proportion de cellules $iNOS^+$ parmi elles (gate R1, fig. 17A). L'évolution du nombre de TipDC exprimant l'iNOS au cours de l'infection ne semble pas affectée par les traitements administrés. Ainsi, à 20 jours, environ 30 à 40% des TipDC expriment l'iNOS quelque soit le type de traitement (fig. 17B, premier graphe).

Si l'on représente le nombre de cellules $CD11b^+CD11c^+iNOS^+$, soit les TipDC exprimant l'iNOS, mesuré sur l'ensemble des cellules spléniques (10^6 cellules), on constate que les TipDC recrutées en nombre important lors des traitements αCD25 et αIL-10R expriment l'iNOS (fig. 17B, deuxième graphe). Les différences observées entre les différents traitements sont du même ordre de grandeur que dans la figure 16B : les cellules $CD11b^+CD11c^+iNOS^+$ augmentent d'un facteur 11 lors d'un traitement αIL-10R et d'un facteur 5 lors d'un traitement αCD25. Ces cellules participent donc activement à la réponse immunitaire en cours, et leur recrutement pourrait être lié à un système de régulation impliquant l'IL-10 et les cellules Tregs.

3.3. En résumé

Le traitement utilisé pour éliminer les cellules Tregs et altérer leurs fonctions effectrices (αCD25) ainsi que celui visant le récepteur de l'IL-10 (αIL-10R) induit un modification de la réponse immunitaire. Celui-ci se manifeste à des temps assez tardifs de l'infection (20 jours) et apparaît plus marqué lors du traitement avec l' αIL-10R. En effet, ce dernier traitement conduit à un meilleur contrôle de l'infection, comme le révèle la diminution de la charge bactérienne d'un facteur 5. De plus, nous avons constaté une légère augmentation de la contribution des lymphocytes $TCD4^+$ dans la production d'IFNγ, ainsi qu'un recrutement important de TipDC. Toutefois, aucun impact de ce traitement n'est observé sur l'expression d'iNOS par ces cellules.

Fig 16. Importance des cellules CD11b+ CD11c+ lors de l'infection et impact de la neutralisation des cellules T régulatrices ou de l'IL-10R sur cette population cellulaire

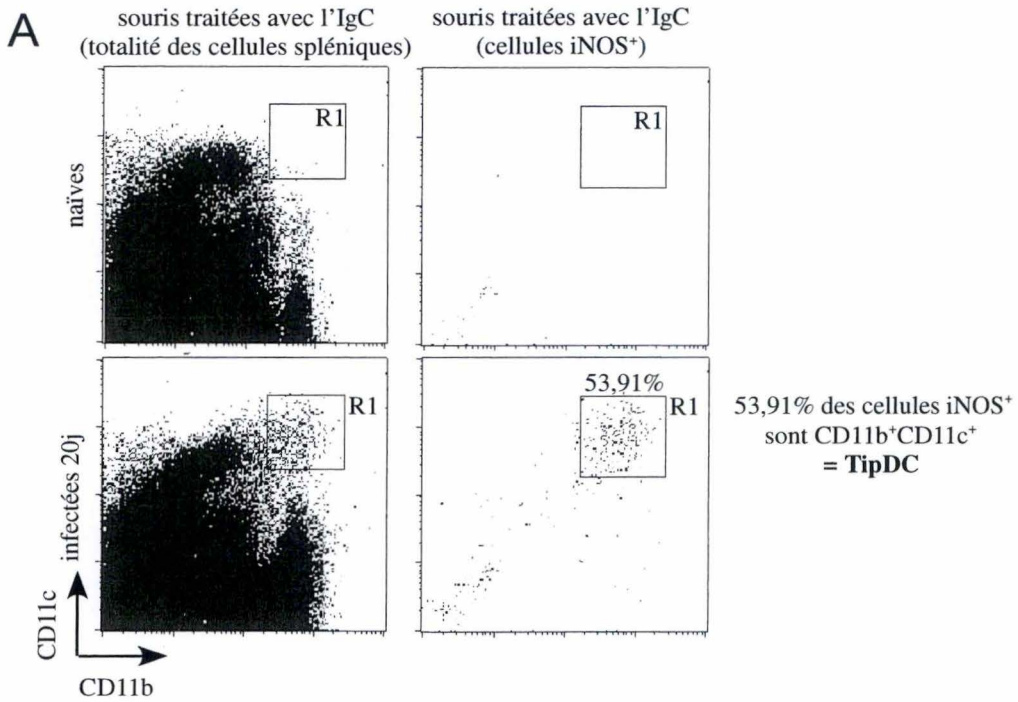


FIGURE 16A : Nombre de cellules CD11b+CD11c+ iNOS+ mesuré sur la population splénique totale. Deux dot plots (colonne de gauche) ont été choisis à titre d'exemple pour illustrer l'augmentation du nombre de cellules CD11b+CD11c+ (TipDC, voir cadre R1) entre une souris naïve et une souris infectée (20 jours). Chacun des dot plots regroupe les cellules issues des demi-rates de 7 souris C57BL/6 traitées avec l'IgC (contrôle). Si on sélectionne les cellules iNOS+ parmi la population splénique totale (colonne de droite), on constate qu'à 20 jours post-infection, 53,91% des cellules iNOS+ sont également CD11b+CD11c+, c'est-à-dire des TipDC.

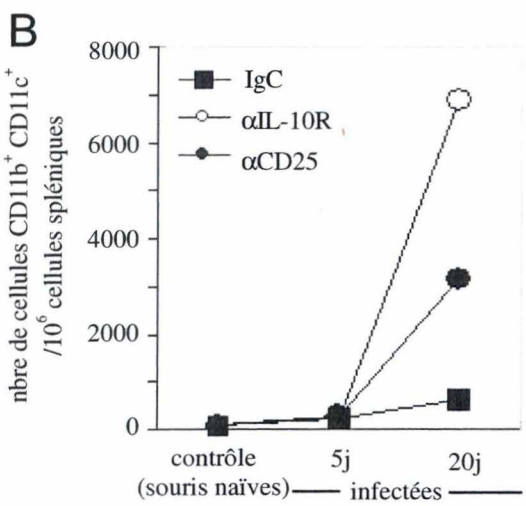


FIGURE 16B : Nombre de TipDC (CD11b+CD11c+) mesuré sur la population splénique totale de souris C57BL/6. Le graphique représente, pour chacun des traitements (IgC, αIL-10R, αCD25), le nombre de TipDC mesuré sur la population splénique totale (en ordonnée) en fonction du temps (en abscisse). Un recrutement important de TipDC est observé après 20 jours, par comparaison au groupe de souris traité avec l'IgC. Le nombre de TipDC augmente de 11x lors d'un traitement αIL-10R et 5x dans le cas du traitement αCD25.

Le traitement par l'αCD25 n'affecte pas de manière significative le nombre de bactérie. Toutefois, il influence les autres paramètres de la réponse immunitaire. Le pourcentage des lymphocytes $TCD4^+$ produisant de l'IFNγ apparaît plus élevé que celui observé lors des traitements avec l'IgC ou l'αIL-10R. L'impact de l'αCD25 sur le nombre de TipDC est également observé ici, mais dans une moindre mesure.

	Log CFU (5 jours)	**Log CFU (20 jours)**	**Cellules $IFN\gamma^+$ (% parmi cellules $TCD4^+$) (20 jours)**	**TipDC $iNOS^+$ (20 jours)**
IgC	5,37	3,95	1,46	204
αIL-10R	5,53	3,46	1,8	2212
αCD25	5,93	4,37	2,14	1198

Tableau 2 : résumé des résultats obtenus suite aux traitements de souris infectées par *B. melitensis* avec l'IgC, l'αIL-10R ou l'αCD25.

Fig 17. Expression d'iNOS par les TipDC

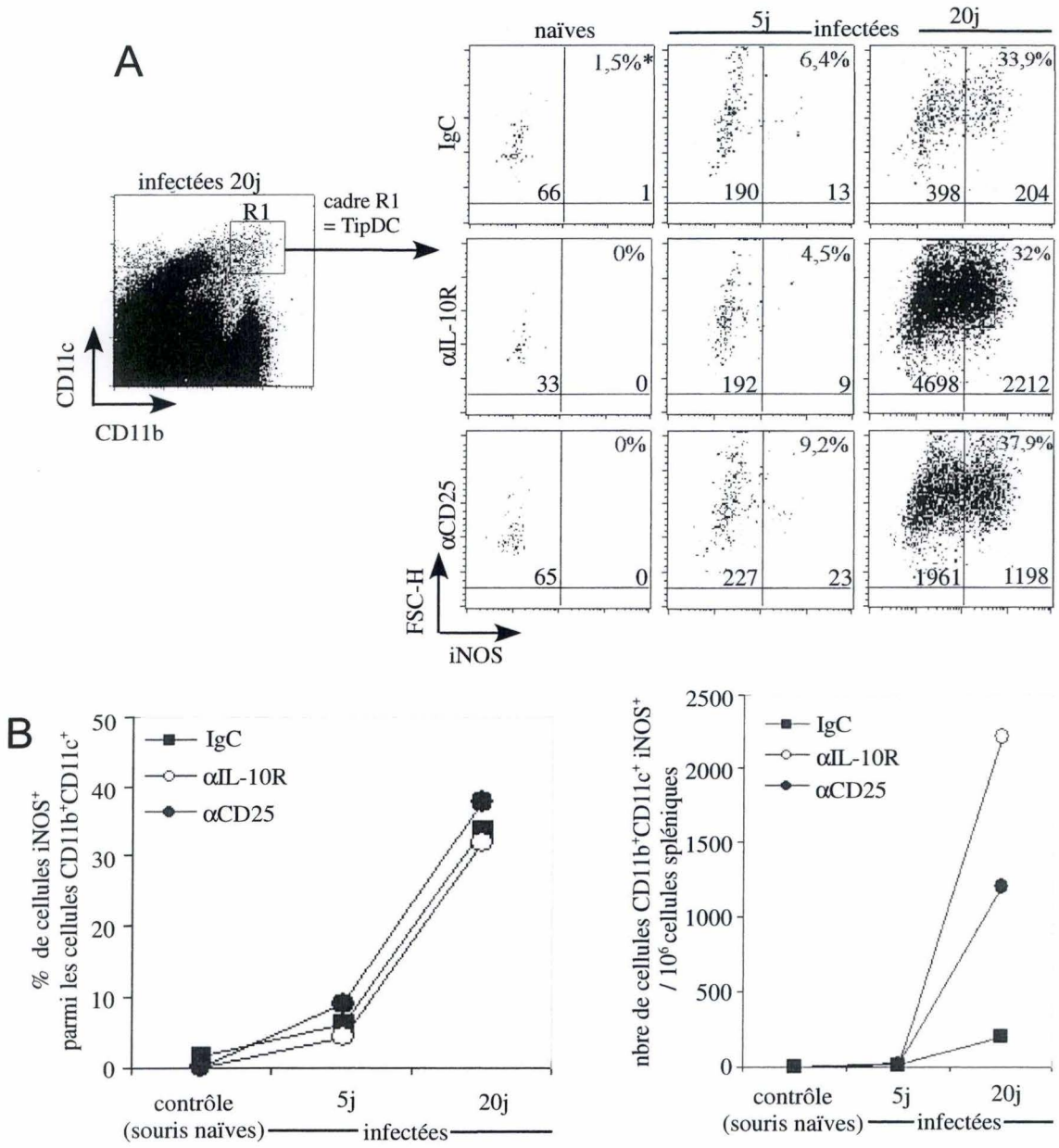


FIGURE 17A : Représentation schématique du nombre de cellules exprimant l'iNOS (iNOS⁺) parmi les cellules CD11b⁺CD11c⁺ (cadre R1) chez des souris C57BL/6 naïves ou infectées, en fonction du traitement administré. La sélection des TipDC en fonction de leurs marqueurs de surface CD11b et CD11c (cadre R1) permet d'analyser l'expression d'iNOS par ces cellules. Les TipDC issues de chaque groupe de souris sont représentées sous la forme de dot plots, selon le traitement administré (IgC, αIL-10R, αCD25) ou le temps (5 ou 20 jours). Le pourcentage de cellules iNOS⁺ ainsi que le nombre de cellules iNOS⁺ ou iNOS⁻ est noté dans chaque dot plot. Ces chiffres augmentent continuellement jusqu'à 21 jours dans les trois groupes de souris (IgC, αIL-10R, αCD25).

* % de cellules CD11b⁺CD11c⁺iNOS⁺

FIGURE 17B : Expression d'iNOS par les TipDC. Deux graphiques représentent l'expression d'iNOS, soit sous la forme d'un pourcentage de cellules iNOS⁺ parmi les TipDC, soit en tant que nombre de TipDC iNOS⁺ mesuré sur la population splénique totale. Le premier nous informe que le pourcentage de cellules iNOS⁺ parmi les TipDC augmente continuellement et de manière similaire dans les trois groupes (IgC, αIL-10R, αCD25). Le deuxième nous indique que le nombre de TipDC exprimant l'iNOS augmente considérablement lors des traitements αIL-10R et αCD25 (d'un facteur 11 et d'un facteur 5 respectivement). Cela suggère que ces deux traitements n'influencent pas la production d'iNOS, mais agissent sur les cellules exprimant cette enzyme.

Discussions & perspectives

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Au cours de ce travail, nous avons étudié deux aspects de la relation hôte-pathogène dans le cadre d'une infection par *B. melitensis* en modèle murin. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au devenir des mécanismes effecteurs de l'immunité (exerçant une fonction connue à l'encontre de *Brucella)* dans le cas d'une réponse secondaire. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'aspect « régulation » de la réponse immunitaire lors d'une infection par *B. melitensis*. Ces deux aspects de la réponse immunitaire sont discutés séparément dans ce chapitre.

A. REPONSE IMMUNE SECONDAIRE LORS D'UNE INFECTION PAR *B. MELITENSIS*

1. Pourquoi étudier la réponse immune secondaire développée à l'encontre de B. melitensis ?

A ce jour, on sait qu'une infection par *Brucella* induit une réponse immunitaire de type Th1, impliquant majoritairement les lymphocytes $TCD4^+$ dont la production d'IFNγ activerait les mécanismes bactéricides des macrophages, tels que la production d'oxyde nitrique (Copin, *et al.*, 2007). Bien que ces mécanismes soient essentiels dans le contrôle de l'infection, d'autres effecteurs, et notamment les anticorps, pourraient également jouer un rôle plus ou moins important, selon l'hôte (Araya *et al.*, 1989, Araya *et al.*, 1990, Elzer *et al.*, 1994). Toutefois, l'ensemble de ces mécanismes n'empêche pas *Brucella* d'échapper à la réponse immune et de s'installer de manière chronique chez son hôte. Cette persistance de la bactérie reste largement incomprise. A ce titre, l'infection de la souris par *B. melitensis* constitue un modèle expérimental très intéressant d'infection chronique par un pathogène intracellulaire.

Les équipes scientifiques qui se concentrent sur la recherche d'un nouveau vaccin sont confrontées à la question de savoir pourquoi *Brucella* persiste chez son hôte, malgré l'activation du système immunitaire. Ce phénomène, qui existe chez d'autres pathogènes, fait que la vaccination est une pratique encore extrêmement empirique. On ignore en général comment le système immunitaire des mammifères développe une mémoire protectrice au contact d'un agent infectieux. Comme pour la majorité des pathogènes, la réponse immunitaire de mémoire contre *Brucella* n'a jamais été analysée de manière approfondie. Nous ignorons par exemple quels éléments sont nécessaires au système immunitaire pour identifier *Brucella* lors de la primo-infection et développer une réponse immunitaire de mémoire protectrice. Nous ignorons également quelles molécules et cellules effectrices sont utilisées par le système immunitaire pour neutraliser *Brucella* lors d'une infection secondaire. Une meilleure connaissance de ces mécanismes pourrait améliorer notre capacité à générer des vaccins protecteurs contre *Brucella* et les bactéries intracellulaires en général.

De nombreuses études ont été consacrées au développement de vaccins contre la brucellose (pour revue : (Schurig *et al.*, 2002)). La majorité de ces travaux sont réalisés en administrant des extraits de pathogènes tués ou d'antigènes purifiés. Les études comparatives menées sur l'utilisation de *Brucella* tuées comme souche vaccinale apportent déjà une partie de réponse à la question de savoir comment s'établit une réponse secondaire protectrice

Vaccins effectifs	Rev.1.	La souche vaccinale *B. melitensis* revision 1 (Rev.1) est utilisée depuis plus de 40 ans et protège 70 à 85 % des animaux contre une réinfection par une souche virulente de *B. melitensis*, mais également de *B. ovis* ((Blasco, 1997, Garin-Bastuji *et al.*, 1998). Elle fut isolée pour la première fois dans les années 1950 à partir de souches virulentes de *B. melitensis* devenues dépendantes de la streptomycine, mais qui, après réversion, ont perdu cette caractéristique et sont restées résistantes à cet antibiotique (Elberg *et al.*, 1957). La ou les cause(s) de son atténuation demeure(nt) inconnue(s), mais il semblerait que celle-ci soit liée à l'altération de certaines propriétés de la membrane externe. Cependant, cette souche présente une virulence résiduelle et peut causer l'avortement des animaux en gestation lors de son administration. De plus, Rev.1 reste infectieux pour les humains (Alton *et al.*, 1967). Enfin, l'inconvénient principal de ce vaccin est qu'il empêche la différenciation entre un animal vacciné et un animal malade. En effet, tout comme la souche virulente, *B. melitensis Rev.1* est une souche lisse qui induit une réponse immunitaire conduisant à la production d'anticorps dirigés contre son LPS. Détectant la présence des ces mêmes anticorps, les tests sérologiques ne sont dès lors plus fiables pour diagnostiquer la brucellose chez les animaux.
	S19	La souche 19 (S19) de *Brucella abortus* fut découverte dans les années 1920 dans du lait de vache laissé à température ambiante durant un an en laboratoire. Elle fut décrite par Buck en 1930. Bien que les raisons précises de l'atténuation de *B. abortus strain 19* soient inconnues, cette souche présente clairement un trafic intracellulaire altéré (Moreno, *et al.*, 2006, Schurig *et al.*, 2002). *B. abortus strain 19* est moins dangereuse que *B. melitensis Rev.1*, mais peut également causer l'avortement des animaux en gestation et être la cause d'une infection chez l'homme. Elle interfère, elle aussi, avec les tests sérologiques visant à diagnostiquer les animaux malades.

Tableau 1. Vaccins effectifs contre Brucella

envers *Brucella.* En effet, l'inoculation de bactéries tuées confère une moins bonne protection qu'une vaccination avec des bactéries vivantes lors d'une réponse secondaire. Il semblerait même que cette protection diminue rapidement (Montaraz, *et al.*, 1986). Plusieurs études suggèrent que l'inoculation de *Brucella* tuées active le système immunitaire d'une manière différente de celle observée dans le cas de *Brucella* vivantes (Huang *et al.*, 2003, Huang, *et al.*, 2005, Zhan, *et al.*, 1998, Zhan *et al.*, 1993b). Les seuls vaccins qui confèrent une protection significative chez les animaux sont des souches vivantes atténuées de *Brucella*, pourvue d'un LPS lisse (tableau 1 et 2). Leur efficacité dépend toutefois de nombreux facteurs tels que l'âge, le sexe, la voie d'administration, le dosage, etc. Ainsi, certaines étapes du cycle infectieux de *Brucella* semblent être essentielles à la mise en place d'une mémoire protectrice. En accord avec cette hypothèse, l'étude de l'infection par *Listeria monocytogenes* a démontré que certaines étapes de son cycle infectieux étaient indispensables pour conférer une protection contre ce pathogène (Muraille *et al.*, 2007).

Dans le cadre de ce travail, nous avons étudié la réponse immune secondaire en modèle murin suite à une infection par la bactérie *B. melitensis* vivante ou tuée. Nous avons de la sorte essayé de comprendre ce qu'il advenait des mécanismes effecteurs précédemment identifiés lors d'une réponse primaire ainsi que les divergences de réponse existant lors de l'inoculation d'une souche tuée.

2. Caractérisation de la réponse immune secondaire envers B. melitensis

Plusieurs paramètres ont été étudiés en parallèle. L'estimation du nombre de bactéries par le comptage des CFU nous a permis d'analyser l'évolution de l'infection dans les différentes situations, tandis que l'analyse des cellules spléniques au cytomètre de flux nous a apporté des informations sur les effecteurs de l'immunité présents lors de la réponse secondaire.

2.1. Les souris vaccinées présentent un meilleur contrôle de l'infection

Lors d'une infection de souris préalablement immunisées par des souches vaccinales vivantes ou tuées de *B. melitensis*, la charge bactérienne observée est significativement moins importante que lors d'une primo-infection (cfr résultats, fig. 3). Deux jours après l'infection des souris vaccinées, quelques-unes sont exemptes de bactéries dans la rate. Ce nombre s'accroît au fil des jours, sans jamais cependant dépasser les 50%. Cette absence d'infection splénique dès les premiers jours post-injection nous laisse penser que le contrôle de l'infection aurait pu avoir lieu directement au site d'injection de *B. melitensis*, à savoir la cavité péritonéale.

Ces résultats démontrent qu'une mémoire immunologique protectrice a été développée lors de la vaccination et a permis un meilleur contrôle de l'infection. Cependant, lors d'une vaccination par des *Brucella* tuées, la protection semble moins efficace et paraît diminuer à 21 jours (charge bactérienne supérieure). Une observation similaire a déjà été mentionnée dans une ancienne étude (Montaraz, *et al.*, 1986).

L'inoculation de *Brucella* tuées, même à un nombre plus élevé (10^8 au lieu de 4.10^4 CFU) n'est pas suffisante pour conférer une protection à long terme. Les bactéries tuées constituent rarement de bons vaccins car elles n'informent pas efficacement le système immunitaire. L'absence de multiplication naturelle, et donc de persistance de la bactérie, conduit à la disparition rapide des antigènes. Le cycle infectieux apparaît donc comme un élément clé dans la mise en place d'une mémoire immunologique.

Recherches expérimentales	Vaccins vivants atténués	Les problèmes d'interférence lors du diagnostique rencontrés lors d'une vaccination par B. *melitensis Rev.1* et *B. abortus S19* peuvent être évités en utilisant des souches rugueuses. Ainsi, plusieurs recherches se sont portées sur la souche *B. abortus RB51*, faible productrice de la chaîne O du LPS (Schurig *et al.*, 1991). Malgré son approbation en tant que vaccin officiel aux Etats-Unis (Schurig, *et al.*, 2002), il a été rapporté que cette souche ne conférait pas une protection effective (Moriyon *et al.*, 2004). Les progrès en génétique bactérienne permettent de nouvelles approches tels que le développement de mutants génétiquement stables mais de virulence atténuée. Les mutants atténués sont obtenus par la délétion de gènes tels que ceux encodant pour la biosynthèse du LPS (wboA), l'appareil de sécrétion de type IV (virB), la synthèse de purines (purEK) ou de composés aromatiques (aroC), les systèmes de régulation (bvr), etc. (pour revue : (Ko *et al.*, 2003))
	Vaccins tués	*B.abortus* 45/20 est une souche rugueuse qui, administrée sous forme de vaccin tué accompagné d'un adjuvant, permet d'éviter les problèmes d'interférence lors des tests sérologiques. Bien qu'une protection soit observée chez les adultes vaccinés, le vaccin 45/20 est moins efficace chez les veaux de moins de 6 mois (Moreno, *et al.*, 2006). *Brucella abortus S2308* tuée confère une protection significative en modèle murin. Cependant, la vaccination avec *Brucella* vivante semble être plus protectrice qu'un vaccin tué (Montaraz *et al.*, 1986). Il semblerait que la persistance de la souche vaccinale soit essentielle pour assurer une protection maximale.
	Vaccins sous-unitaires	De nombreux composants intracellulaires ou membranaires font l'objet d'études et semblent être des antigènes protecteurs. Ce type de vaccin élimine les problèmes de virulence et, pour peu qu'ils ne contiennent pas de LPS, résolvent les ambiguïtés de diagnostique. Parmi ces antigènes protecteurs, on retrouve la protéine ribosomale L7/L12, la superoxyde dismutase Cu-Zn, une protéine de 22,9 kDa, la protéine périplasmique p39, la lumazine synthase, et la glyceraldéhyde déhydrogénase. Les souris immunisées avec ces protéines présentaient un certain niveau de protection. Certains de ces antigènes potentiellement protecteurs ont fait l'objet de vaccination ADN. Par exemple, la vaccination de souris par l'ADN codant pour la protéine L7/L12 se révéla protectrice, et ce jusqu'à 30 jours après l'inoculation. Cependant, il n'est pas encore certain que ces approches vaccinales puissent fournir une protection à long terme car aucune étude n'a été réalisée sur une longue période (pour revue : (Ko, *et al.*, 2003, Schurig, *et al.*, 2002)).

Tableau 2. Vaccination anti-*Brucella* : recherches expérimentales en cours.

2.2. Un rôle précoce pour l'IFNγ

Lors d'une primo-infection, le rôle essentiel de l'IFNγ dans l'élimination de *Brucella* est à présent reconnu (Copin, *et al.*, 2007). Produite majoritairement par les lymphocytes $TCD4^+$ durant la deuxième semaine post-infection, cette cytokine active entre autres les mécanismes bactéricides des cellules phagocytaires (production de NO, etc.) et permet de la sorte l'élimination des bactéries intracellulaires.

Durant la réponse secondaire, la situation apparaît différente. Les souris ayant reçu un vaccin vivant présentent un pic précoce de cellules productrices d'IFNγ. Notre première analyse n'ayant eu lieu que le deuxième jour post-infection, il n'est pas à exclure que cette production ait pu débuter dès le premier jour, voir les premières heures qui ont suivi l'infection par la souche challenge. Les lymphocytes $TCD4^+$ ne constituent pas la source principale d'IFNγ puisque ces cellules ne représentent que 8% des cellules $IFN\gamma^+$ lors du pic observé à 2 jours. Les lymphocytes $TCD8^+$, autre source possible d'IFNγ, n'interviennent pas non plus dans cette production. Celle-ci est peut-être prise en charge par d'autres populations cellulaires, telles que les cellules NK ou les lymphocytes Tγδ (Bertotto *et al.*, 1993, Ottones *et al.*, 2000).

Cette activation précoce des cellules phagocytaires par l'IFNγ pourrait permettre une meilleure résistance de ces cellules envers *Brucella* et empêcher de la sorte son établissement de manière chronique. L'IFNγ produit abondamment en réponse secondaire n'agirait donc pas directement sur les bactéries extracellulaires, mais permettrait d'armer les cellules phagocytaires au cas où elles venaient à rencontrer *Brucella*. Ceci semble corréler avec le comptage des CFU du groupe « VLive » où aucune augmentation de la charge bactérienne n'est observée.

Dans le cas de la réponse secondaire développée chez les souris ayant reçu le vaccin tué (« VHK »), la production d'IFNγ augmente mais reste relativement faible, sans présenter aucun pic. Contrairement à ce qui a été observé dans le groupe VLive (ci-dessus), la contribution des lymphocytes $TCD4^+$ s'accroît au cours de l'infection jusqu'à 21 jours où ils représentent près d'un tiers des cellules productrices d'IFNγ. Ces résultats, associés avec la protection moindre observée parmi les souris de ce groupe lors du comptage des CFU, nous indiquent que la production d'IFNγ conserve sa place de mécanisme effecteur essentiel lors d'une réponse secondaire. Toutefois son origine semble différente et doit encore être identifiée, notamment par l'utilisation de marquages immunofluorescents visant d'autres types cellulaires (lymphocytes TCD8, lymphocytes Tγδ, cellules NK).

2.3. Une faible production d'iNOS et une contribution fort réduite des TipDC

La production d'oxyde nitrique (NO) par l'iNOS au sein des cellules phagocytaires infectées par *Brucella* constitue un des mécanismes effecteurs importants pour l'élimination de la bactérie. L'ampleur de cette production dépend de la présence d'IFNγ, puissant activateur des mécanismes bactéricides des cellules phagocytaires (Copin, *et al.*, 2007).

Lors de la réponse secondaire, la fréquence moyenne de cellules exprimant l'iNOS est moins importante qu'en réponse primaire.

Chez les souris ayant reçu un vaccin vivant, ces cellules n'apparaissent cependant pas plus tôt, comme aurait pu le laisser supposer la production précoce d'IFNγ. De plus, les TNF/iNOS producing dendritic cells (TipDC), principales productrices d'iNOS lors d'une réponse primaire, ne semblent pas apporter la même contribution lors de la réponse secondaire. En effet, elles ne représentent pas plus de 2% de la population de cellules $iNOS^+$,

contre 30% en réponse primaire. Malgré ces résultats peu élevés, les TipDC semblent participer à la réponse secondaire car on observe un recrutement de ces cellules dans la rate qui atteint son maximum au 6ème jour, c'est-à-dire un peu plus tôt qu'en réponse primaire. Parmi celles-ci, le pourcentage de cellules iNOS$^+$ augmente légèrement.

Les souris ayant reçu le vaccin tué présentent une situation similaire à celle observée chez les souris vaccinées par la souche vivante. La fréquence de cellules iNOS$^+$ suit la même évolution, si ce n'est qu'elle apparaît légèrement plus élevée. Il semblerait donc que la production de NO est d'autant plus faible que la protection mise en place est élevée. Le recrutement des TipDC et leur contribution dans l'expression d'iNOS suivent la même tendance que le groupe VLive. Toutefois, à 21 jours, nous avons constaté une augmentation du nombre de TipDC iNOS$^+$: elles constituent 12% des cellules iNOS$^+$, contre 1,6% dans le groupe VLive. Ceci pourrait suggérer que la protection conférée par le vaccin tué n'agit qu'à des temps précoces de l'infection, mais diminue à long terme. La charge bactérienne pourrait peut-être s'accroître à des temps plus tardifs, ce qui expliquerait un nouveau recrutement des mécanismes effecteurs actifs envers *Brucella*. Un résultat similaire a été rapporté par Montaraz et Winter : un vaccin tué conférait une protection une semaine post-infection, mais cette protection diminuait après 4 semaines et n'était plus statistiquement significative (Montaraz, *et al.*, 1986).

3. Perspectives expérimentales

3.1. Quels sont les mécanismes effecteurs qui diffèrent de la réponse immune primaire ?

L'infection par une injection intra-péritonéale est couramment utilisée pour l'étude de *Brucella*. En modèle murin, on considère généralement la rate comme étant représentative de l'infection générale. Toutefois, la cavité péritonéale est le lieu central de l'infection. Dans le cas d'une réponse secondaire, il est fort possible que la majorité de la réponse ait lieu à cet endroit. Il serait dès lors judicieux de prélever le liquide issu de la cavité péritonéale pour analyser ses différents composants. En effet, cette cavité comprend des cellules résidentes telles que les cellules mésothéliales et des macrophages, mais également des cellules recrutées lors de l'inflammation, telles que les neutrophiles, monocytes et lymphocytes (Cook *et al.*, 2003).

L'élimination précoce de *Brucella* lors de la réponse secondaire suggère que ces bactéries pourraient avoir été éliminées avant qu'elles n'aient pu gagner leur niche intracellulaire. Il n'est donc pas à exclure que des anticorps spécifiques (IgG) à *B. melitensis* aient participé à cette réponse secondaire. En effet, l'infection par *Brucella* génère une production importante d'anticorps qui, dans certaines conditions, peuvent demeurer durant de longues périodes dans l'organisme (Araya, *et al.*, 1989, Moreno, *et al.*, 2006). Ceci peut être dû à la persistance du LPS de *Brucella* dans les cellules phagocytaires car, bien que les traitements antibiotiques aient éliminé les bactéries, des antigènes continuent à circuler dans l'organisme des souris (Forestier *et al.*, 1999b). La présence de ces anticorps pourrait avoir facilité la phagocytose des bactéries lors du challenge par le phénomène de l'opsonisation. Cette voie d'entrée n'est pas bénéfique pour *Brucella* puisqu'elle conduit dans la plupart des cas à la fusion phago-lysosomale, donc à son élimination (Porte, *et al.*, 2003). Ainsi, l'opsonisation de *Brucella*, couplée à la stimulation des activités bactéricides des cellules phagocytaires par l'IFNγ, pourrait apporter une protection efficace lors de la réponse secondaire.

L'utilisation de souris knock-out (KO) pour les différents mécanismes effecteurs (iNOS,

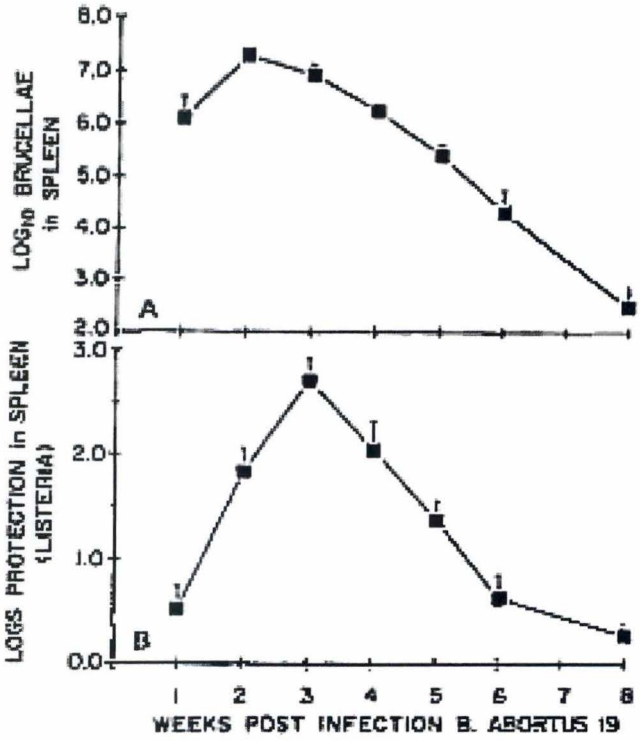


Figure 1. L'effet « Mackaness » (Araya *et al.*, 1989). Des souris BALB/C infectées par *B. abortus* S19 présentent une résistance à *Listeria monocytogenes* (A: courbe de croissance de *B. abortus* en logarithmes, B : logarithmes de protection gagnés lors d'une infection par *Listeria*). Les souris ont été infectées par *B. abortus* puis, à différents temps de l'infection, ont reçu une injection de *L. monocytogenes*. Elles ont été sacrifiées 24h après pour déterminer la charge bactérienne. La persistance de *Brucella* génère une protection non spécifique (macrophages activés) contre d'autres pathogènes. Dans cette étude, cette protection atteint son maximum 3 semaines après l'infection par *Brucella* puis diminue.

IFNα, β et γ, TNF-α, etc.) et populations cellulaires du système immunitaire ($TCD4^+$, $TCD8^+$, lymphocytes B, etc.) pourrait également nous renseigner sur l'identité des effecteurs mis en place lors de la réponse secondaire. La capacité de ces souris à développer une mémoire protectrice envers *B. melitensis* serait étudiée parallèlement à une analyse des différents éléments clés de la réponse immunitaire dont les rôles ont déjà été identifiés lors d'une primo-infection (iNOS, IFNγ, etc.) (Copin, *et al.*, 2007).

3.2. L'absence de traitement antibiotique et donc la persistance de B. melitensis permettrait-elle de conférer une meilleure résistance à une nouvelle infection ?

Dans les années 60, les études de Mackaness ont mis en évidence que *Brucella* pouvait induire une « résistance cellulaire acquise » chez son hôte. Cela signifie que les souris infectées par *Brucella* seront capables d'éliminer plus efficacement un autre pathogène, tel que *Listeria*, malgré le fait qu'il s'agisse d'une bactérie $gram^+$. Ceci s'explique par la persistance de *Brucella*, qui conduit à la présence continue de macrophages activés, capables de conférer une protection non spécifique. Les animaux en convalescence perdraient peu à peu cette résistance, mais celle-ci pourrait réapparaître dans un délai très bref lors d'une réinfection (Mackaness, 1962, Mackaness, 1964, Mackaness, 1967). Des souris infectées par *B. abortus* parviennent donc à éliminer efficacement une infection par *Listeria* grâce à la présence de macrophages activés (figure 1). Dans notre cas, la réinfection des souris par *Brucella*, en absence de traitements antibiotiques, devrait conduire à une résistance élevée puisqu'elle ferait intervenir des effecteurs non spécifiques, tels que les macrophages activés (effet « Mackaness »), et spécifiques, tels que les anticorps produits lors de la réponse primaire.

Toutefois, la présence de cytokines immunosuppressives (IL-10, TGFβ) issues de la réponse immune primaire pourrait persister et conduire à un contrôle de l'infection moins efficace lors d'une exposition ultérieure à *B. melitensis*.

Au cours de cette étude, nous avons réalisé un traitement antibiotique avant le challenge dans le but de nous prémunir contre cet effet « Mackaness », de telle sorte que nos résultats ne dépendent pas de mécanismes effecteurs non spécifiques. Toutefois, il serait intéressant d'étudier la réponse secondaire en absence de traitement antibiotique. Cette procédure nous permettrait de nous rapprocher du contexte réel d'une infection par *B. melitensis* dont la persistance chronique a déjà été caractérisée (Ficht, 2003, Hong *et al.*, 2000).

3.3. Combien de temps est-il nécessaire au développement d'une mémoire immunologique envers B. melitensis ?

Le développement de la mémoire immunologique est un processus qui prend du temps. L'activation, la sélection et l'amplification clonale des lymphocytes T et B est nécessaire pour permettre sa mise en place. Dans les ouvrages de référence, cette réponse adaptative est décrite comme apparaissant 4 jours après le début de l'infection. Cependant, la réalité est plus complexe. Selon le pathogène, sa virulence, son cycle infectieux, etc., cette réponse apparaîtra à différents temps. Dans le cas de *B. melitensis*, aucune étude ne s'est encore intéressée à ce sujet. L'administration d'un traitement antibiotique à des temps précoces après l'immunisation pourrait nous renseigner sur le temps nécessaire à la mise en place d'une mémoire immunologique envers *B. melitensis*. En effet, en éliminant les bactéries, ce traitement interromprait la réponse immunitaire en cours et empêcherait de la sorte le développement de la mémoire.

3.4. Quel élément du cycle infectieux de B. melitensis est requis pour l'établissement d'une mémoire protectrice à long terme ?

La vaccination de souris par *B. melitensis* tuée (VHK) confère une moins bonne protection que la vaccination par une souche vivante. Il semblerait même que cette protection ne perdure pas à long terme (Montaraz, *et al.*, 1986). Lors de l'inoculation de bactéries VHK, seuls les PAMPs stimulent le système immunitaire. Ces éléments ne semblent donc pas suffisants pour induire une mémoire protectrice à long terme. Dès lors, il serait intéressant de caractériser la réponse primaire développée suite à l'inoculation de bactéries tuées. Ceci nous permettrait d'identifier l'origine de cette mauvaise protection.

Pour comprendre les mécanismes par lesquels les pathogènes intracellulaires induisent le développement d'une mémoire protectrice, il est nécessaire d'identifier les facteurs bactériens qui stimulent efficacement le système immunitaire. En effet, l'expression de facteurs de virulence par la bactérie lui permettent d'établir un cycle infectieux réussi et contribuent donc à l'activation des différents mécanismes effecteurs de l'immunité. L'étude de mutants pour diverses étapes du cycle infectieux pourrait permettre l'identification d'éléments clés dans le développement d'une mémoire protectrice à long terme. Une récente étude chez *Listeria monocytogenes* a par exemple montré que le développement d'une mémoire protectrice à long terme dépendait de l'expression cytosolique de SecA2, un système de sécrétion auxiliaire (Muraille, *et al.*, 2007).

A ce jour, plusieurs étapes du cycle infectieux de *B. melitensis* peuvent être ciblées. Ainsi, l'opéron VirB, codant pour le système de sécrétion de type IV, pourrait être un facteur clé. La présence de cet opéron fonctionnel est essentielle pour l'établissement et la persistance de l'infection (Hong, *et al.*, 2000). En effet, les mutants déficients pour VirB sont avirulents chez la souris (Lestrate *et al.*, 2000). L'expression du système de sécrétion de type IV, et donc la libération d'effecteurs de *B. melitensis* dans la cellule hôte, pourraient constituer des éléments essentiels pour la stimulation adéquate du système immunitaire.

De même, la présence de gènes nécessaires à l'assemblage du flagelle chez *B. melitensis* semble nécessaire pour sa persistance en modèle murin. En effet, l'infection de souris par des mutants pour ces différents gènes a révélé que leur expression était nécessaire pour la survie à long terme de *B. melitensis* (l'atténuation n'apparaît qu'après 4 semaines) (Fretin *et al.*, 2005). Il serait dès lors intéressant d'étudier ces mutants dans le contexte d'une réponse secondaire.

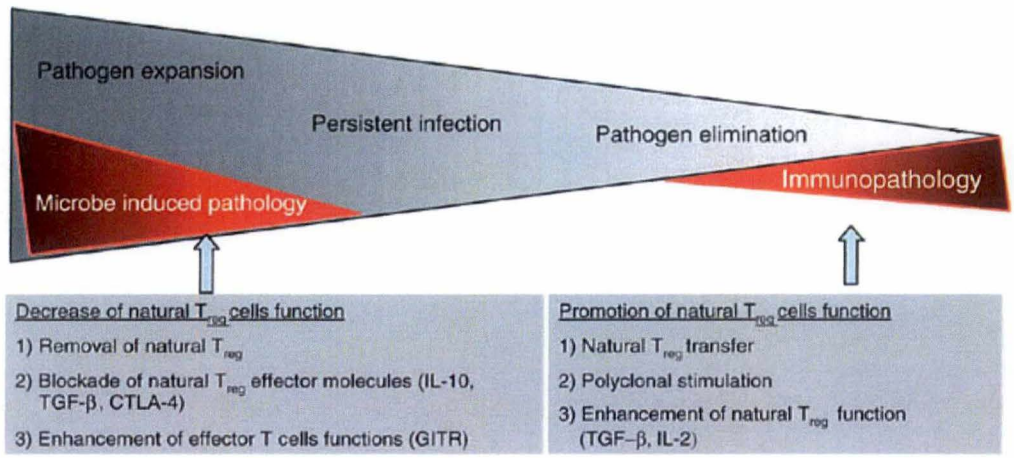


Fig 2. Manipulation des cellules Tregs naturelles comme une approche thérapeutique durant l'infection (Belkaid *et al.*, 2005). Les interactions entre un pathogène et son hôte s'étendent de la croissance incontrôlée du pathogène jusqu'à son élimination complète. En effet, un contrôle excessif de la réponse immunitaire par les cellules Tregs peut conduire à une croissance incontrôlée et éventuellement à la mort de l'hôte. Dans certains cas, diminuer les fonctions régulatrices peut restaurer la capacité de l'hôte à contrôler l'infection. Ceci peut se faire par l'élimination des cellules Tregs, le blocage des mécanismes effecteurs de ces cellules (IL-10, TGF-β et CTLA-4, ce dernier étant un récepteur exprimé par tous les lymphocytes $TCD4^+$ et inhibant leur fonctions effectrices) ou encore par la stimulation des fonctions effectrices des lymphocytes T (GITR est exprimé par les cellules Tregs et les lymphocytes. L'utilisation d'un anticorps agoniste de ce récepteur induit une puissante activation des lymphocytes T et les rend résistants aux effets suppresseurs des cellules Tregs). A l'autre extrême de cette interaction, la réponse immune effectrice peut éliminer efficacement le pathogène, mais cette réponse est si forte qu'elle peut aboutir à des maladies inflammatoires exacerbées et parfois causer la mort de l'hôte. Dans ces situations, stimuler les fonctions effectrices des cellules Tregs pourrait éviter ce type de pathologies. Ceci peut se faire par un transfert de cellules Tregs naturelles, une stimulation polyclonale ou une stimulation des fonctions effectrices de ces cellules (par l'IL-2, un facteur de croissance ou par le TGF-β, connu pour stimuler la conversion des lymphocytes T conventionnels en cellules Tregs naturelles Foxp3+).
TGF-β : Transforming Growth Factor-β, **CTLA-4** : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4, **GITR** : Glucocorticoïd-Induced TNF-Receptor

B. LES CELLULES T REGULATRICES PARTICIPENT-ELLES A LA REPONSE IMMUNITAIRE ANTI-*BRUCELLA* ? L'IL-10 EST-IL IMPLIQUE ?

1. Le rôle controversé des cellules T régulatrices lors d'une infection ?

Dans la plupart des maladies infectieuses, la réponse immunitaire développée à l'encontre du pathogène peut être la cause de dommages collatéraux pour les tissus de l'hôte. Cette réponse immunitaire est donc régulée par plusieurs mécanismes suppresseurs, dont la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF-β principalement) et l'activation de cellules T régulatrices (Tregs). La fonction immunosuppressive de ces mécanismes peut toutefois agir au détriment de l'hôte. En effet, de nombreux pathogènes ont acquis des stratégies facilitant leur persistance chez l'hôte et permettant l'établissement d'une infection chronique. Parmi celles-ci, on retiendra leur capacité à perturber la réponse immunitaire, notamment par leur production de molécules homologues aux cytokines anti-inflammatoires de l'hôte, l'induction directe de ces mêmes cytokines ou encore l'induction des cellules Tregs (pour revue : (Mills, 2004)). On peut dès lors se demander comment font les mécanismes régulateurs pour contrôler le développement de pathologies autoimmunitaires tout en autorisant le même type de réponse immunitaire pour protéger l'hôte d'une infection. De même, quel est l'avantage de l'hôte à générer des cellules Tregs supprimant la réponse immunitaire qui devait faciliter l'élimination des pathogènes ? « L'homéostasie » immunitaire serait réalisée par une fragile balance entre la réponse effectrice et la réponse suppressive, c'est-à-dire entre le nombre de lymphocytes T effecteurs et de cellules Tregs (Mills, 2004). Dès lors, en inactivant par exemple les cellules Tregs ou en interférant avec leurs mécanismes d'action, il pourrait être possible d'influencer le degré de dommages tissulaires, la charge bactérienne ou encore le développement de la mémoire immunologique (fig. 2). Plusieurs études se concentrent actuellement sur ce sujet.

Ainsi, il a été montré que des filaires (*Litomosoides sigmodontis*) induisaient un recrutement de cellules Tregs qui permettait de supprimer la réponse des cellules T effectrices. Cette stratégie assurerait dès lors l'établissement et la persistance du parasite. L'élimination des cellules Tregs par l'injection d'anticorps dirigés contre les marqueurs de surface de ces cellules (CD25 et GITR[1]) a permis une diminution significative du nombre de parasites (Taylor *et al.*, 2005).

La production d'IL-10 par les cellules T régulatrices semble jouer un rôle important dans la persistance d'une infection par *Leishmania major*. Les souris déficientes pour l'IL-10 (IL-$10^{-/-}$) ou traitées par des anticorps dirigés contre le récepteur de l'IL-10 éliminent rapidement l'infection (Belkaid *et al.*, 2001). De plus, il a été montré que les cellules Tregs s'accumulaient rapidement au site d'infection et supprimaient la capacité des cellules T effectrices d'éliminer le parasite (Belkaid, *et al.*, 2002).

Une autre étude réalisée sur *Mycobacterium tuberculosis* a également pu mettre en évidence un recrutement des cellules Tregs lors de l'infection. Cependant, l'élimination de ces cellules par l'injection de l'anticorps PC61 (dirigé contre CD25) n'a pas affecté le nombre

---

[1] **GITR, *glucocorticoid-induced TNF receptor family related-gene*** : récepteur appartenant à la famille des récepteurs du TNF et dont l'expression est induite chez les lymphocytes T et B activés. Les cellules Tregs expriment de manière constitutive un taux élevé de GITR.

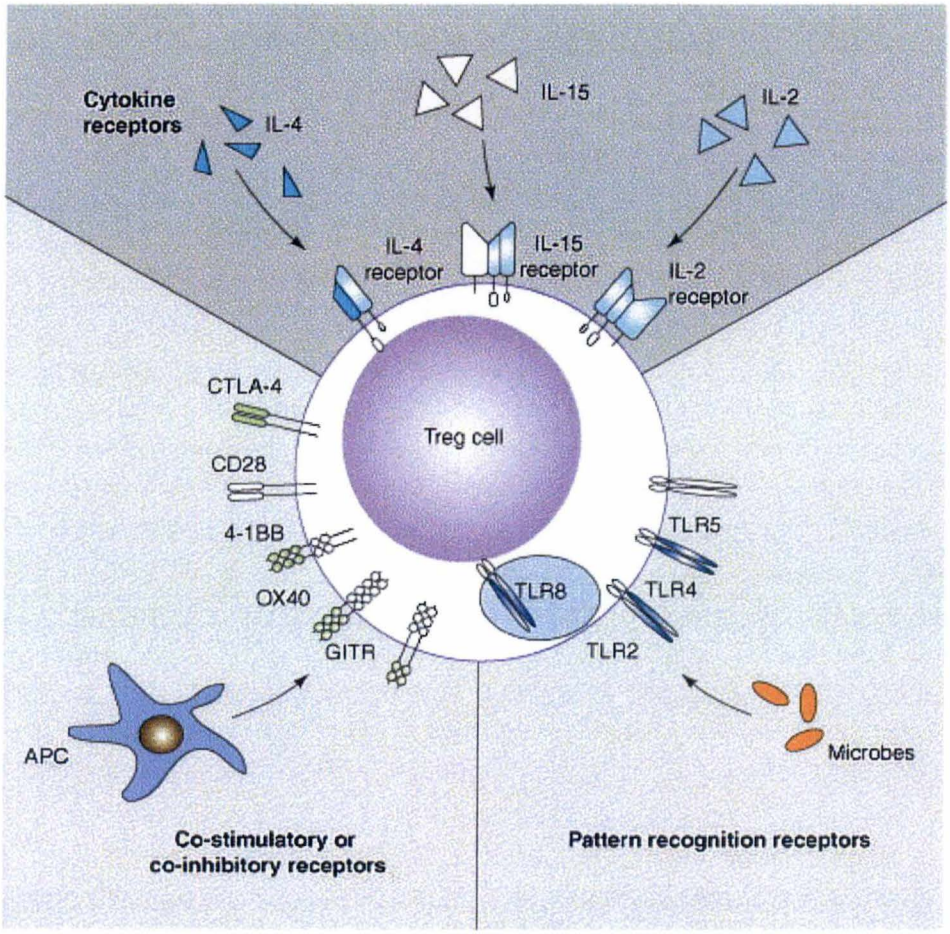


Fig. 3. Molécules exprimées par les cellules T régulatrices (Sutmuller *et al.*, 2006). Trois grandes classes de molécules sont exprimées par les cellules Tregs et peuvent moduler leur fonctionnement : les récepteurs de cytokines, co-stimulateurs et co-inhibiteurs. Trois facteurs de croissances majeurs affectent le fonctionnement des cellules Tregs : l'IL-2, l'IL-4 et l'IL-15. L'IL-2 (dont le récepteur est la molécule CD25) est nécessaire à la différenciation et au maintien des cellules Tregs in vivo. CD28 est un co-récepteur qui stimule la prolifération des cellules Tregs. Une autre molécule de la même famille, CTLA-4 (cytotoxic T-Lymphocyte-associated antigen-4) participe à la fonction suppressive des Tregs, sans doute selon un mécanisme contact-dépendant. Les membres de la famille des récepteurs du TNF, 4-1BB, OX40 et GITR, sont de puissants stimulateurs des cellules Tregs. La prolifération et le fonctionnement des cellules Tregs sont modulés de manière directe via la stimulation de leurs TLRs. Par exemple, la stimulation du TLR5 augmente l'expression de FoxP3 et la fonction suppressive des cellules Tregs.

de bactéries. Toutefois, les auteurs ont observé une légère augmentation de lymphocytes $TCD4^+$ produisant de l'IFNγ (Quinn *et al.*, 2006).

Des études de plus en plus nombreuses suggèrent que les cellules Tregs pourraient contrôler la réponse immunitaire dans le but de limiter mais non d'éliminer l'infection. Cette persistance de l'infection assurerait le maintien d'une mémoire immunologique (Belkaid, *et al.*, 2002, Mills, 2004).

2. *Quel(s) rôle(s) pour les cellules Tregs lors d'une infection par B. melitensis ?*

2.1. *Aucune contribution des cellules Tregs $CD4^+CD25^+$ démontrée dans la persistance de B. melitensis...*

Il est reconnu que certains pathogènes, particulièrement ceux qui sont la cause d'une infection chronique, recrutent les cellules Tregs dans le but d'assurer leur persistance en supprimant la réponse immunitaire (Anderson *et al.*, 2007, Belkaid, *et al.*, 2002, Quinn, *et al.*, 2006). Dès lors, comme dans le cas des filaires, la suppression des cellules Tregs devrait conduire à une élimination du pathogène (Taylor, *et al.*, 2005). Dans le cas de *B. melitensis*, les souris traitées avec l'anticorps dirigé contre CD25 (αCD25) ne se montrent pas plus efficaces dans l'élimination des bactéries que les souris du groupe contrôle (IgC). Ces résultats, déjà observés chez d'autres pathogènes tels que *M. tuberculosis (Quinn et al)*, pourraient suggérer que *B. melitensis* n'exploite pas les cellules Tregs pour supprimer la réponse immunitaire.

Cependant, il existe de nombreuses sous-populations de cellules Tregs. L'anticorps PC61 (αCD25) utilisé dans cette étude n'affecte pas les cellules Tregs induites ni une sous population de cellules Tregs naturelles de phénotype $CD25^-Foxp3^+$. Bien que dépourvues de l'expression constitutive de CD25, ces cellules expriment les autres protéines caractéristiques des cellules Tregs (fig. 3) et exercent également une activité suppressive (Fontenot *et al.*, 2005). Contrairement aux cellules $CD25^+Foxp3^+$, ces cellules expriment plusieurs récepteurs et molécules de surface leur permettant de pénétrer dans des tissus tels que la rate, et d'y représenter la majeure partie des cellules $Foxp3^+$. Il est donc possible qu'une sous-population particulière de cellules Tregs intervienne dans l'infection par *B. melitensis*.

L'utilisation d'une thérapie combinée PC61 (dirigé contre CD25) et anticorps dirigé contre le *glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene* (GITR) pourrait révéler de manière plus pertinente le rôle des cellules Tregs. Lors d'études sur les filaires, cette thérapie a permis d'observer une diminution significative du nombre de nématodes parasitant les souris, alors qu'un traitement αCD25 seul n'avait aucun effet (Taylor, *et al.*, 2005). GITR est un récepteur fortement exprimé par les cellules Tregs. Lorsqu'on réalise une thérapie avec des anticorps dirigés contre ce récepteur, ceux-ci jouent le rôle d'agoniste en inhibant l'activité régulatrice des cellules T $CD4^+CD25^+$ (Ermann *et al.*, 2003) et en agissant comme un costimulateur pour les lymphocytes $TCD4^+$ activés (Tone *et al.*, 2003) tout en rendant ceux-ci résistants à la suppression par les cellules Tregs (Stephens *et al.*, 2004).

2.2. *... mais un rôle probable pour l'IL-10 dans cette persistance*

La diminution de la charge bactérienne observée après 20 jours de traitement suggère que l'IL-10 est requis pour la persistance de *B. melitensis*. Cette observation avait déjà été rapportée en 1995 par une étude similaire sur *B. abortus* : la neutralisation in vivo de l'IL-10

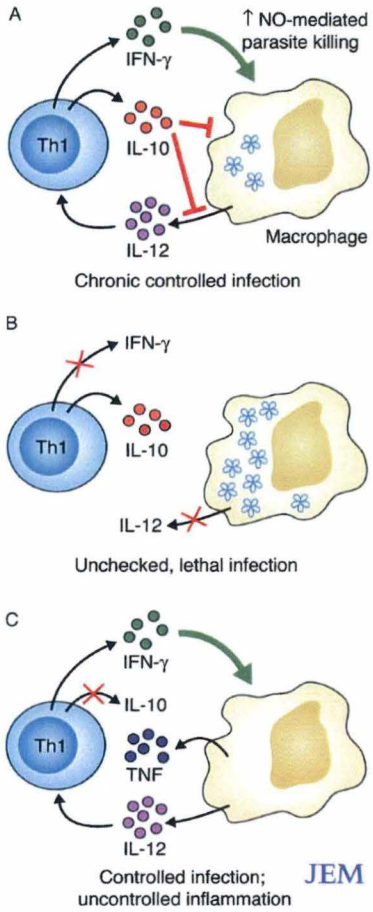


Fig 4. Modèle de régulation lors d'une infection par *Toxoplasma gondii* chez des souris C57BL/6 (Trinchieri 2007). Chez des animaux intacts (A), la production d'IFNγ par les cellules Th1 assure un contrôle efficace de l'infection. Certaines de ces cellules Th1 produisent aussi de l'IL-10 qui permet de limiter la réponse Th1 et l'inflammation qui s'en suit. (B) Le blocage de l'IFNγ ou de l'IL-12 empêche le contrôle de l'infection et résulte en la mort de l'hôte. (C) Si on empêche la production d'IL-10 par les cellules Th1 , on permet une surproduction de cytokines proinflammatoires par les cellules T et autres cellules de l'immunité, pouvant conduire à la mort de l'animal infecté, même si l'infection est contrôlée.

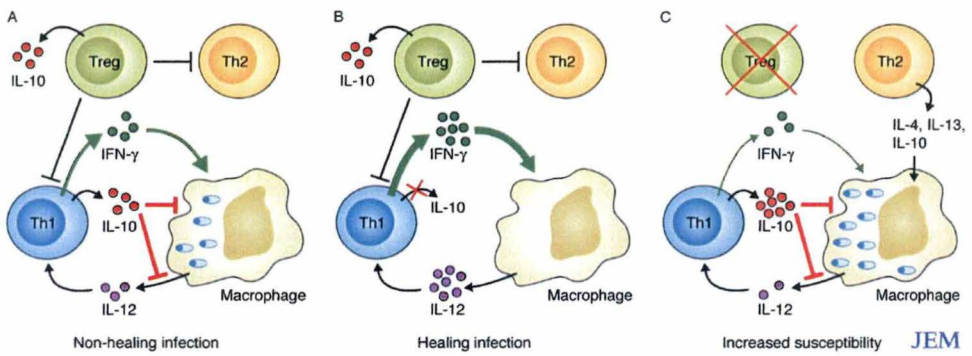


Fig 5. Modèle de régulation d'une infection par *Leishmania major* chez des souris C57BL6 (Trinchieri 2007). Chez un animal intact (A), la production d'IFNγ par les cellules Th1 permet seulement un contrôle de l'infection et n'empêche pas le développement de lésions. (B) Si on empêche la production d'IL-10 par les cellules Th1, les fonctions effectrices de ces cellules sont stimulées, ce qui permet d'éliminer l'infection. (C) L'élimination des cellules Tregs se solde par une augmentation du nombre de parasites, parallèlement à la production d'IL-10 et de cytokines issues des cellules Th2. La réponse Th2 agit au détriment de l'hôte car elle ne permet pas d'éliminer les parasites.

(à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'IL-10) se soldait par une diminution du nombre de bactéries d'un facteur 10 et par une production supérieure d'IFNγ (Fernandes *et al.*, 1995a).

Notre observation que le traitement αIL-10R est plus efficace que le traitement αCD25 suggère que l'IL-10, dans ce modèle, ne proviendrait pas uniquement des cellules Tregs naturelles (éliminées par l'αCD25). Il est bien connu que l'IL-10 peut être produite non seulement par les cellules Tregs naturelles et les Tr1 induites, mais également par les lymphocytes TCD4 Th1 et Th2, les lymphocytes B CD5, les cellules NK, les macrophages, les cellules dendritiques, etc. Dans notre étude, l'administration d'anticorps dirigés contre le récepteur de l'IL-10 (αIL-10R) pourrait donc non seulement neutraliser l'activité des cellules Tregs naturelles, mais également interférer avec les mécanismes d'action d'autres types cellulaires. Par exemple, de récentes études indiquent que les lymphocytes $TCD4^+$Th1 ($CD4^+CD25^-FoxP3^-$) produisent des quantités importantes d'IL-10 lors de l'infection par *Leishmania major* ou par *Toxoplasma gondii* (Anderson, *et al.*, 2007, Jankovic *et al.*, 2007, Trinchieri, 2007). Pour chacun de ces pathogènes intracellulaires, un modèle de la régulation de l'infection est proposé en figures 4 et 5 (Trinchieri, 2007). D'autres études suggèrent que le pathogène lui-même peut induire la production d'IL-10 par les cellules de l'immunité et « éteindre » de la sorte la réponse immunitaire à son égard. Ainsi, l'antigène V de *Yersinia enterocolitica* stimulerait la production d'IL-10 par les macrophages, si bien que les souris déficientes pour l'IL-10 présentent un meilleur contrôle de l'infection (Sing *et al.*, 2002). Une telle hypothèse n'est pas à exclure dans le cas de *Brucella*.

2.3. Peu d'impact sur la production d'IFNγ

Lors d'une infection par *B. melitensis*, la production d'IFNγ est majoritairement prise en charge par les lymphocytes $TCD4^+$ et permet notamment l'activation des activités bactéricides des macrophages (Boehm, *et al.*, 1997, Copin, *et al.*, 2007). Les traitements αCD25 et αIL-10R visant les cellules Tregs ne semblent pas modifier le taux de production d'IFNγ. Cependant, la contribution des lymphocytes $TCD4^+$ dans cette production augmente légèrement, ce qui suggère que les cellules Tregs pourraient exercer un effet immunosuppresseur sur ces lymphocytes.

2.4. Un rôle immunosuppresseur sur la production de NO et sur le recrutement des TipDC

L'oxyde nitrique (NO) joue un rôle important dans l'élimination de *B. melitensis*. Cette production est dépendante de l'IFNγ et est majoritairement réalisée par les TipDC (Copin, *et al.*, 2007). Curieusement, lors des traitements αCD25 et αIL-10R, on observe une augmentation de la fréquence de cellules exprimant l'iNOS de 4 fois et 7,5 fois respectivement. De même, on constate que ces traitements induisent un recrutement important des TipDC (5 et 11 fois plus de cellules respectivement). La contribution de ces cellules dans l'expression d'iNOS reste constante (environ 40%). Cela suggère que les deux traitements administrés n'influencent pas l'expression de l'iNOS, mais agissent sur les cellules exprimant cette enzyme. Il semble donc que ces deux traitements ont levé un mécanisme suppresseur important agissant sur les TipDC et donc sur la production d'iNOS. La neutralisation du récepteur de l'IL-10 provoque un effet deux fois plus important que le traitement αCD25. Ce résultat est cohérent avec la diminution de charge bactérienne observée après 20 jours de traitement dans le groupe de souris traité par l' αIL-10R. En effet, l'expression nettement plus importante d'iNOS pourrait avoir favorisé l'élimination de *B. melitensis*.

Au vu de ces résultats, l'IL-10 apparaît comme un important mécanisme suppresseur de la

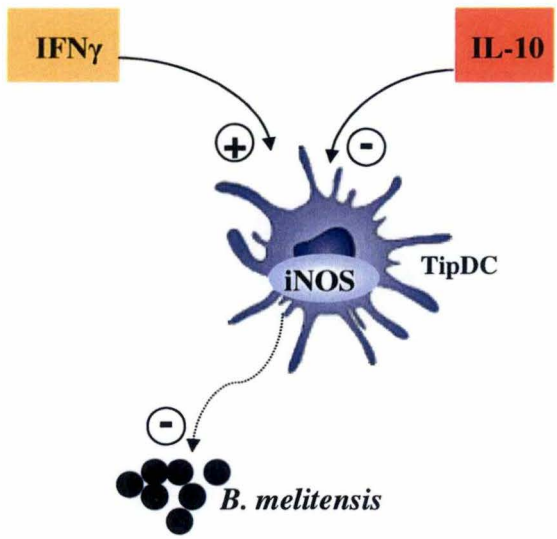


Figure 6. L'IL-10 apparaît comme un mécanisme suppresseur important lors d'une infection par *B. melitensis*. Il semblerait que les TipDC, principales productrices de NO, soient sous le contrôle de cette cytokine anti-inflammatoire. Lors d'un traitement visant à neutraliser le récepteur de l'IL-10, on observe un recrutement important des TipDC et une meilleure élimination des bactéries. L'IL-10 ne semble pas altérer la synthèse d'IFNγ.

réponse immunitaire envers *B. melitensis*. Il est connu que l'IL-10 exerce ses effets sur de nombreuses cellules, y compris les cellules dendritiques. Il semblerait donc que les TipDC soient soumises à une régulation immunosuppressive par l'intermédiaire de l'IL-10. Cette régulation peut provenir soit d'un effet direct de l'IL-10 sur ces cellules, soit d'un effet indirect, par l'intermédiaire d'autres cellules régulant les TipDC. Les études de Fernandes et Baldwin suggéraient également que l'IL-10 pouvait diminuer la réponse immunitaire envers *B. abortus* en altérant les fonctions effectrices des macrophages et en inhibant la production d'IFNγ par les cellules Th1 (Fernandes, *et al.*, 1995a).

Les cellules Tregs semblent également influencer les TipDC puisque le traitement αCD25 modifie le recrutement de ces cellules. Toutefois, cet effet pourrait être dépendant de l'IL-10 produit par les cellules Tregs.

2.5. En conclusion

Au vu des résultats de cette étude, nous observons que l'IL-10 exerce un effet immunosuppresseur sur la réponse immunitaire développée à l'encontre de *Brucella*. Cet effet s'observe tant sur le nombre de bactéries que sur la réponse immunitaire (fig 6). On ne connaît cependant pas l'origine cellulaire de cette cytokine. Pour éclaircir ce point, il serait utile de réaliser des analyses au cytomètre de flux combinant des colorations intracellulaires (IL-10, IFNγ) et extracellulaires, visant les cellules T $CD4^+CD25^+$ et les autres types cellulaires susceptibles de produire l'IL-10 (cellules B, macrophages, cellules T effectrices). Les cellules T effectrices ont déjà été reconnues comme étant des productrices d'IL-10 et d'IFNγ qui s'accumulent sur les sites chroniques d'une infection par Leishmania major (Belkaid, *et al.*, 2001).

Le rôle des cellules Tregs est difficile à établir. Bien qu'un effet du traitement αCD25 soit visible sur la réponse immunitaire (recrutement de TipDC productrices de NO), aucune diminution du nombre de bactéries n'est observée. Il serait dès lors intéressant d'utiliser des thérapies combinant plusieurs anticorps (par exemple αCD25 et αGITR, cfr (Taylor, *et al.*, 2005)). De plus, la thérapie utilisée dans cette étude s'est étalée sur à peine 20 jours. Dans la littérature, il semblerait que les effets d'un tel traitement apparaissent après plusieurs semaines. Une étude sur le long terme permettrait peut-être d'observer un effet sur le nombre de bactéries.

Matériel & Méthodes

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. BACTERIES, SOURIS, REACTIFS

1. Souche bactérienne

B. melitensis 16M biovar 1, mutant spontané résistant à l'acide nalidixique (Nal^R), est une souche de phénotype lisse. Elle a été isolée sur le terrain en 1955 et provient de MacMillan (Central Veterinary Laboratory, UK).

2. Souris

Souris C57BL/6 mâles et femelles âgées de 16 semaines (étude de la réponse secondaire) ou 8 à 9 semaines (étude des cellules T régulatrices). Ces souris proviennent d'un élevage réalisé à l'animalerie des FUNDP (Namur).

3. Milieux, tampons, solutions et anticorps

3.1. Milieux

Milieu riche pour B. melitensis 16 M : milieu 2YT, préparé avec de l'eau désionisée, et autoclavé (121°C, pendant 20 minutes)	
Mix pour LB* liquide	20 g/l
Hydrolysat de caséine (peptone)	6 g/l
Yeast extract	5 g/l
Agar (uniquement pour milieu solide)	1 g/l
Milieu de culture riche pour les cellules eucaryotes : RPMI 1640 (GIBCO Invitrogen) complémenté par :	
FBS décomplémenté (Fœtal Bovine Serum)	10 %
Pénicilline/streptomycine acides aminés non essentiels pyruvate de sodium L-glutamine	5000 U/ml 5% 1,1M 2,0M

* milieu LB (Luria Bertani), constitué d'hydolysat de caséine (peptone) 10g/l, NaCl (5g/l), Yeast extract (5g/l).

3.2. Tampons

PBS 10x, préparé dans de l'eau désionisée, et ajusté à pH 7,4	
NaCl	80 g/l
KCl	2 g/l
Na_2HPO_4	11,5 g/l
KH_2PO_4	2,4 g/l
PBS Triton-X 100	
PBS 1x	500 ml
Triton-X 100	500 µl
Tampon de FACS	
PBS 1x	500 ml
BSA (Bovine Serum Albumin)	2 g/l
NaN3	0,2 g/l

3.3. Solutions

Collagénase D (Roche)	Resuspendre le contenu du récipient dans un volume d'HBSS correspondant à : (activité enzymatique x750x500) / 4000 (ml) Congeler en aliquots de 1 ml
DNase (Sigma)	Resuspendre le contenu du récipient dans du NaCl 0,15M stérile (filtré à 0,22 µm) de manière à avoir une concentration finale de 10mg/l. Congeler en aliquots de 100 µl.
Solution Collagénase / DNase	Diluer 1ml de collagénase et 100 µl de DNase par 10 ml de RPMI. Cette solution permet de lyser la matrice extracellulaire de manière à isoler les cellules (collagénase) tout en empêchant la formation d'aggrégats d'ADN (DNase)
Paraformaldhéhyde (PAF) 4%	Dissoudre 4 g de PAF dans 50 ml d' H_20 désionisée, à 70°C, en milieu basique (ajouter 1-3 gouttes de NaOH). Ajouter 50 ml de PBS 2x, mettre à pH et filtrer (filtre 0,22 µm).

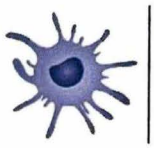
CELLULES	MARQUEURS	CARACTERISTIQUES
LYMPHOCYTES TCD4	TCRβ	Chaîne β du récepteur des lymphocytes T
	CD4	Corécepteur pour le MHC II, exprimé par les lymphocytes T
	(IFNγ*)	Cytokine immuno-modulatrice exprimée par les cellules Th1
CELLULES TREGS	TCRβ	Chaîne β du récepteur des lymphocytes T
	CD4	Corécepteur pour le MHC II, exprimé par les lymphocytes T
	CD25	Chaîne α du récepteur de l'IL-2
	FoxP3*	Facteur de transcription
TIPDCS 	CD11b	Chaîne α_M de l'intégrine CR3 (associée à CD18)
	CD11c	Chaîne α_X de l'intégrine CR4 (associée à CD18)
	MHCII	Complexe majeur d'histocompatibilité, présente les antigènes aux lymphocytes $TCD4^+$
	iNOS*	(ou NOS2) Enzyme assurant la synthèse du NO

Figure 1. Tableau illustrant les principales molécules de surface ou intracellulaires (dotées d'une astérisque) caractérisant les types cellulaires dont il est question dans ce travail. Les lymphocytes TCD4 sont caractérisés par l'expression de TCRβ, la chaîne du récepteur des lymphocytes T, et la molécule CD4. La sous-population T helper (Th)1 produit de l'IFNγ. Les cellules Tregs expriment le TCRβ et le CD4, mais également le CD25. Ce dernier marqueur ne serait pas exprimé par toutes les sous-populations de cellules Tregs, à l'opposé de FoxP3 (forkhead transcription factor 3) que l'on considère actuellement comme le marqueur caractéristique de ces cellules. Les TipDCs (TNF/iNOS producing dendritic cells) sont des cellules dendritiques caractérisées par le phénotype $CD11b^{high}CD11c^{high}MHCII^{high}$. Elles sécrètent du TNF-α et expriment l'iNOS.

3.4. Anticorps

Les cellules hématopoïétiques se distinguent par leur phénotype de surface particulier, à savoir l'expression de molécules de surface typiques. Le phénotype des cellules dont il est question dans ces travaux est repris en figure 1. Les cellules peuvent être identifiées par un marquage immunofluorescent des molécules de surface ou intracellulaires qui les caractérisent. Le tableau ci-dessous reprend les anticorps utilisés au cours de ce travail. Ceux-ci sont dilués dans du tampon de FACS ou du tampon de perméabilisation (BD Perm/Wash) dans le cas des anticorps intracellulaires. Le volume final est de 150 µl par puits (plaque 96 puits).

NOM	CIBLE	DILUTION	ORIGINE
M1/70 (FITC)	CD11b	1/200	BD pharmingen
HL3 (PE)	CD11c	1/200	BD pharmingen
2G9 (PE)	MHCII	1/400	BD pharmingen
H57-597 (FITC)	TCRβ	1/200	BD pharmingen
RM4-5 (PE)	CD4	1/400	BD pharmingen
RM4-5 (APC)	CD4	1/400	BD pharmingen
7D4 (PE)	CD25	1/200	BD pharmingen
M-19	iNOS	1/1500	Santa Cruz Biotechnology
XMG1.2 (APC)	IFNγ	1/300	BD pharmingen
24G2	Récepteur Fc	1/1	Surnageant d'hybridome

4. Traitements antibiotiques

Les traitements antibiotiques sont administrés via l'eau de boisson des souris. Les solutions ont été préparées extemporanément dans de l'eau de ville, selon les dosages suivants :

TRAITEMENT 1 (Grillo, *et al.*, 2006):
rifampicine (Aventis) 40mg/kg/jour
Doxycycline hyclate (Sigma-Aldrich) 160 mg/kg/jour
TRAITEMENT 2 (Sathiyaseelan, *et al.*, 2006) :
rifampicine (Aventis) 3mg/kg/jour
streptomycine sulfate (Sigma) 300 mg/kg/jour

5. Traitements anticorps

Chaque traitement est administré par une injection intrapéritonéale de 200 µl par souris.

Clone PC61 (ATCC): anticorps dirigé contre le récepteur CD25 (500µg/souris)

Clone 1B1.2 (ATCC): anticorps dirigé contre le récepteur de l'IL-10, (100µg/souris)

Isotype contrôle (IgC) (ATCC): IgG rate, purifiés à partir de surnageant de culture d'hybridome B (500µg/souris)

B. METHODES

1. Infection de souris par Brucella melitensis (vivante ou tuée)

Lancer une préculture la veille de l'infection dans 10 ml de milieu de culture liquide 2YT.

Le jour de l'infection :

- réaliser 2 lavages de la culture, chaque lavage comprenant une centrifugation à 3500 rpm (10 minutes) qui précipite les bactéries, puis une resuspension du culot dans 10ml de RPMI.
- mesurer la DO_{600nm} de la préculture de manière à calculer le facteur de dilution permettant d'obtenir une dose infectante de 8.10^4 bactéries par ml (une DO de 1 équivaut à plus ou moins 3.10^9 bactéries par ml).
- l'infection est réalisée par l'injection intrapéritonéale de 500 µl (soit 4.10^4 bactéries/souris) de solution bactérienne

Remarque : la dose infectante est contrôlée par l'étalement de plusieurs dilutions de la solution d'inoculation sur du milieu 2YT solide et comptage des CFUs après 4 jours d'incubation à 37°C.

Pour l'infection des souris par *B. melitensis* tuée, la même procédure a été suivie. Après avoir dilué la préculture de manière à avoir une dose infectante de 2.10^8 bactéries par ml, la solution d'inoculation a été chauffée dans un bain à 80°C pendant 60 minutes. Après refroidissement, l'inoculation a été réalisée par l'injection intrapéritonéale de 500 µl de la solution (soit 10^8 bactéries/souris).

2. Sacrifice des souris en vue du comptage des CFUs

Après un temps d'infection déterminé, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale. La rate est extraite et écrasée dans un sachet stérile. Le broyat est resuspendu dans 2ml de PBS Triton-X 100 pour lyser les cellules spléniques et libérer les bactéries. Plusieurs dilutions de cette solution bactérienne sont réalisées en plaque 96 puits pour être ensuite étalées sur du milieu 2YT solide. L'estimation du nombre de bactéries est obtenue par comptage des CFUs après 4 jours d'incubation à 37°C.

Remarque : dans le cas où l'on désire réaliser une coloration des cellules spléniques dans le but de faire une analyse au cytomètre de flux, la rate est divisée en deux. Cette division doit être prise en compte lors du comptage des CFUs.

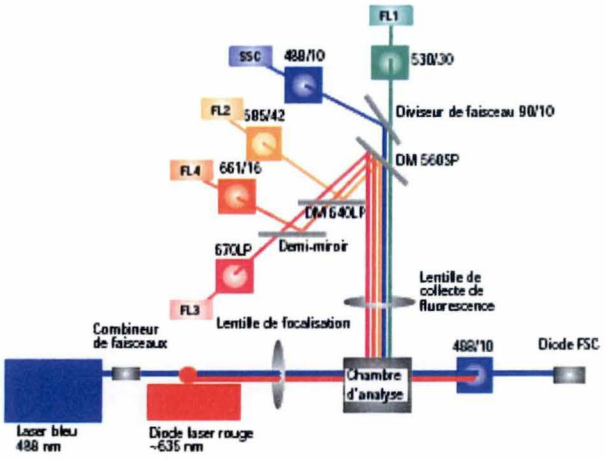


Figure 2. Le cytomètre de flux BD FACSCalibur inclut un laser argon d'une puissance de 15 mW émettant à 488 nm et des détecteurs pour trois paramètres fluorescent (FL1, FL2 et FL3). Il comprend aussi une deuxième diode laser rouge émettant à 635 nm et un détecteur supplémentaire. La lumière du laser est focalisée dans la chambre d'analyse par une lentille de focalisation. Le signal FSC (Forward Scatter – lumière diffractée aux petits angles) est recueilli par la diode FSC. Les signaux SSC (Side Scatter – lumière diffractée aux grands angles) et fluorescents sont recueillis par une lentille de collecte de fluorescence et divisés spectralement par un ensemble de miroirs dichroïques (DM) et des filtres (http://www.bdbiosciences.com).

3. Coloration des cellules spléniques et analyse au cytomètre de flux

Principe

Grâce à un marquage immunofluorescent préliminaire, l'analyse au cytomètre de flux (appelé FACS, Fluorescent Activated Cell Sorter, quand il est équipé d'un trieur de cellules) permet d'identifier et d'énumérer les cellules exprimant une ou plusieurs molécules de surface particulière(s). Le FACS est un instrument très spécialisé, permettant de mesurer certaines caractéristiques physiques (taille, forme, etc.) et chimiques (constituants marqués par un fluorochrome) sur des cellules ou particules individuelles en mouvement dans une suspension.

La suspension de cellules est propulsée à travers un tuyau étroit qui crée un mince flux de liquide dans lequel chaque cellule défile l'une après l'autre. Chacune passe devant un faisceau laser excitateur (lumière monochromatique). La lumière est soit diffractée, soit absorbée par le fluorochrome lorsqu'elle frappe la cellule. La lumière absorbée peut être réémise sous forme de fluorescence de longueur d'onde particulière qui sera enregistrée par des détecteurs (FL1, FL2 et FL3, voir figure 2). La lumière diffractée dépend des caractéristiques tridimensionnelles de la cellule, de sa granulosité et de sa taille. Elle est mesurée par les détecteurs SSC (Side Scatter) et FSC (Forward Scatter). Le détecteur SSC, placé à angle droit par rapport au faisceau laser, nous renseigne sur la granulosité de la cellule, tandis que le détecteur FSC, placé dans l'axe du faisceau, indique la taille de la cellule. Trois paramètres sont donc analysés par le cytomère de flux : la fluorescence, la taille et la granulosité.

Le cytomètre de flux BD FACSCalibur utilisé au laboratoire de biologie moléculaire inclut deux lasers. Le premier, un laser argon d'une puissance de 15mW, émet à 488 nm tandis que le second, une diode laser rouge, émet à 635 nm. Le système comprend des détecteurs pour 4 paramètres fluorescents. Lorsque des particules marquées interceptent la lumière du laser, la lumière diffractée et la fluorescence fournissent des informations sur la taille, la forme, la granulosité et l'intensité de fluorescence des cellules (figure 2).

Méthode

La coloration des cellules spléniques est réalisée à l'aide d'anticorps couplés aux fluorochromes FITC (fluorescein isothyocyanate), PE (phycoerythrin) ou APC (allophycocyanin). Le tableau ci-dessous présente les différentes longueurs d'onde d'excitation et d'émission optimales pour chacun des fluorochromes :

FLUOROCHROME	LONGUEUR D'ONDE D'EXCITATION	LONGUEUR D'ONDE D'EMISSION	COULEUR EMISE
FITC	488 nm	519 nm	Vert
PE	488 nm	578 nm	Jaune
APC	633 nm	660 nm	Rouge

Après un temps d'infection déterminé, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale et disséquées pour l'extraction de la rate. Si cette analyse est réalisée parallèlement à l'estimation des CFU, la rate sera divisée en deux. Dans ce cas, il est nécessaire de regrouper deux demi-rates par échantillon dans le but d'avoir un nombre suffisant de cellules pour l'analyse au cytomètre de flux. Les étapes qui suivent présentent le traitement et la coloration des cellules spléniques qui, pour des raisons pratiques, sont réalisées en 2 jours :

Premier jour :

- Cisailler la demi-rate dans une plaque 6 wells. Les organes doivent être préalablement humidifiés par une solution de collagénase/DNase préparée extemporanément.
- Resuspendre les cellules spléniques dans 2ml de la solution collagénase/DNase et incuber 30 minutes à 37°C (5% CO_2).
- Diluer la suspension de cellules dans 10 ml de RPMI et resuspendre ces cellules en effectuant une vingtaine de passages avec un tips coupé.
- Filtrer la suspension (tamis cellulaire, 70 µm) et centrifuger à 1400 rpm (7 minutes) pour précipiter les cellules spléniques.
- Resuspendre le culot cellulaire dans 5ml de milieu de culture riche additionné de BD GolgiStop (1µl/ml, BD GolgiPlug), un inhibiteur du transport de protéines. Ceci permet de bloquer le transport protéique intracellulaire et conduit à une accumulation des cytokines et/ou protéines dans le complexe de Golgi. Ce traitement permet une meilleure détection des cellules productrices d'une protéine particulière lors de l'analyse au cytomètre de flux. Laisser incuber 4 heures à 37°C (5% CO_2).
- Laver les cellules spléniques : centrifugation à 1400 rpm (7 minutes) et resuspendre dans 1ml de milieu de culture riche. Placer les cellules à 4°C jusqu'au lendemain.

Deuxième jour :

- Centrifuger la suspension de cellules spléniques dans 10 ml de tampon de FACS à 1400 rpm (7 minutes) et resuspendre le culot cellulaire dans 500 µl de l'anticorps 24G2. Celui-ci se fixe aux récepteurs Fc des cellules hématopoïétiques et permet ainsi un blocage des sites de fixation non spécifiques. Laisser incuber 20 minutes à 4°C.
- Diluer les cellules dans un volume déterminé de tampon de FACS (à estimer en fonction de la taille du culot et du nombre de colorations à effectuer) puis transvaser la suspension cellulaire dans une plaque multipuits.
- Centrifugation de la plaque multipuits à 2000 rpm (1minute) et resuspendre les cellules dans 150µl de la solution d'anticorps de surface. Laisser incuber 30 minutes à 4°C.
- Réaliser 3 lavages, chacun comprenant une centrifugation à 2000 rpm (1minute 30 secondes) et une resuspension des cellules dans 150µl de tampon de FACS. Au dernier lavage, resuspendre dans 150µl de PAF 1% et laisser incuber 15 minutes à 4°C. Le PAF permet de fixer les cellules avant leur perméabilisation et le marquage intracellulaire.
- Après 3 lavages (cfr ci-dessus), resuspendre les cellules dans 150 µl de la solution d'anticorps intracellulaires primaires (cette solution est préparée dans un tampon de perméabilisation, le BD Perm/Wash, ce qui permet la perméabilisation des cellules spléniques et l'entrée des anticorps). Laisser incuber 30 minutes à 4°C.
- Après 3 lavages (cfr ci-dessus), resuspendre les cellules dans 150 µl de la solution d'anticorps secondaires. Laisser incuber 30 minutes à 4°C.
- Après 3 lavages (cfr ci-dessus), resuspendre dans 200µl de tampon de FACS et

diluer dans 400 µl de PAF 1%. Ce dernier point permet d'assurer la stérilité de l'échantillon, le PAF étant reconnu pour tuer par fixation les bactéries.

4. Analyse statistique

L'ANOVA II croisée fixe a été utilisée pour l'analyse des données, après avoir testé l'homogénéité des variances (test de Hartley). La comparaison des moyennes 2 à 2 a été réalisée par un contraste de Scheffé. Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance à la moyenne (95%), ce qui correspond à +/- 2 SEM (standard error of the mean).

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

Abbas, A. K. & Janeway, C. A., Jr. Immunology: improving on nature in the twenty-first century. *Cell* **100**, 129-38 (2000).

Ackermann, M. R., Cheville, N. F. & Deyoe, B. L. Bovine ileal dome lymphoepithelial cells: endocytosis and transport of Brucella abortus strain 19. *Vet Pathol* **25**, 28-35 (1988).

Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M. H., de Sauvage, F. J. & Gurney, A. L. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* **278**, 1910-4 (2003).

Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801 (2006).

Alonso, A. & Garcia-del Portillo, F. Hijacking of eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens. *Int Microbiol* **7**, 181-91 (2004).

Alp, E., *et al.* Doxycycline plus streptomycin versus ciprofloxacin plus rifampicin in spinal brucellosis [ISRCTN31053647]. *BMC Infect Dis* **6**, 72 (2006).

Alton, G. G., Elberg, S. S. & Crouch, D. Rev. 1 Brucella melitensis vaccine. The stability of the degree of attenuation. *J Comp Pathol* **77**, 293-300 (1967).

Anderson, C. F., Oukka, M., Kuchroo, V. J. & Sacks, D. CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* **204**, 285-97 (2007).

Araya, L. N., Elzer, P. H., Rowe, G. E., Enright, F. M. & Winter, A. J. Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in BALB/c mice infected with Brucella abortus. *J Immunol* **143**, 3330-7 (1989).

Araya, L. N. & Winter, A. J. Comparative protection of mice against virulent and attenuated strains of Brucella abortus by passive transfer of immune T cells or serum. *Infect Immun* **58**, 254-6 (1990).

Arellano-Reynoso, B., *et al.* Cyclic beta-1,2-glucan is a Brucella virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol* **6**, 618-25 (2005).

Ariza, J., *et al.* Characteristics of and risk factors for relapse of brucellosis in humans. *Clin Infect Dis* **20**, 1241-9 (1995).

Banchereau, J., *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**, 767-811 (2000).

Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-52 (1998).

Baumann, H. & Gauldie, J. The acute phase response. *Immunol Today* **15**, 74-80 (1994).

Beck, B. L., Tabatabai, L. B. & Mayfield, J. E. A protein isolated from Brucella abortus is a Cu-Zn superoxide dismutase. *Biochemistry* **29**, 372-6 (1990).

Belkaid, Y., *et al.* The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of Leishmania major in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med* **194**, 1497-506 (2001).

Belkaid, Y., Piccirillo, C. A., Mendez, S., Shevach, E. M. & Sacks, D. L. CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. *Nature* **420**, 502-7 (2002).

Bertotto, A., *et al.* Lymphocytes bearing the gamma delta T cell receptor in acute Brucella melitensis infection. *Eur J Immunol* **23**, 1177-80 (1993).

Blasco, J. M. A review of the use of B. melitensis Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev Vet Med* **31**, 275-83 (1997).

Bluestone, J. A. & Abbas, A. K. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* **3**, 253-7 (2003).

Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. & Howard, J. C. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* **15**, 749-95 (1997).

Canning, P. C., Roth, J. A. & Deyoe, B. L. Release of 5'-guanosine monophosphate and adenine by Brucella abortus and their role in the intracellular survival of the bacteria. *J Infect Dis* **154**, 464-70 (1986).

Celli, J. Surviving inside a macrophage: the many ways of Brucella. *Res Microbiol* **157**, 93-8 (2006).

Celli, J., *et al.* Brucella evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* **198**, 545-56 (2003).

Celli, J., Salcedo, S. P. & Gorvel, J. P. Brucella coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1673-8 (2005).

Chakravortty, D. & Hensel, M. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. *Microbes Infect* **5**, 621-7 (2003).

Chan, C. W., *et al.* Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat Med* **12**, 207-13 (2006).

Chen, W., *et al.* Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* **198**, 1875-86 (2003).

Colonna, M., Trinchieri, G. & Liu, Y. J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* **5**, 1219-26 (2004).

Cook, A. D., Braine, E. L. & Hamilton, J. A. The phenotype of inflammatory macrophages is stimulus dependent: implications for the nature of the inflammatory response. *J Immunol* **171**, 4816-23 (2003).

Copin, R., De Baetselier, P., Carlier, Y., Letesson, J. J. & Muraille, E. MyD88-Dependent Activation of B220-CD11b+LY-6C+ Dendritic Cells during Brucella melitensis Infection. *J Immunol* **178**, 5182-5191 (2007).

Corbeil, L. B., *et al.* Killing of Brucella abortus by bovine serum. *Infect Immun* **56**, 3251-61 (1988).

Cua, D. J., *et al.* Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* **421**, 744-8 (2003).

Cutler, S. J., Whatmore, A. M. & Commander, N. J. Brucellosis--new aspects of an old disease. *J Appl Microbiol* **98**, 1270-81 (2005).

Eisenschenk, F. C., Houle, J. J. & Hoffmann, E. M. Mechanism of serum resistance among Brucella abortus isolates. *Vet Microbiol* **68**, 235-44 (1999).

Elberg, S. S. & Faunce, K., Jr. Immunization against Brucella infection. VI. Immunity conferred on goats by a nondependent mutant from a streptomycin-dependent mutant strain of Brucella melitensis. *J Bacteriol* **73**, 211-7 (1957).

Elzer, P. H., *et al.* Antibody-mediated protection against Brucella abortus in BALB/c mice at successive periods after infection: variation between virulent strain 2308 and attenuated vaccine strain 19. *Immunology* **82**, 651-8 (1994).

Ermann, J. & Fathman, C. G. Costimulatory signals controlling regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15292-3 (2003).

Esche, C., Stellato, C. & Beck, L. A. Chemokines: key players in innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol* **125**, 615-28 (2005).

Fearon, D. T. & Locksley, R. M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* **272**, 50-3 (1996).

Fernandes, D. M. & Baldwin, C. L. Interleukin-10 downregulates protective immunity to Brucella abortus. *Infect Immun* **63**, 1130-3 (1995a).

Fernandes, D. M., Benson, R. & Baldwin, C. L. Lack of a role for natural killer cells in early control of Brucella abortus 2308 infections in mice. *Infect Immun* **63**, 4029-33 (1995b).

Fernandez-Prada, C. M., *et al.* Deletion of wboA enhances activation of the lectin pathway of complement in Brucella abortus and Brucella melitensis. *Infect Immun* **69**, 4407-16 (2001).

Fernandez-Prada, C. M., *et al.* Interactions between Brucella melitensis and human phagocytes: bacterial surface O-Polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis. *Infect Immun* **71**, 2110-9 (2003).

Ficht, T. A. Intracellular survival of Brucella: defining the link with persistence. *Vet Microbiol* **92**, 213-23 (2003).

Fontenot, J. D., *et al.* Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* **22**, 329-41 (2005).

Fontes, P., *et al.* Absence of evidence for the participation of the macrophage cellular prion protein in infection with Brucella suis. *Infect Immun* **73**, 6229-36 (2005).

Forestier, C., Deleuil, F., Lapaque, N., Moreno, E. & Gorvel, J. P. Brucella abortus lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation. *J Immunol* **165**, 5202-10 (2000).

Forestier, C., *et al.* Interaction of Brucella abortus lipopolysaccharide with major histocompatibility complex class II molecules in B lymphocytes. *Infect Immun* **67**, 4048-54 (1999a).

Forestier, C., Moreno, E., Pizarro-Cerda, J. & Gorvel, J. P. Lysosomal accumulation and recycling of lipopolysaccharide to the cell surface of murine macrophages, an in vitro and in vivo study. *J Immunol* **162**, 6784-91 (1999b).

Frank, M. M. & Fries, L. F. The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today* **12**, 322-6 (1991).

Fretin, D., *et al.* The sheathed flagellum of Brucella melitensis is involved in persistence in a murine model of infection. *Cell Microbiol* **7**, 687-98 (2005).

Garin-Bastuji, B., Blasco, J. M., Grayon, M. & Verger, J. M. Brucella melitensis infection in sheep: present and future. *Vet Res* **29**, 255-74 (1998).

Godefroid, J., Al-Mariri, A., Walravens, K. & Letesson, J. J. Brucellose bovine. *Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail*, E. m. internationales (ed.), **71**, 869-889 (2003).

Godfroid, J., *et al.* From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet Res* **36**, 313-26 (2005).

Grillo, M. J., *et al.* Efficacy of several antibiotic combinations against Brucella melitensis Rev 1 experimental infection in BALB/c mice. *J Antimicrob Chemother* **58**, 622-6 (2006).

Guzman-Verri, C., *et al.* The two-component system BvrR/BvrS essential for Brucella abortus virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12375-80 (2002).

Harrington, L. E., Mangan, P. R. & Weaver, C. T. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol* **18**, 349-56 (2006).

Henkart, P. A. Lymphocyte-mediated cytotoxicity: two pathways and multiple effector molecules. *Immunity* **1**, 343-6 (1994).

Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A. & Ezekowitz, R. A. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**, 1313-8 (1999).

Hong, P. C., Tsolis, R. M. & Ficht, T. A. Identification of genes required for chronic persistence of Brucella abortus in mice. *Infect Immun* **68**, 4102-7 (2000).

Huang, L. Y., *et al.* Heat-killed Brucella abortus induces TNF and IL-12p40 by distinct MyD88-dependent pathways: TNF, unlike IL-12p40 secretion, is Toll-like receptor 2 dependent. *J Immunol* **171**, 1441-6 (2003).

Huang, L. Y., Ishii, K. J., Akira, S., Aliberti, J. & Golding, B. Th1-like cytokine induction by heat-killed Brucella abortus is dependent on triggering of TLR9. *J Immunol* **175**, 3964-70 (2005).

Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* **5**, 987-95 (2004).

Jahans, K. L., Foster, G. & Broughton, E. S. The characterisation of Brucella strains isolated from marine mammals. *Vet Microbiol* **57**, 373-82 (1997).

Janeway, C. A., Jr. How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect* **3**, 1167-71 (2001).

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. Immunobiology. The Immune System in Health and Disease. *De Boeck Université*, (2003).

Jankovic, D., *et al.* Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J Exp Med* **204**, 273-83 (2007).

Jiang, H. & Chess, L. Regulation of immune responses by T cells. *N Engl J Med* **354**, 1166-76 (2006).

Jiang, X., Leonard, B., Benson, R. & Baldwin, C. L. Macrophage control of Brucella abortus: role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide. *Cell Immunol* **151**, 309-19 (1993).

Jubier-Maurin, V., *et al.* Major outer membrane protein Omp25 of Brucella suis is involved in inhibition of tumor necrosis factor alpha production during infection of human macrophages. *Infect Immun* **69**, 4823-30 (2001).

Kagan, J. C. & Roy, C. R. Legionella phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites. *Nat Cell Biol* **4**, 945-54 (2002).

Kahl-McDonagh, M. M. & Ficht, T. A. Evaluation of protection afforded by Brucella abortus and Brucella melitensis unmarked deletion mutants exhibiting different rates of clearance in BALB/c mice. *Infect Immun* **74**, 4048-57 (2006).

Karabay, O., Sencan, I., Kayas, D. & Sahin, I. Ofloxacin plus rifampicin versus doxycycline plus rifampicin in the treatment of brucellosis: a randomized clinical trial [ISRCTN11871179]. *BMC Infect Dis* **4**, 18 (2004).

Kemper, C. & Atkinson, J. P. T-cell regulation: with complements from innate immunity. *Nat Rev Immunol* **7**, 9-18 (2007).

Kim, S., *et al.* Lipid raft microdomains mediate class A scavenger receptor-dependent infection of Brucella abortus. *Microb Pathog* **37**, 11-9 (2004).

Ko, J., Gendron-Fitzpatrick, A. & Splitter, G. A. Susceptibility of IFN regulatory factor-1 and IFN consensus sequence binding protein-deficient mice to brucellosis. *J Immunol* **168**, 2433-40 (2002).

Ko, J. & Splitter, G. A. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin Microbiol Rev* **16**, 65-78 (2003).

Kohler, S., Michaux-Charachon, S., Porte, F., Ramuz, M. & Liautard, J. P. What is the nature of the replicative niche of a stealthy bug named Brucella? *Trends Microbiol* **11**, 215-9 (2003).

Kreutzer, D. L., Dreyfus, L. A. & Robertson, D. C. Interaction of polymorphonuclear leukocytes with smooth and rough strains of Brucella abortus. *Infect Immun* **23**, 737-42 (1979).

Lapaque, N., Moriyon, I., Moreno, E. & Gorvel, J. P. Brucella lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr Opin Microbiol* **8**, 60-6 (2005).

Lapaque, N., *et al.* Differential inductions of TNF-alpha and IGTP, IIGP by structurally diverse classic and non-classic lipopolysaccharides. *Cell Microbiol* **8**, 401-13 (2006).

Lestrate, P., *et al.* Identification and characterization of in vivo attenuated mutants of Brucella melitensis. *Mol Microbiol* **38**, 543-51 (2000).

Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A. K. & Flavell, R. A. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* **24**, 99-146 (2006).

Lippincott, Williams & Wilkins. Porth's Pathophysiology: concepts of altered health states., (2005).

Mackaness, G. B. Cellular resistance to infection. *J Exp Med* **116**, 381-406 (1962).

Mackaness, G. B. The Immunological Basis Of Acquired Cellular Resistance. *J Exp Med* **120**, 105-20 (1964).

Mackaness, G. B. The relationship of delayed hypersensitivity to acquired cellular resistance. *Br Med Bull* **23**, 52-4 (1967).

Mangan, P. R., *et al.* Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* **441**, 231-4 (2006).

Martinez de Tejada, G., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E. & Moriyon, I. The outer membranes of Brucella spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infect Immun* **63**, 3054-61 (1995).

McHeyzer-Williams, L. J., Malherbe, L. P. & McHeyzer-Williams, M. G. Checkpoints in memory B-cell evolution. *Immunol Rev* **211**, 255-68 (2006).

McHeyzer-Williams, L. J. & McHeyzer-Williams, M. G. Antigen-specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol* **23**, 487-513 (2005).

McNeill, A., Spittle, E. & Backstrom, B. T. Partial depletion of CD69low-expressing natural regulatory T cells with the anti-CD25 monoclonal antibody PC61. *Scand J Immunol* **65**, 63-9 (2007).

Medzhitov, R. & Janeway, C. A., Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* **9**, 4-9 (1997).

Medzhitov, R. & Janeway, C. A., Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* **296**, 298-300 (2002).

Mills, K. H. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* **4**, 841-55 (2004).

Miyara, M. & Sakaguchi, S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med* **13**, 108-16 (2007).

Montaraz, J. A. & Winter, A. J. Comparison of living and nonliving vaccines for Brucella abortus in BALB/c mice. *Infect Immun* **53**, 245-51 (1986).

Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. & O'Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* **19**, 683-765 (2001).

Moreno, E. & Moriyon, I. The Genus *Brucella*. *The Prokaryotes*, Springer-Verlag, New York, **5**, 315-456 (2006).

Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & Coffman, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* **136**, 2348-57 (1986).

Muraille, E., *et al.* Cytosolic expression of SecA2 is a prerequisite for long-term protective immunity. *Cell Microbiol* **9**, 1445-54 (2007).

Murphy, C. A., *et al.* Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* **198**, 1951-7 (2003).

Murphy, E. A., Sathiyaseelan, J., Parent, M. A., Zou, B. & Baldwin, C. L. Interferon-gamma is crucial for surviving a Brucella abortus infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice. *Immunology* **103**, 511-8 (2001).

Naroeni, A. & Porte, F. Role of cholesterol and the ganglioside GM(1) in entry and short-term survival of Brucella suis in murine macrophages. *Infect Immun* **70**, 1640-4 (2002).

Okada, T. & Cyster, J. G. B cell migration and interactions in the early phase of antibody responses. *Curr Opin Immunol* **18**, 278-85 (2006).

Ottones, F., Dornand, J., Naroeni, A., Liautard, J. P. & Favero, J. V gamma 9V delta 2 T cells impair intracellular multiplication of Brucella suis in autologous monocytes through soluble factor release and contact-dependent cytotoxic effect. *J Immunol* **165**, 7133-9 (2000).

Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L. & Tsianos, E. V. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis* **6**, 91-9 (2006).

Parker, L. C., Prince, L. R. & Sabroe, I. Translational mini-review series on Toll-like receptors: networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity. *Clin Exp Immunol* **147**, 199-207 (2007).

Pillarisetty, V. G., Katz, S. C., Bleier, J. I., Shah, A. B. & Dematteo, R. P. Natural killer dendritic cells have both antigen presenting and lytic function and in response to CpG produce IFN-gamma via autocrine IL-12. *J Immunol* **174**, 2612-8 (2005).

Porte, F., Naroeni, A., Ouahrani-Bettache, S. & Liautard, J. P. Role of the Brucella suis lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infect Immun* **71**, 1481-90 (2003).

Prussin, C. & Metcalfe, D. D. 5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* **117**, S450-6 (2006).

Quinn, K. M., *et al.* Inactivation of CD4+ CD25+ regulatory T cells during early mycobacterial infection increases cytokine production but does not affect pathogen load. *Immunol Cell Biol* **84**, 467-74 (2006).

Radtke, A. L. & O'Riordan, M. X. Intracellular innate resistance to bacterial pathogens. *Cell Microbiol* **8**, 1720-9 (2006).

Rasool, O., Freer, E., Moreno, E. & Jarstrand, C. Effect of Brucella abortus lipopolysaccharide on oxidative metabolism and lysozyme release by human neutrophils. *Infect Immun* **60**, 1699-702 (1992).

Reiner, S. L. Development in motion: helper T cells at work. *Cell* **129**, 33-6 (2007).

Roop, R. M., 2nd, Bellaire, B. H., Valderas, M. W. & Cardelli, J. A. Adaptation of the Brucellae to their intracellular niche. *Mol Microbiol* **52**, 621-30 (2004).

Roy, C. R. Exploitation of the endoplasmic reticulum by bacterial pathogens. *Trends Microbiol* **10**, 418-24 (2002).

Saalmuller, A. New understanding of immunological mechanisms. *Vet Microbiol* **117**, 32-8 (2006).

Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708-12 (1999).

Sathiyaseelan, J., *et al.* Treatment of Brucella-susceptible mice with IL-12 increases primary and secondary immunity. *Cell Immunol* **243**, 1-9 (2006).

Schurig, G. G., *et al.* Biological properties of RB51; a stable rough strain of Brucella abortus. *Vet Microbiol* **28**, 171-88 (1991).

Schurig, G. G., Sriranganathan, N. & Corbel, M. J. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol* **90**, 479-96 (2002).

Serbina, N. V., *et al.* Sequential MyD88-independent and -dependent activation of innate immune responses to intracellular bacterial infection. *Immunity* **19**, 891-901 (2003a).

Serbina, N. V., Salazar-Mather, T. P., Biron, C. A., Kuziel, W. A. & Pamer, E. G. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* **19**, 59-70 (2003b).

Sing, A., Roggenkamp, A., Geiger, A. M. & Heesemann, J. Yersinia enterocolitica evasion of the host innate immune response by V antigen-induced IL-10 production of macrophages is abrogated in IL-10-deficient mice. *J Immunol* **168**, 1315-21 (2002).

Sola-Landa, A., *et al.* A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in Brucella abortus and controls cell invasion and virulence. *Mol Microbiol* **29**, 125-38 (1998).

Solera, J., Martinez-Alfaro, E. & Espinosa, A. Recognition and optimum treatment of brucellosis. *Drugs* **53**, 245-56 (1997).

Solera, J., *et al.* Doxycycline-rifampin versus doxycycline-streptomycin in treatment of human brucellosis due to Brucella melitensis. The GECMEI Group. Grupo de Estudio de Castilla-la Mancha de Enfermedades Infecciosas. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 2061-7 (1995).

Stephens, G. L., *et al.* Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4+CD25+ T cells. *J Immunol* **173**, 5008-20 (2004).

Stevens, M. G., Pugh, G. W., Jr. & Tabatabai, L. B. Effects of gamma interferon and indomethacin in preventing Brucella abortus infections in mice. *Infect Immun* **60**, 4407-9 (1992).

Sutmuller, R. P., Morgan, M. E., Netea, M. G., Grauer, O. & Adema, G. J. Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. *Trends Immunol* **27**, 387-93 (2006).

Svanborg, C., Godaly, G. & Hedlund, M. Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Curr Opin Microbiol* **2**, 99-105 (1999).

Takahashi, K., Ip, W. E., Michelow, I. C. & Ezekowitz, R. A. The mannose-binding lectin: a prototypic pattern recognition molecule. *Curr Opin Immunol* **18**, 16-23 (2006).

Takeda, K. & Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **17**, 1-14 (2005).

Tam, M. A. & Wick, M. J. Dendritic cells and immunity to Listeria: TipDCs are a new recruit. *Trends Immunol* **25**, 335-9 (2004).

Taylor, M. D., *et al.* Removal of regulatory T cell activity reverses hyporesponsiveness and leads to filarial parasite clearance in vivo. *J Immunol* **174**, 4924-33 (2005).

Tomlinson, S. Complement defense mechanisms. *Curr Opin Immunol* **5**, 83-9 (1993).

Tone, M., *et al.* Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is costimulatory for T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15059-64 (2003).

Trinchieri, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J Exp Med* **204**, 239-43 (2007).

Watarai, M., *et al.* Cellular prion protein promotes Brucella infection into macrophages. *J Exp Med* **198**, 5-17 (2003).

Weaver, C. T., Harrington, L. E., Mangan, P. R., Gavrieli, M. & Murphy, K. M. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* **24**, 677-88 (2006).

Zhan, Y. & Cheers, C. Endogenous gamma interferon mediates resistance to Brucella abortus infection. *Infect Immun* **61**, 4899-901 (1993a).

Zhan, Y. & Cheers, C. Control of IL-12 and IFN-gamma production in response to live or dead bacteria by TNF and other factors. *J Immunol* **161**, 1447-53 (1998).

Zhan, Y., Kelso, A. & Cheers, C. Cytokine production in the murine response to brucella infection or immunization with antigenic extracts. *Immunology* **80**, 458-64 (1993b).