

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Brucellose bovine : suivi comparatif de la réponse humorale post-vaccinale et post-infectieuse

Mattot, Marie-Noëlle

*Award date:*  
1993

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

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

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

#### Take down policy

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

## **Brucellose bovine : suivi comparatif de la réponse humorale post-vaccinale et post-infectieuse**

Mattot Marie-Noëlle

### Résumé

La brucellose est un fléau pour le cheptel bovin et pour l'économie agricole. Chez les bovins, la maladie est due essentiellement à *Brucella abortus*. La manifestation clinique la plus fréquente est l'avortement.

Actuellement, dans les régions où la prévalence de la maladie est supérieure à 2%, la vaccination avec la souche B19 est recommandée. Cependant elle entraîne la formation d'anticorps anti-lipopolysaccharides dans le sérum ce qui constitue le désavantage majeur de ce vaccin puisque ces anticorps interfèrent lors du dépistage des animaux infectés.

L'activité protectrice de la fraction SDS-I (vaccin sous-unitaire composé d'un nombre réduit d'antigènes) par rapport au vaccin B19 a été testée chez des génisses gestantes.

Pour l'étude de la réponse sérologique spécifique de protéines, nous avons pu mettre en évidence l'existence :

- d'une protéine de 15,7 kDa reconnue par 2 anticorps monoclonaux dont nous disposons. Les ELISA de compétition avec ces anticorps monoclonaux indiquent que cette protéine est un antigène de diagnostic qui permet de révéler l'infection avant l'avortement.
- la présence par immuno-empreintes de protéines de 59,5 - 16,9 et 14,7 kDa qui pourraient être de bons candidats pour le développement de nouveaux tests diagnostiques
- la présence d'Ac dirigés contre une protéine de 16,5 kDa qui pourrait être un bon marqueur de l'infection chronique.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques (Zoologiques)

Août 1993

Promoteur : J.J. Letesson

Que toutes les personnes qui m'ont aidée de près ou de loin dans la réalisation de ce mémoire soient ici remerciées et tout particulièrement :

- Le Docteur J.J. Letesson, Professeur et Chef du département de microbiologie aux FUNDP de Namur pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour m'avoir donné la possibilité de réaliser ce travail.
- Le Docteur J. Limet, pour le suivi scientifique de ce travail tout au long de l'année et pour sa disponibilité sans réserve.
- Toute l'équipe de microbiologie et en particulier Anne Tibor et Vincent Weynants pour leurs conseils amicaux et pour la bonne ambiance qu'ils font régner dans le laboratoire.

## TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION</b>	7
1. Historique	8
2. Manifestations cliniques de la brucellose bovine et modes de contamination	8
3. Impact de la brucellose bovine au point de vue économique	9
3.1. Position du problème	9
3.2. Lutte contre la brucellose	9
4. La bactérie Brucella	9
4.1. Identité bactériologique	9
4.2. Structure de la paroi	9
4.2.1. Membrane plasmique	10
4.2.2. Espace périplasmique	10
4.2.3. Le peptidoglycane	10
4.2.4. Membrane externe	10
4.2.4.1. LPS	10
a. Le lipide A	11
b. Le core	11
c. La chaîne polysaccharidique	11
4.2.4.2. Les protéines	11
5. Immunité en Brucellose	12
5.1. Immunité cellulaire	13
5.2. Immunité humorale	13
5.3. Conclusions	14
6. Diagnostic	14
7. Vaccination	15
7.1. Généralités	15
7.2. Efficacité	15
7.3. Inconvénients pour le diagnostic	15
8. Plan de lutte contre la brucellose	16
8.1. Conditions d'utilisation du vaccin B19 et antigènes de Brucella	16
8.1.1. Vaccination à dose réduite et par voie conjonctivale	16
8.1.2. Antigènes de Brucella	17
a. LPS	17
b. Les protéines	17
c. Antigènes proposés pour le diagnostic en vue de faire la distinction entre animaux infectés/vaccinés	17
8.2. Vaccin sous-unitaire	18
<b>BUT DU TRAVAIL</b>	19
<b>MATERIEL ET METHODES</b>	22
1. Protocole de l'expérience	23
2. Méthodes usuelles de diagnostic	24
2.1. Diagnostic bactériologique	24

2.2. Diagnostic sérologique	24
2.2.1. Rose Bengale	24
2.2.2. Séro-agglutination lente en tube (S.A.T.)	24
2.2.3. Réaction de déviation du complément	24
2.2.4. Test de Coombs	25
2.2.5. ELISA	25
2.3. Hypersensibilité retardée	25
3. Souches bactériennes utilisées	25
3.1. Brucella abortus 45/20	25
3.2. Brucella melitensis B115	25
4. Protéines recombinantes	26
5. Anticorps monoclonaux spécifiques des protéines de la fraction pariétale	27
6. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (EGPA-SDS)	29
7. Technique d'immunoempreinte (IE) après EGPA-SDS	30
8. ELISA indirect sur protéine recombinante	32
9. ELISA de compétition	33
10. Solutions et tampons	34

## RESULTATS

<b>RESULTATS</b>	<b>37</b>
I. Réponse dirigée contre le LPS et données bactériologiques	38
I.1. Protocole de l'expérience	38
I.2. Résultats de l'étude	38
II. Réponse humorale dirigée contre les protéines	40
II.1. Réactivité des protéines recombinantes	41
II.2. ELISA indirect et ELISA de compétition	44
II.2.1. Mise au point	44
II.2.1.1. ELISA indirect	44
II.2.1.2. ELISA de compétition	45
II.2.2. Résultats	47
II.2.2.1. Réponse sérologique spécifique des PME majeures	47
-PME 25 et 36	47
II.2.2.2. Réponse sérologique spécifique des PME mineures	47
- PME 19	48
- PME 16,5	48
Réponse sérologique spécifique de la PME 16,5 par ELISA indirect	48
- PME 16,5 et 15,7	49
Etude comparative de la réponse sérologique spécifique de ces	
2 PME grâce à l'ELISA de compétition	49
II.2.2.3. Cinétique d'apparition des Ac spécifiques du LPS et des PME de	
16,5 et 15,7 kDa	50
II.3. Analyse de la réponse immunitaire humorale par immunoempreintes	52
II.3.1. Introduction	52
II.3.2. Résultats	53
II.3.2.1. Cinétique d'apparition des anticorps chez les bêtes témoins,	
vaccinées B 19 et vaccinées avec la fraction SDS-I	53
II.3.2.2. Répartition de la réponse en IgG1 et IgG2	53
II.3.2.3. Etude comparative de la réponse humorale 135 jours après	
l'infection	53
II.3.2.4. Corrélation entre l'ELISA et l'IE	55
II.3.2.5. Cinétique d'apparition des anticorps	56
II.3.2.6. Réactivité des sérums sur la PME recombinante de 16,5 kDa en IE	57

<b>DISCUSSION</b>	58
1. Réponse sérologique spécifique du LPS	59
2. Suivi de la réponse cellulaire par les tests cutanés utilisant le brucellergène	59
3. Réponse sérologique spécifique des antigènes protéiques contenus dans la fraction SDS-I	60
4. Antigènes susceptibles d'être utilisés pour le diagnostic	61
4.1. PME 19	61
4.2. PME 16,5 et PME 15,7	61
4.2.1. Réponse sérologique spécifique des PME 16,5 et 15,7 kDa	63
4.2.1.1. PME 16,5	63
4.2.1.2. PME 15,7	63
4.3. Protéines identifiées par IE	64
5. Comparaison entre la réaction sérologique après infection chez les génisses protégées et non protégées de l'avortement	64
6. Corrélation entre la production d'Ac et les résultats bactériologiques	64
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	66
1. Relation entre la production d'Ac et la protection conférée par la vaccination	67
2. Antigènes candidats pour le développement de nouveaux tests diagnostiques	68
3. Ac qui signeraient l'infection de type chronique	68
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	69

Réponse dirigée contre le LPS et données bactériologiques

N° bovin	Avortement= A Mise-bas d'un veau indemne V Mise-bas d'un veau infecté V*	Délai entre l'infection et l'avortement ou le vêlage	DC après vaccination titre max.	Nombre de prélèvements contaminés/nom bre total	DC à l'abattage
<i>Groupe témoin</i>					
85	A	41	-	0/10	30
33	A	43	-	8/10	>400
92	A	54	-	0/11	nég
79	A	61	-	1/8	50
<i>Groupe B19</i>					
60	A	45	50	6/10	> 400
81	A	85	100	0/10	> 400
67	A	86	120	1/11	> 400
41	A	89	120	4/9	> 400
93	V*	109	60	0/10	> 60
91	V*	119	120	2/10	> 400
49	V	121	60	1/11	> 400
45	V	124	400	0/10	15
3463	V	126	50	0/11	30
62	V	126	120	0/11	Nég
<i>SDS-I</i>					
42	A	62	100	7/11	> 400
89	A	76	400	2/11	> 400
69	A	79	200	4/11	> 400
94	A	81	200	1/10	> 400
35	A	81	100	1/10	> 400
74	A	82	25	7/11	> 400
68	A	88	25	3/11	> 400
64	A	88	100	3/11	> 400
56	A	90	400	1/11	/
88	A	93	400	4/10	> 400
58	A	98	50	8/11	> 400
84	A	114	50	1/11	> 400

## ABREVIATIONS

AcM	anticorps monoclonal
APS	peroxydisulfate d'ammonium
BCIP	bromochloroindoyl phosphate
CEB	Centre d'Etude de la Brucellose
DC	test de déviation du complément
DO	densité optique
DTT	dithiothréitol
EGPA-SDS	électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécylsulfate
ELISA	enzyme-linked immunosorbent Assay
HC	hydrolysat de caséine
IDR	intradermo-réaction
IE	immunoempreinte
Ig	immunoglobine
kDa	kilodalton
LPS-R	lipopolysaccharide de souche rugueuse R
LPS-S	lipopolysaccharide de souche lisse S
NBT	nitro blue tetrazolium
PME	protéine de la membrane externe
PG	peptidoglycane
RB	test au Rose Bengale
RT	Ring Test
SAM-PO	anticorps de mouton anti-souris couplé à la peroxydase
SAT	test de séro-agglutination lente en tube
SDS	dodécylsulfate de sodium
SDS-I	fraction de protéines insolubles dans le SDS
TEMED	NNN'N' tetraméthylène-diamine
WB	Western Blotting

---

# INTRODUCTION

---

La brucellose est une maladie infectieuse d'origine bactérienne, contagieuse, commune à l'homme et aux animaux domestiques.

## 1. HISTORIQUE

---

Les premiers cas de brucellose ont été décrits dans l'île de Malte, les îles avoisinantes et le bassin méditerranéen, sous le nom de fièvre de Malte. Depuis, des cas ont été rapportés dans le monde entier et la maladie est connue également sous le nom de fièvre ondulante, fièvre méditerranéenne ou fièvre de Bang. En 1887, Bruce a isolé de la rate d'un soldat décédé, le micro-organisme responsable de la fièvre de Malte et l'a nommé *Micrococcus melitensis* (Bruce, 1887).

Dix ans plus tard, Bang a isolé un micro-organisme, *Bacillus abortus*, qui est responsable de l'avortement contagieux chez les bovins (Bang, 1897).

En 1905, Horrocks a décelé la présence de *Micrococcus melitensis* dans du lait de chèvre et a ainsi établi la relation entre la contamination et la consommation de lait cru de chèvre.

Alors que jusque-là, les 2 pathologies avaient été étudiées tout à fait indépendamment, Evans a démontré en 1919, des similitudes morphologiques, sérologiques et bactériologiques des 2 micro-organismes.

Les micro-organismes décrits par Bruce et Bang sont maintenant inclus dans le genre *Brucella* et désignent respectivement *Brucella melitensis* et *Brucella abortus*. Une troisième espèce, *Brucella suis*, a été découverte par Traum en 1914. Actuellement, six espèces sont reconnues : *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* et *B. canis*.

Chez les bovins, l'espèce la plus pathogène est *B. abortus*. Les caprins et les ovins sont surtout sensibles à *B. melitensis*. Les béliers peuvent toutefois être infectés par *B. ovis*. L'homme serait sensible à *B. melitensis*, *B. ovis* et *B. abortus*. *B. melitensis* entraînerait une infection aiguë tandis que l'infection par *B. abortus* serait de type chronique.

## 2. MANIFESTATIONS CLINIQUES DE LA BRUCELLOSE BOVINE ET MODES DE CONTAMINATION

---

L'infection chez les bovins est le plus souvent inapparente. Lorsqu'elle s'exprime cliniquement, elle se traduit par des avortements ou des naissances avant terme accompagnées de l'excrétion de milliards de *Brucella*. L'excrétion de bactéries se fait également par le lait.

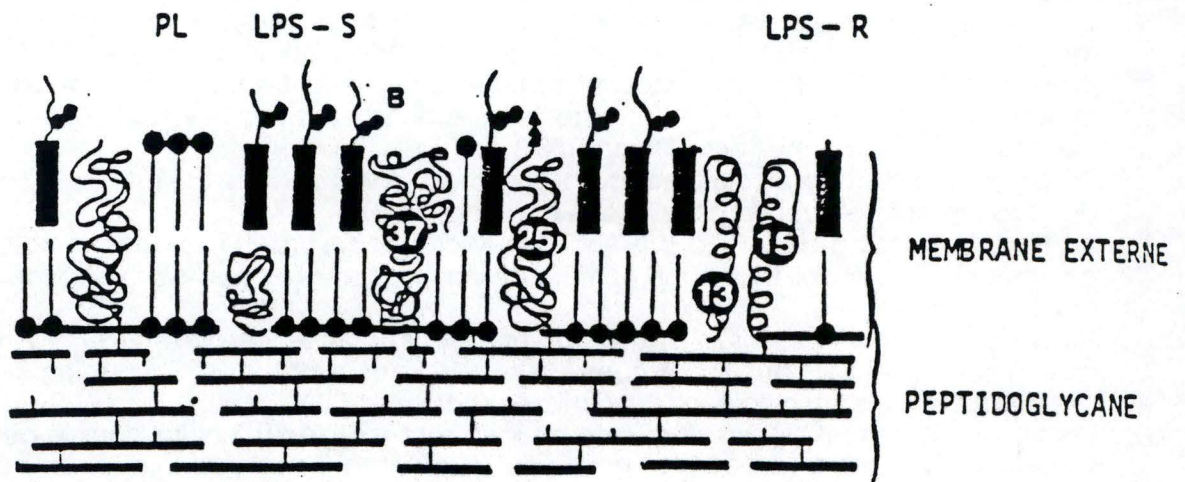
Cette excrétion de *Brucella* est la cause de la transmission horizontale de la maladie.

Les portes d'entrée des bactéries sont le plus souvent les muqueuses du pharynx, les voies respiratoires supérieures et la conjonctive.

Les veaux viables, nés de mères infectées, sont porteurs d'une infection congénitale dans des proportions difficilement estimables ( $\pm 10\%$ ) : c'est la transmission verticale de la vache au veau (Plommet et al., 1973).

Chez le taureau, la localisation des *Brucella* est fréquente dans les testicules, l'épididyme et les organes génitaux annexes.

L'excrétion peut se faire dans le sperme sans que cela ne soit un mode majeur de transmission (Berman et Jones, 1980).



LPS - S : lipopolysaccharide de spécificité S

LPS - R : lipopolysaccharide de spécificité R

B : polysaccharide B

polysaccharide lié à II (25 K)

protéines

PL : phospholipides



Figure 1 Représentation schématique de l'organisation de la paroi des bactéries à gram négatif

### **3. IMPACT DE LA BRUCELLOSE BOVINE AU POINT DE VUE ÉCONOMIQUE**

---

#### **3.1. Position du problème**

Même si en général la prévalence a diminué ces dernières années, la brucellose continue de peser lourdement dans l'économie de nombreux pays.

Elle affecte directement la rentabilité de l'exploitation touchée et constitue un danger de dissémination pour les exploitations environnantes.

De plus, dans le cadre du grand marché européen, elle risque d'affecter tout le secteur de l'exportation des bovins et de leurs produits car les pays indemnes risquent de fermer leurs frontières aux exportations en provenance des régions où la maladie n'est pas complètement maîtrisée.

#### **3.2. Lutte contre la brucellose**

La lutte contre la brucellose bovine consiste à dépister les animaux infectés à l'aide d'épreuves diagnostiques appropriées, puis à les abattre. Cependant, dans le cas où la prévalence est supérieure à 2%, une campagne préliminaire de vaccination d'une durée de 4-5 ans est recommandée dans le but de limiter le développement de foyers et de diminuer la prévalence. Après la fin de cette campagne, il faut attendre que les taux d'Ac sériques induits par la vaccination aient diminué avant de poursuivre l'éradication de la maladie par abattage. Ce moyen de lutte présente toutefois des inconvénients. En effet, les épreuves de diagnostic ne dépistent pas tous les animaux infectés, entre autres, les animaux infectés en période de latence et les animaux dont l'infection est chronique.

### **4. LA BACTÉRIE BRUCELLA**

---

#### **4.1. Identité bactériologique**

La bactérie appartient au genre *Brucella*. Elle apparaît souvent sous la forme de petits coccobacilles immobiles de 0,5 µm à 1 µm de large, gram négatifs, aérobies stricts, à cultures délicates, parasites intracellulaires facultatifs des macrophages (Alton et al., 1977; Roitt et al., 1985).

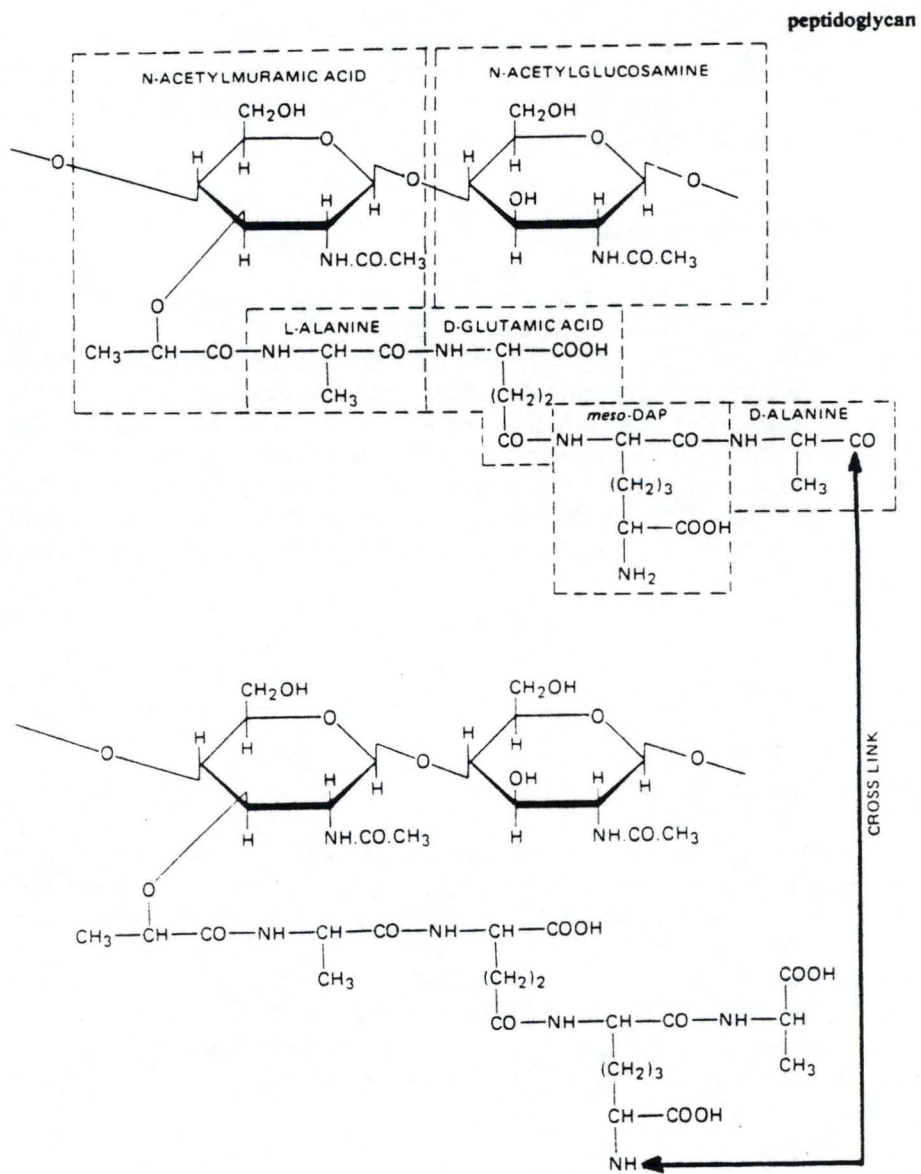
Les caractéristiques biochimiques, antigéniques et métaboliques ont permis de distinguer plusieurs espèces et types de *Brucella* (Breed et al., 1975).

Les colonies se présentent sous 2 aspects après coloration au cristal violet : colonies lisses bleutées (colonies dites S) ou rugueuses jaunes (colonies dites R) (Alton et al., 1977).

#### **4.2. Structure de la paroi**

La paroi des *Brucella* comme celle des autres bactéries à gram négatif est constituée d'une membrane externe, d'une couche dense ou peptidoglycane, d'un espace périplasmique et d'une membrane cytoplasmique (**Figure 1**). (Dubray, 1979).

La membrane externe et la couche dense sont toujours étroitement associées chez les *Brucella*, contrairement aux entérobactéries comme *E. coli*, ce qui lui confère un aspect dissymétrique (Dubray, 1972).



**Figure 2.** Structure du peptidoglycane des parois bactériennes

#### 4.2.1. Membrane plasmique

Sa structure consiste en deux couches de phospholipides, au sein desquelles diverses protéines sont incluses, douées principalement de fonctions enzymatiques.

#### 4.2.2. Espace périplasmique

Contrairement aux bactéries à gram positif, les bactéries à gram négatif montrent un espace entre la membrane interne et les enveloppes externes. La taille de cet espace périplasmique pourra varier en fonction de l'osmolarité du milieu extérieur. Les limites en sont généralement définies par les protéines périphériques de la face interne de la membrane externe et la face externe de la membrane plasmique.

#### 4.2.3. Le peptidoglycane (PG)

Il est responsable de la rigidité de la paroi et détermine la forme de la bactérie. Le peptidoglycane des bactéries gram -, dont *E. coli* est le modèle (**Figure 2**), est un polymère formé de chaînes linéaires dont l'unité élémentaire glycanique est le N-acétyl-glucosamine- $\beta$ 1,4-acide N-acétyl muramique. Sur le carboxyle (-COOH) de l'acide 4-N acétyl muramique de ces chaînes, vient se greffer un petit peptide constitué de 4 acides aminés : L-alanine, acide D-glutamique, acide diaminopimélique et D-alanine.

Les chaînes polymérisées sont finalement reliées entre elles par des ponts d'acides aminés entre le COOH du dernier résidu D-alanine des petits peptides d'une chaîne, et le groupement NH<sub>2</sub> du résidu d'acide diaminopimélique des petits peptides d'une autre chaîne.

Ce réseau peut être scindé par une enzyme, le lysozyme, que l'on trouve notamment dans les lysosomes des phagocytes. Cette enzyme hydrolyse les liaisons  $\beta$ -1,4, pont glycosidique unissant le C1 de l'acide N-acétyl-muramique avec le C4 de la N-acétyl-glucosamine du peptidoglycane de la paroi.

#### 4.2.4. Membrane externe

Elle est composée de phospholipides, de lipopolysaccharides (LPS) et de protéines. Les constituants antigéniques majeurs sont les lipopolysaccharides et les protéines.

##### 4.2.4.1. LPS

On distingue 2 types de structures du LPS chez *Brucella*.

Le premier type, le LPS-S, détermine des souches de type "smooth" (S) ou lisses et le deuxième type, le LPS-R, détermine des souches de type "rough"(R) ou rugueuses.

Le LPS est constitué de chaînes hétéropolysaccharidiques liées de manière covalente à un glycolipide (lipide A). Ce lipide est enfoui dans la couche hydrophobe, et la chaîne polysaccharidique est orientée vers l'extérieur de la paroi. Cette chaîne hétéropolysaccharidique comprend une portion initiale qui est largement similaire chez toutes les espèces bactériennes apparentées, c'est le core. Le reste de la chaîne, l'antigène O est spécifique de l'espèce (**Figure 3**).

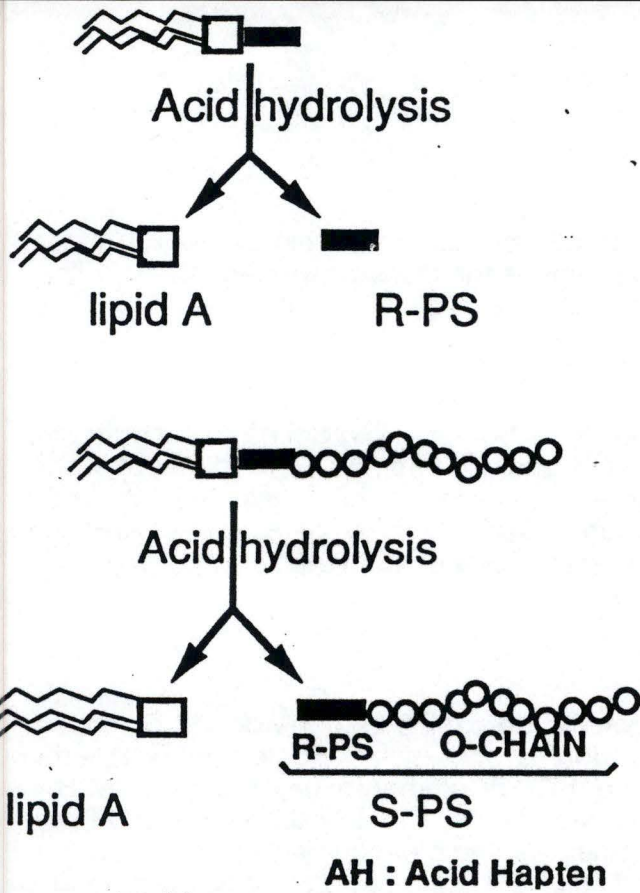


Figure 3. Structure des LPS - R et -S

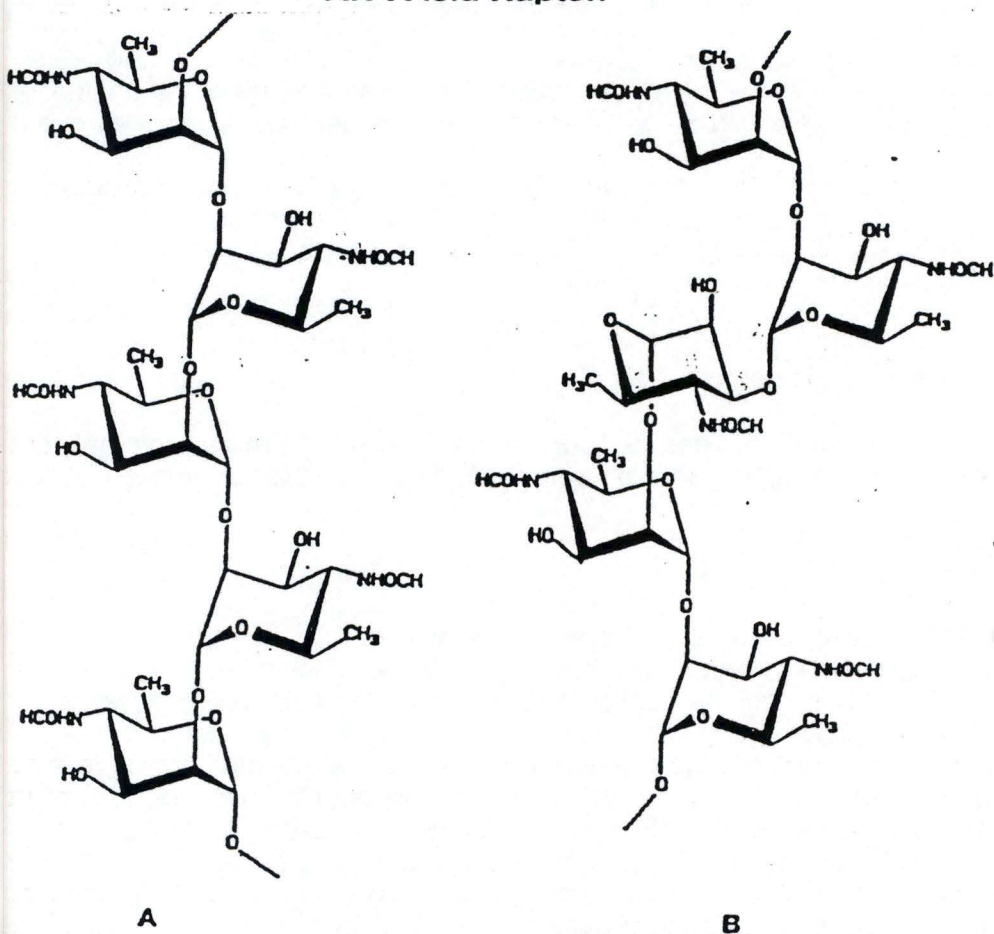


Figure 4. Structures chimiques des chaînes O de souches A>M (A) et M>A (B)

- A. homopolymère de 4,6-didéoxy-4-formamido- $\alpha$ -D-mannopyranosyles unis par des liaisons  $\alpha$ -1,2
- B. polymères linéaires d'unités répétitives composées de 4,6-didéoxy-4-formamido- $\alpha$ -D-mannopyranosyles dont 4 liaisons sont du type  $\alpha$ -1,2 et une liaison de type  $\alpha$ -1,3

#### a. Le lipide A

Ce glycolipide est enchâssé dans la membrane, et est doué de propriétés toxiques. Il diffère significativement de celui d'*E.coli* par la présence d'acides palmitiques et stéariques, alors que le lipide A d'*E.coli* contient surtout les acides lauriques, myristiques et  $\beta$  hydroxymyristiques (Dubray, 1984).

#### b. Le core

Le core est composé de D-glucose, de D-mannose et de 2-amino-2,6-didésoxy-D-glucose (Caroff et al., 1984). Il est relié au lipide A par le 2 céto-3 désoxyoctonate (KDO) (Wicken, 1985).

#### c. La chaîne polysaccharidique O

Elle porte les antigènes A et M. Les souches R ne possèdent pas cette chaîne O. Les antigènes A et M sont portés en quantité variable suivant les différents biovars : A>M pour la plupart des biovars de *B. abortus* et *B. suis* et M>A pour la plupart des biovars de *B. melitensis*. Ces spécificités ont pu être établies par agglutination avec des sérums mono-spécifiques anti-A ou anti-M. (Wilson et Miles, 1932).

La distinction entre les souches A>M et celles M>A peut également être faite par la technique d'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécylsulfate (EGPA-SDS). Le profil en EGPA-SDS du LPS coloré au nitrate d'argent montre des bandes régulièrement espacées. Des différences entre le pattern des espacements permettent de distinguer les souches A>M des souches M>A (Garin-Bastuji et al., 1990). L'épitope A est appelé Ag majeur pour les souches A>M et Ag mineur pour les souches A<M.

Des anticorps monoclonaux (AcM) dirigés contre des épitopes du LPS-S communs aux souches A et M dominantes de *Brucella* ont été décrits (Limet et coll., 1987-1989). Le LPS-S de *Brucella* porterait donc en plus des épitopes A et M, un ou plusieurs épitopes communs ou présents en quantité équivalente sur les souches A et M dominantes.

La chaîne O de *Brucella* est un homopolymère de résidus 4,6-didésoxy-4 formamido- $\alpha$ -D-manopyranosyl. Dans les souches A>M, ces résidus sont liés par des liens  $\alpha$  1,2 (avec un maximum de 2% de liens  $\alpha$  1,3) et chez les souches M>A, nous retrouvons une structure pentasaccharidique répétitive avec 4 liaisons  $\alpha$  1,2 et une liaison  $\alpha$  1,3 (Caroff, 1984) (**Figure 4**).

#### 4.2.4.2. Les protéines

Les protéines de la membrane externe (PME) des *Brucella* ont été extraites et partiellement caractérisées. Les PME sont obtenues par extraction avec des détergents, après digestion de la paroi au lysozyme (Dubray et Bézard, 1980; Dubray et Charriaut, 1983; Verstrete et al., 1982).

Verstrete et al. (1982) ont utilisé un Zwittergent R et ont purifié les protéines par chromatographie d'échange d'ions et filtration en gel. Ils ont extrait, des souches de *Brucella* en phase S, des PME qu'ils ont réparties en trois groupes en fonction de leur masse moléculaire (MM) : 89-94 kDa (groupe 1), 36-43 kDa (groupe 2) et 25-31 kDa (groupe 3). Douglas et al. (1984) ont démontré que les protéines du groupe 2 avaient une fonction de porine. Les protéines du groupe 2 ressemblent aux porines d'*E.Coli* quant à leur composition en acides aminés.

P. de Wergifosse (Thèse de doctorat, 1992) a cloné le gène codant pour une PME de 36 kDa dans *E.coli* et l'a séquencé. La séquence en acides aminés déduite a permis de trouver quelques zones étroites de similarité entre cette PME du groupe 2 et les porines d'*E. coli*. Néanmoins le peu de similarité observé ne permet pas de classer cette protéine dans la famille des porines d'*E.coli*.

Dubray et Charriaut (1983) ont utilisé le SDS pour solubiliser les membranes et ont électroélué les protéines. Ils ont ainsi détectés 3 protéines majeures de masses moléculaires un peu différentes, à savoir de 43, 36-38 et 25-27 kDa, en plus des protéines mineures de 15, 31 et 88-94 kDa.

Une fraction de paroi de *Brucella* insoluble dans le SDS à 100 °, appelée fraction SDS-I a été produite par Dubray et Bézard. Elle contient les PME majeures de 25-27 kDa et 36-38 kDa (50 %), du PG (30 %) et des traces de LPS-S (<1%).

Cinq PME mineures (10, 16,5, 19, 31-34 et 89 kDa) ainsi que les PME majeures de 25 et 36 kDa ont été individualisées par A. Cloeckert et al. (1990) au moyen d'AcM. Ils ont montré que chez *B. melitensis* contrairement à *B. abortus*, la PME 36 est mineure et la PME de 31-34 kDa est majeure.

Les AcM dirigés contre les PME majeures de 25, 36 et 31-34 kDa révèlent des bandes multiples en immunoempreinte (IE) dans des extraits de *Brucella* traités au lysosyme. Ils ont démontré une association des 3 PME majeures de *Brucella* avec le peptidoglycane et confirment les résultats de Sowa et al. (1991) qui ont récemment décrits chez *B. abortus* une association des PME majeures du groupe 2 (36-38 kDa) et groupe 3 (25-27 kDa) au PG.

Quant aux PME mineures, elles ne semblent pas être associées au PG puisque le traitement au lysozyme ne modifie pas leur mobilité électrophorétique et, contrairement aux PME 25 et 36, l'AcM anti-PG ne révèle pas ces PME mineures.

## 5. IMMUNITÉ EN BRUCELLOSE

---

Le mécanisme de dissémination des *Brucella* dans l'organisme suit la séquence suivante (Spink, 1956).

- survie sur le site primaire de "contamination"
- entrée dans les phagocytes et prolifération
- envahissement du courant sanguin
- dissémination dans les organes, principalement la rate, le foie, les os, la moëlle, les ganglions lymphatiques, les reins et l'utérus.

Chez la souris, l'inoculation par voie veineuse de *Brucella* virulentes provoque une colonisation très rapide du foie et de la rate, ces 2 organes retenant la plupart de l'inoculum (Plommet et Plommet, 1983). Les *Brucella* se multiplient alors très rapidement dans une première phase jusqu'à ce que l'activation du système immunitaire par l'infection entraîne, dans une 2<sup>ème</sup> phase, la régression de l'infection dans ces deux organes (MackAness, 1964). L'inversion de la courbe exprimant cette évolution a lieu selon les lignées de souris de 7 à 21 jours après l'inoculation et ne dépend pas de la dose de l'inoculum (Plommet et Plommet, 1983). La régression de la 2<sup>ème</sup> phase est ensuite interrompue ou très ralentie, avec évolution lente soit vers la chronicité, soit vers la guérison (Bossery et al., 1982).

La vaccination des souris par vaccin vivant ou par certains vaccins tués modifie cette évolution par l'enclenchement immédiat des mécanismes de défense, ce qui limite la colonisation de la rate, réduit ou supprime totalement la multiplication bactérienne dans les organes et accélère la guérison (Plommet et Plommet, 1984).

Les mécanismes immunitaires mis en jeu ne sont pas encore parfaitement connus. Toutefois, il a été largement décrit que l'immunité à médiation cellulaire est un mécanisme de défense majeur en brucellose. (Mackaness 1964). Mais, M. Plommet (1983) a montré, chez la souris, que l'immunité humorale contribuait indubitablement aux mécanismes de défense contre *Brucella*.

### **5.1. Immunité cellulaire**

En 1964, Mackaness a suggéré que les macrophages activés jouaient un rôle dans l'immunité à médiation cellulaire. Pavlov et al. (1982), par transfert de cellules spléniques de souris CBA donneuses vaccinées avec la souche *B. abortus* B19, ont montré que la protection avait ainsi été transférée à des souris naïves.

Des expériences similaires de transfert chez des souris DBA/2 ou CBA vaccinées avec la fraction SDS-I, partie de la paroi insoluble dans le SDS bouillant, (Plommet et al., 1986) montrent que :

- a) l'immunité peut être transférée par :
  - des cellules spléniques non purifiées
  - des populations cellulaires enrichies en cellules T ou B
  - des cellules ganglionnaires
- b) l'immunité augmente après transfert pendant environ 15 jours
- c) le niveau de l'immunité transférée, exprimé par le nombre de *Brucella* retrouvées dans la rate 15 jours après l'épreuve, dépend du type de vaccin, de la souche d'épreuve, de la souche de souris
- d) les immunités transférées par sérum immun et cellules immunes ne sont additives que dans un laps de temps très court. Cela suggère, soit que les cellules effectrices ne peuvent être activées qu'à un niveau limité par les deux voies, soit que les facteurs transférés peuvent limiter l'induction de l'immunité vis-à-vis de l'infection expérimentale elle-même.

### **5.2. Immunité humorale**

En 1983, M Plommet (1983) a montré l'importance des sérums immuns dans la protection.

Celui-ci, avant inoculation d'une bactérie virulente aux souris, injecta, par voie intraveineuse, des sérums immuns induits par la fraction LPS-S isolée de *B. melitensis* 16M ou la fraction SDS-I isolée de *B. abortus* 544. Trois types d'effets sont observés :

1. La souche d'épreuve virulente inoculée par voie sous-cutanée plantaire est stoppée dans le ganglion lymphatique le plus proche. l'infection systémique est alors évitée et le faible niveau d'infection dans le ganglion (Pardon, 1977) est capable d'induire une bonne immunité vaccinale (Plommet et al., 1987).
2. Une grande partie de la souche d'épreuve inoculée par voie intra-veineuse peut être détournée de la rate au foie. Le foie étant plus efficace dans la destruction des *Brucella*, cet effet peut être bénéfique (Plommet, 1987).
3. Les capacités de destruction des *Brucella* par la rate et le foie sont fortement augmentées.

Alors que l'immun sérum anti-LPS n'est efficace que pour les 2 premiers effets, l'immun sérum anti-fraction SDS-I est efficace pour les 3 effets. Cela suggère que les anticorps dirigés contre les protéines de la fraction SDS-I de ces sérums immuns, jouent un rôle protecteur non négligeable. Dès lors, selon les auteurs, ce 3<sup>ème</sup> effet serait du aux Ac anti-protéines.

Plus récemment, des expériences de protection passive ont été réalisées au moyen d'AcM spécifiques du LPS.

Limet et al.(1987) ont démontré que 3 AcM (IgG1-IgG2a-IgG3) dirigés contre l'épitope A de *B. abortus* sont très efficaces dans la prévention de la colonisation initiale et dans la stimulation de l'élimination secondaire des bactéries.

Par la suite, le même type d'expériences a été réalisé au moyen d'AcM dirigés contre l'épitope M chez des souris infectées par des souches où l'épitope M est majeur. Les mêmes résultats ont été observés.

En 1992, Cloeckert et al. montrent que des AcM spécifiques d'un épitope commun aux souches A et M dominantes assurent une protection aussi efficace que les AcM contre le LPS-A et le LPS-M.

Ceux-ci ont également étudié la protection conférée par des AcM spécifiques du LPS-R chez la souris. Sur les 4 AcMs testés, 1 seul confère une protection mais celle-ci est beaucoup plus faible que celle obtenue avec le LPS-A ou LPS-M.

Trente-six AcM, dirigés contre 7 PME, ont également été testés (Cloeckert et al.,1991). Seuls 3 AcM dirigés contre la PME 25, la PME 36, et la PME 16,5 protégeaient. Mais leur efficacité était plus faible que celle des AcM anti LPS-S. La combinaison d'AcM anti-PME avec des AcM anti-LPS-S produit seulement l'effet des AcM anti-LPS après inoculation de l'épreuve virulente (Jacques et al, 1992).

### 5.3. Conclusions

Dans le modèle souris, les Ac anti-PME semblent peu protecteurs, la protection à médiation humorale vis-à-vis de souches S de *B. abortus* serait principalement due aux Ac anti-LPS-S.

On peut toutefois s'attendre à un rôle protecteur des PME dans l'immunité cellulaire. En effet, l'immunisation avec le LPS seul ne confère à la souris qu'une protection d'une durée limitée ( $\pm$  21 jours). Après cette période, les bactéries recolonisent la rate. Par contre, la fraction SDS-I (contenant du LPS et principalement 2 PME) induit une protection durable. Le LPS seul ne peut donc suffire à supprimer l'infection. Les PME présentes dans la fraction SDS-I seraient la base antigéniques de la protection à longue durée.

## 6. DIAGNOSTIC

---

Le diagnostic de la brucellose peut se faire selon différentes méthodes, soit par la mise en évidence de *Brucella*, soit par la détection d'Ac dans le sérum et dans le lait, soit par la mise en évidence d'une réaction d'hypersensibilité retardée (HSR) après injection intra-dermique d'un mélange de protéines cytoplasmiques appelé brucelline (INRA) et commercialisé sous le nom de brucellergène par Rhône Mérieux.

Les épreuves sérologiques actuelles sont basées sur la mise en évidence des **anticorps dirigés contre le LPS**, l'antigène immuno-dominant. Il s'agit du test au Rose Bengale, de la séro-agglutination lente en tube, de la réaction de déviation du complément, de la réaction de Coombs et l'ELISA utilisant le LPS comme antigène (voir matériel et méthodes).

## 7. VACCINATION

---

Actuellement la souche vaccinale principalement utilisée est *B.abortus B19* (vaccin vivant atténué)

### 7.1. Généralités

La souche B 19 de *B. abortus* a été isolée d'une vache malade en 1923 par Buck. Des études sur cobayes et bovins ont montré que la souche avait perdu sa virulence initiale après un an de séjour à la température du laboratoire. Ses principales caractéristiques sont une faible pathogénicité, une bonne immunogénicité et antigénicité.

### 7.2. Efficacité

Le vaccin vivant ne confère pas une protection parfaite. En effet, un animal vacciné pourra facilement se défendre contre l'infection dans un milieu peu contaminé par les *Brucella*; par contre, face à une grande quantité de bactéries, suite à un avortement par exemple, l'animal sera ou non infecté en fonction de sa résistance naturelle.

On considère qu'accompagnée de mesures d'hygiène strictes, la vaccination protège dans 60% à 70% des cas chez les bovins. Dans l'expérience réalisée à Machelen, sur laquelle porte ce travail, sans isolement de l'animal lors de la parturition, ni désinfection des zones contaminées, 60 % des bovins ont été protégés. La bonne efficacité de ce vaccin chez les bovins fait qu'il est utilisée par tous les pays qui pratiquent la vaccination à l'exception de l'Arabie Saoudite.

Des études relativement récentes (Alton et al., 1984 ; Sutherland et al. 1981) ont démontré que la protection conférée est plus grande lorsque les animaux sont vaccinés à l'âge adulte par rapport aux veaux vaccinés.

Il semblerait qu'une dose vaccinale confère une immunité adéquate pour au moins 5 gestations. La revaccination donne une meilleure immunité mais a l'inconvénient d'induire une sérologie positive. (Mc Diarmid, 1957).

### 7.3. Inconvénients pour le diagnostic

La vaccination avec la souche B19 ( $9 \times 10^{10}$  bactéries par voie sous-cutanée) entraîne la formation et la persistance d'anticorps anti-LPS dans le sérum. L'apparition de ces anticorps constitue le désavantage majeur de ce vaccin puisqu'ils peuvent interférer lors du dépistage et conduire ainsi à l'élimination d'animaux sains vaccinés, déclarés injustement infectés (Dubray, 1985).

L'intensité et la durée de la réponse sérologique après vaccination dépendent de la dose, de l'état de gestation et de l'âge au moment de la vaccination (Alton et al., 1980; Crawford et al. 1990).

Des études ont montré que la proportion de génisses présentant une sérologie positive un mois après la vaccination est plus grande lorsque la dose vaccinale augmente (Crawford et al., 1990; Manthei, 1952).

Indépendamment de la méthode vaccinale, la tendance à présenter des anticorps dans le sérum est grande si l'animal est gestant lors de la vaccination.

La vaccination des femelles avant la puberté est recommandée de sorte que les tests sérologiques soient redevenus négatifs à l'âge adulte.

En 1961, King et al., ont étudié l'effet de l'âge sur la rétention d'immunoglobulines chez les veaux vaccinés à différents âges.

Les veaux vaccinés à 3 mois, 6 mois et 9 mois redeviennent sero-négatifs respectivement 2 mois, 6 mois et 15 mois après la vaccination.

## 8. PLAN DE LUTTE CONTRE LA BRUCELLOSE

Pour accélérer l'éradication de la maladie, 2 moyens ont été imaginés.

Le premier consiste d'une part à déterminer les meilleures conditions d'utilisation du vaccin B19 pour diminuer l'interférence avec les tests diagnostiques et d'autre part à rechercher parmi les antigènes ceux spécifiques des souches virulentes. De nombreuses recherches ont déjà été entreprises dans ces domaines et leurs résultats sont résumés ci-dessous.

Le deuxième moyen vise à produire un vaccin qui ne contiendrait qu'un nombre restreint d'Ag capables d'induire chez l'animal un taux élevé de cellules et d'anticorps protecteurs. D'autres antigènes, non utilisés dans le vaccin, devraient permettre le développement d'un ou plusieurs tests diagnostiques sensibles et spécifiques.

### **8.1. Conditions d'utilisation du vaccin B19 et antigènes de *Brucella***

#### 8.1.1. Vaccination à dose réduite et par voie conjonctivale

De nombreuses études ont été réalisées en vue de déterminer la meilleure méthode d'administration et la dose de souche B19 qui fournira l'immunité optimale et interfèrera le moins possible avec les épreuves diagnostiques.

C'est ainsi que Plommet M. et Plommet A.M. en 1976 préconisent l'inoculation de doses réduites par voie conjonctivale.

Deux protocoles ont fait l'objet d'expériences donnant des résultats de qualité comparable (Plommet and Fensterbank, 1976) :

- Vaccination de veaux de 4 à 7 mois par administration sous cutanée de  $9 \times 10^{10}$  bactéries (= dose standard) suivie d'un rappel par voie conjonctivale ( $5 \times 10^3$  bactéries) à 10-15 mois. Les réactions post-vaccinales auront disparu à 13-18 mois.
- Deux vaccinations successives, à 6-12 mois d'intervalle, par voie conjonctivale de  $5 \times 10^9$  bactéries. Les anticorps vaccinaux disparaissent complètement dans un délai maximal de 4 mois, quel que soit l'âge des animaux et les vaccinations antérieures qu'ils ont reçues (Plommet et Fensterbank, 1984). Grâce à ce procédé, des animaux adultes peuvent être vaccinés (Nicoletti et al., 1978; Plommet et Fensterbank, 1976).

L'utilisation d'une autre souche vaccinale qui n'entraînait pas de réponse sérologique interférant avec les épreuves diagnostiques, avait été également envisagée : le vaccin *B. abortus* souche 45/20 (World Health Organisation, 1986).

Il s'agit d'une souche rugueuse, ne possédant pas les antigènes de la chaîne osidique du LPS responsables des réactions sérologiques post-vaccinales. Les animaux vaccinés avec cette souche ont donc l'avantage de ne pas réagir aux épreuves sérologiques utilisant le LPS-S comme antigène. Il peut être administré quel que soit l'âge des animaux et qu'ils soient gravides ou non.

Cependant, des rappels fréquents étaient nécessaires et ceux-ci induisaient à la longue l'apparition d'anticorps décelables par la réaction de fixation du complément. Actuellement, l'utilisation de ce vaccin n'est plus autorisée car la protection obtenue était insatisfaisante.

## 8.1.2. Antigènes de Brucella

### *a. LPS*

C'est le composant majeur et le plus immunogène de la membrane. Les épreuves sérologiques usuelles sont basées sur la mise en évidence des anticorps anti-LPS présents dans le sérum.

### *b. Les protéines*

Les protéines de Brucella, aussi bien cytoplasmiques que celles de la membrane externe ont fait l'objet d'études en vue d'établir leur importance antigénique. La réponse immunitaire spécifique des PME a été mise en évidence chez des bovins infectés, par A. Cloeckart (1992). Par immuno-empreinte (IE) et ELISA de compétition, il a montré l'existence d'une réponse sérologique dirigée contre les PME de 10-16,5-19-25-36 et 89 kDa.

Une étude, réalisée par M. Leboutte (mémoire de licence, 1992), de la réponse immunitaire chez les bovins, caprins et ovins infectés naturellement, a confirmé la présence d'une réaction sérologique dirigée contre les protéines de 16,5 et 19 kDa (par ELISA indirect et IE).

La réponse immunitaire spécifique des protéines cytoplasmiques a été étudiée en IE par M. Zygmunt et coll.(1990) chez des chèvres infectées naturellement. Les anticorps immunodominants sont dirigés contre des protéines dont les MM ont été estimées à 39 et 50 kDa et sont détectés respectivement chez 12 et 10 chèvres sur 17.

Les protéines cytoplasmiques sont utilisées lors de l'épreuve allergique utilisant le brucellergène et déclenchent une réponse de type cellulaire chez les animaux sensibilisés.

Au Centre d'Étude de la Brucellose (CEB), à partir du brucellergène, une protéine cytoplasmique de 39 kDa a été identifiée et purifiée. Celle-ci a été testée comme nouvel allergène chez des cobayes et bovins infectés. Elle a permis de détecter quasi tous les animaux infectés détectés par le brucellergène, sans détecter les bovins indemnes de Brucellose.

Le gène codant pour cette protéine a été cloné.

### *c. Antigènes proposés pour le diagnostic en vue de faire la distinction entre animaux infectés/vaccinés*

Un grand nombre de recherches ont été effectuées afin d'identifier des antigènes spécifiques soit de la souche B 19, soit des souches sauvages.

#### *- Le polysaccharide B*

Il a été décrit par Diaz et al.(1981) comme un carbohydrate de faible masse moléculaire obtenu après traitement des souches de *B. melitensis* ou *B. abortus* avec 0,2 M d'acide trichloroacétique.

Cet antigène a semblé être intéressant à partir du moment où il a été décrit que les animaux infectés par *B. abortus* produisaient des anticorps contre le poly-B contrairement aux animaux vaccinés. (Diaz et al., 1979).

Bundle et al.(1987) l'ont purifié à partir d'un extrait de *B. melitensis* 16M et l'ont décrit comme un homopolymère cyclique du glucose, présent chez toutes les espèces de Brucella. Malheureusement, purifié, son antigénicité n'apparaissait plus. Les réactions sérologiques attribuées au poly-B étaient probablement dues à la présence de la chaîne O contaminant les préparations de polysaccharide B.

### - L'antigène A2

De nature protéique et présent dans le cytoplasme de la bactérie, spécifique du genre *Brucella*, il a été utilisé en immunodiffusion simple (Berman, 1975). Récemment, (Zygmunt et al., 1992) l'antigène a été purifié à partir d'extraits de *B. melitensis* B115. Grâce à l'EGPA-SDS, la MM de la protéine a été estimée à 20 kDa. Zygmunt et al. ont montré en IE que les sérums de 10 moutons infectés réagissaient avec l'Ag A2. Des anticorps anti-A2 avaient aussi été trouvés dans des sérums de bovins et caprins infectés. Cet antigène pourrait alors être utile pour la mise au point d'un nouveau test diagnostique. Cependant, la vaccination par *B. abortus* B19 induit également des anticorps anti-A2 mais qui disparaissent après 5 mois. Cet antigène n'est donc pas idéal pour discriminer les animaux infectés, des animaux vaccinés.

### - L'antigène X (Raybould et al., 1981)

De nature lipido- ou lipidoglucido protéique, il aurait permis la différenciation d'animaux infectés et vaccinés par agglutination sérique passive. Cependant, cette observation n'a jamais été confirmée.

### - L'antigène reconnu par l' AcM Br 25

L'AcM Br25 serait spécifique d'un antigène du genre *Brucella* absent de la souche vaccinale B19 (Gorell et al., 1983). Cependant, Limet et coll. (communication personnelle) ont montré que l'Ag Br25 n'est pas totalement absent de la souche B19, et ne permet donc pas la différenciation entre animaux vaccinés avec la souche B19 et les animaux infectés. Cependant, la vaccination par la souche *B. melitensis* H38 entraîne peu de réponse contre cet antigène alors que l'infection induit des Ac contre cet Ag.

Un ELISA de capture développé à l'aide de l' AcM Br25 permet de déceler la quasi totalité des animaux infectés décelés par l'ELISA utilisant le LPS comme antigène, avec toutefois un léger retard. L'Ag Br 25 semble dès lors un des plus intéressants dans le contexte général des projets du CEB c'est-à-dire le développement d'un vaccin et de tests diagnostiques basés sur des Ag différents.

## **8.2. Vaccin sous-unitaire**

Un vaccin sous-unitaire pourrait ne contenir que les Ag indispensables à la protection et donc, d'autres antigènes absents de celui-ci pourraient être à la base de nouveaux tests diagnostiques.

La fraction SDS-I, une fraction insoluble de la paroi de *Brucella* dans le SDS à 100°C, pourrait constituer la composante vaccinale du système.

Cette fraction a été produite par Dubray et Bézard (1980). Elle contient ± 30 % de peptidoglycane, 50 % de protéines et des traces de LPS-S (moins de 1 %).

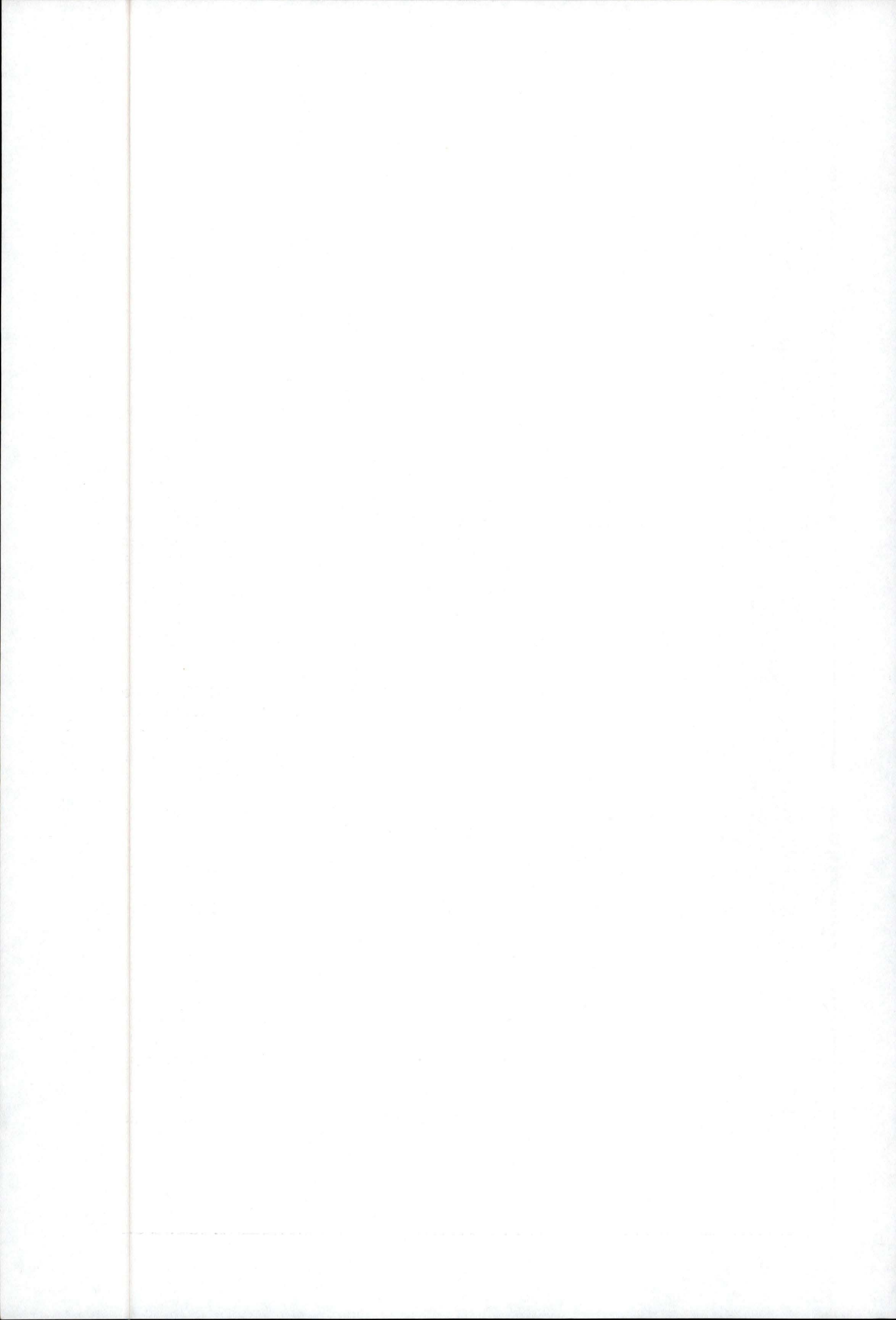
Le LPS-S est très immunogène et est responsable pour une grande part de la protection conférée par cette fraction chez la souris.

Les polypeptides ont été caractérisés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (EGPA-SDS) après hydrolyse au lysozyme. Deux bandes majeures ont été observées d'une masse moléculaire estimée à 36-38 kDa et 25-27 kDa. Des bandes mineures apparaissent à 70 kDa et 31 kDa. Chez la souris, cette fraction confère une protection égale à celle obtenue avec les meilleurs vaccins.

---

**BUT DU TRAVAIL**

---



La vaccination anti-brucellique permet de diminuer la prévalence de la maladie en limitant le développement de foyers en milieu largement infecté.

Cependant, le vaccin B19 utilisé induit une réponse en anticorps indistinguable par les méthodes diagnostiques actuelles, de celle qui résulte d'une infection naturelle, ce qui ralentit considérablement la campagne d'éradication de la maladie.

Il conviendrait de développer un vaccin efficace et des tests diagnostiques sensibles et spécifiques, basés sur des antigènes différents, de manière à pouvoir différencier les animaux vaccinés des animaux infectés à abattre.

La fraction SDS-I pourrait constituer la composante vaccinale. Celle-ci contient un nombre réduit d'antigènes de *Brucella* (du LPS, les PME majeures 25 et 36 et du PG) et confère à la souris une protection comparable aux vaccins cellulaires. Des antigènes non présents dans cette fraction comme par exemple les PME mineures ou des protéines cytoplasmiques telles que la protéine de 39 kDa, pourraient être à la base de nouveaux tests diagnostiques pourvu que ces antigènes soient spécifiques de *Brucella* et induisent une réponse sérologique ou cellulaire décelable suite à l'infection. Cette fraction vaccinale offrirait en plus l'avantage de ne pas induire de réaction positive à l'intradermo-réaction (IDR) avec le brucellergène (contenant des protéines cytoplasmiques).

L'activité protectrice de cette fraction SDS-I par rapport au vaccin B19 a été testée chez des génisses gestantes. Celles-ci ont été réparties en 3 groupes. Les génisses du premier et 2<sup>ème</sup> groupe ont été vaccinées respectivement avec la souche B19 et la fraction SDS-I. Le 3<sup>ème</sup> groupe comprend des génisses non vaccinées servant au contrôle de l'épreuve infectieuse. Les génisses des 3 groupes ont été infectées.

Les résultats de l'étude concernant les anticorps anti-LPS, le suivi de la réponse cellulaire par IDR et le suivi bactériologique nous ont été fournis.

Notre travail vise à étudier la réponse humorale spécifique des protéines chez des animaux vaccinés (B19 ou avec la fraction SDS-I) puis infectés, et chez des animaux infectés, dans le but d'identifier des antigènes protéiques majeurs qui seraient les plus adéquats pour le développement de tests de diagnostic.

Deux techniques ont été utilisées : l'ELISA et l'Immuno-Empreinte (IE)

L'ELISA nous a permis d'étudier les réponses spécifiques d'antigènes dont soit les gènes avaient déjà été clonés et pour lesquelles des protéines recombinantes purifiées étaient disponibles, soit des protéines contre lesquelles des AcM avaient été produits.

Les 4 protéines recombinantes dont nous disposons, à savoir les PME 25 et 36, qui sont les 2 protéines majoritaires contenues dans la fraction SDS-I et les PME mineures de 16,5 et 19 kDa ont été utilisées en ELISA indirect.

Des AcM dirigés contre les protéines de 15,7 et 16,5 kDa ont été utilisés en ELISA de compétition.

Par la technique d'IE, nous avons pu élargir l'étude de la réponse humorale à un grand nombre de protéines .

Nous avons ainsi essayé de voir s'il existait :

- une relation entre la production d' Ac spécifiques de certains Ags et la protection conférée par la vaccination
- des antigènes qui seraient de bons marqueurs de l'infection, et éventuellement non révélés suite à la vaccination (principalement pour la fraction SDS-I). De tels antigènes seraient de bons candidats pour le développement de nouveaux tests diagnostiques pourvu que les anticorps dirigés contre ceux-ci puissent être détectés avant l'avortement
- des Ac qui signeraient l'infection de type chronique

---

# **MATERIEL ET METHODES**

---

## 1. PROTOCOLE DE L'EXPÉRIENCE

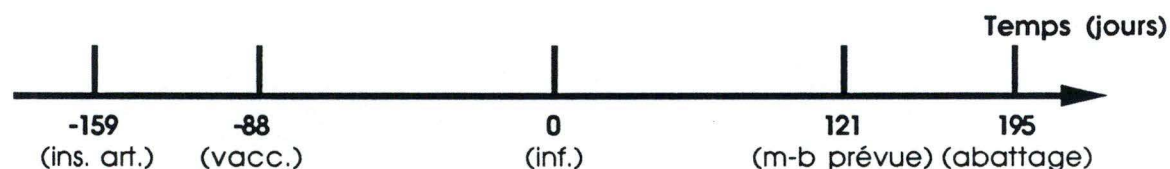
Le travail réalisé entre dans le cadre d'une expérience visant à évaluer l'activité protectrice de la fraction SDS-I par rapport au vaccin B19.

Vingt-six génisses de race Pie Noire, achetées en Bretagne, dans une région indemne de brucellose depuis plus de 10 ans, ont été inséminées et réparties en 3 groupes après contrôle des gestations :

- le premier groupe comprend 10 génisses vaccinées au 2<sup>ème</sup> mois de la gestation par injection sous-cutanée de 150 millions de *B.abortus* souche B19.
- le 2<sup>ème</sup> groupe comprend 12 génisses vaccinées au 2<sup>ème</sup> mois de la gestation avec la fraction SDS-I préparée à partir des souches de *Brucella melitensis rev 1* et de *Brucella abortus w99 S*, administrée par voie sous-cutanée à la dose de 9 mg dans 2 ml d'adjuvant BG\* .
- Le 3<sup>ème</sup> groupe comprend 4 génisses, non vaccinées, qui servent de témoins de l'épreuve d'infection.

Les animaux des 3 groupes ont été infectés au 5<sup>ème</sup> mois de la gestation par l'instillation de  $16,6 \times 10^6$  de *B.abortus 544* dans la conjonctive.

Le jour de l'infection correspond au jour 0. L'insémination artificielle, la vaccination, et l'abattage ont dès lors eu lieu respectivement aux jours -159, -88, et 195. La mise-bas était prévue pour le jour 121.



Les génisses de chaque groupe ont été placées dans des étables séparées. Tout au long de l'expérience, il n'y a pas eu de passage de matériel d'entretien d'une étable à l'autre et des membres du personnel différents ont été désignés pour chaque groupe.

Afin de pouvoir suivre la réponse humorale, des prélèvements de sang ont été réalisés une fois par semaine.

Ces prélèvements ont été effectués :

- avant la vaccination (= présaignées)
- après la vaccination
- après l'infection et jusqu'à l'abattage

---

\* composition de l'adjuvant BG :

- mélange A : 6 gr d'arlacel + 4gr de Tween 20
- mélange B : 8,25 gr du mélange A + bayol F QSP = 100 ml

Les tests classiques de diagnostic et le test ELISA utilisant le LPS comme antigène ont été réalisés à partir de ces prélèvements.

Des tests cutanés ont été effectués avant et, 35 jours après la vaccination ainsi que 20, 46, 117, 152 et 187 jours après l'infection.

## **2. MÉTHODES USUELLES DE DIAGNOSTIC**

---

### **2.1. Diagnostic bactériologique**

Le diagnostic bactériologique est utilisé depuis très longtemps en brucellose animale. Il vise à mettre en évidence la bactérie responsable par culture sur milieux hautement sélectifs.

Les prélèvements ont été réalisés sur l'avorton ( le liquide de la caillette, la rate, le foie et les poumons), les arrièr-faix, le colostrum, le lait, le mucus, les ganglions, le foie, la rate et l'utérus de toutes les génisses faisant partie de l'expérience.

### **2.2. Diagnostic sérologique**

Les différentes méthodes de diagnostic sérologiques (Alton et al., 1988; Fensterbank, 1986) sont principalement basées sur la détection des Ac anti-lipopopolysaccharides (LPS) de type S.

#### **2.2.1. Rose Bengale (RB)**

Ce test d'agglutination rapide sur lame permet la mise en évidence qualitative d'anticorps agglutinants du sérum (IgM et IgG1) par fixation sur une suspension de bactéries tuées, colorées au rose bengale et tamponnées à pH 3,6.

En l'absence d'agglutination, l'épreuve est considérée comme négative, toute agglutination permet de considérer l'épreuve comme positive. La positivité est exprimée en +, ++, +++, ++++ en fonction de la vitesse d'apparition des agrégats à savoir respectivement après 4, 3, 2, et 1 minute.

#### **2.2.2. Séro-agglutination lente en tube (S.A.T.)**

C'est une épreuve quantitative détectant les anticorps IgG2 et les IgM (Levieux, 1974) des sérums par agglutination d' une suspension de *B. abortus* . Le titre obtenu est donné par la plus haute dilution du sérum agglutinant encore l'antigène.

La lecture est l'évaluation de l'opacité du liquide surnageant, après 18 h d'incubation à 37° C.

Le seuil de positivité est fixé à 30 UI en milieu indemne et en absence de toute vaccination.

Ce test d'agglutination peut également être effectué après traitement des sérums par le dithiothréitol (DTT) en présence du facteur rhumatoïde. Le DTT inactive les IgM et le facteur rhumatoïde confère le pouvoir agglutinant aux IgG1 et prévient les phénomènes de zone.

#### **2.2.3. Réaction de déviation du complément (DC)**

La mise en évidence quantitative des anticorps fixant le complément se fait par interaction avec *B. abortus* .

La réaction est révélée par l'addition d'un système Ag-Ac (globules rouges de mouton, anticorps anti-globules rouges de mouton).

En l'absence d' Ac dans le sérum, les globules rouges de mouton sont lysés par le complément resté libre. Si le sérum contient des anticorps, le complément sera fixé et ne pourra pas hémolyser les globules rouges sensibilisés.

Le seuil de positivité est fixé à 20 U CEE.

#### 2.2.4. Test de Coombs

Il permet la détection d'anticorps incomplets (IgG1), incapables d'agglutiner bien que capables de fixer l'antigène. On utilise un second Ac dirigé contre les Ac incomplets. Ce test détecte toutes les Ig.

#### 2.2.5. ELISA

L'antigène est du LPS-S, adsorbé sur la surface des puits de microplaques. La fixation des Ac du sérum est révélée par un second Ac couplé à la peroxydase (Limet et al., 1988).

On peut révéler l'isotype que l'on désire par le choix du second Ac.

Le seuil de positivité est fixé à 2,5 UI.

### **2.3. Hypersensibilité retardée**

Cette épreuve allergique est réalisée par une injection intradermique de brucellergène, commercialisé par la firme Rhône-Mérieux. Le brucellergène semble contenir principalement des protéines cytoplasmiques. Les Ac éventuellement synthétisés suite à l'épreuve allergique n'induisent pas de réactions faussement positives, ni d'anticorps décelables par les tests sérologiques (Fensterbank, 1984). Les résultats de l'intradermo-réaction avec le brucellergène sont exprimés par la différence d'épaisseur de peau existant à l'endroit de l'injection avant et après l'épreuve. A partir d'une différence de 1 mm, le test est considéré comme positif.

## **3. SOUCHES BACTÉRIENNES UTILISÉES**

### **3.1. *Brucella abortus* 45/20**

Les bactéries sont mises en culture pendant 48 H à 37 °C sur brucellagar. Les cellules sont alors récoltées, lavées et leur concentration est déterminée par la mesure de la DO à 600 nm. Une DO de 0,165 correspond à  $10^9$  cellules/ml. Les cellules sont tuées par 2 H d'incubation à 85 °C. L'inactivation est contrôlée par ensemencement.

### **3.2. *Brucella melitensis* B115 (R)**

#### Préparation de l'extrait pariétal

Les cellules sont inactivées par la chaleur (65°C pendant 1H) et leur broyage est réalisé avec un broyeur à billes Dyno-Mill KDL.

Les parois cellulaires sont obtenues en traitant les parois brutes pendant 30 minutes à 20°C avec une solution contenant 1% de Triton X-100, 0,2 M NaCl et 0,01 M MgCl<sub>2</sub>.

#### 4. PROTÉINES RECOMBINANTES

Nous disposons des protéines recombinantes de Brucella de 16,5-19-25 et 36 kDa ainsi que de la protéine recombinante GP 120 de HIV appelée par la suite protéine contrôle ou protéine HIV. Celles-ci sont conservées dans du tampon guanidine 6M, un agent dénaturant dans lequel les protéines sont solubles.

Les gènes codant pour ces protéines recombinantes ont été clonés dans des vecteurs d'expression (PIGAL ou PmTNF) développés par la firme Innogénétics.

Ces vecteurs d'expression ont été conçus afin de faciliter la purification des protéines dont les gènes ont été exprimés. En effet, en amont du site multiple de clonage (MCS), se trouve une séquence codant pour 6 histidines, qui permet la purification ultérieure par chromatographie d'affinité sur ions métalliques. Le site de clonage multiple est situé après une séquence constituée par les premiers nucléotides des gènes Cro ou mTNF qui code pour une séquence "leader" à laquelle seront fusionnés les produits des gènes exprimés. Les gènes sont exprimés sous la dépendance du promoteur PR.

séquence leader	6 hist	MCS	gène de Brucella
-----------------	--------	-----	------------------

Dans le tableau ci-dessous, sont précisés pour chaque PME, la nature du peptide leader, les séquences absentes des protéines recombinantes de Brucella ainsi que la MM attendue de la protéine.

PME	peptide leader	séquences absentes	MM attendue (KDa)
16,5	mTNF	peptide signal	20 024
19	crolac	peptide signal	22 041
25	crolac	peptide signal	27 387
36	crolac	60 AA N-term	39 359

N.B. : Peptide signal = environ 20 AA de l'extrémité N-terminale  
Les peptides leader, mTNF et Crolac font respectivement 28 AA et 50 AA.

Le gène codant pour la protéine contrôle HIV a été cloné dans les vecteurs d'expression PIGAL et PNTNF. Nous disposons donc de la protéine HIV en fusion avec le peptide leader mTNF et de cette même protéine en fusion avec le peptide leader Crolac.

## 5. ANTICORPS MONOCLONAUX SPÉCIFIQUES DES PROTÉINES DE LA FRACTION PARIÉTALE

---

Les AcM dont nous disposons, ont été produits par fusion de cellules myélomateuses NSO avec des cellules spléniques de souris BALB/ C, soit immunisées avec des parois ou fractions SDS-I de Brucella, soit infectées par des souches R ou S de *B. abortus* ou *B. melitensis*.

Les surnageants de culture de ces hybridomes, produisant les anticorps monoclonaux, ont été testés en ELISA, en utilisant pour le coating différentes fractions antigéniques de Brucella. La spécificité des AcM a été déterminée par immunoempreintes en utilisant ces mêmes antigènes. Ainsi, des AcM dirigés contre sept PME ont été obtenus, à savoir les protéines mineures de masses moléculaires de 10-16,5-19 et 89 kDa et les protéines majeures de masses moléculaires de 25, 31-34, et 36 kDa.

Caractérisation des AcM utilisés

MM de la PME reconnue Numéro du Clone	Isotype	Immunogène
<b>16,5 kDa</b> 29E3C10 4G1C6 5H1E9 8C3G3 4E3B7	IgG2a IgG2a IgG2a IgG2a IgG2b	B.abortus 45/20 vivant B.abortus 45/20 vivant paroïis B115(R) paroïis B115(R) paroïis B115(R)
<b>19 kDa</b> 10D3H2 12F2D6 2A4A7 18B2D6 5C10A8 25H10A5	IgG2b IgG2b IgG2b IgG2a IgG2a IgG2a	paroïis B115 (R) paroïis B115 (R) paroïis B115 (R) paroïis B115 (R) paroïis B 115 (R) B.abortus 45/20 vivant
<b>25 kDa</b> 13D2F5 12B10F4 1C6E1 28G6C7 7D11B3 4B10F5 9F4B11 15H7E7 12H9A5 8H9A2 2F4F1 6B5A7	IgG1 IgG1 IgG2b IgG2a IgG2a IgG2a IgG3 IgG3 IgG3 IgG3 IgG3 IgG2a IgG3	B.abortus B3 vivant B abortus B3 vivant paroïis B115 (R) B.abortus 45/20 vivant B.abortus 45/20vivant B.abortus 45/20 vivant paroïis B115 (R) paroïis B115 (R) paroïis B115 (R) paroïis B115 (R) paroïis B115 (R) paroïis B115 (R) paroïis B115(R)
<b>36 kDa</b> 4D11G1 25G5A5 8D8C7 13G2C4 11E5D11 3H2B1	IgG2a IgG2a IgG1 IgG1 IgG1 IgG1	fraction SDS-I de H38 B.abortus 45/20 vivant fraction SDS-I de H38 fraction SDS-I de H38 fraction SDS-I de H38 fraction SDS-I de H38

## 6. ELECTROPHORÈSE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRÉSENCE DE SDS (EGPA-SDS)

### 6.1. Principe

Le SDS, détergent anionique dénaturant, se fixe sur les protéines dans un rapport constant détergent/protéine, et leur donne une densité de charge nette négative. Placées dans un champ électrique au sommet d'un gel d'acrylamide, les protéines sont concentrées en zones très fines par le gel de concentration (gel à larges pores) et sont ensuite séparées suivant leur masse moléculaire par le gel de séparation de réticulation déterminée.

Le gel de polyacrylamide est préparé par la polymérisation d'acrylamide ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ), en présence d'un agent bifonctionnel, le NN'-méthylène bisacrylamide ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ ) qui réalise des liens entre les différentes chaînes de polymères. La polymérisation est initiée par le peroxydisulfate d'ammonium ou APS ( $(\text{NH}_4)_2 \text{S}_2 \text{O}_8$ ). La réaction de polymérisation est catalysée par la NNN'N' tétraméthylène- diamine (TEMED). On peut produire un gel dont les pores sont de taille plus ou moins grande en variant la concentration en acrylamide. La taille des pores et la rigidité sont aussi fonction de la concentration de bisacrylamide. Au delà de 5 %, la réticulation devient hétérogène. L'électrophorèse est réalisée selon la méthode discontinue (plusieurs tampons) avec un gel composé de deux parties (Laemmli (1970)).

### 6.2. Préparation du gel

<b>gel de séparation</b> (running gel)	12 % acrylamide
- tampon Tris-HCl 1,5 M à pH 8,8	10 ml
- solution d'acrylamide(LKB) (30%) et de bisacrylamide (0,8%)	16 ml
- eau distillée	12 ml
- TEMED(MERCK)	40 $\mu\text{l}$
- APS (MERCK) 1%	2 ml
<b>gel de concentration</b> (stacking gel)	3 % acrylamide
- tampon Tris-HCl à pH 6,8	5 ml
- solution d'acrylamide(LKB) (30%) et de bisacrylamide (0,8%)	2 ml
- eau distillée	11 ml
- TEMED	20 $\mu\text{l}$
- APS 1 %	2 ml

L'APS et le TEMED doivent être ajoutés extemporanément.

Les gels de résolution et de séparation sont coulés entre 2 plaques de verre et ont des dimensions de 8 X 6 cm pour les petits gels et de 16 X 14 cm pour les grands gels. L'épaisseur des petits et grands gels est respectivement de 1,5 et 3 mm.

### **6.3. Préparation de l'antigène**

#### **6.3.1. Lyse des Brucella 45/20 par le SDS (MERCK)**

- les bactéries sont mises en suspension dans le tampon d'échantillon bouillant
- la suspension est incubée pendant 10 minutes au bain-marie dans de l'eau bouillante
- la suspension est centrifugée 5 minutes à 13000 rpm
- le surnageant est prélevé et on y ajoute la solution contenant le bleu de bromophénol (BBP) sans  $\beta$  mercaptoéthanol (MERCK)

#### **6.3.2. Les protéines recombinantes**

Elles sont conservées dans du tampon guanidine 6 M. Pour l'électrophorèse, elles sont diluées dans du tampon échantillon contenant du bleu de bromophénol (BBP) avec mercaptoéthanol, de manière à déposer 1  $\mu$ g de protéines par puits.

### **6.4. Electrophorèse**

20  $\mu$ l d'échantillon sont déposés par puits ou 100  $\mu$ l et 400  $\mu$ l sont déposés tout le long du gel respectivement pour les petits et grands gels.

Pour les grands gels, la cuve d'électrophorèse Bio-Rad est placée dans la glace. Une tension de 400V est appliquée, un courant de 85 mA en résulte. La puissance est limitée à 15 W. la migration dure environ 2h30'.

Pour les petits gels, la tension appliquée est de 200 V et la migration dure environ 40 minutes.

Du vert de méthyle est déposé dans les puits 10 minutes avant d'arrêter l'électrophorèse. Il permettra d'aligner les bandes de nitrocellulose.

## **7. TECHNIQUE D'IMMUNOEMPREINTE (IE) APRÈS EGPA-SDS**

### **7.1. Principe**

Les protéines séparées en fonction de leur masse moléculaire par l'électrophorèse en gel de polyacrylamide sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Millipore) sous l'influence d'un champ électrique. Les anticorps du sérum vont reconnaître des protéines fixées sur la nitrocellulose et vont être détectées grâce à des anticorps couplés à une enzyme.

### **7.2. *Electrotransfert sur membrane de nitrocellulose ou Western Blotting (WB)***

#### **7.2.1. Préparation du montage de transfert**

Le système, composé d'une éponge, un papier Wattman, le gel, la nitrocellulose, un papier wattman puis une éponge est placé dans l'appareil de transfert avec la nitrocellulose du côté de l'anode de manière à ce que les protéines chargées négativement migrent vers la nitrocellulose.

La cuve contient le tampon de transfert de basse force ionique. Le transfert dure 90 minutes à 60 V.

Afin de vérifier le transfert des protéines, on colore le gel au bleu de Coomassie.

### 7.2.2. Saturation de la nitrocellulose

Les sites de fixation de la membrane de nitrocellulose non utilisés par les protéines transférées sont saturés par des protéines étrangères afin de diminuer le bruit de fond. La solution utilisée est de l'hydrolysate de caséine (HC) dilué 2 fois dans du tampon TBS pendant 2H à 37°.

Préparation de l'hydrolysate de caséine

- dissoudre 30 g de caséine dans 800 ml de NaOH 0,3 N.
- laisser la nuit à 37 ° sous agitation
- porter la solution à pH 7 avec de l'acide chlorhydrique concentré
- ajuster le volume final à 1 L avec de l'eau distillée
- filtrer la solution et conserver l'hydrolysate à -20°C.

### 7.3. *Révélation immunologique des protéines transférées*

- La membrane de nitrocellulose est découpée en bandelettes de 0,4 cm de largeur. Les bandelettes sont incubées pendant la nuit à 4°C avec les sérums à tester dilués 50 fois dans du tampon TBS contenant 0,05 % de Tween 20 et 50 % d'HC (TTBS-HC 50%).  
Certaines bandelettes sont incubées avec les AcM dilués dans une solution de TTBS-HC 50%. Celles-ci serviront de marqueurs de masse moléculaire. L'incubation est effectuée dans des bacs (Bio-Rad) prévus à cet effet.
- Les bandelettes sont ensuite lavées 5 X avec TTBS.
- Les bandelettes tests sont alors incubées avec un anticorps monoclonal dirigé contre les Ig bovines du sérum, soit 1C8, un AcM anti-IgG1 (dilué 100 X dans TTBS-HC 50 %), soit ILA 74 qui est un AcM anti-IgG2 (dilué 50 x dans TTBS-HC 50 %), pendant 1 h et à température ambiante.
- Les bandelettes sont lavées 5 X avec TTBS.
- Les bandelettes sont incubées avec un second anticorps spécifique des IgG de souris (Sheep Anti-Mouse IgG (SAM)) couplé à la peroxydase (PO) dilué 400 x dans du TTBS-HC 50% ou couplé à la phosphatase alcaline dilué 1000 fois.
- Les bandelettes qui serviront de marqueurs de MM sont incubées avec SAM-PO.

La révélation de l'activité de la peroxydase est effectuée par une solution contenant 60 mg de HRP 4-chloronaphtol dans 20 ml de CH<sub>3</sub>OH mélangés extemporanément à froid avec 100 ml de TBS contenant 60 µl d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30 %.

La réaction est arrêtée par plusieurs lavages avec de l'eau de ville.

La révélation de l'activité de la phosphatase alcaline est effectuée par une solution contenant pour 10 ml de tampon de révélation à la phosphatase, 1 mg de NBT et 12 µl de BCIP.

La réaction est arrêtée par plusieurs lavages avec de l'eau de ville.

Le calcul de la MM des différentes bandes protéiques reconnues par les sérums a été effectué par interpolation sur une courbe de calibration réalisée à l'aide de 6 AcM reconnaissant des protéines de MM connue : PME 10-16,5-19-36-70 et 89 kDa. L'équation qui a permis l'estimation la plus correcte des MM en fonction de la distance de migration est l'équation logistique à 4 paramètres utilisée dans le logiciel Delta Soft.

## **8. ELISA INDIRECT SUR PROTÉINE RECOMBINANTE**

---

### **8.1. Principe**

La technique d'ELISA permet dans ce cas d'estimer la quantité d'Ig spécifiques d'un Ag donné de Brucella présent dans les sérums bovins.

### **8.2. Coating des plaques**

Les protéines recombinantes de Brucella et la protéine contrôle HIV sont diluées dans du tampon GBS 0,05 M à une concentration de 1 µg/ml. Dans la moitié des puits de la plaque sont incubés 100 µl de la PME de Brucella et dans l'autre moitié, 100 µl de la protéine HIV pendant 2 h à 37°C.

### **8.3. Saturation**

Les sites non occupés par les Ag doivent être saturés afin d'éviter une adsorption non spécifique des anticorps .

La saturation est assurée par un dépôt de 100 µl par puits d'une solution de PBS à pH 7,4 contenant 8 % d'HC (voir 7.2.2.) pendant la nuit à 4°C plus 3 heures à 37°C.

La solution de saturation est ajoutée à celle de coating.

On effectue 6 lavages des plaques avec du tampon NaCl-Tw.

### **8.4. Dépôt des sérums**

Chaque sérum est testé sur la protéine recombinante et sur la protéine contrôle.

50 µl des sérums, dilués 50 fois dans le tampon GBS-EDTA-Tw à pH 9,2 sont déposés dans les puits. Les plaques sont mises à incuber à température ambiante pendant 1 h. Les puits sont lavés 6 fois avec du tampon NaCl-Tw.

### **8.5. Dépôt du conjugué**

La révélation de la fixation d'anticorps spécifiques des protéines est réalisée par un second anticorps couplé à la peroxydase. Il s'agit d'un mélange de l'AcM de souris 1C8 dirigé contre les IgG1 bovines et l'AcM ILA 74 dirigé contre les IgG2 bovines.

50 µl du mélange à 1 µg/ml est ajouté dans chaque puits. Le conjugué est dilué dans du tampon GBS-EDTA-Tw avec 4 % d'HC. L'incubation dure 1 h à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les plaques sont lavées 6 fois avec du tampon NaCl-Tw.

### **8.6. Révélation**

L'évaluation de la concentration en Ig anti-protéine est réalisée par une solution contenant de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de l'OPD et du tampon citrate-phosphate. 100 µl de la solution de révélation sont déposés par puits pendant 20 minutes. La réaction est stoppée par addition de 25 µl par puits de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M.

### **8.7. Lecture**

L'intensité de la coloration est mesurée à 492 nm (maximum du spectre d'absorption) par un spectrophotomètre Bio-Tek. Cette intensité est proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-brucella présente dans le sérum. On mesure également l'intensité de la coloration à 620 nm. Ces DO sont soustraites à celles obtenues à 492 nm pour minimiser les différences de cupules à cupules.

Afin d'obtenir une réponse spécifique de la protéine de Brucella, le signal obtenu par un sérum sur la protéine témoin, est soustrait du signal obtenu avec ce même sérum sur les PME de Brucella exprimées en fusion avec le même gène.

## **9. ELISA DE COMPÉTITION**

---

### **9.1. Principe**

Les puits sont sensibilisés par des parois de Brucella. Les sérums sont déposés sur les puits contenant l'Ag.

L'AcM est alors ajouté à la dilution adéquate. La fixation de l'AcM est visualisée par la révélation de l'activité de la peroxydase couplée à un 2ème anticorps reconnaissant l'AcM.

Si le sérum contient des anticorps entrant en compétition avec l'AcM pour leur fixation sur l'antigène, la D.O. sera plus faible par rapport à celle observée avec le sérum d'un animal indemne.

### **9.2. Coating des plaques**

Des parois de *B. melitensis* B115 à 20 µg/ml dans du tampon GBS 0,05 M, ultrasoniquées, sont incubées à raison de 100 µl par puits pendant 1 nuit à 37°C.

### **9.3. Saturation**

Elle est assurée par une incubation de 100 µl par puits d'une solution de PBS-HC 8% pendant 3H à 37°C. La solution de saturation est ajoutée à celle de coating. On effectue 6 lavages des plaques avec du tampon NaCl-Tw.

### **9.4. Dépôt des sérums et de l'AcM**

25 µl de sérum dilué 25 fois dans le tampon GBS-EDTA-Tw à pH 9,2 sont déposés dans les puits et ensuite, 25 µl de l'AcM à la dilution appropriée dans le même tampon, sont déposés. Après agitation pendant 10 minutes, les plaques sont incubées à température ambiante pendant 50 minutes.

Les puits sont lavés 6 fois avec du tampon NaCl-Tw.

### **9.5 Dépôt du conjugué**

La révélation de la fixation de l'AcM est réalisée par un second anticorps couplé à la peroxydase (SAM-PO), dilué 1000 fois dans du GBS-EDTA-Tw.

50 µl sont déposés par puits. Les plaques sont mises à incuber 1 h à t° ambiante et à l'abri de la lumière. Les plaques sont lavées 6 fois avec du tampon NaCl-Tw.

## 9.6. Révélation

Cfr 8.6.

## 9.7. Lecture

Comme pour l' ELISA indirect, les plaques sont lues par un spectrophotomètre Bio-Tek à 492 nm et 620 nm (cfr 8.7.).

## 10. SOLUTIONS ET TAMPONS

---

### 10.1. Electrophorèse

- tampon stacking gel
  - Tris HCl 0,5 M
  - SDS
  - pH 8,8
- tampon running gel
  - Tris- HCl 0,5 M
  - SDS 4%
  - pH 6,8
- tampon pour échantillon en électrophorèse
  - Tris 0,0625 M
  - SDS 2 %
  - PH 6,8
- tampon d'électrophorèse
  - Tris pH 8,3 0,025 M
  - glycine 0,192 M
  - SDS 0,1 %
- bleu de bromophénol (BBP) : solution 5 x concentrée
  - SDS 10 %
  - Tris-HCl 250 mM
  - Mercaptoéthanol 10 %
  - Glycerol 50 %
  - BBP 0,25 %
- vert de méthyle
  - vert de méthyle 0,1 %
  - tampon électrophorèse 50 %
  - glycérol 50 %

### 10.2. Immunoempreintes

- tampon de blotting
  - Tris HCl 0,025 M
  - glycine 0,192 M
  - methanol 20 % (V/V)

- tampon TBS
 

Tris HCl	20 mM
NaCl	500 mM
ajuster à pH 7,5	
  
- tampon TTBS
 

idem TBS + 0,05 % de Tween 20 (V/V)
  
- solution de bleu de Coomassie
 

bleu de Coomassie brillant blue (MERCK)	0,25 g
méthanol	45 ml
eau distillée	45 ml
acide acétique glacial	10 ml
  
- solution de décoloration
 

méthanol technique	30 %
acide acétique glacial	10 %
eau distillée	60 %
  
- tampon de révélation à la phosphatase alcaline
 

Tris	2,42 g
Mg Cl <sub>2</sub>	80 mg
dans 100 ml d'eau bidistillée	
ajuster à pH 9,5	

### 10.3. ELISA

- tampon GBS (stock 10 X concentré)
 

NaCl	2,7 M
glycine	1,7 M
azide(NaN <sub>3</sub> )	1 M
pH 9,2	0,4 g par litre
  
- GBS 0,054 M
 

Solution stock de GBS à 2,7 M diluée 50 fois
  
- tampon GBS-EDTA-Tw
 

GBS	2,7 M dilué 10 x
EDTA	50 mM
Tween 20	0,1 %
réajuster à pH 9,2	
  
- tampon PBS
 

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	8,1 mM
NaCl	137,9 mM
KCl	2,7 mM
pH 7,4	
  
- tampon NaCl Tw
 

NaCl	0,15 % (P/V)
Tween 20	0,01 % (V/V)

- tampon citrate-phosphate

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M

acide citrique 0,1 M

pH 5

- solution de révélation pour la peroxydase

OPD(O-phénylènediamine dihydrochloride) à 4mg/ml 1 ml

tampon citrate phosphate pH5 9 ml

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % 2 ml

---

## **RESULTATS**

---

**TABLEAU 1**

N° bovin	Avortement= A Vêlage = V	Délai de l'A/V (J après infection)	DC après vaccination titre max.	DR 66 jours après vaccination Δ épais. peau (mm)	DC après infection		IDR après infection titre max. Δ épais. peau (mm)	Culture ganglions, foie, rate, utérus nbre positif / nbre testé	DC à l'abattage Titre max.
					Titre max.	Nbre de Jours			
<i>Groupe témoin</i>									
85	A	41	-	-	> 400	50	3,2	0/10	30
33	A	43	-	-	> 400	50	2,0	8/10	>400
92	A	54	-	-	> 400	71	4,7	0/11	nég
79	A	61	-	-	> 400	71	4,6	1/8	50
<i>Groupe B19</i>									
60	A	45	50	3,8	> 400	50	5,0	6/10	> 400
81	A	85	100	3,4	> 400	82	5,2	0/10	> 400
67	A	86	120	3,0	> 400	71	6,0	1/11	> 400
41	A	89	120	6,2	> 400	82	5,2	4/9	> 400
93	V	109	60	0,7	> 400	110	4,0	0/10	> 60
91	V	119	120	0,7	> 400	89	1,5	2/10	> 400
49	V	121	60	3,7	> 400	64	4,1	1/11	> 400
45	V	124	400	6,3	100	37	7,2	0/10	15
3463	V	126	50	1,0	100	153	4,5	0/11	30
62	V	126	120	4,0	30	37	2,0	0/11	Nég
<i>SDS-I</i>									
42	A	62	100	0	> 400	64	3,2	7/11	> 400
89	A	76	400	0	> 400	82	6,0	2/11	> 400
69	A	79	200	0	> 400	82	8,2	4/11	> 400
94	A	81	200	0	> 400	82	6,0	1/10	> 400
35	A	81	100	0	> 400	64	5,7	1/10	> 400
74	A	82	25	0	> 400	64	3,0	7/11	> 400
68	A	88	25	0	> 400	82	6,0	3/11	> 400
64	A	88	100	0	> 400	71	5,5	3/11	> 400
56	A	90	400	0	> 400	64	2,6	1/11	/
88	A	93	400	0	> 400	43	9,0	4/10	> 400
58	A	98	50	0	> 400	89	5,7	8/11	> 400
84	A	114	50	0	> 400	64	3,0	1/11	> 400

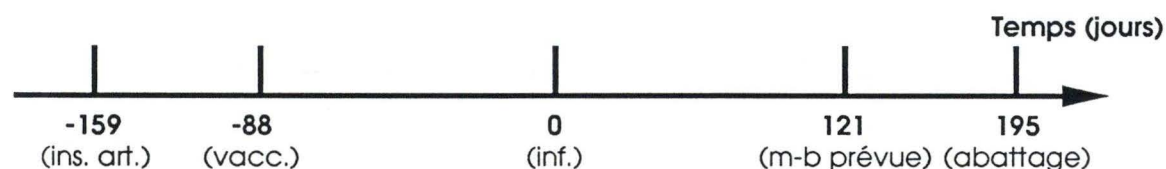
La première partie des résultats concerne la détection d'Ac spécifiques du LPS, l'intradermo-réaction et la bactériologie. Le bilan de ces résultats nous a été fourni. Aucune étude statistique n'ayant été réalisée à partir de ces données, la description de celles-ci est basée sur les tendances qui s'en dégagent.

La deuxième partie des résultats concerne la réponse humorale dirigée contre les protéines, qui fait l'objet de notre travail.

## I. RÉPONSE DIRIGÉE CONTRE LE LPS ET DONNÉES BACTÉRIOLOGIQUES

### I.1. Protocole de l'expérience

Vingt-six génisses gestantes ont été suivies lors d'une expérience visant à évaluer l'activité protectrice de la fraction SDS-I par rapport au vaccin B 19. L'infection a eu lieu au 5<sup>ème</sup> mois de la gestation et correspond au jour 0. L'insémination artificielle (I.A.) et la vaccination (vacc.), réalisée au 2<sup>ème</sup> mois de la gestation, ont dès lors eu lieu respectivement aux jours -159 et -88. La mise-bas (m-b) était prévue pour le jour 121. Les génisses ont été abattues au jour 195.



Les génisses ont été réparties en 3 groupes :

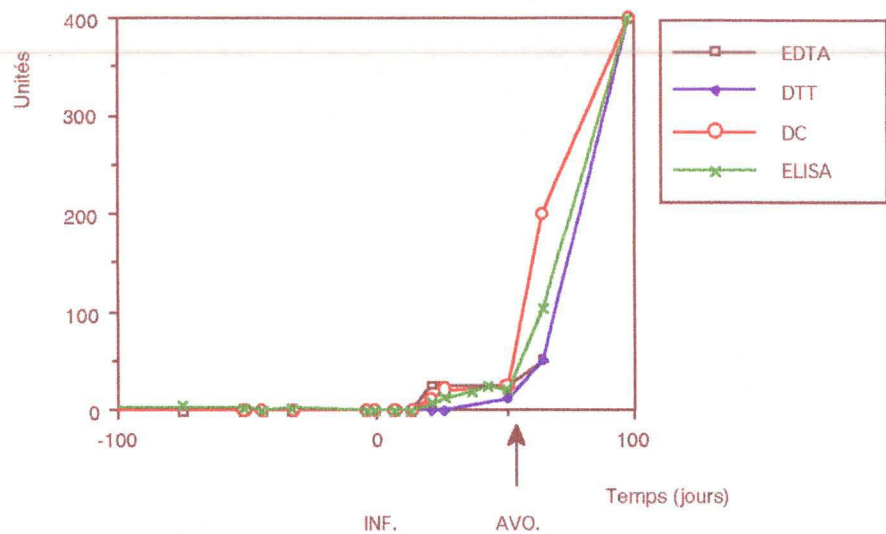
- Le premier groupe comprend 10 génisses vaccinées avec 150 millions de *B.abortus* souche 19 (= vaccin de référence) par voie sous-cutanée.
- Le deuxième groupe comprend 12 génisses vaccinées par voie sous-cutanée avec 9 mg d'un mélange 1/1 de fractions SDS-I préparées à partir des souches de *B.abortus* W99 et *B. melitensis* Rev1 .
- Le groupe témoin comprend 4 génisses non vaccinées, servant au contrôle de l'infection.

Les animaux des 3 groupes ont été infectés par  $16,6 \times 10^6$  de *B. abortus* 544 par voie conjonctivale.

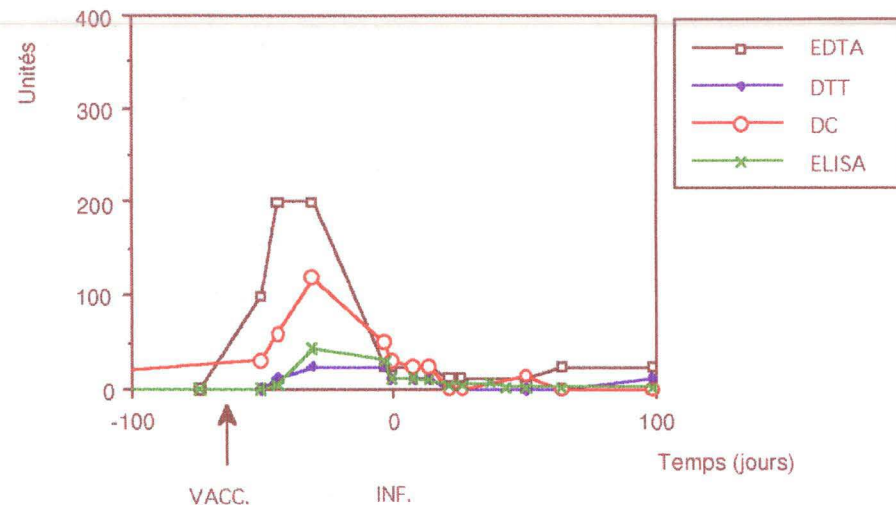
### I.2. Résultats de l'étude

Dans le **tableau 1** sont repris pour chaque groupe, le numéro de l'animal, si l'animal a avorté ou mené à terme sa gestation et le délai de l'avortement ou du vêlage exprimé en nombre de jours le séparant de l'infection.

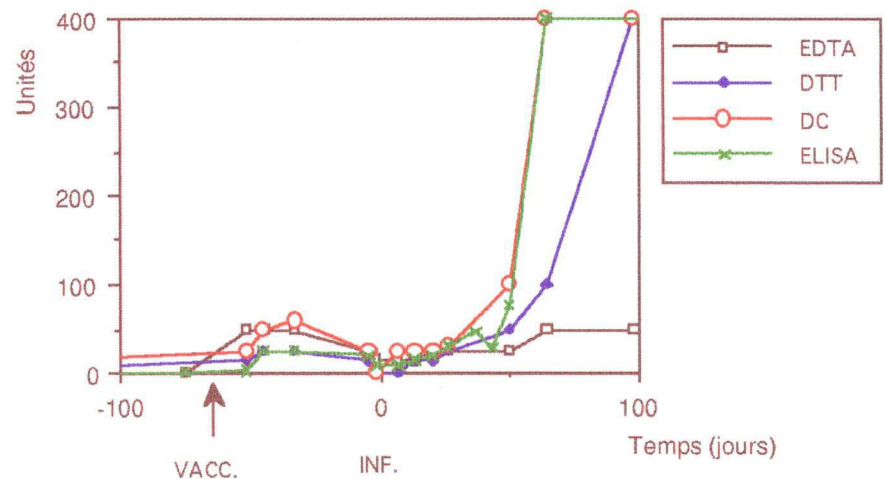
Les colonnes suivantes sont réservées aux résultats du test de déviation du complément (DC) au maximum de la réponse après vaccination, à l'intradermo-réaction (IDR) 35 jours après la vaccination, au test de déviation du complément au maximum de la réponse après l'infection, avec le nombre de jours nécessaires pour l'obtenir, et aussi à l'IDR réalisée après l'infection.



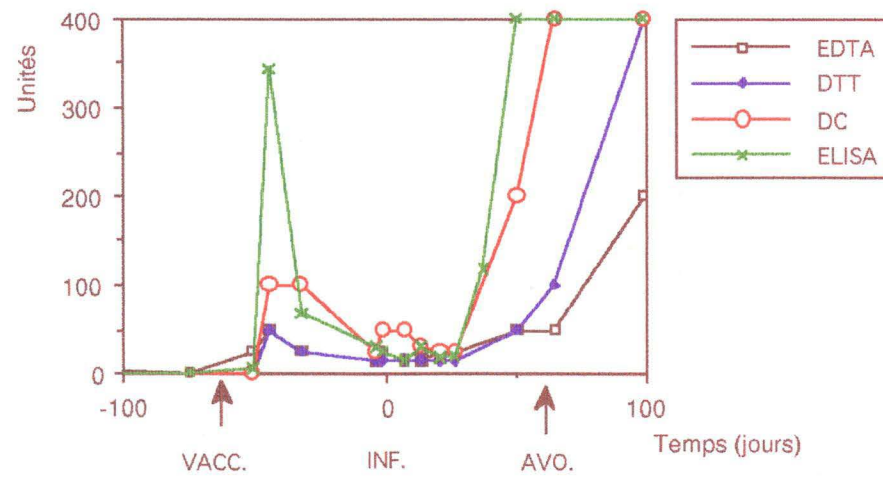
A



B



C



D

Figure 1 : Evolution des titres sérologiques observés chez les génisses 92 (A), 62 (B), 49 (C) et 35 (D) par les tests d'agglutination en présence d'EDTA (EDTA), d'agglutination après traitement des sérums par le dithiothréitol en présence du facteur rhumatoïde (DTT), le test de déviation du complément (DC) et l'ELISA indirect utilisant le LPS comme antigène (ELISA).

Ensuite sont mentionnés les résultats des cultures de ganglions, foie, rate et utérus exprimés par le nombre de cultures positives sur le total des prélèvements mis en culture.

Les résultats sérologiques du test de déviation du complément, à l'abattage, se trouvent en dernière colonne.

#### groupe témoin

- Les 4 génisses ont avorté
- Après l'infection, tous les animaux présentent des taux très élevés d'Ac anti-LPS. La cinétique d'apparition de ces anticorps a été étudiée par les tests classiques d'agglutination en présence d'EDTA, d'agglutination après traitement des sérums par le dithiothréitol (DTT) en présence du facteur rhumatoïde, le test de déviation du complément (DC) et l'ELISA indirect utilisant le LPS comme antigène. Un profil type pour ce groupe est présenté à la **figure 1A**. Il s'agit de l'évolution des titres observés pour la bête 92. Parmi les tests classiques, c'est le test de DC qui s'avère le plus sensible pour la détection des Ac anti-LPS. Cependant, l'ELISA LPS détecte plus précocément l'infection, 7 ou 15 jours après l'infection pour un seuil de positivité fixé à 2,5 UI (12 jours avant les tests classiques).
- La réponse à l'IDR est positive pour les 4 génisses après infection.
- Les génisses 79 et 33 présentent respectivement 1 et 8 prélèvements contaminés. Pour les génisses 85 et 92, aucune bactérie n'a été isolée dans les prélèvements. Toutefois, pour les 4 génisses, des bactéries ont été trouvées dans le lait et le mucus.
- A l'abattage, les résultats en Ac anti-LPS variables d'un animal à l'autre.

#### groupe vacciné B 19

- 6 vaches sur 10 ont mené une gestation à terme
- Le taux d'Ac anti-LPS après vaccination est très variable mais ne semble pas significativement différent pour le groupe des vaches ayant mis-bas et les vaches ayant avorté. Pour les vaches ayant avorté, la moyenne est de 97,5 et l'écart-type de 33, tandis que pour les génisses protégées, la moyenne est de 135 et l'écart-type de 133,5.
- On n'observe pas de relation entre l'intensité de la réponse due à l'IDR après vaccination et l'avortement ou le vêlage. Après l'infection, l'IDR est positive chez toutes les génisses.
- Les vaches 45, 3463 et 62 gardent un taux relativement bas d'Ac anti-LPS durant toute l'évolution et mènent leur gestation à terme. La cinétique d'apparition de ces Ac étudiée par les tests classiques est illustrée à la **figure 1B** pour la génisse 62. Le résultat des cultures sur les ganglions, le foie, la rate et l'utérus est négatif pour toutes les trois. Chez les vaches 3463 et 45, des bactéries ont été mises en évidence dans le lait et le mucus, tandis que chez la vache 62, ces résultats sont aussi négatifs.
- Les autres génisses présentent un taux important d'Ac anti-LPS après l'infection de même qu'à l'abattage. Le délai séparant la réponse vaccinale et la remontée du taux d'Ac après infection est difficile à fixer étant donné que le taux d'Ac ne redescend pas à 0 entre la vaccination et la réponse à l'infection. L'augmentation du taux d'Ac anti-LPS après infection a lieu entre le jour 50 et le jour 98 c'est-à-dire peu de temps avant la date des avortements ou mise-bas. Un profil type, celui de la génisse 49, est illustré à la **figure 1C**. Le premier test sérologique qui devient positif est l'ELISA (5 jours avant les tests classiques).

#### groupe vacciné avec la fraction SDS-I

- Toutes les vaches de ce groupe ont avorté mais l'avortement survient plus tardivement que pour les animaux du groupe témoin.
- Le taux d'anticorps anti-LPS après vaccination est très variable d'un animal à l'autre mais ne semble pas différent de celui du groupe B19. Pour le groupe vacciné B19, la moyenne est de 120 et l'écart-type de 103,2 tandis que pour le groupe vacciné avec la fraction SDS-I, la moyenne est de 170 avec un écart-type de 149,5.
- L'IDR est négative après vaccination chez toutes les vaches, ce qui s'explique puisque la fraction SDS-I contient principalement 2 protéines de la membrane externe et que le brucellergène utilisé est composé principalement des protéines cytoplasmiques. Après l'infection, l'IDR est positive chez toutes les génisses.
- Les taux d'Ac anti-LPS après infection et à l'abattage sont très élevés chez toutes les vaches. Un profil type, celui de la génisse 35 est illustré à la **figure 1D**. Le premier test sérologique augmentant après l'inoculation d'épreuve est le test ELISA (7 jours avant les tests classiques).  
Le taux d'Ac ne redescend pas à 0 après la vaccination. La remontée du taux d'Ac après infection a lieu pour tous les animaux du lot au jour 37, soit 25 jours avant le premier avortement.
- Le nombre de ganglions et d'organes contaminés est très variable d'un animal à l'autre mais, contrairement au groupe témoin et B19, toutes les génisses présentent, une carcasse contaminée.

## II. RÉPONSE HUMORALE DIRIGÉE CONTRE LES PROTÉINES

La réponse humorale dirigée contre les protéines a été étudiée en ELISA et en Immuno-Empreinte (IE). L'ELISA permet de détecter les Ac sériques dirigés contre un Ag bien précis, tandis que l'IE offre la possibilité d'élargir l'étude de la réponse humorale à un grand nombre de protéines.

En ELISA indirect, nous avons étudié la réponse humorale dirigée contre les PME de 16,5-19-25 et 36 kDa.

Les raisons du choix de l'utilisation de ces PME sont les suivantes :

- la fraction SDS-I contenant en majorité les PME 25 et 36, il est intéressant d'étudier l'influence de la vaccination avec cette fraction sur la réponse humorale dirigée contre ces 2 PME. En effet, ces résultats pourraient nous fournir un indice sur l'implication de ces 2 PME dans la protection.
- Une réponse sérologique dirigée contre les protéines 16,5-19-25 et 36 a été mise en évidence par Cloeckart et al. (1992) chez des bovins brucelliques par IE et ELISA de compétition.
- M. Leboutte (mémoire de licence, 1992) a montré que les PME de 16,5 et 19 kDa induisent la production d'Ac détectés chez un grand nombre d'ovins, caprins et bovins infectés naturellement par *Brucella*.

Grâce à l'ELISA de compétition, nous avons pu analyser la réponse spécifique d'une protéine de 15,7 kDa contre laquelle des AcM avaient été produits. L'ELISA indirect n'était pas envisageable puisque nous ne disposions pas de la protéine recombinante correspondante.

L'ELISA a l'avantage d'être un test très sensible, quantifiable, de consommer peu de matériel et de pouvoir être appliqué rapidement à un grand nombre de sérums.

L'IE est une technique moins précise, car plusieurs protéines de même MM ne peuvent être différenciées; bien que difficilement quantifiable l'IE nous a permis d'analyser la réponse humorale dirigée contre un grand nombre de protéines de la bactérie.

### II. 1. Réactivité des protéines recombinantes

Avant d'utiliser les protéines recombinantes de *Brucella* en ELISA indirect pour tester les sérums des génisses de l'expérience (point II.2.), nous avons dans un premier temps voulu nous assurer que celles-ci étaient bien antigéniques en testant leur réactivité avec des AcM dirigés spécifiquement contre chaque PME utilisée.

Les protéines recombinantes dont nous disposons sont conservées dans du tampon guanidine 6 M, un agent dénaturant dans lequel les protéines sont solubles. Afin donc de s'assurer que les protéines recombinantes sont bien réactives après dilution dans le tampon de sensibilisation et adsorption sur le fond des puits, pour l'ELISA indirect et, après dilution et chauffage dans du tampon échantillon contenant du bleu de bromophénol avec  $\beta$  mercaptoéthanol, pour l'IE, nous avons testé les AcM anti-16,5-19-25 et 36 en ELISA indirect et en IE utilisant les protéines recombinantes comme antigènes.

Pour l'ELISA indirect, les plaques ont été sensibilisées avec 100  $\mu$ l par puits d'une solution à 1  $\mu$ g/ml de la PME. Chaque AcM ayant été testé en double, la valeur reprise dans le tableau correspond à la moyenne des DO observées avec chaque AcM à la dilution 1/3. Pour chaque PME, un AcM spécifique d'une autre PME est inclus comme témoin négatif.

En IE, l'absence de signal est exprimé par un - et en cas de réponse, l'intensité de celle-ci est exprimée par + ou ++.

#### PME 36

AcM	ELISA indirect DO observée	IE sur protéine recombinante
4D11G1	1,7	+
25G5A5	0,02	-
8D8C7	0,55	+
13G2C4	1,3	+
11E5D11	1,4	+
3H2B1	0,03	-
contrôle (anti-25)	0,05	-

**PME 25**

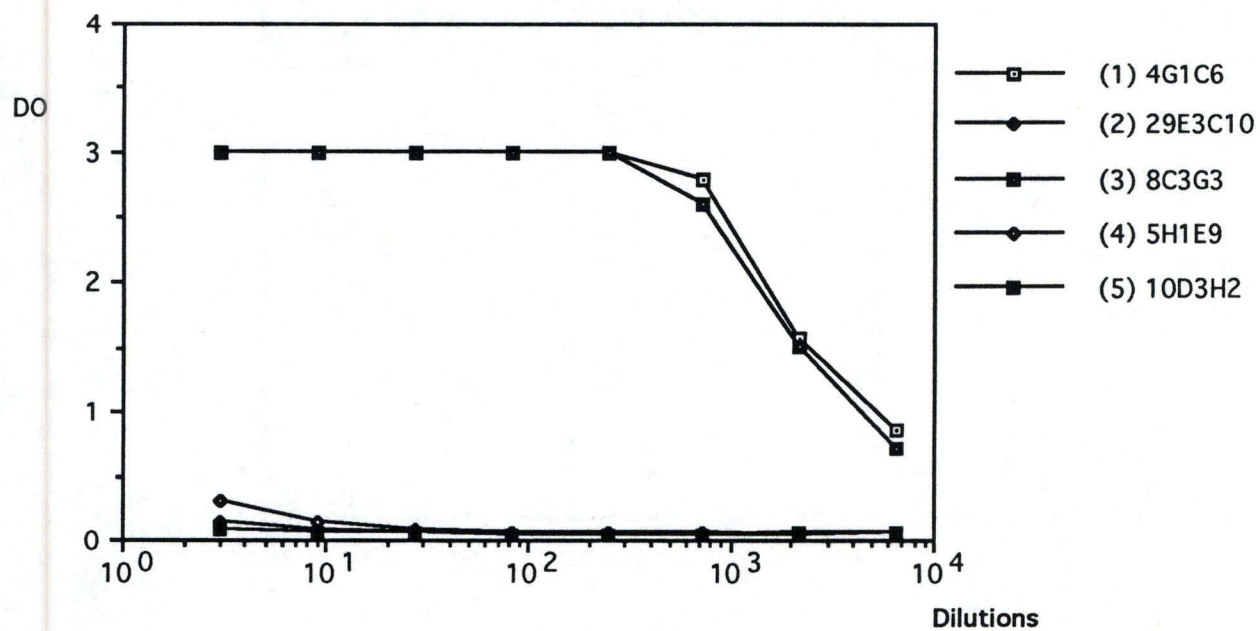
AcM	ELISA indirect DO observée	IE sur protéine recombinante
9F4B11	1	++
15H7E7	1,3	++
12H9A5	1,6	+
18H9A2	1,6	++
7D11B3	0,06	±
1C6E1	0,04	-
13D2F5	2,9	++
4B10F5	0,04	+
28G6C7	1,2	+
2F4F1	2,2	+
6B5A7	0,03	+
contrôle (anti-36)	0,04	-

**PME 19**

AcM	ELISA indirect DO observée	IE sur protéine recombinante
10D3H2	2,7	++
12F2D6	2,8	++
25H10A5	2,7	++
18B2D6	2,8	++
5C10A8	>3	++
2A4A7	2,7	++
contrôle (anti-16,5)	0,09	-

**PME 16,5**

AcM	ELISA indirect DO observée	IE sur protéine recombinante	IE sur extrait 45/20 MM de la prof.(kDa)
29E3C10	0,09	-	15,7
5H1E9	0,18	-	15,7
4G1C6	>3	++	16,5
8C3G3	>3	++	16,5
4E3B7	>3	++	16,5
contrôle (anti-19)	0,06		



**Figure 2.** Réactivité de la PME 16,5 recombinante en ELISA indirect avec les AcM anti-16,5

- (1) AcM anti-16,5 4G1C6
- (2) AcM anti-16,5 8C3G3
- (3) AcM anti-16,5 5H1E9
- (4) AcM anti-16,5 29E3C10
- (5) AcM anti-19

### PME recombinante 36

Tous les AcM anti-36 se fixent sur la protéine recombinante en ELISA indirect, sauf le 3H2B1 et le 25G5A5. Cependant, les DO observées ne sont pas très élevées comparé à celles observées avec les AcM anti-19 sur la PME 19, et ce, même en augmentant la concentration de sensibilisation à 3 et 10 µg/ml (non montré).

La non-réactivité des AcM 3H2B1 et 25G5A5 s'explique puisque P. de Wergifosse (Thèse de doctorat, 1992) a localisé l'épitope reconnu par l'AcM 3H2B1 dans la région N-terminale, qui n'est pas présente dans la protéine recombinante.

Quant à l'AcM 25G5A5, il reconnaît un épitope conformationnel. En effet, en ELISA sur cellules entières, l'Ac se fixe très bien; par contre, en IE utilisant la fraction SDS-I non chauffée dans le SDS comme antigène, cet AcM révèle fortement une bande de MM élevée (>92 kDa) et faiblement le triplet révélé par tous les AcM anti-36. Cette bande disparaît quand la fraction SDS-I est chauffée 10 minutes à 100°C et le marquage du triplet ne s'intensifie pas. Elle correspond probablement au trimère constituant la porine, décrit par Moriyon et Berman (1983).

### PME recombinante 25

Les résultats obtenus suggèrent que la PME 25 après dilution dans le tampon de sensibilisation et adsorption sur le fond des puits ne se replierait pas correctement. En effet, excepté pour 2 AcM, les DO obtenues en ELISA indirect sont relativement faibles. Les AcM 4B10F5 et 6B5A7 ne reconnaissent pas en ELISA indirect la protéine alors qu'ils la reconnaissent en IE.

Quant à l'AcM 7D11B3, il ne reconnaît pas son épitope en ELISA indirect et très faiblement en IE.

### PME recombinante 19

Tous les AcM qui selon les IE réalisées auparavant reconnaissent une bande d'une MM de 19 kDa dans des extraits de *Brucella 45/20*, se fixent sur la protéine recombinante en ELISA indirect et en IE. Les DO observées en ELISA indirect sont élevées et le signal détecté en IE est intense, ce qui laisse supposer que cette PME a retrouvé une conformation proche de la conformation native ou que les AcM reconnaissent des épitopes continus.

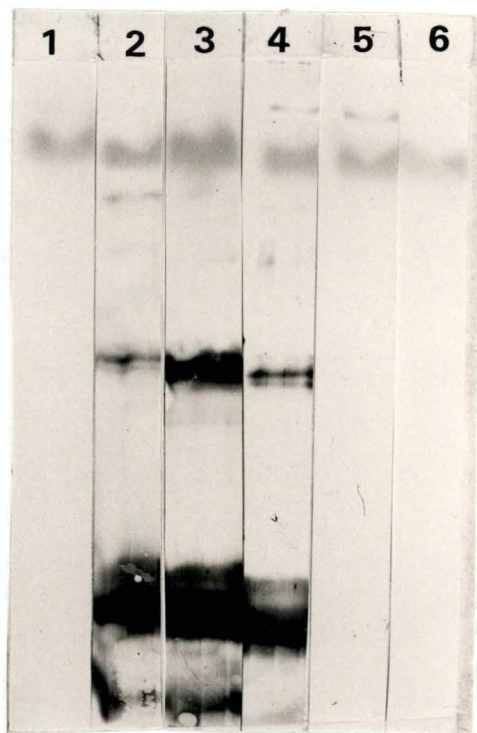
### PME recombinante 16,5

En ELISA indirect sur la PME de 16,5 kDa, nous constatons que 2 AcM (5H1E9 et 29E3C10) qui reconnaissent une bande d'une MM de 16,5 kDa dans des extraits de *Brucella 45/20* comme les 3 autres AcM (4G1C6-8C3G3-4E3B7), ne reconnaissent pas la protéine recombinante.

La **figure 2** illustre les évolutions des DO observées pour ces AcM en fonction de leur dilution dans le test. Les AcM 5H1E9 et 29E3C10 présentent un signal qui est quasi nul, tout comme l'AcM anti-19 (10D3H2) qui est le témoin de la spécificité du test.

La réactivité de ces AcM a également été vérifiée en IE afin de tester si la non-réactivité en ELISA ne serait pas due à un repliement incorrect de la protéine.

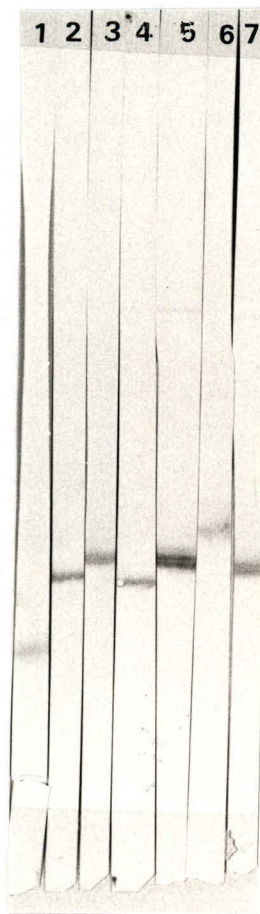
La qualité des préparations d'AcM a enfin été contrôlée sur des extraits de *Brucella 45/20*.



**Figure 3.** : Réactivité de la PME 16.5 recombinante en IE avec les AcM anti-16.5

piste 1 : AcM anti-19  
piste 2 : AcM anti-16,5 4G1C6  
piste 3 : AcM anti-16,5 8C3G3  
piste 4 : AcM anti-16,5 4E3B7  
piste 5 : AcM anti-16,5 5H1E9  
piste 6 : AcM anti-16,5 29E3C10

---



**Figure 4 :** Réactivité des AcM anti-16,5 sur extrait de *Brucella* 45/20 en IE

- piste 1 : AcM anti-10
- piste 2 : AcM anti-16,5 29E3C10
- piste 3 : AcM anti-16,5 4G1C6
- piste 4 : AcM anti-16,5 5H1E9
- piste 5 : AcM anti-16,5 8C3G3
- piste 6 : AcM anti-19
- piste 7 : AcM anti-16,5 4E3B7

## Réactivité de la PME 16,5 recombinante en IE avec les AcM anti-16,5

Les 5 AcM anti-16,5 sont testés par IE sur la PME de 16,5 kDa (**figure 3**). Les résultats confirment ceux obtenus en ELISA indirect, à savoir que seuls 3 AcM (4G1C6-8C3G3 et 4E3B7) reconnaissent la protéine. Une bande intense et deux bandes mineures, d'une MM supérieure et inférieure à la bande majeure, sont observées. La bande intense correspondrait à une MM de 20 kDa. La bande mineure de faible MM pourrait s'expliquer par la présence de produits de dégradation. La bande de MM supérieure, pourrait correspondre à la liaison de plusieurs unités protéiques par des ponts disulfures.

## Réactivité des AcM anti-16,5 sur extrait de *Brucella* 45/20 en IE

Les 5 AcM anti-16,5 sont testés sur des *Brucella* 45/20 lysées dans du SDS (**figure 4**). Les 3 AcM (4G1C6, 8C3G3 et 4E3B7) qui se fixent sur la protéine recombinante, reconnaissent une protéine de MM supérieure à celle reconnue par les 2 autres AcM (29E3C10 et 5H1E9). Les bandelettes n°1 et 6 ont été incubées respectivement avec un AcM anti-10 et un anti-19. Celles-ci ont servi au contrôle du test et ont permis d'estimer la MM de la protéine reconnue par les AcM 29E3C10 et 5H1E9. La MM de cette protéine a été estimée à 15,7 kDa. La MM de la protéine reconnue par les 3 autres AcM est bien de 16,5 kDa.

Nous émettons dès lors l'hypothèse que les deux familles d'AcM présentant une réactivité différente, reconnaissent 2 protéines distinctes de MM proche.

Pour la clarté de l'exposé, les AcM reconnaissant la protéine recombinante seront appelés AcM anti-16,5 et les 2 AcM détectant en IE sur extrait 45/20 une protéine dont la MM a été estimée à 15,7 kDa, les AcM anti-15,7.

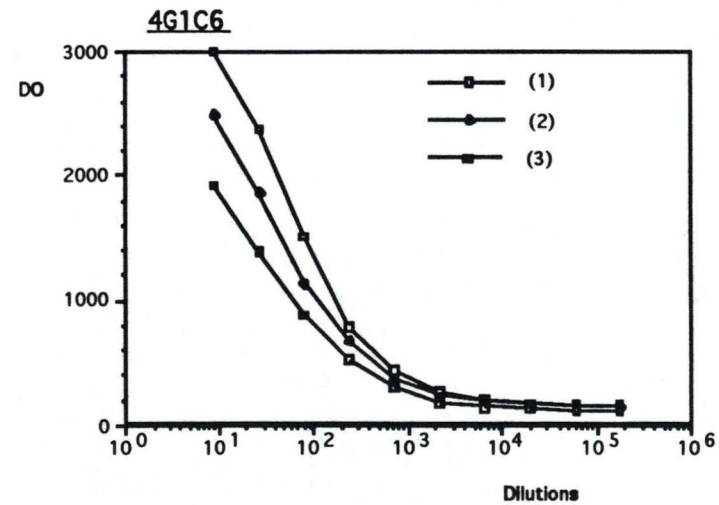
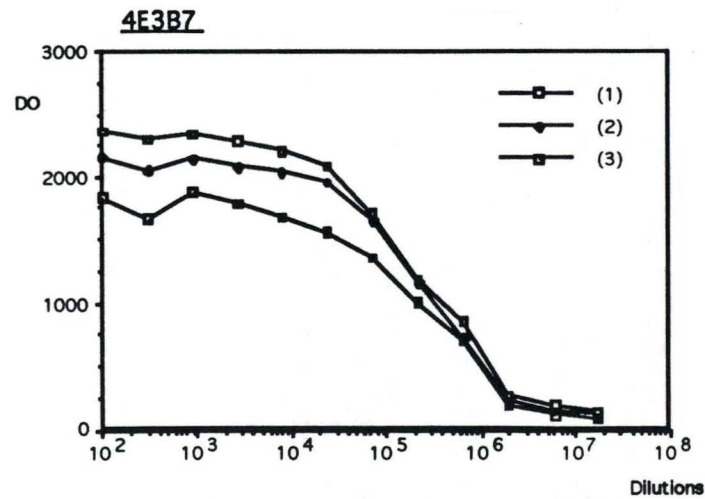
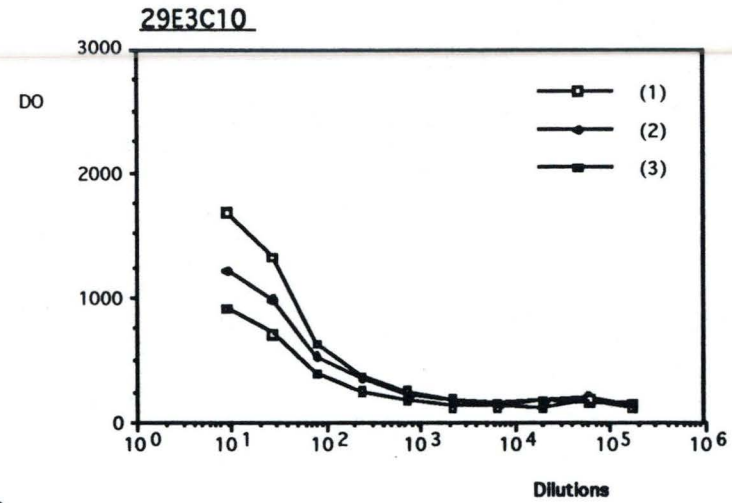
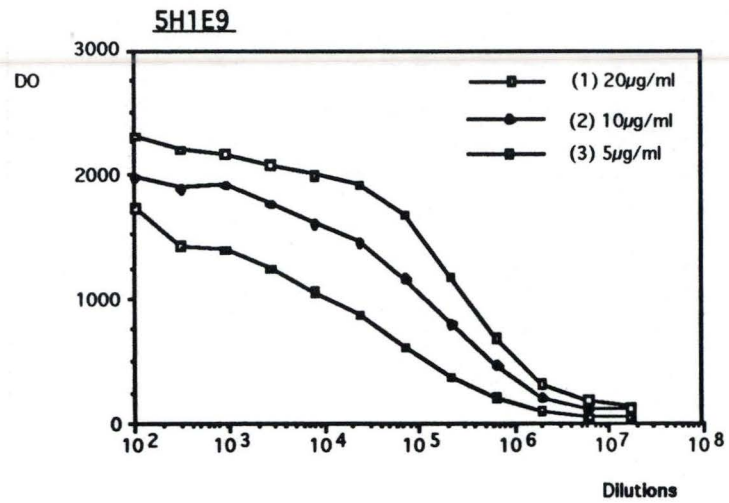
## **II.2. ELISA indirect et ELISA de compétition**

### II.2.1. Mise au point

#### II.2.1.1. *ELISA indirect*

Pour étudier la réponse humorale contre les PME de 16,5-19-25 et 36 kDa, nous avons sensibilisé les plaques avec les protéines recombinantes correspondantes. La pureté élevée de ces dernières (> 99 %) nous permet de supposer que la réponse observée en ELISA indirect correspond bien à la réponse dirigée contre la protéine utilisée.

Cependant, certains AcM anti-16,5, 19, 25 et 36 testés en ELISA indirect, se fixent sur des parois d'*E. coli* O:157. Les épitopes reconnus par ces AcM ne seraient donc pas spécifiques du genre *Brucella*. De plus, la PME 16,5 présente une similarité de 40,7 % dans sa séquence en AA, déduite de la séquence du gène, avec une lipoprotéine d'*E.coli*. Ces constatations indiquent qu'il existerait des épitopes communs entre ces PME de *Brucella* et des protéines d'*E. coli*. Un épuisement des sérums avec des extraits d'*E.coli* a donc été réalisé, lors de la dilution des sérums, en vue de neutraliser les Ac reconnaissant des épitopes communs à *E. coli* et *Brucella*.



**Figure 5 :** Fixation des AcM 5H1E9 (A), 29E3C10 (B), 4E3B7 (C) et 4G1C6 (D) en présence de sérum normal sur des parois B115 aux concentrations de 20 µg/ml (1), 10 µg/ml (2) et 5 µg/ml (3).

#### - choix du type de plaque

Deux types de plaques ont été comparés : les plaques Nunc 69620 (plaques non traitées) utilisées pour l' ELISA LPS, et les plaques Maxisorp (Nunc) traitées pour augmenter leur capacité à fixer les protéines. Les plaques 69620 ont été choisies car avec les plaques Maxisorp, nous avons observé des DO élevées avec des sérums négatifs ainsi que pour des AcM non spécifiques de la protéine recombinante, sans augmentation du pouvoir de discrimination. Ceci, quelle que soit la concentration d'Ag de sensibilisation utilisée.

#### - détermination de la concentration de sensibilisation optimale

Les protéines recombinantes ont été diluées dans du tampon GBS 0,054 M pH 9,2 de manière à obtenir une concentration finale de 0,5, 1, 3, et 10  $\mu\text{g/ml}$ . Les DO observées pour la fixation d'AcM spécifiques n'augmentent que peu de 1 à 3 et 10  $\mu\text{g/ml}$ . La concentration de 1  $\mu\text{g/ml}$  a été choisie pour les quatre protéines recombinantes.

#### II.2.1.2. ELISA de compétition

A. Cloeckert (1992) a montré que les sérums de 35 % des bovins infectés contenaient des Ac qui inhibaient la fixation de l'AcM 29 E3C10 sur des parois cellulaires et que la fixation de ce même AcM était inhibée par les Ac sériques d'un taureau infecté, contrairement à l'AcM 4G1C6. Nous avons dès lors utilisé les AcM anti-16,5 (4G1C6 et 4E3B7) et les AcM anti-15,7 (29E3C10 et 5H1E9) afin d'évaluer la présence d'Ac dirigés contre ces 2 épitopes dans les sérums.

#### - détermination de la concentration de paroi optimale pour la sensibilisation des plaques et de la concentration optimale des AcM

Les parois B115, diluées dans du tampon GBS 0,054 M pH 9,2 de manière à obtenir des concentrations finales de 20-10-5  $\mu\text{g/ml}$  ont été utilisées pour la sensibilisation des plaques.

Les 4 AcM, à des dilutions croissantes dans du tampon GBS-EDTA-Tween contenant 2% de sérum négatif, ont été testés aux différentes concentrations de sensibilisation (*figure 5*).

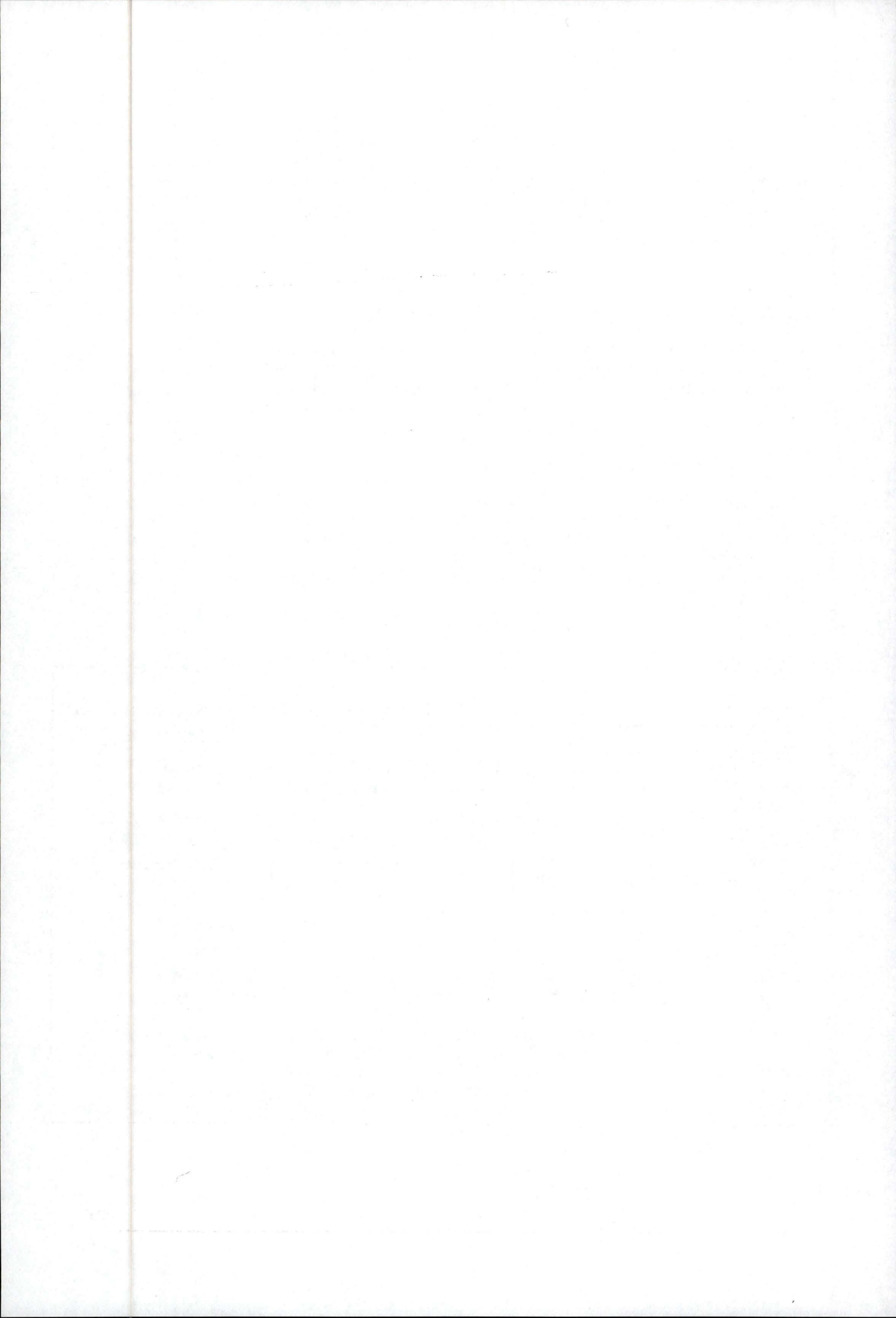
Les concentrations minimales en AcM donnant une DO de  $\pm 1,5$  sont retenues. Pour les 4 AcM, la concentration optimale était de 20  $\mu\text{g/ml}$  de parois B115. Les AcM sont utilisés aux dilutions suivantes : 1/220000 pour les AcM 4E3B7 et 5H1E9, 1/81 pour le 4G1C6 et 1/26 pour l'AcM 29E3C10.

#### - détermination du seuil de positivité pour les 4 AcM

Ce seuil a été établi sur base des DO observées suite à la fixation des AcM en présence de sérums négatifs prélevés avant vaccination et infection. Ceux-ci ont été testés en double.

A la moyenne des DO obtenues sur ces présaignées, on a soustrait la valeur correspondant à 3 écarts-types. A partir de la valeur obtenue, on a établi le seuil de positivité en calculant le pourcentage d'inhibition correspondant. *expliquer*

Lorsque le pourcentage d'inhibition obtenu avec un sérum est supérieur au seuil de positivité, on considèrera que les anticorps contenus dans ce sérum inhibent la fixation de l'AcM de manière significative.



Le tableau ci-dessous reprend les valeurs obtenues pour chaque AcM testé.

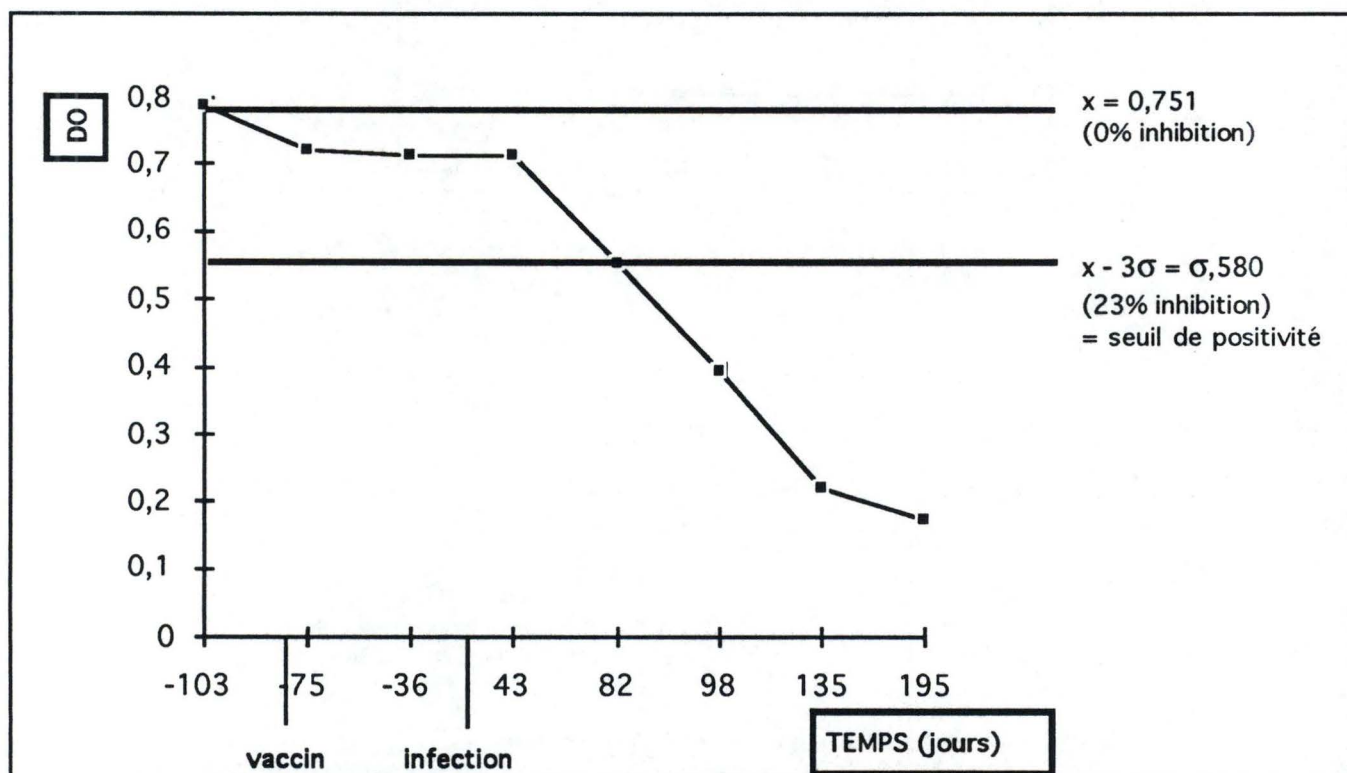
AcM	n*	x**	$\sigma^\circ$	x-3 $\sigma$	% d'inhibition
29E3C10	27	0,751	0,057	0,580	23
5H1E9	22	1,133	0,160	0,651	43
4G1C6	27	1,087	0,060	0,907	17
4E3B6	22	0,880	0,060	0,700	20

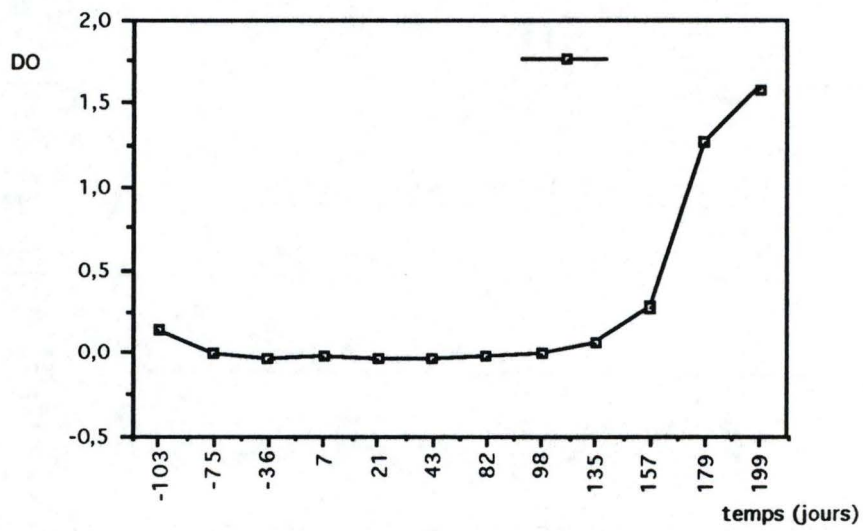
n\* : nombre de présaignées testées  
 x\*\* : moyenne des DO obtenues  
 $\sigma^\circ$  : écart-type

L'évolution du taux d' Ac sériques inhibant l'AcM 29E3C10 est illustrée ci-dessous. Le premier graphique représente l'évolution des DO en fonction du temps. Celui du bas illustre l'évolution du % d'inhibition en fonction du temps. Pour chaque graphique, le seuil de positivité est représenté.

Génisse 94 avec AcM E3C10

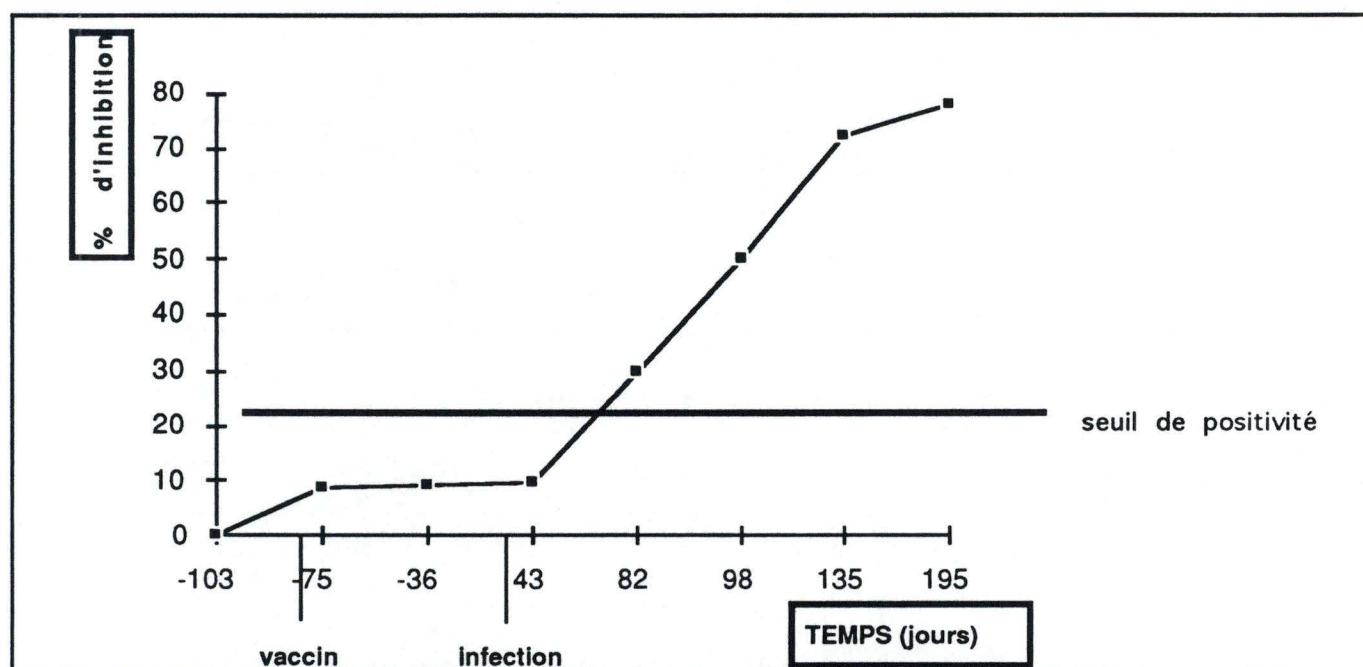
Evolution des DO en fonction du temps





**Figure 6 :** Evolution en ELISA indirect des taux d'Ac anti-PME 19 pour la génisse 94

## Evolution du pourcentage d'inhibition en fonction du temps



### II.2.2. Résultats

#### II.2.2.1. Réponse sérologique spécifique des PME MAJEURES

##### **PME 25 et 36**

Deux présaignées et 3 saignées après infection (82, 110, et 157 jours après infection) pour lesquelles les taux d'Ac anti-LPS sont élevés, ont été testées en ELISA indirect pour 7 animaux (33-79-92-81-93--58-35) représentatifs des 3 groupes de génisses.

Aucun animal n'a présenté de D.O. plus élevées après infection que pour les présaignées, pour aucune des 2 PME. Le signal obtenu sur la protéine témoin est faible comparé à celui obtenu sur la protéine recombinante.

Pour la PME 25, excepté chez les vaches 33 et 35, les DO obtenues pour les présaignées étaient mêmes plus élevées que celles obtenues pour les saignées après infection. L'épuisement du sérum avec *E.coli* n'a pas amélioré la spécificité : le signal obtenu pour les présaignées, malgré l'épuisement, était toujours supérieur à celui obtenu pour les saignées.

La réponse immunitaire dirigée contre ces 2 PME semble négligeable, ces protéines utilisées telles quelles ne sont probablement pas des outils intéressants dans l'étude de la réponse humorale, c'est pourquoi nous n'avons pas poursuivi leur étude.

#### II.2.2.2. Réponse sérologique spécifique des PME MINEURES

En ELISA indirect, 63 % et 37 % des bovins infectés naturellement développaient des Ac dirigés respectivement contre les protéines recombinantes de 19 et 16,5 kDa (M. Leboutte : mémoire de licence, 1992). Nous avons dès lors cherché chez tous les animaux la présence d'Ac dirigés contre ces 2 PME.

## Réponse sérologique spécifique de la PME 16,5 et effet de l'épuisement

### TABLEAU 2 : GROUPE TÉMOIN

n° bête	délai de l'A (J après infection)	Rép. précoce DO max (délai)	Rép. tardive DO max (délai)	Epuisement
85	41	-	-	-
33	43	-	0,9 (82)	-
92	54	-	-	-
79	61	-	0,33 (135)	0
Animaux répondant (%)		0	50	

### TABLEAU 3 : GROUPE B19

n° bête	Rép. vaccin. DO max.	délai de l'A/V (J après infection)	Rép. précoce DO max (délai)	Rép. tardive DO max (délai)	Epuisement
<i>Avortement</i>					
60	0,25	45	-	-	=
81	-	85	-	0,4 (135)	=
67	-	86	-	-	-
41	0,23	89	0,89 (43)	0,98 (98)	-
Animaux répondant (%)	50		25	50	
<i>Gestation à terme</i>					
93	-	109	-	-	-
91	-	119	-	-	-
49	-	121	-	0,22 (135)	=
45	0,59	124	0,6(43)	0,72 (135)	-
3463	0,33	126	0,31(43)	0,84 (199)	-
62	0,2	126	-	-	0
Animaux répondant (%)	50		33,3	50	

### TABLEAU 4 : GROUPE SDS-I

n° bête	Rép. vaccin. DO max.	Délai de l'A (J après infection)	Rép. précoce DO max (délai)	Rép. tardive DO max (délai)	Epuisement
<i>Avortement</i>					
42	-	62	-	0,47 (82)	-
89	-	76	1,1 (43)	-	-
69	-	79	-	0,5(135)-	0
94	-	81	-	0,89(82)/1,39(199)	-
35	-	81	-	0,20 (98)	0
74	-	82	-	0,24 (98)	0
68	-	88	-	0,34 (135)	-
64	-	88	-	0,30 (98)	=
56	-	90	-	-	-
88	-	93	-	-	-
58	-	98	-	0,90 (135)	-
84	-	114	0,51 (43)	-	-
Animaux répondant (%)	0		16,6	66,6	

= : pas d'effet  
 0 : annule le signal  
 - : signal plus faible

Les sérums testés ont été prélevés aux jours suivants :

- au jour -103, qui correspond à la saignée avant la vaccination
- au jour -75 (14 jours après la vaccination) et au jour -36 (51 jours après la vaccination)
- après l'infection et jusqu'à l'abattage, c'est-à-dire aux jours 7, 21, 43, 82, 98, 135, 157, 179 et 195 jours.

### **PME.19**

Les sérums n'ont pas été épuisés par des extraits d'*E.coli* puisque lors de l'étude préliminaire, aucune diminution du signal n'a été observée après épuisement. Les D.O. observées sur la protéine témoin HIV sont faibles comparé à celles observées sur la PME 19.

Seule la bête 94, vaccinée avec la fraction SDS-I, présente une augmentation significative du taux d'Ac (**figure 6**). La DO atteint 1,5 au jour 199.

Pour les autres animaux, aucune évolution du taux d'Ac anti-19 au cours du temps n'a été observée.

### **PME.16.5**

#### **Réponse sérologique spécifique de la PME16,5 par ELISA indirect**

L'étude préliminaire ayant montré que l'épuisement avec des extraits d'*E.coli* améliorerait la spécificité du test, les sérums de tous les animaux ont été testés en ELISA indirect avec et sans épuisement par *E.coli* sur la PME de 16,5 kDa et sur la protéine contrôle.

Les résultats des DO obtenues avec les sérums non épuisés et de l'effet de l'épuisement sont synthétisés dans les **tableaux n° 2, 3 et 4** pour les 3 groupes d'animaux.

Le délai de l'avortement est exprimé par le nombre de jour le séparant de l'infection.

La réponse induite par la vaccination est exprimée par la D.O. maximale observée.

Toutes les réponses positives sont apparues 14 jours après la vaccination.

La réponse à l'infection, décomposée en réponse précoce (avant l'avortement ou la mise-bas) ou tardive (après l'avortement ou la mise-bas) est caractérisée par la D.O. maximale observée. Le délai séparant l'infection de la réponse en Ac, exprimé en jours, est indiqué entre parenthèses. La dernière colonne résume l'effet obtenu par l'épuisement avec *E.coli* aussi bien pour la réponse vaccinale que pour la réponse infectieuse.

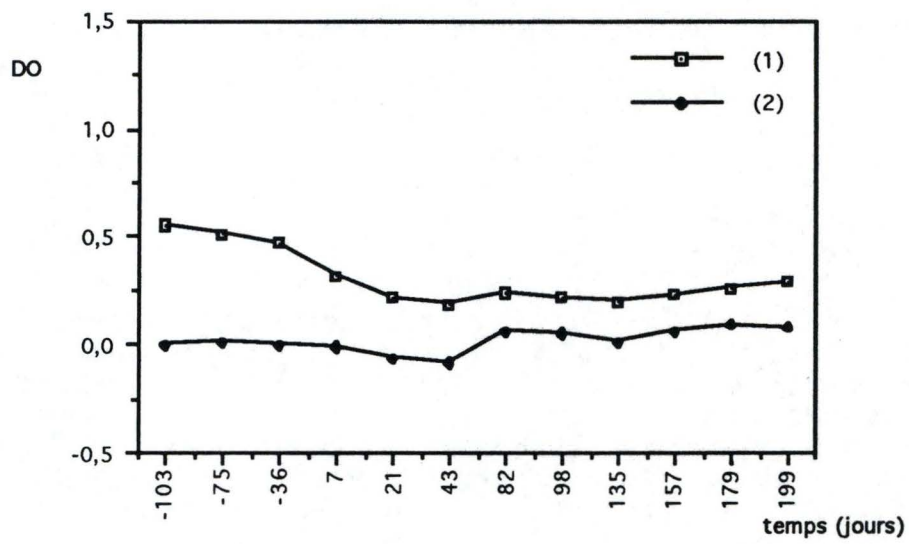
Trois effets différents ont été observés :

- l'épuisement par *E. coli* a annulé le signal (0)
- l'intensité du signal observé est diminué mais l'évolution de la DO n'est pas altérée (-)
- l'épuisement n'a aucun effet et les 2 courbes sont superposables (=)

Le pourcentage d'animaux chez qui la vaccination et l'infection induit une production d'Ac est calculé par groupe.

Après la vaccination avec la souche B19, 50 % des animaux ayant avorté et 50% des animaux ayant mené leur gestation à terme présentent une réponse en Ac anti-16.5, mais les taux d'Ac sont très faibles.

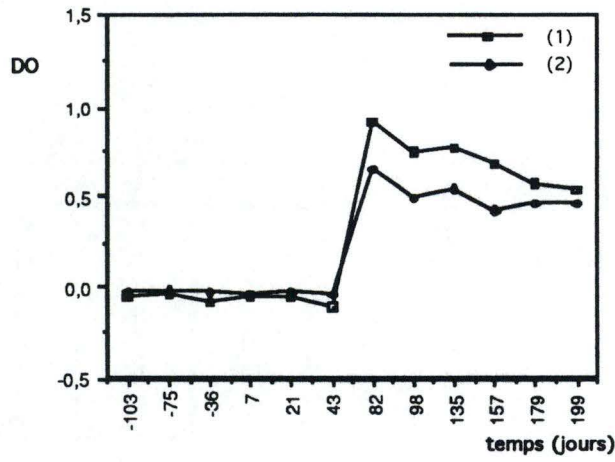
Aucun animal vacciné avec la fraction SDS-I n'a réagi suite à la vaccination. Ce résultat était prévisible puisque la fraction SDS-I, en principe, ne contient pas la PME 16.5.



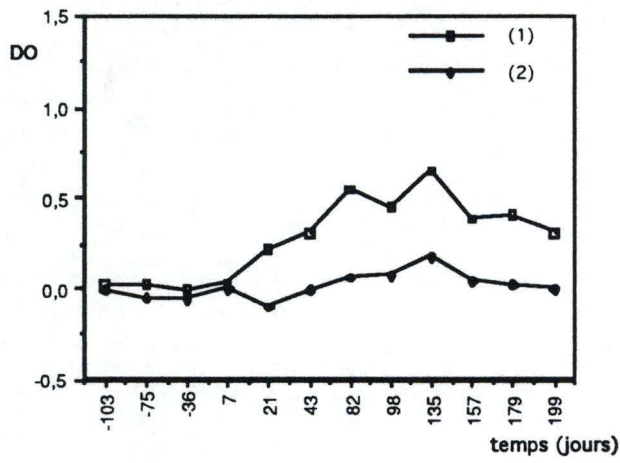
**Figure 7 :** Evolution des taux d'anticorps dirigés contre la PME 16,5 en ELISA indirect sur la PME 16,5 recombinante pour la génisse 92

- (1) sérums non épuisés par E.coli
- (2) sérums épuisés par E.coli

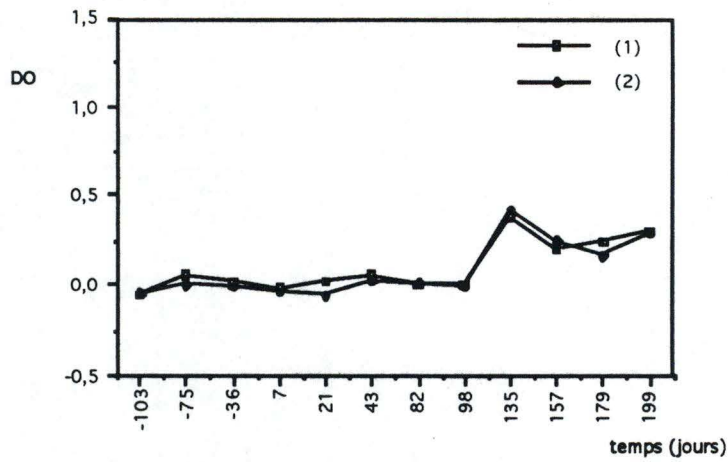
A)



B)



C)



**Figure 8 :** Evolution des taux d'anticorps dirigés contre la PME 16,5 en ELISA indirect sur la PME 16,5 recombinante pour les génisses 33 (A), 79 (B) et 81 (C)  
 (1) sérums non épuisés par E.coli  
 (2) sérums épuisés par E.coli

**Étude comparative de la réponse sérologique spécifique des PME 15,7 et 16,5 par ELISA de compétition**

**TABLEAU 5**

**GROUPE TÉMOIN**

n° bête	Avortement (J)	Délai d'apparition de la réponse infectieuse (Jours)				Inhibition maximale (%)						
		AcM anti-15,7		AcM anti-16,5		AcM anti-15,7		AcM anti-16,5				
		29E3C1	5H1E9	4G1C6	4E3B7	29E3C10	5H1E9	4G1C6	4E3B7			
85	41	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	43	82	82	82	82	59	88	19	53	-	-	-
92	54	98	98	-	-	67	91	-	-	-	-	-
79	61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Animaux positifs (%)						50	50	25	25			

**GROUPE B19**

n° bête	Av./Vél. (jours)	Réponse vaccinale (% Inhibition)				Délai de la réponse infectieuse (jours)				Inhibition maximale (%)			
		AcManti-15,7		AcManti-16,5		AcManti-15,7		AcManti-16,5		AcManti-15,7		AcManti-16,5	
		29E3C1	5H1E9	4G1C6	4E3B7	29E3C1	5H1E9	4G1C6	4E3B7	29E3C1	5H1E9	4G1C6	4E3B7
<i>Avortement</i>													
60	45	-	-	-	-	82	82	82	82	72	93	47	56
81	85	-	-	-	-	98	82	-	135	69	93	-	41
67	86	-	-	-	-	82	82	98	199	75	94	45	52
41	89	33	68	-	-	82	43	199	98	84	93	23	45
Animaux positifs (%)		25	25							100	100	75	100
<i>Gestation à terme</i>													
93	109	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
91	119	-	-	-	-	98	98	199	135	49	91	22	24
49	121	-	-	-	-	98	82	135	-	43	79	26	-
45	124	24	-	18	24	-	-	-	43	-	-	-	39
3463	126	-	-	-	-	199	-	199	199	27	-	33	63
62	126	-	47,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Animaux positifs (%)		16,6	16,6	16,6	16,6					50	33,3	50	50

**GROUPE SDS-I**

n° bête	Av./Vél. (jours)	Réponse vaccinale (% Inhibition)				Délai de la réponse infectieuse (jours)				Inhibition maximale (%)			
		AcManti-15,7		AcManti-16,5		AcManti-15,7		AcManti-16,5		AcManti-15,7		AcManti-16,5	
		29E3C1	5H1E9	4G1C6	4E3B7	29E3C1	5H1E9	4G1C6	4E3B7	29E3C1	5H1E9	4G1C6	4E3B7
42	62	-	-	-	-	82	82	82	82	60	88	20	23
89	76	-	-	-	-	43	82	43	43	62	90	28	35
69	79	-	-	-	-	82	82	43	135	62	92	-	29
94	81	-	-	-	-	98	98	82	82	88	94	36	60
35	81	-	-	-	-	82	82	43	135	48	81	20	29
74	82	-	-	-	-	82	82	-	-	48	91	-	-
68	88	-	-	-	-	82	82	-	-	57	89	-	-
64	88	-	-	-	-	135	98	135	135	-	75	18	28
56	90	-	-	-	-	82	82	82	98	73	93	43	49
88	93	-	-	-	-	43	43	-	135	61	91	-	28
58	98	-	-	-	-	98	98	135	135	74	91	36	66
84	114	-	-	-	-	43	43	43	43	59	91	22	22
Animaux positifs (%)		0	0	0	0					95	100	66,6	83,3

Après l'infection, parmi les animaux chez qui on détecte des Ac anti-16,5, 3 types d'évolution sont observés :

- la réponse est tardive chez 69 % des animaux (ces animaux appartiennent aux 3 groupes)
- la réponse est précoce chez 13 % des animaux (ceux-ci font partie du groupe SDS-I)
- l'évolution est bimodale chez 18 % des animaux (ceux-ci font partie du groupe B19)

Les DO observées ne sont pas élevées, elles ne dépassent pas 1,4.

La génisse 92 présente un profil en anticorps particulier (**figure 7**) qui n'est pas suggéré par le tableau. La DO de la présaignée (jour -103) est de 0,6. Le signal diminue jusque 43 jours après l'infection et ensuite reste stable. L'épuisement avec E.coli annule le signal initial et il semble qu'à partir du jour 43, une très faible réponse spécifique soit détectée.

L'épuisement a pour effet de diminuer le signal dans 52,6 % des cas, de l'annuler dans 26,4 % des cas et il n'a pas d'effet dans 21 % des cas.

Les 3 types d'effets de l'épuisement sont illustrés à la **figure 8**.

Pour la génisse 33 (**8A**), l'épuisement par E. coli diminue le signal.

La génisse 79 (**8B**), voit son signal annulé suite à l'épuisement.

La génisse 81 (**8C**) présente la même courbe avec ou sans épuisement.

#### **PME 16.5 et 15.7**

##### **Etude comparative de la réponse sérologique spécifique de ces 2 PME grâce à l'ELISA de compétition**

Les résultats de l'ELISA de compétition sont présentés séparément pour les 3 groupes.

Pour toutes les génisses, les sérums testés sont ceux prélevés :

- avant la vaccination (jour -103)
- 14 jours après la vaccination (jour -75) et 51 jours après vaccination (jour-36)
- après l'infection, aux jours 43-82-98-135 et 195.

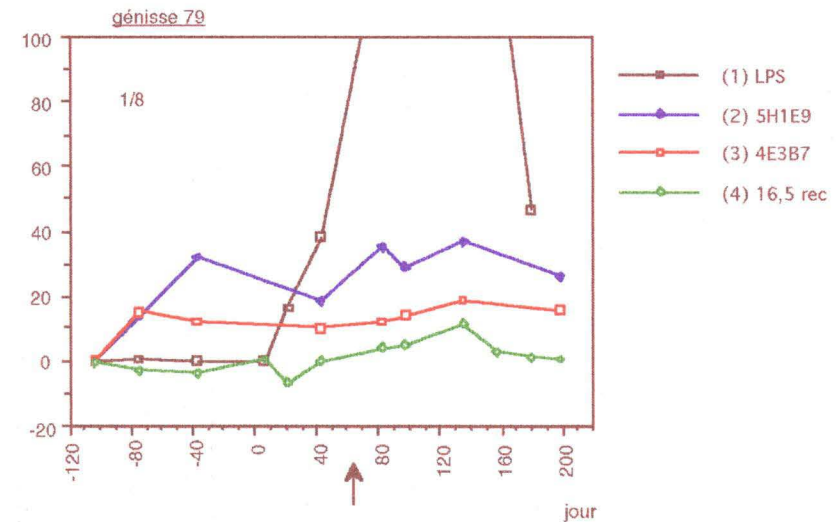
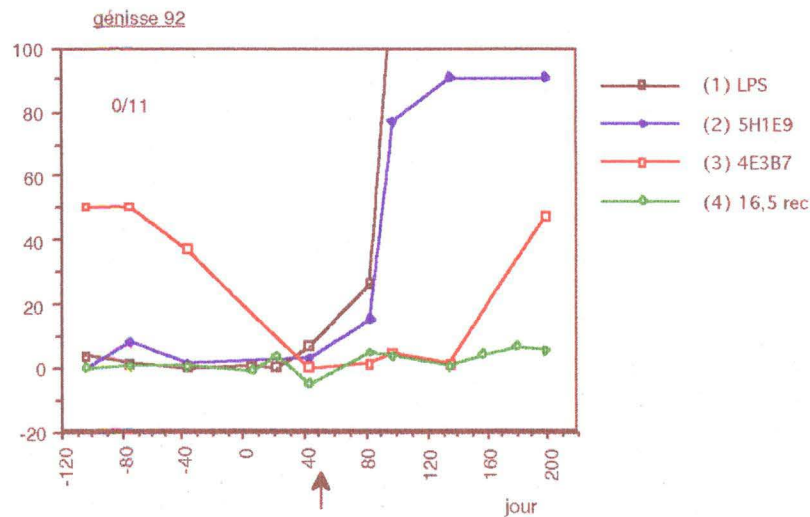
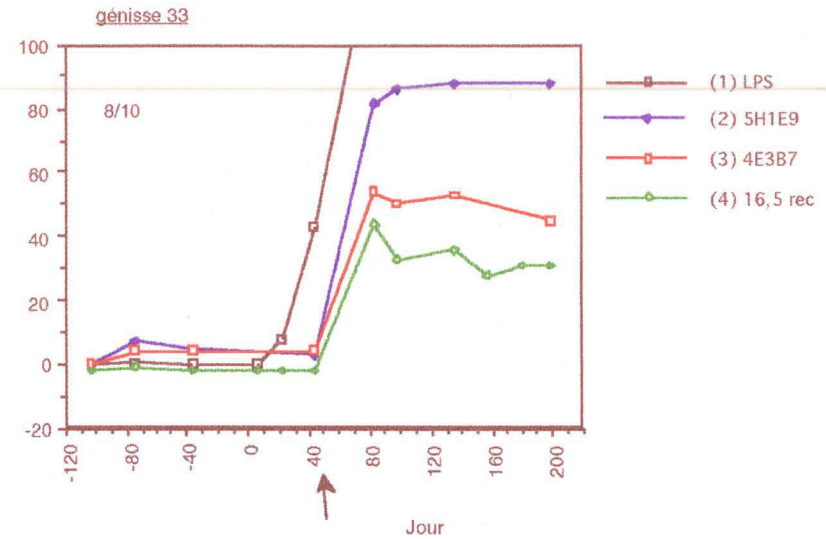
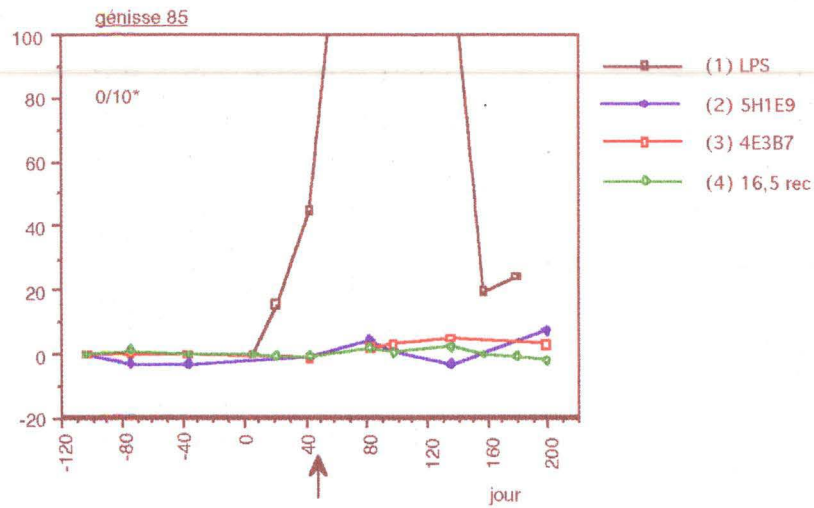
Les pourcentages d'inhibition observés après vaccination, les délais d'apparition de la réponse infectieuse et les inhibitions maximales observées sont repris dans le **tableau 5** pour chaque AcM testé.

Ce tableau ne reprend que les résultats significatifs.

La vaccination avec la souche B19 entraîne la formation d'Ac inhibant significativement un des deux ou les deux AcM anti-15,7 et anti-16,5 chez respectivement 30 et 10 % des animaux. Les pourcentages d'inhibition observés sont relativement faibles.

Aucune bête n'a présenté, après la vaccination et avec la fraction SDS-I, des taux d'Ac sériques inhibant de manière significative les AcM, que ce soient les anti-15,7 ou les anti-16,5. Comme pour l'ELISA indirect, ce résultat était prévisible puisque théoriquement cette fraction ne contient pas ces protéines.

Après l'infection, la fixation des AcM anti-15,7 est mieux inhibée par les Ac sériques que celle des AcM anti-16,5, surtout celle du 5H1E9. Pour les AcM anti-16,5, l'inhibition de l'AcM 4E3B7 est meilleure que celle du 4G1C6 dans 90 % des cas. L'inhibition de l'AcM anti-16,5, 4E3B7 est plus tardive que celle de l'AcM anti-15,7 5H1E9 dans 62,5 % des cas. Les résultats sont significatifs avec l'AcM 5H1E9 chez 50 % des génisses du groupe témoin, 100 % des génisses vaccinées avec la souche B19 ayant avorté, 33,3 % des génisses vaccinées B19 ayant mené leur gestation à terme et chez 100 % des génisses vaccinées avec la fraction SDS-I.



**Figure 9 :** Cinétique d'apparition des Ac dirigés contre le LPS, la PME de 16,5 kDa et la PME de 15,7 kDa pour les génisses du groupe témoin.  
 Le taux d'Ac anti-LPS (1) est exprimé en UI. Les taux d'Ac inhibant les AcM 5H1E9 (2) et 4E3B7 (3) sont donnés par le pourcentage d'inhibition obtenu.  
 Les résultats de l'ELISA indirect sur la PME 16,5 sont donnés en pourcentage (4).

\* nombre de prélèvements contaminés

Avec l'AcM 4E3B7, les résultats sont significatifs chez 25 % des génisses du groupe témoin, 100 % des génisses vaccinées avec la souche B19 ayant avorté, 50 % des génisses ayant mené leur gestation à terme et 83,3 % des génisses vaccinées avec la fraction SDS-I.

### II.2.2.3. Cinétique d'apparition des Ac spécifiques du LPS et des PME de 16,5 et 15,7 kDa

La cinétique d'apparition des Ac dirigés contre le LPS (étudiée en ELISA), la PME de 16,5 kDa (étudiée en ELISA indirect et en ELISA de compétition avec l'AcM 4E3B7) et la PME 15,7 (étudiée en ELISA de compétition avec l'AcM 5H1E9) est illustré pour chaque génisse. En plus, le résultat des cultures réalisées à partir des prélèvements de la carcasse est précisé. Les flèches indiquent la date de l'avortement ou du vêlage.

L'inhibition obtenue avec les AcM 5H1E9 (anti-15,7) et 4E3B7 (anti-16,5) étant plus importante que celle obtenue avec les AcM 29E3C10 (anti-15,7) et 4G1C6 (anti-16,5), seuls les résultats obtenus avec les AcM 5H1E9 et 4E3B7 sont présentés. Pour l'ELISA indirect sur la PME 16,5, nous n'avons tenu compte que des DO obtenues avec les sérums épuisés par des extraits d'E.coli, de manière à étudier uniquement la réponse spécifique de Brucella.

Le taux d'Ac anti-LPS est exprimé en unités internationales. Les taux d'Ac sériques inhibant les AcM sont donnés par le pourcentage d'inhibition obtenu. Pour faciliter la lecture des figures, pour l'ELISA indirect sur la PME 16,5, les valeurs des DO observées ont été transformées en pourcentage. 100 % correspondant à une DO de 1,5.

#### groupe témoin. (figure 9)

Les sérums des génisses 85 et 79 présentent des cinétiques en Ac assez similaires. Les Ac spécifiques du LPS apparaissent 15 jours après l'infection. Le taux d'Ac anti-LPS reste élevé jusqu'à 3 mois après l'avortement et ensuite chute. Les taux d'Ac spécifiques des protéines de 16,5 et 15,7 kDa sont quasi nuls.

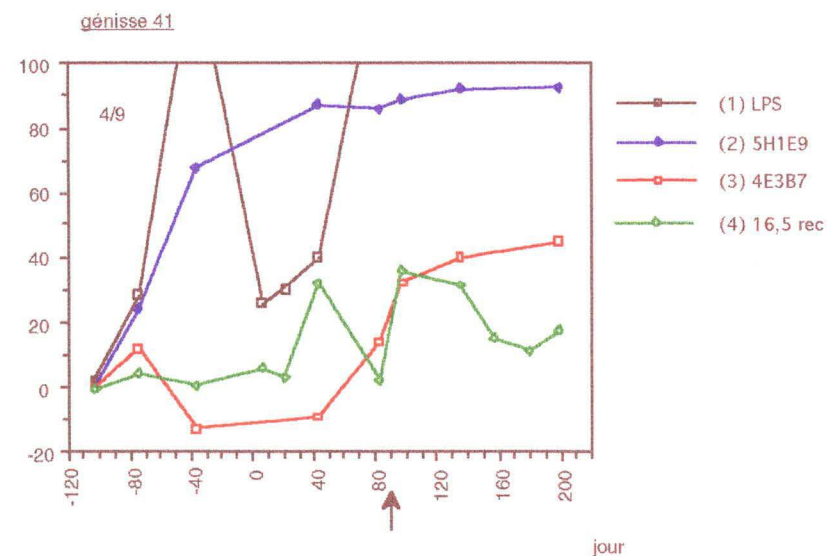
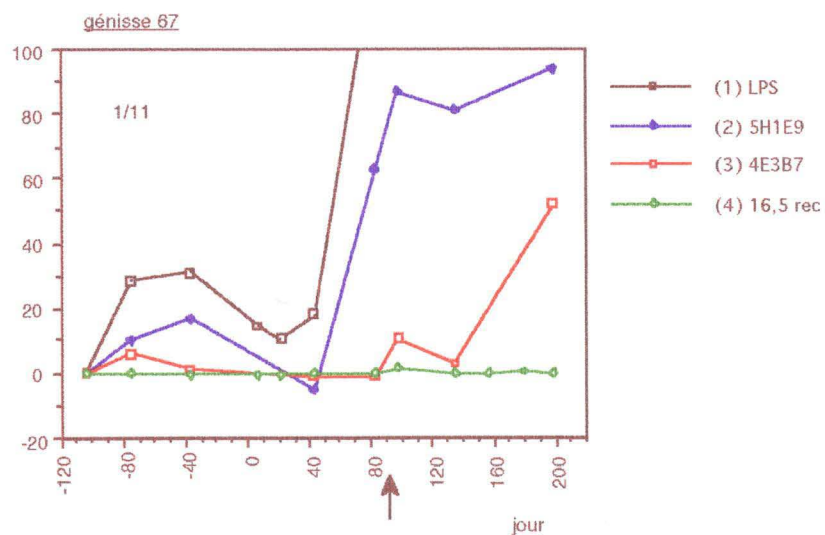
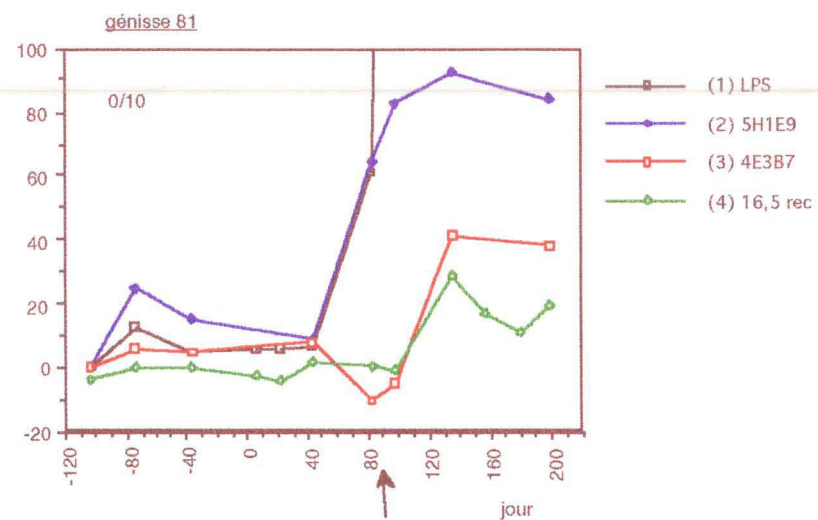
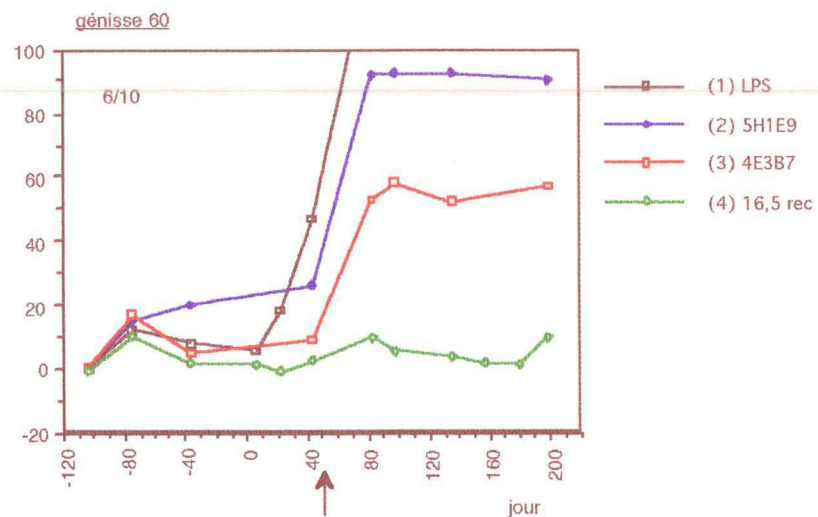
Les résultats des cultures sur l'avorton, le colostrum et les arrières-faix sont positifs et à l'abattage les génisses 85 et 79 présentent respectivement 0 et 1 prélèvement contaminé, ce qui signifie que les mécanismes immunitaires ont été relativement efficaces pour éliminer les bactéries.

Les sérums des génisses 33 et 92 présentent des taux d'Ac anti-LPS qui restent élevés jusqu'à l'abattage.

L'apparition des Ac sériques entrant en compétition avec la fixation de l'AcM 5H1E9 est plus tardive que celle des Ac anti-LPS mais l'évolution des taux de ces Ac est semblable.

La génisse 33 synthétise aussi des Ac qui reconnaissent la PME 16,5 en ELISA indirect. Parmi ceux-ci, certains sont spécifiques de l'épitope reconnu par l'AcM 4E3B7 puisqu'ils inhibent sa fixation sur l'antigène. Pour ces 2 génisses, les résultats des cultures réalisées sur les prélèvements lors de l'avortement sont positifs mais, les résultats des cultures au niveau de la carcasse suggèrent que la génisse 92 a pu se débarrasser des bactéries contrairement à la génisse 33 pour laquelle 8 prélèvements sur 10 sont encore contaminés à l'abattage.

Le cas de la génisse 92 est particulier dans le sens où le sérum contient déjà des Ac dirigés contre la PME 16,5 (détectés en ELISA indirect, sans épuisement des sérums) et contre l'épitope reconnu par l'AcM 4E3B7 (détectés par ELISA de compétition), avant l'infection. Le sérum contiendrait donc des anticorps dirigés contre des épitopes partagés par la PME 16,5 de Brucella et par un autre germe. L'épuisement du sérum par des extraits d'E.Coli a annulé le signal en ELISA indirect et en ELISA de compétition (résultats non montrés).



**Figure 10 :** Cinétique d'apparition des Ac dirigés contre le LPS, la PME de 16,5 kDa et la PME de 15,7 kDa pour les génisses du groupe B19 ayant avorté. Le taux d'Ac anti-LPS (1) est exprimé en UL. Les taux d'Ac inhibant les AcM 5H1E9 (2) et 4E3B7 (3) sont donnés par le pourcentage d'inhibition obtenu. Les résultats de l'ELISA indirect sur la PME 16,5 sont donnés en pourcentage (4).

groupe vacciné B.19

### *génisses ayant avorté (figure 10)*

Pour les génisses 60, 81 et 67, la réponse vaccinale est faible, aussi bien en Ac anti-LPS que en Ac anti-protéines. La réponse infectieuse est bien marquée en Ac anti-LPS et en Ac inhibant la fixation de l'AcM 5H1E9. Pour la génisse 60, le taux d'Ac inhibant la fixation de l'AcM 5H1E9 augmente seulement après l'avortement. Pour les génisses 81 et 67, nous observons un taux élevé en Ac au moment de l'avortement. Cependant, les figures ne nous permettent pas de savoir si les Acs sont déjà présents avant l'avortement.

Le sérum de la génisse 60 contient déjà des Ac qui inhibent la fixation de l'AcM 4E3B7 au jour 80 alors que chez les 2 autres, ces anticorps apparaissent plus tard. La génisse 60 présente encore 6 prélèvements contaminés sur 10.

Pour la génisse 41, malgré une réponse importante en Ac anti-LPS et en Ac qui inhibent la fixation de l'AcM 5H1E9 suite à la vaccination, 4 prélèvements sur 9 sont contaminés à l'abattage. Après l'infection, les taux d'Ac anti-LPS et d'Ac inhibant la fixation de l'AcM 5H1E9 sont encore élevés tandis que le taux d'Ac anti-16,5 est beaucoup plus faible.

### *génisses ayant mis-bas (figure 11)*

La génisse 62 est très bien protégée. Elle a mené sa gestation à terme et son veau est indemne de brucellose. En effet, les résultats sérologiques (ELISA anti-LPS), de l'IDR et des cultures réalisées sur la carcasse du veau sont négatifs.

De plus, aucune bactérie n'a été mise en évidence ni dans le colostrum, ni dans les arrière-faix au moment de la mise-bas, ni dans le lait et le mucus. La carcasse n'est pas contaminée non plus.

En ce qui concerne les taux d'Ac, la vaccination n'induit qu'une faible réponse en Ac anti-LPS et en Ac inhibant la fixation de l'AcM 5H1E9. Après l'infection, les taux d'Ac sériques spécifiques du LPS et des protéines restent très faibles.

Les génisses 45-49 et 3463 ont également mené leur gestation à terme. Leurs veaux sont indemnes mais chez toutes les trois, *B.abortus* a pu être isolé à partir des prélèvements diversifiés réalisés lors de la mise bas. Les bêtes 45 et 3463 sont mieux protégées puisque seules des bactéries ont été mises en évidence dans le lait et le mucus alors que pour la génisse 49, le colostrum et les arrière-faix étaient aussi contaminés. Les résultats des cultures réalisées sur la carcasse sont négatifs sauf pour la génisse 49 chez laquelle *B.abortus* a été mis en évidence dans un prélèvement.

La génisse 45 présente une réponse vaccinale importante en Ac anti-LPS contrairement aux 3 autres génisses.

Après l'infection, les taux d'Ac spécifiques du LPS et des protéines sont faibles pour la génisses 3463.

Chez la génisse 49, les taux d'Ac anti-LPS et des Ac inhibant la fixation de l'AcM 5H1E9 sont assez importants et sont détectés avant la mise-bas.

Pour la génisse 45 les taux d'Ac anti-LPS et anti-protéines sont relativement peu importants après infection. Il existe un parallélisme dans l'évolution des Ac reconnaissant la protéine recombinante en ELISA indirect et les Ac sériques inhibant la fixation de l'AcM 4E3B7.

Les génisses 91 et 93 ont mené leur gestation à terme mais les veaux sont infectés. Les résultats de l'ELISA anti-LPS et de l'IDR sont positifs chez le veau de la génisse 91. Pour le veau de la génisse 93, seul le résultat de l'IDR est positif.

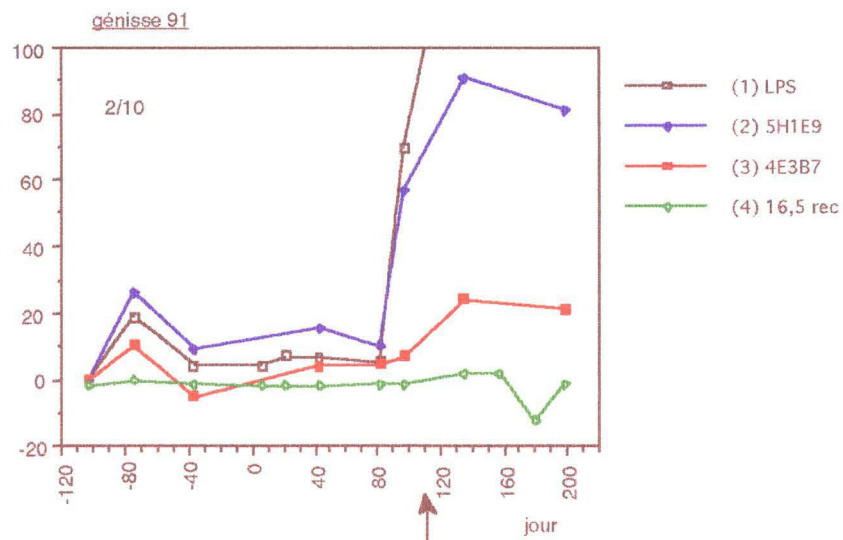
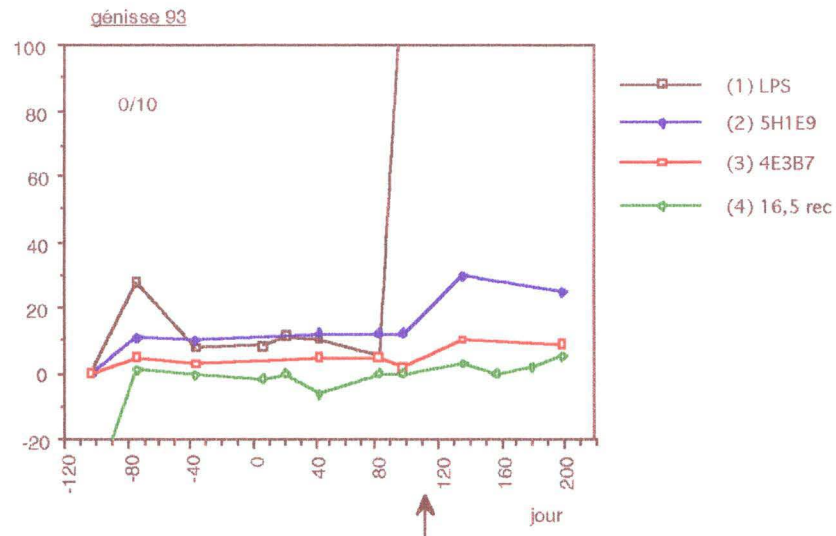
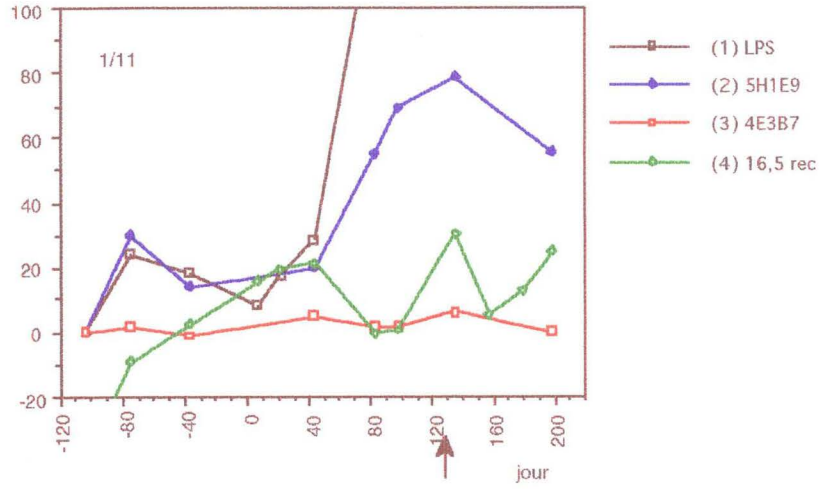
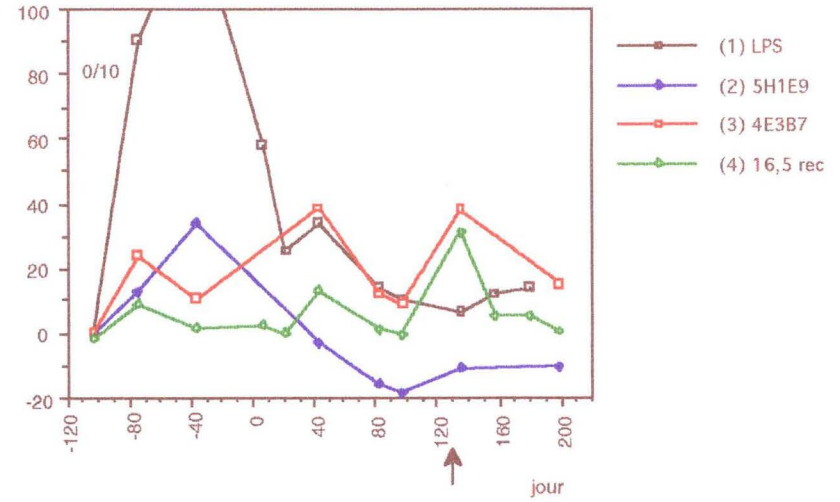


Figure 11 : Cinétique d'apparition des Ac dirigés contre le LPS, la PME de 16,5 kDa et la PME de 15,7 kDa pour les génisses du groupe B19 ayant mis-bas.  
 Le taux d'Ac anti-LPS (1) est exprimé en UI. Les taux d'Ac inhibant les AcM 5H1E9 (2) et 4E3B7 (3) sont donnés par le pourcentage d'inhibition obtenu.  
 Les résultats de l'ELISA indirect sur la PME 16,5 sont donnés en pourcentage (4)

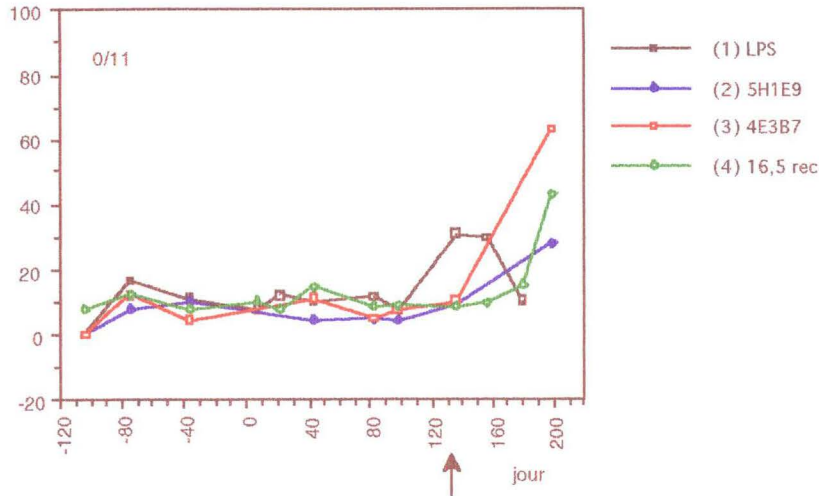
génisse 49



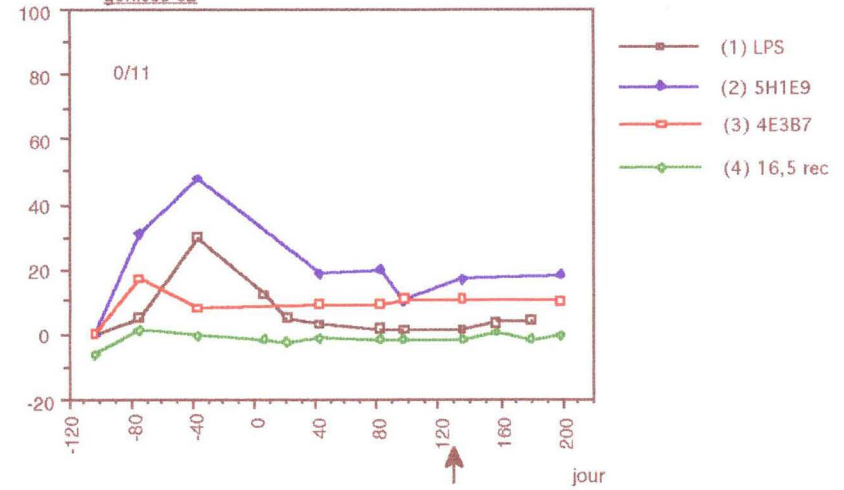
génisse 45

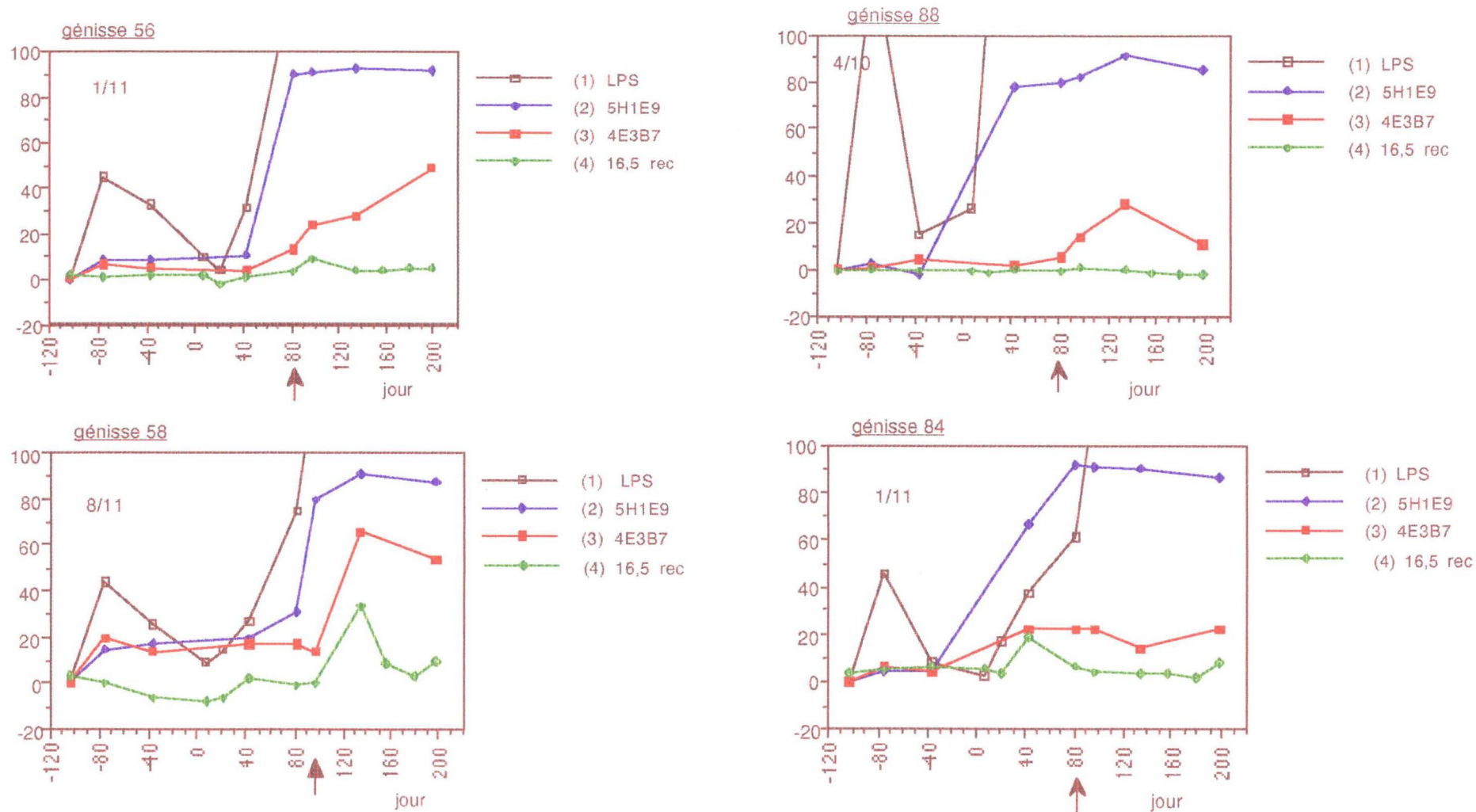


génisse 3463

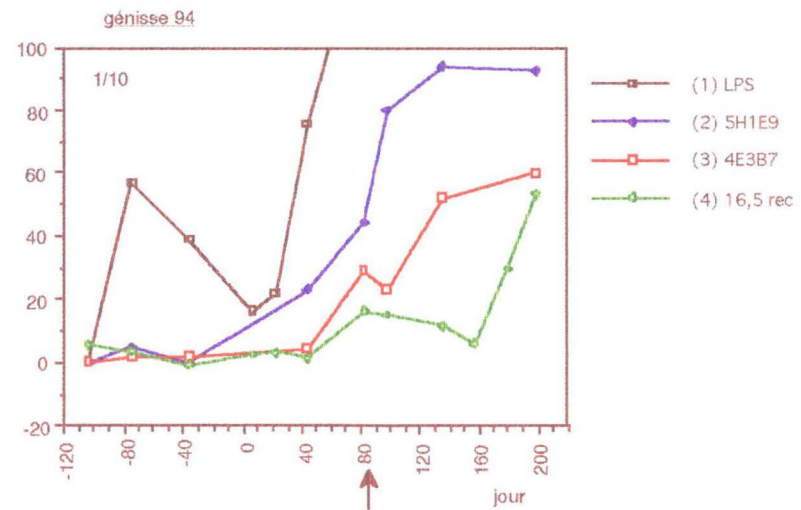
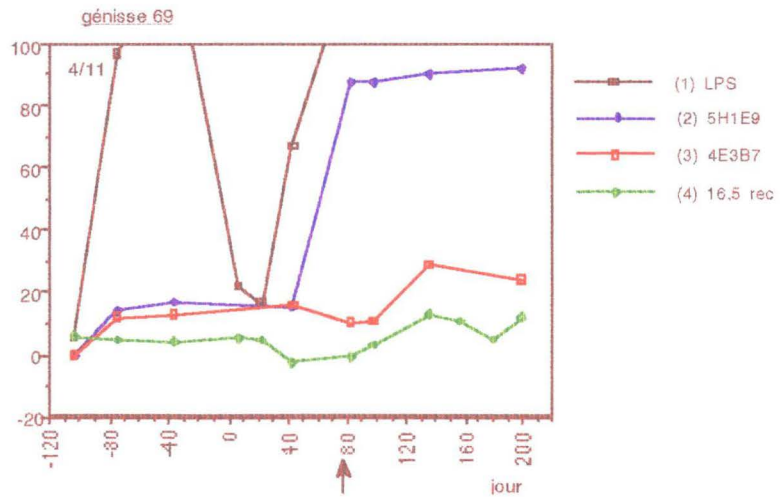
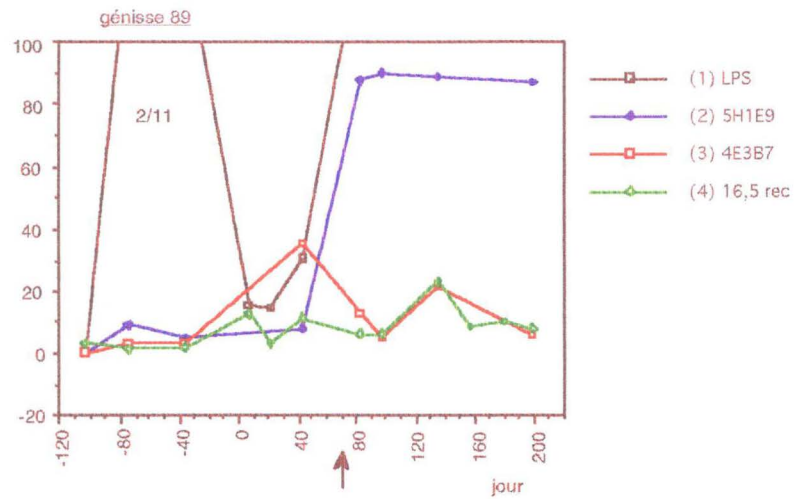
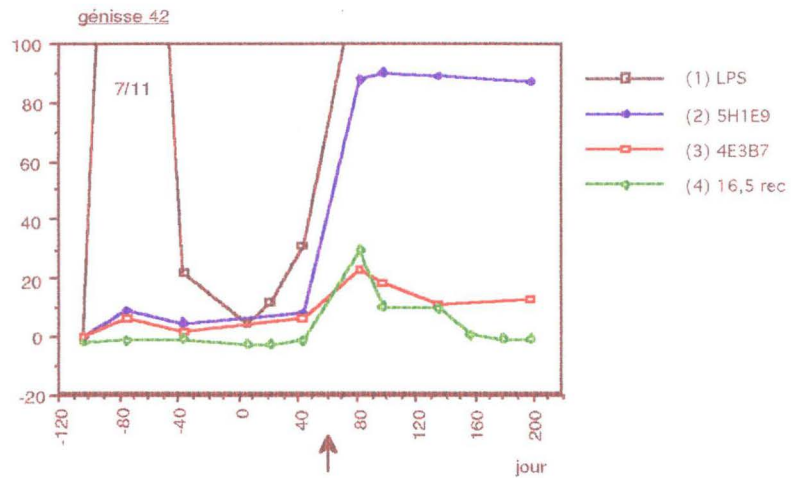


génisse 62

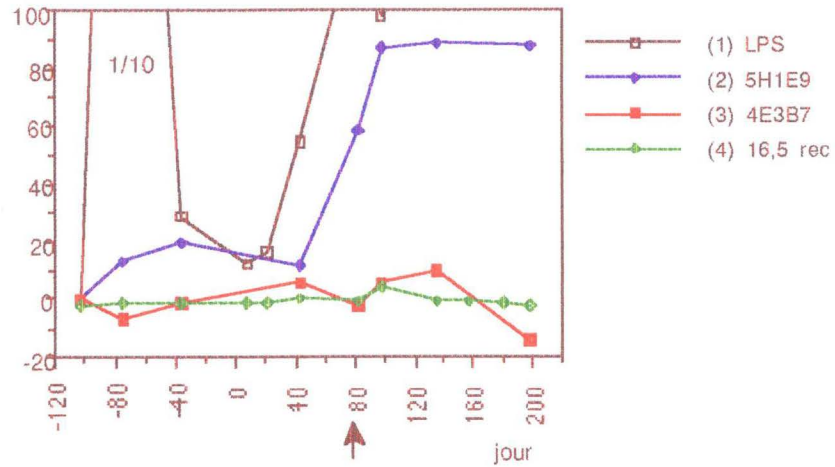




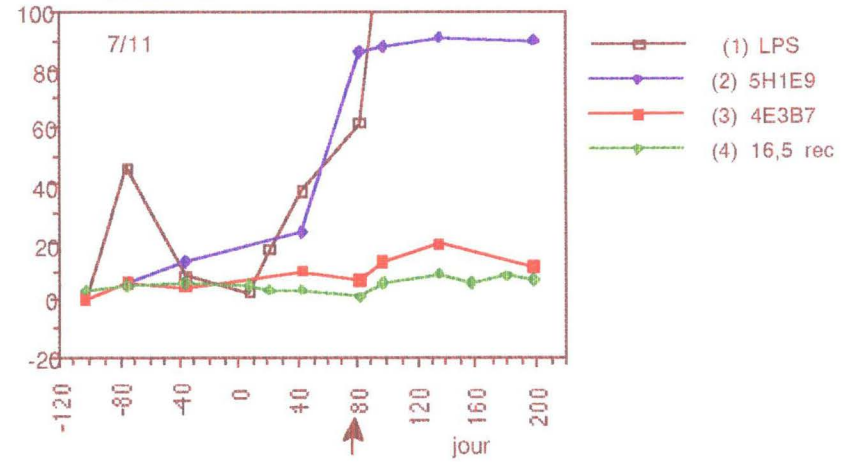
**Figure 12.** : Cinétique d'apparition des Ac dirigés contre le LPS, la PME de 16,5 kDa et ka PME de 15,7 kDa pour les génisses du groupe SDS-I.  
 Le taux d'Ac anti-LPS (1) est exprimé en UI. Les taux d'Ac inhibant les AcM 5H1E9 (2) et 4E3B7 (3) sont donnés par le pourcentage d'inhibition obtenu.  
 Les résultats de l'ELISA indirect sur la PME 16,5 sont donnés en pourcentage (4).



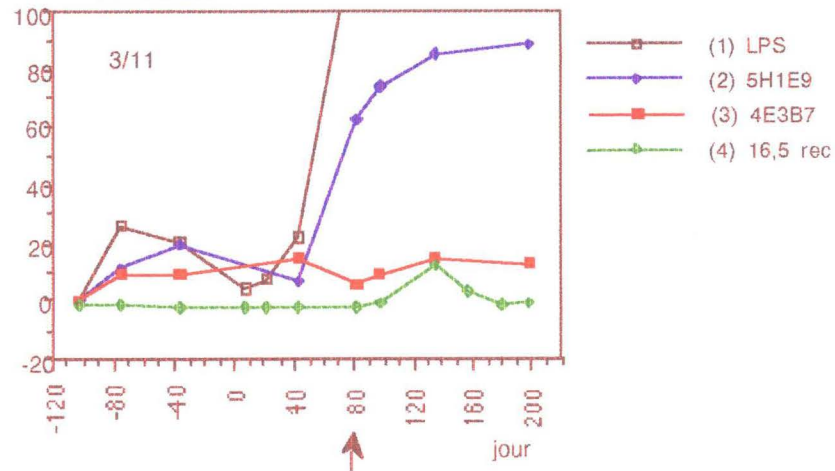
génisse 35



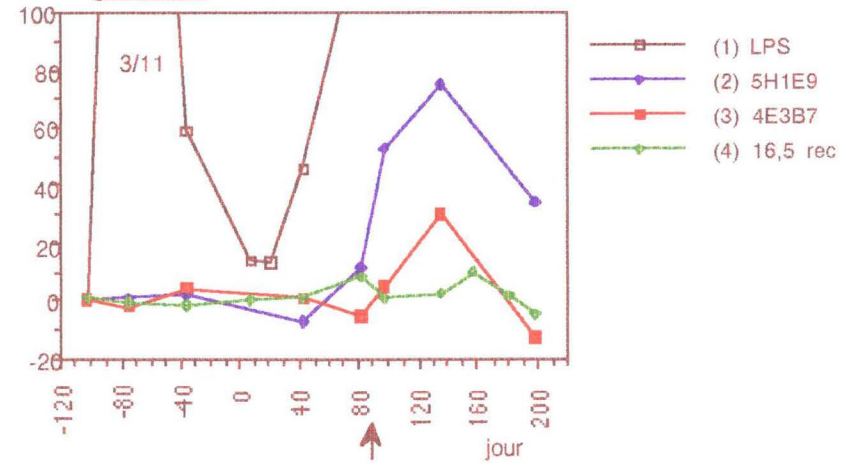
génisse 74



génisse 68



génisse 64



Après infection, le taux d'Ac anti-LPS est élevé chez les 2 génisses tandis que le taux d'Ac inhibant la fixation de l'AcM 5H1E9 est important uniquement chez la génisse 91 et ces Ac sont détectés avant la mise-bas. Les taux d'Ac dirigés contre la PME 16,5 est faible. A l'abattage, 2 prélèvements sont contaminés pour la génisse 93 et un seul pour la génisse 91.

Des taux importants d'Ac inhibant la fixation de l'AcM 5H1E9 sont présents dans les sérums des génisses 49 et 91, les 2 seuls bovins ayant des prélèvements contaminés (respectivement 1 et 2).

#### *groupe vacciné avec la fraction SDS-I (figure 12)*

Chez toutes les génisses de ce groupe, on a mis en évidence des *B. abortus* au niveau de l'avorton, dans le colostrum, les arrières-faix ainsi que dans le lait et le mucus. A l'abattage, le nombre de prélèvements de la carcasse contaminés par animal varie de 1 à 8.

Après vaccination, on n'observe pas d'augmentation des taux d'Ac spécifiques des protéines de 16,5 et 15,7 kDa, ce qui est normal puisque cette fraction ne contient pas ces protéines. Par contre, on observe toujours une réponse spécifique du LPS plus ou moins importante.

Après l'infection, le taux d'Ac anti-LPS remonte et reste élevé jusqu'à l'abattage. Le taux d'Ac inhibant la fixation de l'AcM 5H1E9 augmente toujours après l'infection, parallèlement au taux d'Ac anti-LPS.

Pour les génisses 98, 88 et 84, les Ac sériques inhibant la fixation de l'AcM sont détectés avant l'avortement. Pour les autres génisses, des sérums prélevés entre le jour 43 et 82 devront être testés pour savoir si ces Ac sont détectables avant l'avortement.

Dans la plupart des cas, les courbes traçant l'évolution des Ac spécifiques de la protéine recombinante de 16,5 kDa en ELISA indirect sont parallèles à celles obtenues pour les Ac inhibant la fixation de l'AcM 4E3B7.

L'ELISA indirect et l'ELISA de compétition nous ont permis d'étudier la réponse sérologique spécifique des protéines de la membrane externe de *Brucella* de 25 - 36 - 15,7 - 16,5 et 19 kDa.

Grâce à un extrait de protéines préparé à partir de *B. abortus* 45/20, nous allons analyser la réponse immunitaire humorale dirigée contre un plus grand nombre de protéines.

En utilisant 2 AcM différents et spécifiques soit des IgG1, soit des IgG2, nous étudierons la répartition de la réponse immunitaire en ces 2 sous-classes d'Ac.

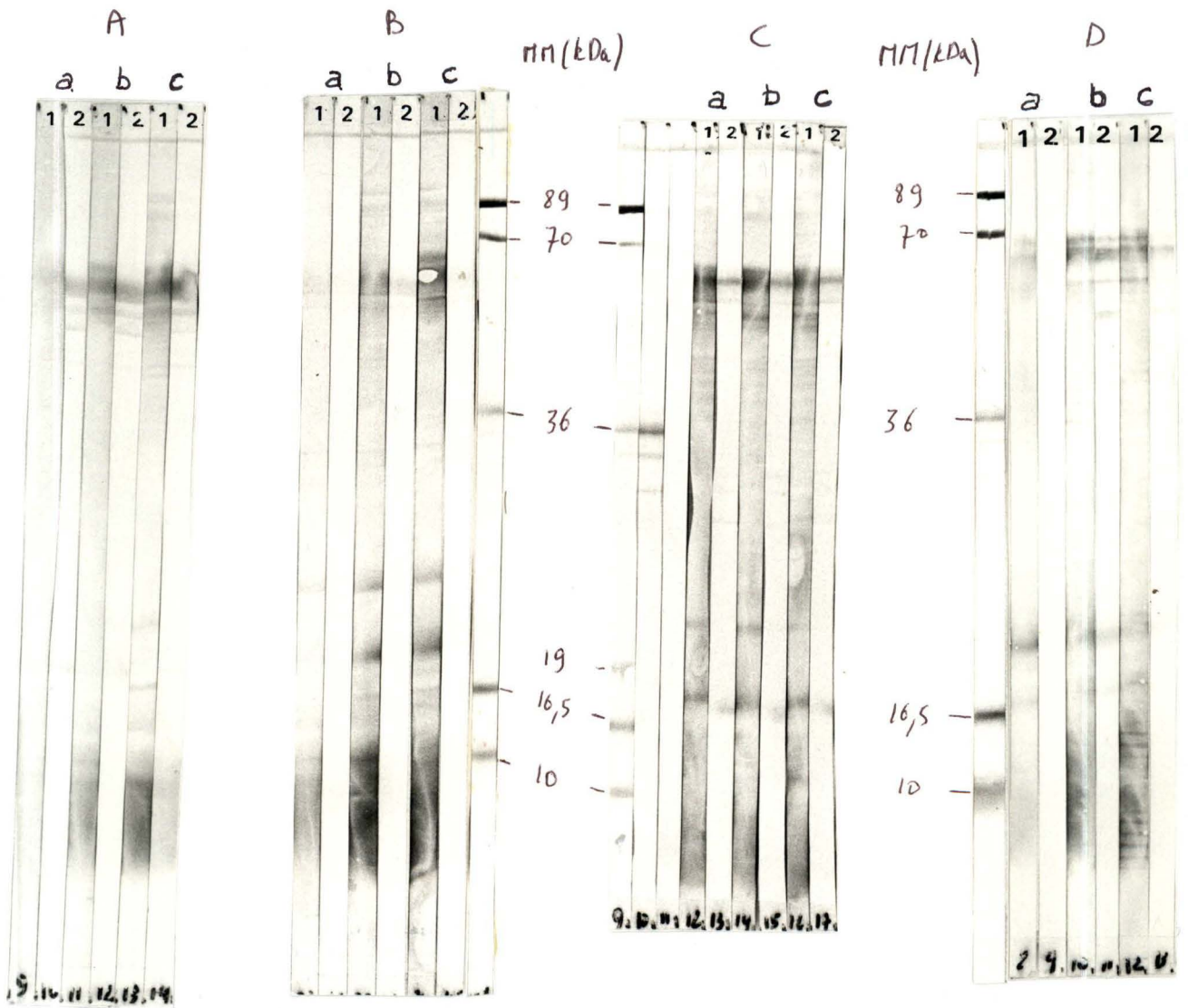
Une étude comparative de la réponse humorale 135 jours après l'infection et une étude de la cinétique d'apparition des Ac vont également être effectuées.

### **II.3. Analyse de la réponse immunitaire humorale par immunoempreintes (IE)**

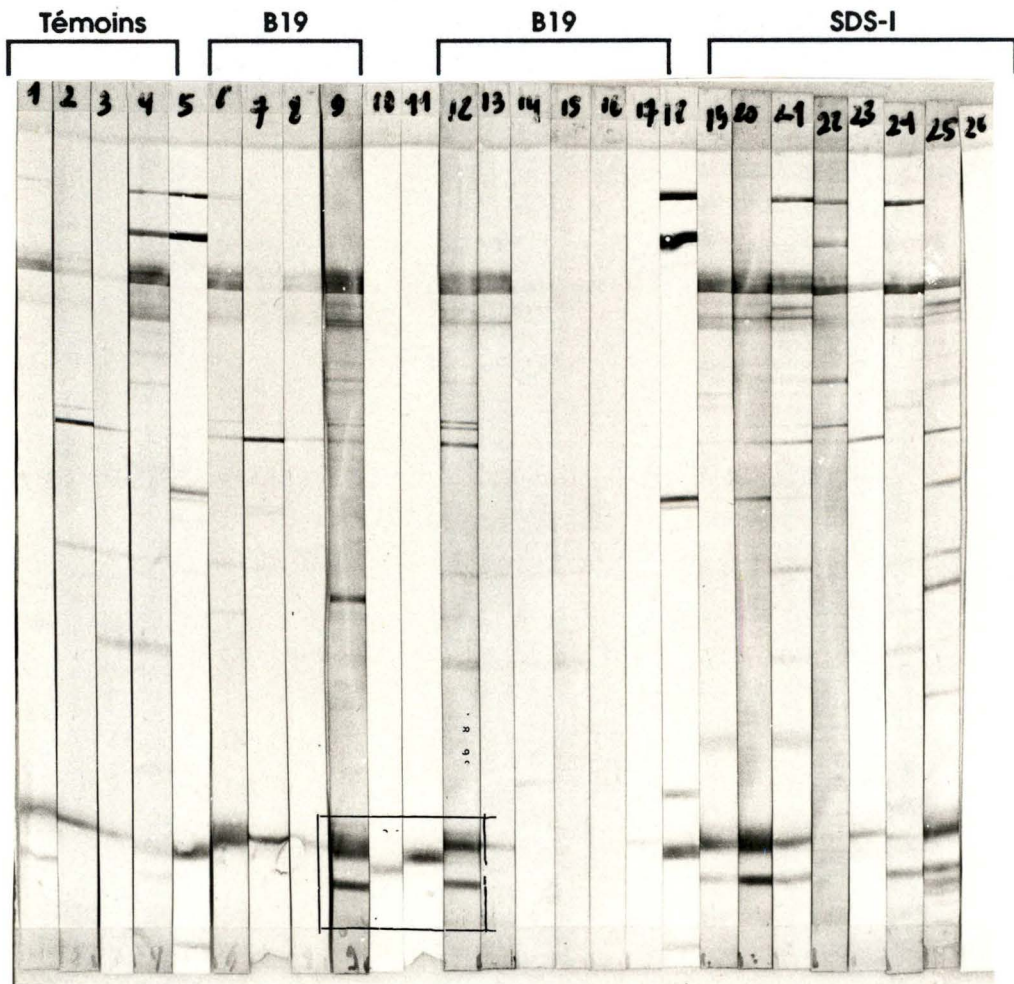
#### **II.3.1. Introduction**

Un extrait de protéines a été préparé à partir d'une souche *Brucella abortus* rugueuse 45/20. Nous avons choisi une souche rugueuse afin d'éviter les interférences dues aux anticorps dirigés contre le LPS-S. En effet, ceux-ci masquent les protéines dont la masse moléculaire est comprise entre 30 et 60 kDa. La lyse dans du SDS bouillant s'est avérée la méthode la plus efficace pour la préparation d'extraits bruts contenant un maximum de protéines différentes (cytoplasmiques et membranaires). Ces protéines sont séparées en fonction de leur masse moléculaire par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (EGPA-SDS).

Les protéines ont ensuite été transférées sur membrane de nitrocellulose par électrophorèse transversale.



**Figure 13 :** Immunoempreintes sur extrait protéique de *B. abortus* 45/20, réalisées à l'aide des sérums des génisses 92 (A) - 35 (B) - 33 (C) et 58 (D) avec les AcM 1C8 (1) et ILA 74 (2) aux jours 82 (a) - 98 (b) - 135 (c). Les AcM sont disposés sur les bandelettes non numérotées.



**Figure 14 :** Immunoempreintes sur extrait protéique de *B.abortus* 45/20, réalisées à l'aide des sérums prélevés au jour 135 chez les 4 génisses témoins, 10 génisses vaccinées avec la souche B19 et 7 des génisses vaccinées avec la fraction SDS-II.

Les sérums des différentes génisses ont été testés dans l'ordre suivant :

piste 1.	génisse 33 (A*)	piste 14	génisse 93 (V)
piste 2.	génisse 79 (A)	piste 15.	génisse 3463 (V)
piste 3.	génisse 85 (A)	piste 16.	génisse 62 (V)
piste 4.	génisse 92 (A)	piste 17.	génisse 67 (A)
piste 5.	AcM anti-10, anti-16,5, anti-36, anti-70, anti-89	piste 18.	AcM anti-10, anti-16,5, anti-19, anti-36, anti-70, anti-89
piste 6.	génisse 41 (A)	piste 19.	génisse 35 (A)
piste 7.	génisse 45 (V°)	piste 20.	génisse 58 (A)
piste 8.	génisse 49 (V)	piste 21.	génisse 42 (A)
piste 9.	génisse 60 (A)	piste 22.	génisse 84 (A)
piste 10.	AcM anti-15,7 29E3C10	piste 23.	génisse 94 (A)
piste 11.	AcM anti-16,5 4G1C6	piste 24.	génisse 69 (A)
piste 12.	génisse 81 (A)	piste 25.	génisse 89 (A)
piste 13.	génisse 91 (V)		

Les sérums sont incubés avec la membrane de nitrocellulose, et les anticorps qui se fixent sur les protéines de Brucella sont mis en évidence à l'aide d'anticorps spécifiques des IgG de l'espèce, couplés à une enzyme, la peroxydase. Dans le but d'analyser la répartition de la réponse des bovins en IgG1 et IgG2, nous avons utilisé des AcM spécifiques de ces 2 sous-classes, à savoir le 1C8 et l'ILA 74.

Des AcM produits par fusion de cellules spléniques de souris infectées ont permis d'identifier des PME de Brucella. Les AcM dirigés contre ces PME ont servi de marqueurs de masse moléculaire (MM).

### II.3.2. Résultats

#### II.3.2.1. *Cinétique d'apparition des anticorps chez les bêtes témoins, vaccinées B19 et vaccinées avec la fraction SDS-I.*

##### - Sérums en mélange

Les sérums ont d'abord été testés en mélange pour chaque saignée étudiée. Les sérums des 4 bêtes témoins ont été mélangés. Deux mélanges ont été réalisés pour les bêtes vaccinées avec la souche B19 : le premier contenant les sérums des bêtes protégées par la vaccination et le deuxième contenant les sérums des bêtes ayant avorté.

Les bêtes vaccinées avec la fraction SDS-I ayant toutes avorté, la répartition s'est faite suivant la date de l'avortement : celles qui ont avorté avant le jour 87 et celles qui ont avorté après ce jour.

Pour toutes les catégories d'animaux, il est apparu que la vaccination induisait très peu d'anticorps et que les anticorps étaient bien décelables seulement à partir de 82 jours après l'infection.

#### II.3.2.2. *Répartition de la réponse en IgG1 et IgG2*

Les sérums ont été testés individuellement pour quelques animaux, dans le but d'analyser la répartition de la réponse en IgG1 et IgG2 (**figure 13**).

Les sérums testés sont ceux qui ont été prélevés au maximum de la réponse sérologique spécifique des protéines, mis en évidence par l'IE réalisée sur les sérums en mélange.

L'AcM 1C8 et l'AcM ILA74 détectent des protéines de même masse moléculaire mais avec l'AcM ILA 74, les signaux sont plus faibles et moins nombreux.

Les anticorps anti-LPS-R (traînée apparaissant à une masse moléculaire inférieure à 10 kDa) sont détectés principalement par le 1C8.

Comme l'utilisation conjointe des deux AcM 1C8 et ILA74 n'apporte pas d'information supplémentaire et que l'AcM ILA 74 procure un signal moins intense, nous n'avons plus utilisé que l'AcM 1C8 pour réaliser les IE ultérieures.

#### II.3.2.3. *Etude comparative de la réponse humorale 135 jours après l'infection*

Les sérums des 4 bêtes témoins, des 10 bêtes vaccinées avec la souche B19 et 7 des animaux vaccinés avec la fraction SDS-I ont été analysés sur un même gel afin de comparer la réponse humorale spécifique des protéines pour les 3 groupes d'animaux. Les 7 animaux vaccinés avec la fraction SDS-I ont été choisis de manière à ce que l'échantillon soit représentatif du groupe (**figure 14**).

Étude comparative de la réponse humorale 135 jours après l'infection

TABLEAU 6

x (σ)	GROUPE TÉMOIN				GROUPE VACCINÉ B19										GROUPE VACCINÉ AVEC LA FRACTION SDS-I						% Total	% tém.	% B19	% SDS-I	
	85 (3) A	33 (1) A	92 (4) A	79 (2) A	60 (9) A	81 (12) A	67 (17) A	41 (6) A	91 (13) V	93 (14) V	49 (8) V	45 (7) V	3463 (15) V	62 (16) V	42 (21) A	89 (25) A	69 (24) A	94 (23) A	35 (19) A	58 (20) A					84 (22) A
89 (0)		±	±											3+		3+				2+	43,8	50	0	42,8	
70 (0,8)			2+																	2+	9,5	25	0	14,2	
59,5 (0,8)		+	3+	±	3+	3+	2+	3+		±				3+	2+	2+	+	3+	3+	3+	76,2	75	50	100	
54,7 (0)														+	+	+				±	9,5	0	0	28,6	
53,6 (0,91)		±	2+		2+	+	±	+						+	+	+		+	+	±	57,1	50	40	85,7	
48 (0,6)			±		+															2+	9,5	25	10	0	
45,5 (0,4)			±			+									±						19,1	25	10	28,6	
43,5																				+	4,76	0	0	14,2	
41,4 (0,3)				+	+	+	+							±						±	38,09	25	40	42,8	
40 (0,5)	+			2+	+	2+	+				+	2+		+	+	±	+	±	±	±	66,6	50	50	100	
36 (0,5)														±	+					2+	14,3	0	0	42,8	
31,7 (0,8)	±			±		±	±	±						+	+						28,5	50	20	28,5	
29,6 (0,0)					2+		±								2+						14,2	0	20	14,2	
26,4 (1,3)	+		±			+								±		±					23,8	50	10	28,5	
24,4															±						4,7	0	0	14,2	
22,4 (0)														±					±		9,5	0	0	28,5	
19,9									±												4,7	0	10	0	
16,9	+	+	±	+	3+	2+	2+	+		+	+			2+	2+	±	+	2+	3+		80,9	100	70	85,7	
14,7 (0,4)		+	±		3+	3+	±							+	+	+		+	3+		47,6	50	30	71,4	
14															+	+					4,7	0	0	14,2	
*	4	5	9	5	8	9	1	8	3	1	3	3	0	0	12	12	8	3	6	7	7				

\* nombre protéines reconnues/animal

Le calcul de la masse moléculaire des différentes bandes protéiques reconnues par les sérums a été effectué par interpolation sur une courbe de calibration réalisée à l'aide de 6 AcM reconnaissant des protéines de masse moléculaire connue : PME 10-16,5-19-36-71 et 89 kDa.

L'AcM anti-16,5 utilisé est le 8C3G3 qui reconnaît en IE sur extrait 45/20 la PME de 16,5 kDa.

En identifiant toutes les bandes ayant migré de la même façon lors de l'électrophorèse par une analyse visuelle, la moyenne des masses moléculaires estimées par l'équation logarithmique est calculée, de même que l'écart-type.

L'analyse des résultats se trouve dans le tableau 6. Le numéro de la bête et si elle a avorté(A) ou vêlé (V) sont indiqués en tête de colonne. Dans ce tableau, en dessous du numéro de l'animal, est repris le numéro de la piste correspondant de la figure 14. Le nombre de bandes détectées par animal est comptabilisé au bas de chaque colonne. En bout de ligne, se trouve le pourcentage d'animaux reconnaissant la protéine pour les 3 groupes confondus, et pour chaque groupe pris séparément. L'intensité de la réponse contre les protéines est estimée par  $\pm$ , 1+, 2+, ou 3+.

## Résultats

Sur l'IE présentée à la *figure 14*, on constate que :

- pour certaines protéines le marquage est intense et pour d'autres discret
- le nombre d'animaux dont le sérum contient des Ac sériques est variable d'une protéine à l'autre.

Pour les 3 groupes confondus (voir *tableau 6*), les protéines les plus immunogènes sont estimées à 59,5 kDa et 16,9 kDa. La protéine de 16,9 kDa est détectée chez 80,9 % des animaux et la protéine de 59,5 kDa chez 76,2 %. Ces 2 protéines sont également celles pour lesquelles le marquage est le plus intense.

Ensuite viennent les protéines de 40, 53,6 et 14,7 kDa reconnues respectivement par 66,6%, 57,1% et 47,6% des animaux. Pour ces protéines, le marquage est plus discret.

De ce tableau, il apparaît nettement que les animaux vaccinés avec la souche B 19, qui ont mené leur gestation à terme détectent un petit nombre de protéines comparé aux animaux ayant avortés (4 animaux du groupe vacciné B19- les animaux du groupe témoin et ceux vaccinés avec la fraction SDS-I.)

En moyenne, 6,9 bandes protéiques sont détectées par les sérums des animaux ayant avorté et seulement 1,6 bandes protéiques sont détectées par les animaux protégés de l'avortement.

L'histogramme de fréquence des sérums positifs pour les 3 groupes d'animaux, en distinguant dans le groupe des animaux vaccinés avec la souche B19 les animaux ayant avorté de ceux ayant mis-bas, se trouve à la *figure 15*. Seules les MM des 9 protéines fortement immunogènes sont reprises en abscisse.

Les réponses en Ac dirigés contre les 5 protéines les plus immunogènes vont être analysées pour les animaux des 4 groupes..

### Protéine estimée à 59,5 kDa

Septante-cinq pourcents des vaches du groupe témoin synthétisent des anticorps contre cette protéine et 100% des vaches vaccinées avec la fraction SDS-I.

Par contre, dans le groupe vacciné B19, 3 des 4 vaches qui ont avorté (41-60-81) présentent des anticorps dirigés contre cette protéine alors que chez toutes les vaches qui ont mis-bas sauf la 91(vache qui a mis-bas un veau infecté), cette protéine n'est pas ou très faiblement détectée.

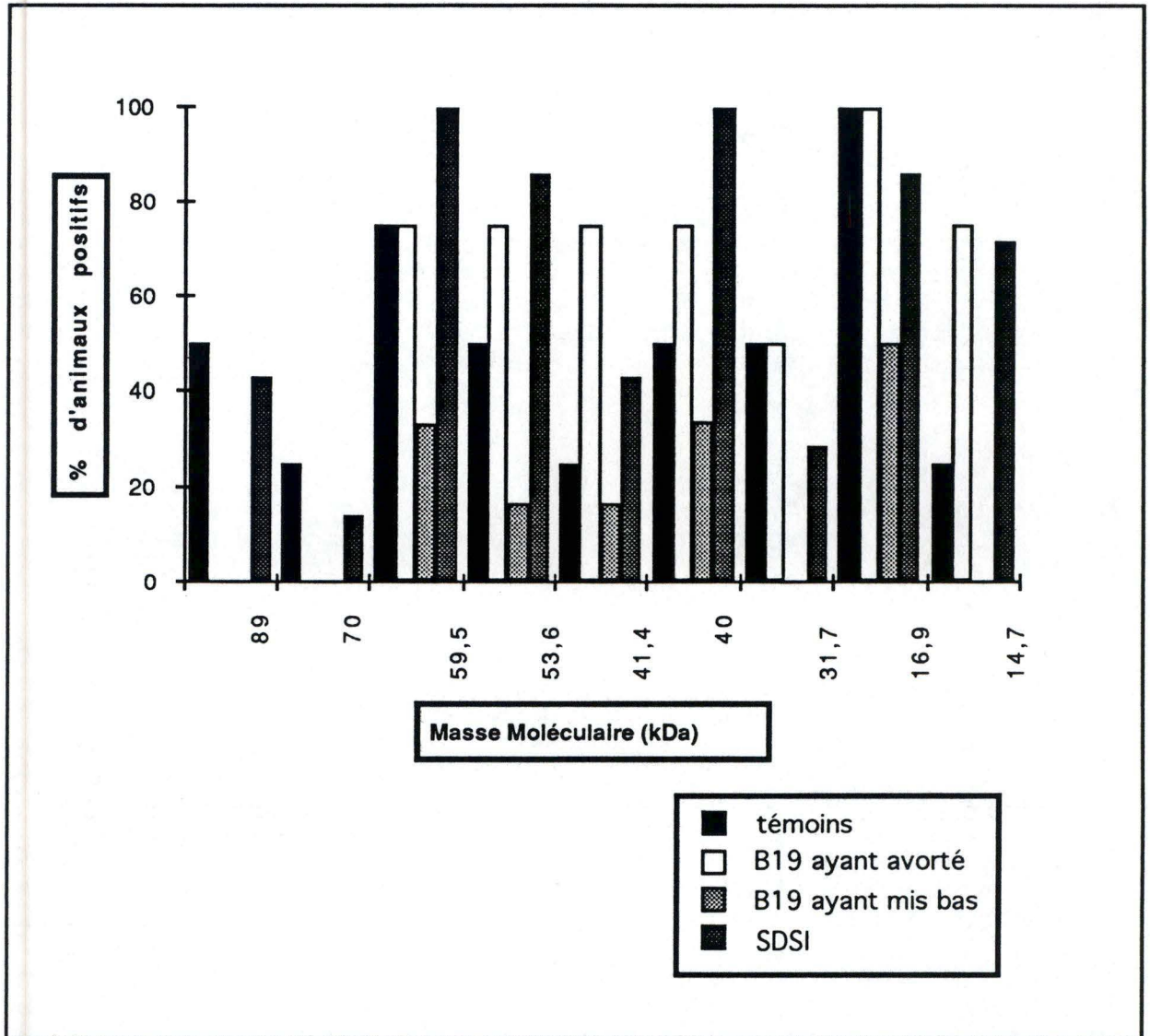


Figure 15 : Histogramme de fréquence des sérums infectés pour le groupe témoin (1), le groupe B19 (2) et le groupe SDS-I (3).

#### Protéine estimée à 16,9 kDa

Pour le groupe témoin, l'effet de bord lors de la migration des protéines, ne permet pas de tirer des conclusions fiables. Toutefois, les 4 vaches présentent une réponse en anticorps dirigée contre une protéine d'environ 16,9 kDa.

Pour le groupe vacciné avec la fraction SDS-I, les sérums de 85,7 % des génisses révèlent cette protéine, mais l'intensité du marquage est variable.

Pour le groupe B19, 3 des 4 bêtes ayant avortés (41-60-81) présentent un marquage intense alors que chez la quatrième (67), la réponse est quasi nulle. Parmi les animaux ayant mené leur gestation à terme, certains sérums (45-49-91) induisent un marquage, mais discret, alors que les autres sérums (93-3463-62) ne révèlent pas cette protéine.

#### Protéine estimée à 40 kDa

Cette protéine est détectée distinctement chez 50 % des bêtes témoins, 100 % des bêtes vaccinées avec la fraction SDS-I et chez 50 % des bêtes vaccinées B19 (dont 2 qui ont vêlé et 3 qui ont avorté).

#### Protéine estimée à 53,6 kDa

Cinquante pourcents des animaux du groupe témoin, 85,7 % du groupe SDS-I et 40 % du groupe vacciné B19 (dont 1 qui a vêlé mais dont le veau est infecté (91) et 3 bêtes qui ont avorté (41-60-81)) synthétisent des anticorps contre cette protéine.

#### Protéine estimée à 14,7 kDa

Cinquante pourcents des bêtes témoins et 71,4% des bêtes vaccinées avec la fraction SDS-I contiennent des Ac révélant cette protéine. Trente pourcents des bêtes vaccinées B19 la reconnaissent. Les 3 bêtes qui présentent un marquage sont 3 des 4 bêtes ayant avortés (41-60-81). Aucune des bêtes ayant mené sa gestation à terme ne répond contre cette protéine.

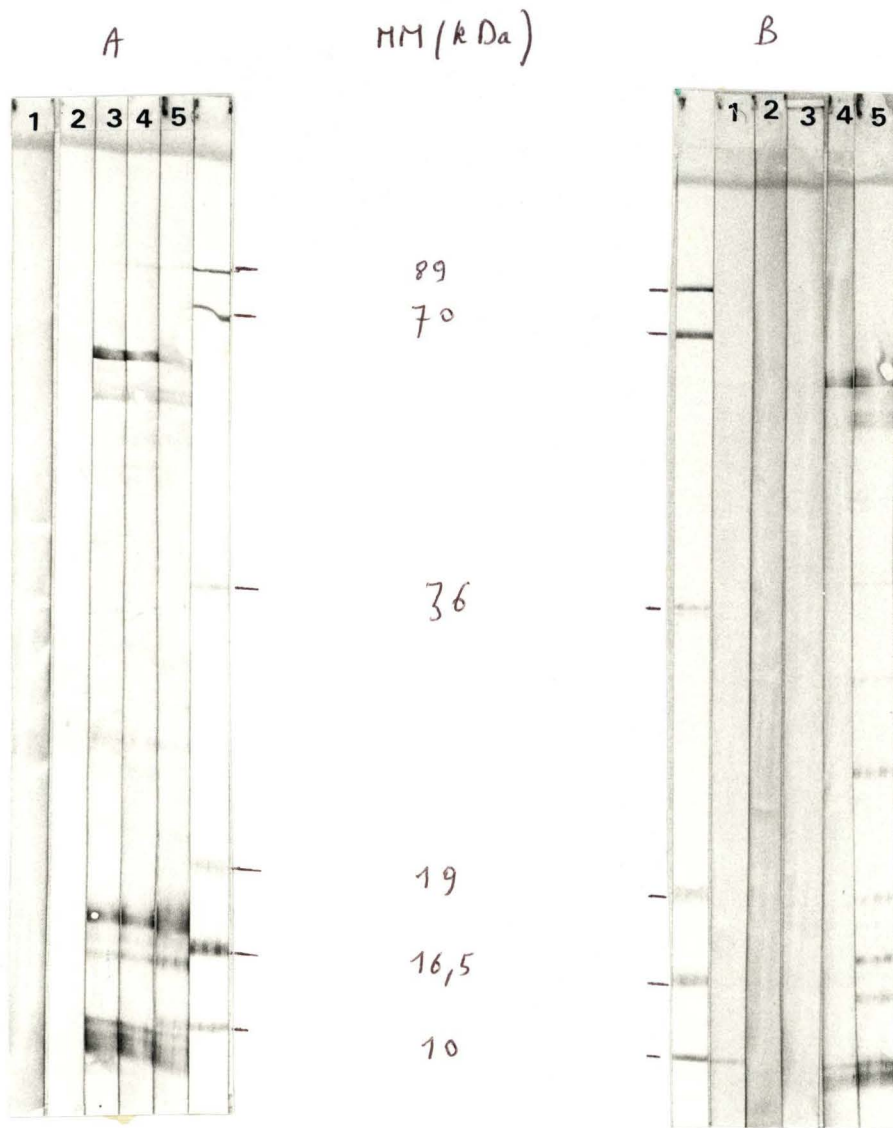
L'encadrement des pistes 9-10-11 et 12 à la figure 14 met bien en évidence que la protéine estimée à 16,9 kDa est une protéine distincte de celle reconnue par l'AcM 4G1C6 (piste 11). De même, la protéine estimée à 14,7 kDa est différente de celle reconnue par l'AcM anti-15,7 29E3C10 (piste 10 de la figure 14).

#### *II.3.2.4. Corrélation entre l'ELISA et l'IE*

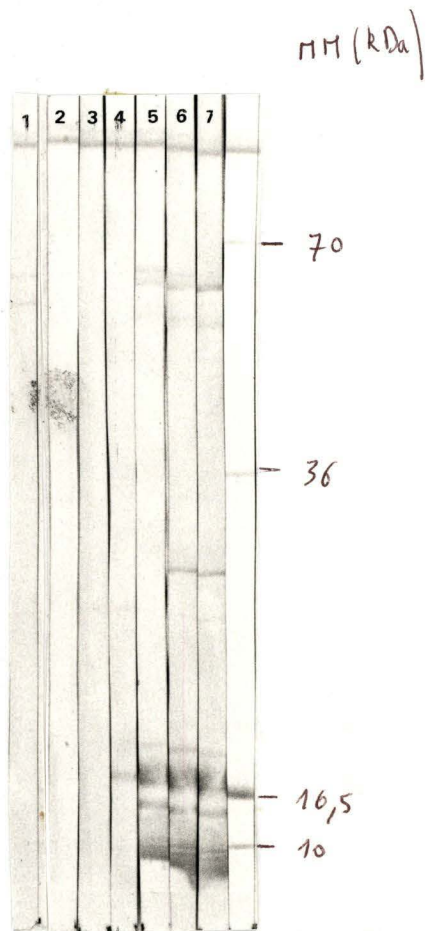
Ni l'ELISA indirect ni l'IE ne permet de détecter des Ac spécifiques des PME 19 et 25.

On n'observe aucune concordance entre l'ELISA indirect et l'IE pour la PME de 16,5 kDa. Alors que l'ELISA indirect a permis de détecter des Ac dans les sérums de 65 % des animaux, en IE, les sérums d'aucune génisse ne révèlent la protéine de 16,5 kDa reconnue par l'AcM 4G1C6 (piste 10 de la figure 14).

On n'observe pas non plus de concordance entre l'ELISA de compétition et l'IE pour la protéine de 15,7 kDa. En effet, alors que l'ELISA de compétition détectait la présence de taux d'Ac significatifs dirigés contre une protéine de 15,7 kDa chez 84,6 % des animaux, en IE, les sérums d'aucune génisse ne révèlent la protéine reconnue par l'AcM anti-15,7 29E3C10 (piste 11 de la figure 14)



**Figure 16 :** Cinétique d'apparition des Ac en IE sur extrait protéique de *B.abortus* 45/20. Les sérums testés, pour les génisses témoins 33 (A) et 92 (B), ont été prélevés aux jours -103 (1), 43(2), 82(3), 98 (4) et 157 (5). Les AcM sont disposés sur les bandelettes non numérotées.



**Figure 17 :** Cinétique d'apparition des Ac en IE sur extrait protéique de *B.abortus* 45/20. Les sérums testés, pour la génisse 60, vaccinée B19 ayant avorté, ont été prélevés aux jours -103 (1), -75 (2), 21(3), 43(4), 82(5), 98 (6) et 157 (7). Les AcM sont disposés sur les bandelettes non numérotées.

Les protéines dont les MM ont été estimées à 16,9 et 14,5 kDa détectées en IE semblent donc être deux protéines immunogènes distinctes de celles reconnues par les AcM anti-16,5 et les AcM anti-15,7.

En ce qui concerne la PME 36, en ELISA indirect, on ne détecte des Ac spécifiques dans aucun sérum des 7 génisses testées. Par contre, en IE, chez les génisses 58 et 89 vaccinées avec la fraction SDS-I des Ac dirigés contre cette PME sont détectés.

### *II.3.2.5. Cinétique d'apparition des anticorps*

La cinétique d'apparition des anticorps a été étudiée dans le but d'évaluer la réponse sérologique spécifique des protéines induite par la vaccination et d'identifier des protéines qui seraient détectées par les Ac sériques après l'infection mais avant l'avortement ou la mise-bas. La détection de telles protéines pourrait fournir des informations quant à l'évolution des bovins, soit vers l'avortement, soit la mise-bas.

La cinétique d'apparition des anticorps a été étudiée pour les vaches 33, 92, 60, 58 et 89.

Pour les bêtes témoins, les sérums testés sont ceux prélevés aux jours -103, 43, 82, 98 et 157.

Pour les bêtes vaccinées, les sérums testés sont ceux prélevés aux jours -103, -75, 21, 43, 82 et 98, et 157.

Les profils des protéines détectées par ces IE sont comparés à ceux obtenus lors de l'IE du jour 135. Les MM attribuées aux protéines sont celles estimées par l'équation logistique à 4 paramètres du jour 135.

#### **Groupe témoin (figure 16)**

Pour la génisse 33, toutes les protéines sont détectées en même temps à partir du jour 82.

La présaignée de la génisse 92 révèle une protéine d'une MM proche de 10 kDa . La protéine de 59,5 kDa apparaît au jour 98.

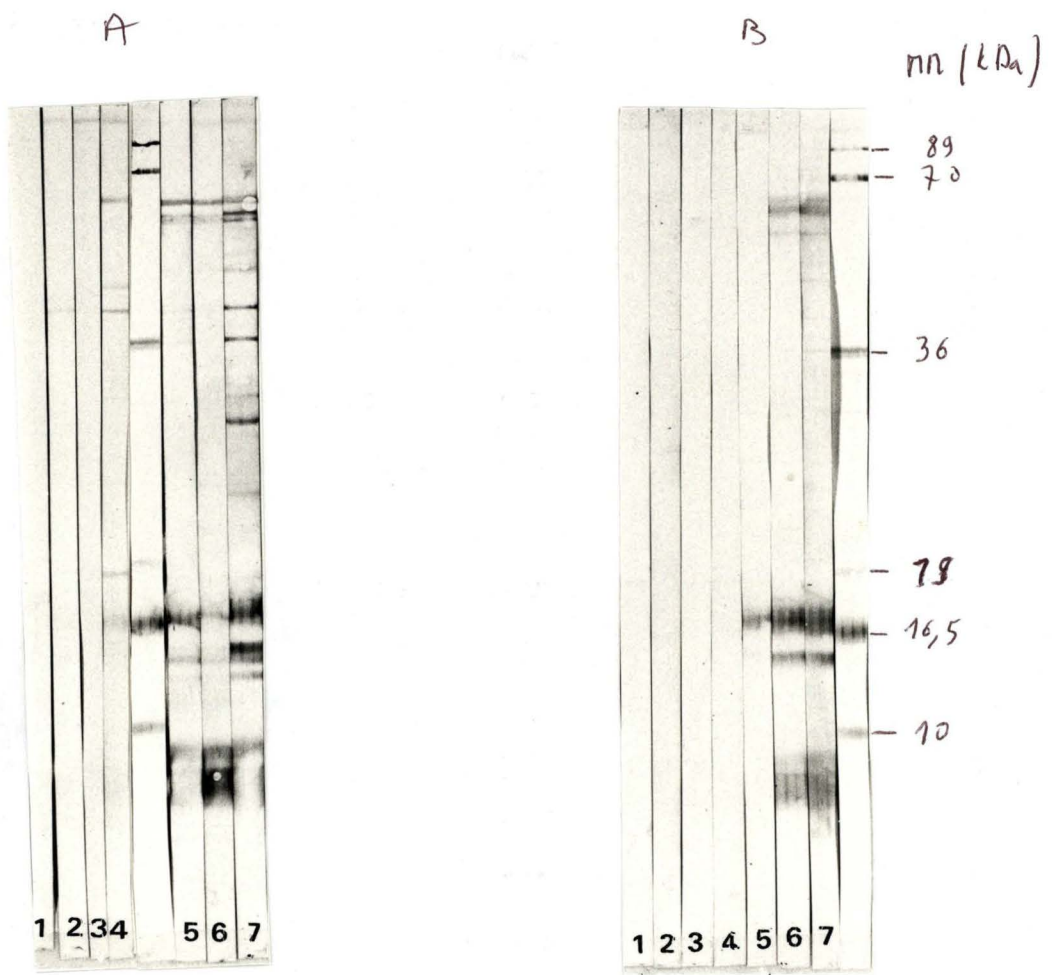
Un grand nombre de protéines sont détectées au jour 157. Sur cette IE, en comparaison à l'IE réalisée au jour 135, les protéines estimées à 89 kDa et 70 kDa ne sont pas détectées. D'autre part, le marquage des bandes dans le bas de l'image est plus net.

#### **Groupe vacciné B.19 (figure 17)**

génisse 60

Toutes les protéines sont détectées au jour 98.

Par rapport au blotting du jour 135, une protéine supplémentaire de masse moléculaire comprise entre 16,5 et 19 kDa est détectée. Par contre, les protéines de MM comprises entre 36 et 53,6 kDa ne sont pas détectées.



**Figure 18 :** Cinétique d'apparition des Ac en IE sur extrait protéique de *B.abortus* 45/20. Les sérums testés, pour les génisses 89(A) et 58(B), vaccinées avec la fraction SDS-1, ont été prélevés aux jours -103 (1), -75 (2), 21(3), 43(4), 82(5), 98 (6) et 157 (7). Les AcM sont disposés sur les bandelettes non numérotées.

## Groupe vacciné par la fraction SDS-I (*figure 18*)

génisse 89

Le marquage qui correspond à la protéine de MM estimée à 40 kDa apparaît faiblement au jour -75. Cette protéine n'est pas détectée avec tous les sérums prélevés ultérieurement. Les protéines détectées le plus précocément c'est-à-dire au jour 43 sont celles de 59,5 kDa, d'une MM comprise entre 16,5 et 19 kDa (non détectée au jour 135) et de 16,9 kDa (dont l'intensité du marquage est faible).

Les protéines de 16,9 et 14,7 kDa apparaissent distinctement au jour 82. Au jour 157, le profil des protéines détectées est le même que à l'IE du jour 135.

génisse 58

La protéine de 16,9 kDa apparaît plus précocément, c'est la seule protéine qui est détectée au jour 82. Au jour 157, toutes les protéines sont détectées.

Cette analyse n'a pas pu mettre en évidence l'existence d'une protéine qui serait un bon marqueur de l'infection, c'est-à-dire qui induirait la production d'anticorps peu de temps après l'infection et avant l'avortement. En effet, les anticorps ne sont bien détectés par IE que à partir de 82 jours après l'infection, soit 41 jours après le premier avortement.

Une IE réalisée sur un plus grand nombre de sérums prélevés après la vaccination (résultats non montrés), confirme que la vaccination n'induit qu'une très faible production d'anticorps.

La variabilité des protéines détectées d'une IE à l'autre, pourtant réalisée dans les mêmes conditions est indiscutable. La technique d'IE s'avère donc être une technique peu reproductible : le pouvoir de séparation des protéines et la qualité du transfert des protéines sur la nitrocellulose est variable.

### II.3.2.6. Réactivité des sérums sur la PME recombinante de 16,5 kDa en IE

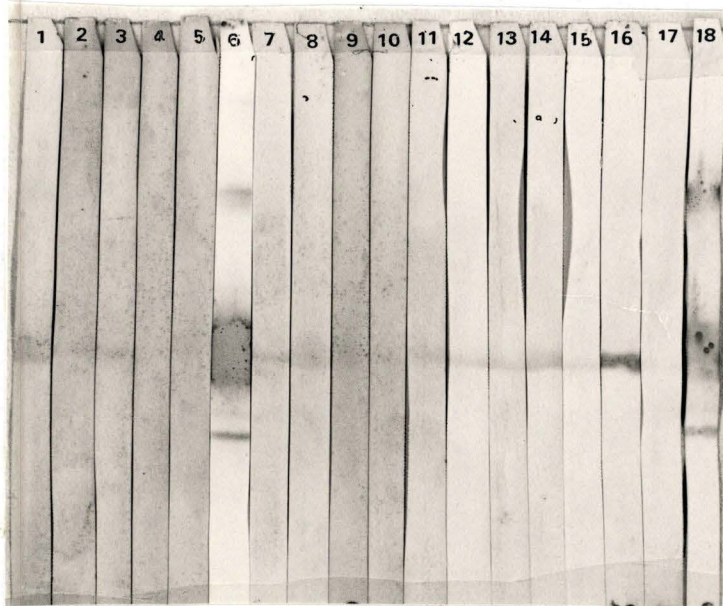
Etant donné que l'ELISA indirect sur la PME 16,5 et l'ELISA de compétition avec les AcM anti-16,5 ont permis de détecter des Ac spécifiques de la PME 16,5 chez respectivement 65 % et 73 % des bovins de l'expérience et que par contre, en IE (au jour 135), la protéine de 16,5 kDa ne semble être détectée chez aucun animal, nous avons testé les sérums des animaux contenant des Ac dirigés contre la PME 16,5 décelables en ELISA indirect, en IE, en utilisant la PME 16,5 comme antigène.

En diluant les sérums 50 fois et en révélant avec l'AcM 1C8 comme deuxième anticorps et une Ig de mouton anti-Ig de souris couplée à la peroxydase comme 3<sup>ème</sup> anticorps, aucune réponse contre la protéine n'a été détectée.

Par contre, l'IE de la *figure 19* a été réalisée en diluant les sérums 25 fois et en révélant avec un anticorps polyclonal, dirigé contre les chaînes légères et lourdes des IgG, couplé à la phosphatase alcaline.

Une réponse apparaît nettement chez la vache 45 au jour 135. Dix des 15 autres animaux testés, présentent un marquage très faible. Chez les autres génisses, aucun marquage n'est détecté.

Il n'existe pas une bonne corrélation pour tous les sérums testés, entre les DO observées en ELISA indirect et l'intensité du marquage en IE. Par exemple, le sérum de la génisse 45 présente un marquage intense en IE et la DO observée en ELISA indirect n'est que de 0,72. A l'opposé, le sérum de la génisse 94 ne révèle pas la protéine en IE alors que la DO observée est de 1,39 en ELISA indirect.



**Figure 19 :** Réactivité des sérums sur la PME recombinante 16.5 en IE

piste 1	génisse 33 au jour 82
piste 2	génisse 79 au jour 135
piste 3	génisse 42 au jour 82
piste 4	génisse 94 au jour 199
piste 5	génisse 84 au jour 43
piste 7	génisse 69 au jour 135
piste 8	génisse 58 au jour 135
piste 9	génisse 89 au jour 43
piste 10	génisse 81 au jour 135
piste 11	génisse 41 au jour 43
piste 12	génisse 41 au jour 135
piste 13	génisse 3463 au jour 199
piste 14	génisse 45 au jour -75
piste 15	génisse 45 au jour 43
piste 16	génisse 45 au jour 135
piste 17	génisse 45 au jour -103 (témoin négatif)
pistes 6 et 18 :	AcM anti 16,5

---

## **DISCUSSION**

---

Les recherches réalisées entrent dans le cadre des projets poursuivis par le Centre d'Etude de la Brucellose (CEB), à savoir la mise au point d'un vaccin et de tests diagnostiques compatibles, c'est-à-dire basés sur des antigènes différents. En effet, idéalement, la vaccination ne devrait ni induire des anticorps détectés par les tests sérologiques de diagnostic, ni induire une réponse cellulaire révélée par les tests cutanés.

La fraction SDS-I pourrait répondre à ces exigences et constituer un nouveau type de vaccin. En effet, elle contient un nombre réduit d'antigènes ( du LPS, les PME majeures 25 et 36 et du PG) et confère à la souris une protection comparable à celle procurée par les vaccins cellulaires. De plus, la vaccination avec cette fraction n'a pas induit dans cette expérience de réaction positive à l'intradermo-réaction (IDR) avec le brucellergène (contenant des protéines cytoplasmiques).

L'activité protectrice de cette fraction SDS-I par rapport au vaccin de référence B19 a été évaluée chez 26 génisses gestantes. Celles-ci ont été réparties en 3 groupes, les génisses du 1<sup>er</sup> et du 2<sup>ème</sup> groupe ont été vaccinées respectivement avec la souche B19 et la fraction SDS-I, par voie sous-cutanée. Les génisses du 3<sup>ème</sup> groupe n'ont pas été vaccinées et ont servi au contrôle de l'infection. Les génisses des 3 groupes ont été infectées par voie conjonctivale.

Les résultats du suivi sérologique spécifique des Ac anti-LPS, des tests intradermiques et bactériologiques nous ont été fournis.

Nous avons étudié la réponse sérologique spécifique des protéines suite à la vaccination et à l'infection chez les génisses appartenant aux 3 groupes, dans le but d'identifier des Ag protéiques adéquats pour le développement de tests de diagnostic.

## **1. RÉPONSE SÉROLOGIQUE SPÉCIFIQUE DU LPS**

Les résultats de cette étude ont confirmé que le LPS n'est pas un Ag permettant de faire la distinction entre animaux vaccinés et animaux infectés puisque les anticorps dirigés contre le LPS sont détectés après la vaccination (avec la souche B19 et la fraction SDS-I) de même qu'après l'infection.

L'évolution des taux d'Ac ne semblent pas différents pour les 3 groupes, excepté chez 3 des 6 génisses vaccinées avec la souche B19 qui ont mené leur gestation à terme, chez qui les taux d'Ac après infection sont faibles.

## **2. SUIVI DE LA RÉPONSE CELLULAIRE PAR LES TESTS CUTANÉS UTILISANT LE BRUCELLERGÈNE**

L'intradermo-réaction est utilisée pour révéler l'infection en mettant en évidence une réaction d'hypersensibilité de type retardée. L'épreuve n'induit pas de réponse humorale pouvant interférer avec les tests sérologiques. Elle permet la détection des animaux infectés en phase aiguë ou chronique, évite les prises de sang, et n'entraîne pas de réactions croisées. Malheureusement, la vaccination avec la souche B19 entraîne également une réponse suite à l'intradermo-réaction dont l'intensité n'est pas en relation avec l'avortement ou le vèlage.

La fraction SDS-I n'induit de réaction positive suite à l'intradermo-réaction avec le brucellergène chez aucune des génisses. Ce test de diagnostic basé sur la réponse cellulaire est donc compatible avec la vaccination par la fraction SDS-I.

### 3. RÉPONSE SÉROLOGIQUE SPÉCIFIQUE DES ANTIGÈNES PROTÉIQUES CONTENUS DANS LA FRACTION SDS-I

---

Ces antigènes protéiques sont les PME majeures de 25 et 36 kDa. Ces 2 protéines contribuent probablement à la protection conférée par la fraction SDS-I chez la souris. En effet, la fraction SDS-I induit chez la souris une protection durable alors que l'immunisation avec le LPS seul ne confère qu'une protection d'une durée limitée ( $\pm$  21 jours). L'immunisation avec le LPS seul ne suffit donc pas pour enrayer l'infection. Les PME présentes dans la fraction SDS-I seraient la base antigénique de la protection à longue durée.

La réponse sérologique spécifique de ces 2 protéines a été étudiée en ELISA indirect grâce aux protéines recombinantes purifiées et en IE utilisant un extrait de *Brucella* contenant des protéines natives de la paroi et du cytoplasme.

Pour la PME 25 de même que pour la PME 36, les sérums des 8 génisses testées ne montrent pas de DO plus élevées après l'infection qu'avant la vaccination, ce qui semble indiquer l'absence d'Ac anti-PME 25 et 36 dans les sérums.

L'IE réalisée avec l'extrait 45/20 au jour 135, ne révèle pas non plus de protéine dont la MM est estimée à 25 kDa (excepté un marquage très discret chez la génisse 89 correspondant à une MM de 24,4 kDa). Par contre avec le sérum d'une des 8 génisses (58), l'IE révèle la PME 36.

Les résultats de ces 2 techniques sont cependant difficilement comparables puisque le marquage avec les AcM anti-36 mais surtout avec les AcM anti-25 en IE réalisé en utilisant l'extrait 45/20 comme antigène est très faible comparé au marquage en IE utilisant les protéines recombinantes de 25 et 36 kDa. Les concentrations de la PME 36 mais surtout de la PME 25 sont donc très faibles dans l'extrait 45/20 lysé dans du SDS. Pour enrichir l'extrait 45/20 en PME 25 et en PME 36, il faudrait le traiter au lysozyme de manière à rendre les PME solubles dans le SDS. Un extrait enrichi en PME 25 et 36 pourrait alors être intéressant pour étudier la réponse sérologique spécifique de ces PME en IE.

Les anticorps dirigés contre la PME 25, détectés dans les sérums prélevés avant la vaccination n'étant pas neutralisés par des extraits d'*E.coli*, cela laisse supposer que ces animaux ont été en contact avec une autre bactérie dont les protéines présentent également des épitopes communs avec la PME 25 de *Brucella*. Des similarités de séquence ont été trouvées entre la PME 25 de *Brucella* et les OMP A de 5 bactéries (*Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurum*, *Serratia macescens* ou *Shigella dysenteriae*) (thèse de P. de Wergifosse, 1992). Il n'est donc pas impossible que dans ces zones de similarité, il existe un épitope responsable de réactions croisées. La fixation de certains AcM anti-25 détectée par ELISA sur des parois de *Yersinia enterocolitica* 0:9 suggère la présence d'épitopes communs entre la PME 25 de *Brucella* et *Yersinia*.

La discordance entre l'ELISA indirect sur la PME 36 et l'IE pour le sérum de la génisse 58 peut s'expliquer par la différence de nature de la protéine de 36 kDa utilisée en ELISA indirect et celle contenue dans l'extrait 45/20.

La protéine recombinante utilisée en ELISA indirect est une protéine tronquée qui ne contient pas les 37 AA N-terminaux. L'épitope reconnu par les Ac du sérum pourrait se situer dans cette région ce qui expliquerait le résultat négatif sur la protéine recombinante. Par contre, l'extrait 45/20 contient la protéine native qui elle, serait reconnue par les Ac sériques.

Un repliement incorrect de la protéine pourrait expliquer les résultats négatifs obtenus en ELISA indirect.

Les PME étant conservées dans un tampon de guanidine 6 M, un agent fortement dénaturant, il se pourrait que celles-ci après dilution dans le tampon de sensibilisation et adsorption sur le fond des puits ne retrouvent pas leur conformation native. Les résultats de la fixation des AcM anti-25 et anti-36 sur ces 2 PME indiquent toutefois que les épitopes des protéines sont reconnus par la plupart des AcM. Cependant, les DO observées étant plus faibles que celles obtenues avec les AcM anti-19 sur la PME 19, il semblerait tout de même qu'il subsiste un problème de renaturation de ces protéines.

#### **4. ANTIGÈNES SUSCEPTIBLES D'ÊTRE UTILISÉS POUR LE DIAGNOSTIC**

---

##### **4.1. PME 19**

Les résultats de l'ELISA indirect utilisant la PME 19 comme antigène sont contradictoires avec ceux obtenus par M. Leboutte (1992, mémoire licence), chez des bovins infectés naturellement.

Or, la protéine recombinante de 19 kDa et le protocole de sensibilisation utilisé pour l'ELISA indirect étaient les mêmes et, en IE nous avons utilisé le même extrait de *Brucella*.

Parmi les génisses de notre expérience, seule une génisse du groupe vacciné avec la fraction SDS-I présente des anticorps spécifiques de cette protéine, décelables en ELISA indirect alors qu'en IE aucun sérum ne révèle une protéine de 19 kDa.

Par contre, dans l'expérience réalisée par M. Leboutte, 63 % des animaux avaient des Ac dirigés contre la PME 19 en ELISA indirect et 31 % en IE.

Nos résultats négatifs ne peuvent être attribués à un repliement incorrect de la protéine adsorbée au fond des puits, puisque tous les AcM anti-19 se fixent en ELISA indirect et que les DO observées sont élevées.

La virulence de la souche d'épreuve *B. abortus* 544 qui exprime la PME 19, ne peut être remise en question puisque toutes les génisses du groupe témoin et toutes celles vaccinées avec la fraction SDS-I ont avorté.

Les 2 types d'expériences diffèrent quant à la race des animaux brucelliques testés, l'état de gestation des animaux et le type d'évolution suite à l'infection.

M. Leboutte a testé des sérums de bovins infectés de Belgique, ces bovins étaient non gestants et présentaient une infection de type chronique.

Dans notre expérience, les génisses gestantes de race Pie Noire ont été infectées artificiellement avec une dose importante de bactéries par voie conjonctivale, qui serait également une voie d'infection naturelle. Les bovins testés répondent de façon aiguë à cette infection.

Alors que chez les bovins infectés naturellement cette protéine se montrait particulièrement intéressante pour le diagnostic, nos expériences remettent son utilité en question.

##### **4.2. PME 16,5 et PME 15,7**

En testant la réactivité de la protéine recombinante de 16,5 kDa en ELISA indirect avec les 5 AcM décrits comme spécifique d'une PME de 16,5 kDa par A. Cloeckert, nous avons mis en évidence 2 AcM qui ne se fixaient pas sur la protéine recombinante. Ces résultats ont été confirmés en IE utilisant la protéine recombinante comme antigène. En effet, les 2 mêmes AcM ne révèlent pas la PME.

En testant ces AcM en IE sur extrait de *Brucella* 45/20, nous avons constaté que ces 2 mêmes AcM reconnaissent une protéine dont la MM a été estimée à 15,7 kDa par rapport à la protéine de 16,5 kDa reconnue par les 3 autres AcM.

Deux hypothèses sont dès lors émises pour expliquer l'existence de ces 2 familles d'AcM présentant des réactivités différentes.

1. Soit ces 2 types d'AcM reconnaissent 2 formes distinctes d'une même protéine, à savoir une protéine à des stades de maturation différents.
2. Soit chaque famille d'AcM reconnaît une protéine différente

Dans le cas où les 2 familles d'AcM reconnaîtraient des protéines à un stade de maturation différent, les AcM anti-15,7 seraient spécifiques d'un épitope non accessible au niveau de la protéine de 16,5 kDa qui correspondrait à un stade de maturation ultérieur. Les AcM anti-16,5 reconnaîtraient un épitope présent sur la protéine aux 2 stades de maturation. Seulement, dans ce cas, les AcM anti-16,5 devraient reconnaître la protéine de 16,5 et celle de 15,7 kDa et, en IE sur extrait 45/20, 2 bandes devraient être révélées, or seule une bande apparaît en IE.

La séquence en AA de la PME de 16,5 kDa déduite de la séquence du gène est connue. Celle-ci indique que la PME 16,5 serait une lipoprotéine. Trois acides gras seraient associés par liaison covalente au 1<sup>er</sup> AA de la séquence codante, à savoir, une cystéine.

Lorsqu'un extrait aqueux de *Brucella* est traité au triton X114 à 1° ambiante, 2 phases apparaissent, une phase triton et une phase aqueuse. Lorsqu'on réalise une IE avec les protéines des 2 phases, les AcM 4G1C6 et 4E3B7 reconnaissent une protéine uniquement dans la phase triton et les AcM anti-15,7, 29E3C10 et 5H1E9 présentent un marquage intense dans la phase aqueuse mais l'AcM 5H1E9 présente également un marquage discret dans la phase triton.

Ces résultats confirment que la PME 16,5 serait une lipoprotéine contrairement à la protéine de 15,7 kDa mais n'excluent pas que la protéine de 15,7 kDa puisse être un précurseur de la PME 16,5.

Les résultats de la fixation des AcM anti-16,5, 4G1C6 et 4E3B7, sur des bactéries entières mesurés par ELISA indirect, confirment que la PME 16,5 est ancrée dans la membrane externe et exposée à sa surface. Les résultats de la fixation des AcM anti-15,7 sur des parois de *B. abortus* et *B. melitensis* permettent de situer cette protéine dans les parois de la bactérie mais, les résultats obtenus sur les bactéries entières ne permettent pas d'affirmer qu'elle est exposée à la surface.

Une banque génomique de *B. abortus* construite dans le phage  $\lambda$ gt11a été criblée avec des sérums d'animaux infectés. Deux phages pour lesquels les résultats étaient positifs avec les AcM 29E3C10 et 5H1E9 (anti-15,7) et négatifs avec l'AcM 4G1C6 (anti-16,5) ont été isolés. Le gène codant pour cette protéine a été isolé et séquencé. La séquence est différente de celle codant pour la protéine de 16,5 kDa

Ces constatations sont en faveur de la 2<sup>ème</sup> hypothèse, à savoir que les AcM anti-15,7 et anti-16,5 reconnaîtraient 2 protéines différentes.

#### 4.2.1. Réponse sérologique spécifique des PME 16,5 et 15,7 kDa

##### 4.2.1.1. PME 16,5

La réponse sérologique spécifique de la PME 16,5 a été étudiée en ELISA indirect, grâce à la protéine recombinante de 16,5 kDa dont nous disposons, en ELISA de compétition grâce aux AcM anti-16,5 (4G1C6 et 4E3B7) et en IE utilisant l'extrait 45/20.

Nous avons obtenu une bonne corrélation entre l'évolution des taux d'Ac en ELISA indirect avec épuisement des sérums et l'ELISA de compétition avec l'AcM 4E3B7. Les réponses dirigées contre cette PME apparaissent le plus souvent après l'avortement. Ces réponses tardives pourraient s'expliquer par la réinfection de l'animal au moment de l'avortement par contact sanguin entre la mère et le fœtus.

Les Ac décelés ne sont pas des Ac présentant des réaction croisées avec *E. coli* puisque les sérums ont été épuisés en ELISA indirect et puisque l'AcM 4E3B7 ne se fixe pas sur les extraits totaux d'*E. coli*.

L'effet variable de l'épuisement des sérums avec *E. coli* amène à penser que les sérums peuvent contenir soit uniquement des anticorps reconnaissant des épitopes spécifiques de *Brucella* non présents sur *E. coli*, dans ce cas, l'effet de l'épuisement est nul, soit ils contiennent des anticorps spécifiques et aussi des anticorps reconnaissant des épitopes communs, dans ce cas, l'effet du signal est plus faible mais la cinétique est inchangée, soit les anticorps du sérum reconnaissent principalement des épitopes communs aux 2 bactéries et l'épuisement annule le signal.

En IE, la PME de 16,5 kDa n'est détectée par aucun des sérums testés. La non détection de cette protéine en IE et les résultats faibles mais positifs en ELISA indirect (DO faibles) et en ELISA de compétition (% d'inhibition faible) suggèrent que soit les Ac reconnaissent des épitopes conformationnels qui n'ont pas été renaturés après électrophorèse en présence de SDS, soit que la concentration de ces anticorps est trop faible et dès lors ils ne sont pas détectés par IE.

Les sérums positifs en ELISA indirect ont alors été testés en IE utilisant la PME 16,5 comme antigène. Les sérums de 11 génisses sur 15 révèlent la protéine mais très faiblement. On en conclut que les Ac dirigés contre cette protéine sont présents mais à trop faible concentration et ne sont pas détectés en IE sur des extraits de *Brucella* 45/20.

La PME de 16,5 ne semble pas être un antigène de diagnostic idéal car les taux d'Ac induits sont faibles, apparaissent bien souvent après l'avortement et ne sont pas détectés chez un grand nombre d'animaux.

##### 4.2.1.2. PME 15,7

La réponse sérologique spécifique de cette protéine a été étudiée en ELISA de compétition grâce aux AcM 29E3C10 et 5H1E9 et en IE utilisant l'extrait 45/20 comme antigène.

Cette protéine s'est avérée être fort immunogène en ELISA de compétition. Elle permet de détecter un grand nombre de bovins infectés : 100 % des génisses vaccinées avec la souche B19 ayant avorté, 91,6 % des génisses vaccinées avec la fraction SDS-I, 50 % des génisses du groupe témoin et 33 % des génisses du groupe B19 ayant mis-bas. De plus, les taux d'Ac dirigés contre cette protéine sont importants puisque les % d'inhibition sont élevés. Dans la majorité des cas, l'évolution du taux de ces Ac est très semblable à celle des taux d'Ac anti-LPS. Au moment de l'avortement, les taux sont élevés. Quelques sérums prélevés entre le jour 43 et 82 ont été testés afin de déceler si les Ac apparaissent avant l'avortement. Toutes les génisses possèdent des Ac sériques dirigés contre la PME 15,7 avant l'avortement.

Par contre, en IE aucun sérum n'a révélé la protéine de 15,7 kDa. Etant donné que les taux de ces Ac sériques spécifiques de cette PME doivent être importants, on expliquerait ce résultat négatif par un repliement incorrect de la protéine après dénaturation par le SDS lors de l'électrophorèse. Les Ac reconnaîtraient donc des épitopes conformationnels.

Cette protéine est un très bon marqueur de l'infection mais principalement chez les génisses qui ont avorté. Elle pourrait être intéressante pour le développement de nouveaux tests diagnostiques puisque les anticorps induits sont détectés avant l'avortement.

#### **4.3. Protéines identifiées par IE**

L'IE a permis d'identifier 5 protéines fort immunogènes, à savoir les protéines de 59,5-53,6-40-16,9 et 14,7 kDa.

Les protéines de 59,5 , 53,6 et 14,7 kDa pourraient être intéressantes pour discriminer les génisses qui ont avorté de celles qui ont mené leur gestation à terme.

La protéine dont la MM a été estimée à 59,5 kDa a permis de détecter 93,3 % des animaux qui ont avorté et 16,6 % des animaux qui ont mis-bas alors que la protéine de 53,6 kDa détecte 55 % des animaux qui ont avorté et 16,6 % des animaux qui ont mis-bas. La protéine de 14,7 kDa détecte 62 % des animaux qui ont avorté et aucun animal qui a mené sa gestation à terme.

Si on étudie la complémentarité des protéines dans le but de développer un test de diagnostic qui identifierait les animaux qui ont avorté, l'association de la protéine de 14,7 kDa à la protéine de 59,5 kDa pourrait être intéressante pour confirmer les résultats obtenus avec celle de 59,5 kDa.

Cette protéine fort immunogène estimée à 59,5 kDa et dont la taille de la bande révélée est assez large, pourrait être la "Heat Shock Protéin" de 62 kDa décrite par Lin et al (1992).

Les protéines de 40 et 16,9 kDa sont de bons marqueurs de l'infection.

#### **5. COMPARAISON ENTRE LA RÉACTION SÉROLOGIQUE APRÈS INFECTION CHEZ LES GÉNISSES PROTÉGÉES ET NON PROTÉGÉES DE L'AVORTEMENT.**

---

On constate que les animaux bien protégés présentent des taux plus faibles d'anticorps tant dirigés contre le LPS que contre les protéines par rapport aux animaux ayant avortés.

L'explication pourrait être que la protection par le vaccin empêcherait la dissémination des bactéries virulentes et dès lors la stimulation de la production d'Ac.

#### **6. CORRÉLATION ENTRE LA PRODUCTION D'AC ET LES RÉSULTATS BACTÉRIOLOGIQUES**

---

On constate que les animaux qui ont mené leur gestation à terme ont peu de prélèvements contaminés (0 ou 1, et 2 prélèvements contaminés chez la génisse dont le veau est infecté)

Il est cependant étrange de constater que dans le groupe témoin, où les 4 animaux ont avorté et, parmi les 4 animaux vaccinés B19 ayant avortés, respectivement 75% et 50% n'ont aucun ou seulement 1 prélèvement contaminé, alors que dans le groupe vacciné SDS-I où toutes les bêtes ont avorté, il y a toujours au moins 1 culture positive.

Il semblerait qu'il y ait une corrélation entre le nombre de prélèvements contaminés et le taux d'Ac inhibant la fixation de l'AcM 4E3B7. La plupart des génisses dont le nombre de prélèvements contaminés est élevé présentent un taux en Ac spécifique de l'épitope reconnu par l'AcM 4E3B7 plus élevé (génisses 33-60-41 et 58). L'épitope reconnu par cet AcM pourrait être un marqueur de l'infection chronique.

#### **Evaluation des techniques utilisées**

La technique d'IE présente l'avantage de détecter les anticorps du sérum dirigés contre les différentes protéines de l'extrait utilisé comme antigène. Cependant, cette technique, comparé à l'ELISA présente certaines limitations :

- Deux protéines de même MM ne peuvent être différenciées
- Le marquage détecté permet seulement d'estimer la MM de la protéine
- Elle est peu reproductible : le pouvoir de séparation des protéines et la qualité du transfert sur la nitrocellulose est variable.
- Elle est moins sensible et difficilement quantifiable.

Le problème rencontré en ELISA indirect avec les protéines recombinantes conservées dans le tampon de guanidine et en IE lorsque l'électrophorèse se fait en présence de SDS est que les protéines ne retrouvent pas nécessairement leur conformation native et les épitopes conformationnels ne sont pas toujours reconnus par les Acs sériques.

L'ELISA indirect utilisant les protéines recombinantes et l'ELISA de compétition au moyen des AcM permettent respectivement la détection d'Ac spécifiques d'une seule protéine et d'un épitope. Pour la PME 16,5, le pourcentage d'animaux détecté par ces 2 techniques est comparable. Cependant, l'ELISA de compétition est plus fiable puisque un seuil de positivité a pu être fixé à partir des DO observées sur des présaignées. Un plus grand nombre de présaignées devrait être testé pour améliorer la détermination de ce seuil. En ELISA indirect par contre, la détermination de la présence d'une réponse vaccinale ou infectieuse a été basée uniquement sur l'analyse de la courbe représentant la variation du taux d'Ac sériques en fonction du temps. De plus, les sources d'erreurs sont plus importantes puisque à la moyenne des DO observées sur la protéine recombinante, on soustrait la valeur moyenne des DO

---

## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

---

La vaccination par la fraction SDS-I retarde les avortements de quelques semaines par rapport au groupe témoin, mais ne protège pas autant que la vaccination par la souche B19 pour laquelle on obtient une protection de 60 %.

La vaccination SDS-I offre cependant un avantage par rapport au B19 car elle n'induit pas une IDR positive avec le brucellergène. Ce test permet donc de différencier les animaux vaccinés avec la fraction SDS-I des animaux infectés. Cependant, dans le cas de l'administration d'une 2<sup>ème</sup> dose vaccinale, ce test n'est plus fiable puisque certains animaux peuvent montrer une réponse positive à l'IDR.

Les taux d'Ac spécifiques du LPS (qui est l'antigène utilisé dans les tests diagnostiques actuels) induits par la vaccination ne diffèrent pas de manière significative chez les bovins qui ont avorté par rapport à ceux qui ont été protégés. La cinétique d'apparition des Ac anti-LPS après l'infection n'apporte pas non plus une information formelle quant à l'évolution de l'animal (avortement ou mise-bas). Il semble néanmoins qu'un faible taux d'Ac après l'infection soit lié à une évolution favorable.

Le LPS s'avère donc être un antigène inadéquat pour différencier les animaux vaccinés des animaux infectés.

L'évaluation de la réponse sérologique dirigée contre les protéines est divisée en 3 paragraphes. Le premier concerne la relation existant entre la production d'Ac et la protection conférée par la vaccination, le deuxième concerne les antigènes candidats pour le développement de nouveaux tests diagnostiques et le troisième, la présence d'Ac qui signeraient l'infection de type chronique.

## **1. RELATION ENTRE LA PRODUCTION D'AC ET LA PROTECTION CONFÉRÉE PAR LA VACCINATION**

---

La vaccination induit la production de peu d'anticorps.

Comme pour les Ac anti-LPS, il existerait une relation inversément proportionnelle entre le taux d'Ac détecté après l'infection et la protection conférée. Les protéines ne semblent donc pas impliquées dans une protection de type humorale. Cloeckart et al étaient arrivés à la même conclusion en testant, en protection passive, 36 AcM dirigés contre 7 PME. En effet, seulement 3 AcM conféraient une protection et celle-ci était inférieure à celle apportée par les AcM anti-LPS. De plus, la combinaison d'AcM anti-PME avec des AcM anti-LPS produit seulement l'effet des AcM anti-LPS, après inoculation de l'épreuve virulente.

Des études réalisées sur la souris montrent que les protéines doivent jouer un rôle dans l'immunité cellulaire. En effet, l'immunisation par le LPS ne fait que diminuer l'extension des bactéries dans le foie et la rate, sans l'arrêter, tandis que la fraction SDS-I permet la réduction de la colonisation de ces 2 organes pouvant aller jusqu'à la disparition des bactéries. Les PME présentes dans la fraction seraient responsables de l'effet durable. De plus, les résultats positifs à l'IDR avec le brucellergène chez la plupart des bovins de l'expérience, 26 jours après l'infection, est un argument supplémentaire en faveur du rôle des protéines dans l'immunité cellulaire.

Les résultats de l'IE et de l'ELISA indirect n'ont pas permis de détecter des Ac dirigés contre les PME majeures 25 et 36, les 2 protéines principalement contenues dans la fraction SDS-I. Ces résultats devraient être confirmés en IE en traitant l'extrait 45/20 au lysozyme et en ELISA indirect dans des conditions de sensibilisation optimales.

## **2. ANTIGÈNES CANDIDATS POUR LE DÉVELOPPEMENT DE NOUVEAUX TESTS DIAGNOSTIQUES**

---

Notre travail a permis :

- de mettre en évidence lors de l'étude de la réactivité des PME recombinantes au moyen des AcM, une nouvelle protéine, celle reconnue par les AcM 29E3C10 et 5H1E9. Les ELISA de compétition réalisés avec ces AcM indiquent que cette protéine est un antigène de diagnostic qui permet de révéler l'infection avant l'avortement. Le gène codant pour la protéine de 15,7 kDa devrait être cloné et la protéine isolée par criblage de la banque génomique à l'aide des AcM. Grâce à la protéine recombinante, on pourrait tester les sérums en ELISA indirect et ainsi détecter les Ac sériques spécifiques de tous les épitopes renaturés, accessibles à la surface de la protéine.
- d'identifier par IE des protéines de 59,5-16,9 et 14,7 kDa qui seraient des candidats au moins aussi intéressants pour le développement de nouveaux tests diagnostiques. La protéine de 59,5 kDa est fort immunogène et présente en IE une bande assez large. Elle est détectée chez 93 % des animaux qui ont avorté. Elle pourrait correspondre à la "Heat Shock Protein" de 62 kDa décrite par Lin et al. (1992). Pour s'en assurer, nous avons comparé en IE, l'intensité de la bande révélée lorsque les bactéries ont été soumises à un choc thermique. Si l'intensité de la bande révélée avait été plus importante, nous aurions supposé que la synthèse de cette protéine était accrue suite au stress thermique. Lin et al ont montré que cette protéine de 62 kDa contenait des épitopes communs avec les protéines GroEl d'E.coli et de mycobactéries. Seuls les épitopes spécifiques de cette protéine pourraient être utilisés à des fins diagnostiques.

Les protéines de 16,9 et 14,7 kDa ont donc été mises en évidence par IE. La réponse spécifique de ces protéines pourrait être étudiée plus précisément si on disposait des protéines recombinantes correspondantes.

La protéine de 16,9 kDa est détectée par les animaux qui ont avorté mais également par les animaux qui ont mis-bas. Par contre, la protéine de 14,7 kDa est détectée uniquement chez des génisses qui ont avorté. Cette protéine de 14,7 kDa pourrait correspondre à la protéine de 15 kDa identifiée par Allardet-Servent et al (1991), qu'ils ont qualifiée de protéine immunologiquement importante. La localisation dans la bactérie de ces protéines mises en évidence par IE n'est pas connue.

## **3. AC QUI SIGNERAIENT L'INFECTION DE TYPE CHRONIQUE**

---

La protéine de 16,5 kDa, utilisée en ELISA indirect permet de détecter un faible pourcentage de bovins infectés et en plus les Ac dirigés contre cette protéine apparaissent après l'avortement ce qui exclut la possibilité de l'utiliser pour le diagnostic. Par contre, cette protéine pourrait être un marqueur de l'infection chronique.

D'une manière générale, la détection d'Ac dirigés contre les protéines est tardive aussi bien pour les protéines détectées par IE que pour la PME 16,5 détectée par ELISA indirect et ELISA de compétition que pour la protéine de 15,7 kDa détectée par ELISA de compétition. La mise au point d'un test plus sensible devrait être envisagée.

---

## **BIBLIOGRAPHIE**

---

- Allardet-Servent A., Carles-Nurit M.J., Bourg G., Michaux S. and Ramuz M., 1991, Physical Map of the *Brucella melitensis* 16 M Chromosome. *J. Bacteriology*, 173 (7) : 2219-2224
- Alton G.G., Corner L.A. and Plackett P., 1980, Vaccination of pregnant cows with low doses of *Brucella abortus* strain 19 vaccine, *Australian Vet. Journal*, 56 : 369-372
- Alton G.G., Corner L.A. and Plackett P., 1984, Vaccination against bovine brucellosis, *Dev. Biol. Stand.*, 56, 643
- Alton G.G., Jones L.M., Angus R. and Verger J.M., 1988, Technique for the brucellosis laboratory, INRA, Paris
- André-Fontaine G., 1980, Les vaccins antibrucelliques en France, *Rec. Méd. Vet.*, 156 (6) : 433-437
- Araya L.N. and Winter A.J., 1990, Comparative protection of mice against virulent and attenuated strains of *Brucella abortus* by passive transfer of immune T cells or serum, *Infect. Immun.*, 58 : 254-256
- Araya L.N., Elzer P.H., Rowe G.E., Enright F.M. and Winter A.J., Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in balb/c mice infected with *Brucella abortus*, *J. Immunol.*, 143 (10), 3330-3337
- Bang B., 1897, The ethiology of epizootic abortion, *J. Comp. Path.*, 10 : 125-149
- Barton C.E. and Lomme J.R., 1980, Reduced-dose whole herd vaccination against Brucellosis : a review of recent experience, *JAVMA*, 177 (12) : 1218-1220
- Bascoul S., Cannat A., M.-F. Hugnet and Serre A., 1978, Studies on the immune protection to murine supernatant brucellosis conferred by *Brucella* fractions I. Positive role of immune serum, *Immunol.* 35 : 213-221
- Belzer C.A., Tabatabai L.B. and Deyoe B.L., 1991, Differentiation by western blotting of immune responses of cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or infected experimentally or naturally with virulent *Brucella abortus*, *Vet. Microbiol.*, 27 : 79-90
- Berman D.T. and Jones M.J., 1980, Summary of research in Brucellosis since 1975, *Organisation mondiale de la souche*, 363
- Bosseray N., Plommet M. and De Ryck Y., 1982, Evolution de l'infection de la souris par *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* et *Brucella sensu stricto* ver l'état chronique et la guérison, *Ann. Rech. Vét.*, 13 : 153-161
- Brooks-Worrell B.M. and Splitter G.A., 1992, Antigens of *Brucella abortus* S19 immunodominant for bovine lymphocytes as identified by one- and two-dimensional cellular immunoblotting, *Infect. Immun.*, 60 (6) : 2459-2464
- Brooks-Worrell B.M. and Splitter G.A., 1992, Sodium dodecyl sulfate- and salt-extracted antigens from various *Brucella* species induce proliferation of bovine lymphocytes, *Infect. Immun.*, 60 (5) : 2136-2138
- Bruce D., 1887, Note on the discovery of a micro-organism in Malta fever, *Practitioner*, 39 : 161-170
- Bundle D.R., Chervonogrodzky J.W., Gidney M.A.J., Meikle P.J., Perry M.B. and Peters T., 1989, Definition of *Brucella* A and M epitopes by monoclonal typing reagents and synthetic oligosaccharides, *Infect. Immun.*, 57 : 2829-2836
- Bundle D.R., Chervonogrodzky Y.W. and Perry M.B., 1987, Structural elucidation of the *Brucella melitensis* M antigen by high-resolution NMR at 500 MHz, *Biochemistry*, 26 : 8717
- Campero C.M., Ladds P.W., Hoffmann D. Duffield B., Watson D. and Fordyce G., 1990, Immunopathology of experimental *Brucella abortus* strain 19 infection of the genitalia of bulls, *Vet. Immunol. Immunopath.*, 24 : 235-246
- Caroff M., Bundle D.R. and Perry M.B., 1984, Structure of the O-drain of the phenol-phase soluble cellular lipopolysaccharide of *Brucella abortus* 1119-3, *Infect. Immunol.*, 46 : 384-388
- Caroff M., Bundle D.R., Perry M.B., Chervonogrodzky J.W. and Duncan J.R., Antigenic S-type lipopolysaccharide of *Brucella abortus* 1119-3, *Infect. Immun.* 46 : 384-388
- Chervonogrodzky J.W., Perry M.B. and Bundle D.R., 1987, Identification of the A and M antigens of *Brucella* as the O-polysaccharides of smooth lipopolysaccharides, *Can. J. Microbiol.*, 33 : 979-981
- Chin J. and Turner B., 1990, Extraction of membrane antigens from *Brucella ovis* and an assessment of their serological activity by immunoblotting, *J. Gen. Microbiol.*, 136 : 1615-1622
- Cloekaert A., de Wergifosse P., Dubray G. and Limet J.N., 1990, Identification of seven surface-exposed *Brucella* outer membrane proteins of use of monoclonal antibodies : immunogold labeling for electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay, *Infect. Immun.*, 58 : 3980-3987
- Cloekaert A., Jacques I., Bosseray N., Limet J.N., Bowden R., Dubray G. and Plommet M., 1991, Protection conferred on mice by monoclonal antibodies directed against outer-membrane-protein antigens of *Brucella*, *J. Med. Microbiol.*, 34 : 175-180
- Cloekaert A., Jacques I., Bosseray N., Limet J.N., Bowden R., Dubray G. and Plommet M., 1991, Protection conferred on mice by monoclonal antibodies directed against outer-membrane-protein antigens of *Brucella*, *J. Med. Microbiol.*, 34 : 175-180
- Cloekaert A., Jacques I., Dubray G. and Limet J.N., 1992, Protection against *Brucella abortus* in mice with IgG and IgM monoclonal antibodies specific for rough lipopolysaccharide, *sous-pressé*
- Cloekaert A., Jacques I., de Wergifosse P., Dubray G. and Limet J.N., 1992, Protection against *Brucella melitensis* or *Brucella abortus* in mice with immunoglobulin G (IgG), IgA, and IgM monoclonal antibodies specific for a common epitope shared by the *Brucella* A and M smooth lipopolysaccharides, *Infect. Immun.*, 60 : 312-315

- Cloekaert A., Kerkhofs P. and Limet J.N., 1992, Antibody response to *Brucella* outer membrane proteins in bovine brucellosis : immunoblot analysis and competitive enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies, sous presse
- Cloekaert A., Zygmunt M.S., Nicolle J.-C., Dubray G. and Limet J.N., 1992, O-chain expression in the rough *Brucella melitensis* strain B115 : induction of O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies and intracellular localization demonstrated by immunoelectron microscopy, *J. Gen. Microbiol.*, 138 : 1211-1219
- Crawford R.P. and Adams L.G. and Richardson B.E., 1990, Effect of dose of *Brucella abortus* strain 19 in yearling heifers on the relative risk of developing brucellosis from challenge exposure with strain 2308, *Am. J. Vet. Res.*, 51 (11)
- Crawford R.P., Adams L.G. and Richardson B.E., 1990, Effect of dose of *Brucella abortus* strain 19 in yearling heifers on the relative risk of developing brucellosis from challenge exposure with strain 2308, *Am. J. Vet. Res.*, 51 (11) : 1837-1840
- Crawford R.P., Heck F.C. and Williams J.D., 1978, Experiences with *Brucella abortus* strain 19 vaccine in adult Texas cattle, *JAVMA*, 173 (11) : 1457-1461
- D.T. Berman, Beach B.A. and Iruin M.R., 1954, A comparison of the effects of subcutaneous and intracaudal vaccination of sexually mature cattle with *Brucella abortus* strain 19, *Am. J. Vet. Res.*, 15, 406
- Diaz R., Garatea P., Jones L.M. and Morijon I., 1979, Radial immunodiffusion test with a *Brucella* polysaccharide antigen for differentiating infected from vaccinated cattle, *J. Clin. Microbiol.*, 10 : 37
- Diaz R., Toyos Y., Salvo M.D. and Parolo M.L., 1981, A simple method for the extraction of polysaccharide B from *Brucella* cells for use in the radial immunodiffusion test diagnosis of bovine brucellosis, *Ann. Rech. Vet.*, 12 : 35
- Douglas J.T. and Palmer D.A., 1988, Use of monoclonal antibodies to identify the distribution of A and M epitopes on smooth *Brucella* species, *J. Clin. Microbiol.*, 26 : 1353-1356
- Douglas J.T., Rosenberg E.V., Nytaido H., Verstrete D.R. and Winter A.J., 1984, Porins of *Brucella* species, *Infect. Immun.*, 44 : 16-21
- Dubray G. and Bezard G., 1980, A highly-sensitive periodic acid-silver stain for 1,2-dial groups of glycoproteins and polysaccharides in polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.*, 119 : 325-329
- Dubray G. and Charriaut C., 1983, Evidence of three major polypeptide species and two major polysaccharide species in the *Brucella* outer membrane, *Ann. Rech. Vet.*, 14 : 311-318
- Dubray G., 1972, Etude ultrastructurale des bactéries de colonies lisses (S) et rugueuses (R) du genre *Brucella*, *Ann. Pasteur*, 123 : 171-193
- Dubray G., 1979, Ultrastructure et antigènes des *Brucella*, *Bulletin des G.T.V.*, 3 : 77-82
- Dubray G., 1984, Progrès récents sur la biochimie et les propriétés biologiques des antigènes de *Brucella*, *Dev. Biol. Stand.*, 56 : 131-150
- Dubray G., 1985, Antigens of diagnosis significance in *Brucella* in "Current topics in veterinary medicine and animal science", Verger Y.M. and Plommet M. (Eds), Martinus Nijhoff, Dordrecht, 123-138
- Durand B., 1988, Protéines : électrophorèse et électrofocalisation, *Le technoscope de biofutur*, 9 : 3-13
- Durand M.P. and Leplatre J., 1984, Etude sur les sérologies bovines observées après inoculations de faibles quantités de B<sup>19</sup>, *Bull. Acad.*, 57 : 55-60
- Fensterbank R., 1984, Le diagnostic allergique des brucelloses animales, *Dev. Biol. Stand.* 56 : 401-405
- Garin-Bastuji B., Bowden R.A., Dubray G. and Limet J.N., 1990, Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting analysis of smooth-lipopolysaccharide heterogeneity among *Brucella* biovars related to heterogeneity among *Brucella* biovars related to A and M specificities, *J. Clin. Microbiol.*, 28 (10) : 2169-2174
- Goldbaum F.A., Rubbi C.P., Wallach J.C., Miguel S.E., Baldi P.C. and Fossati C.A., 1992, Differentiation between active and inactive human brucellosis by measuring antiprotein humoral immune responses, *J. Clin. Microbiol.*, 30 (3) : 604-607
- Goldstein J., Hoffman T., Frasch C., Lizzio E.F., Beining P.R., Hochstein D., Lee Y.L., Angus R.D. and Golding B., 1992, Lipopolysaccharide (LPS) from *Brucella abortus* is less toxic than that from *Escherichia coli*, suggesting the possible use of *B. abortus* or LPS from *B. abortus* as a carrier in vaccines, *Infect. Immun.*, 60(4) : 1385-1389
- Gomez-Miguel M.J., Moriyon I., Alonso-Urmeneta, Riezu-Boj J.I. and Diaz R., 1988, Serological response to the outer membrane lipoprotein in animal brucellosis, *Infect. Immun.*, 716-718
- Gorrell M.D., Milliken G.L., Anderson B.J. and Pucci A., 1984, An enzyme immunoassay for bovine brucellosis using a monoclonal antibody specific for field strains of *Brucella abortus*, *Proceedings 3rd International Symposium on Brucellosis, Algiers, Algeria. Develop. Biol. Standard Vol 56, S. Karger, Basel.*, 491-494
- Hoffman W.L. and Jump A.A., 1986, Tween 20 removes antibodies and other proteins from nitrocellulose, *J. Immunol. Meth.*, 94 : 191-196
- Hoffmann E.M., Shapiro S.J. and Nicolletti P., 1990, Evaluation of serologic and cellular immune responses of cattle to a nonlipopolysaccharide antigen from *Brucella abortus*, *Am. J. Vet. Res.*, 51 (2) : 216-221
- Hoo M. and Cheers C., 1982, Résistance and susceptibility of mice to bacterial infection. Y. Genetic and cellular basis of resistance to chronic infection with *Brucella abortus*; *J. Infect. Bio.*, 146 : 381-387

- Jacques I., Cloeckaert A., Limet J.N. and Dubray G., 1992, Protection conferred on mice by combinations of monoclonal antibodies directed against outer-membrane proteins or smooth lipopolysaccharide of *Brucella*, *J. Med. Microbiol.*, 37 : 100-103
- Jacques I., Cloeckaert A., Limet J.N. and Dubray G., 1992, Protection conferred on mice by combinations of monoclonal antibodies directed against outer-membrane proteins or smooth lipopolysaccharides of *Brucella*, sous presse
- Jones S.M. and Winter A.J., 1992, Survival of virulent and attenuated strains of *Brucella abortus* in normal and gamma interferon-activated murine peritoneal macrophages, *Infect. Immun.*, 60 (7) : 3011-3014
- King N.B. and Frank N.A., 1961, Effect of age on resistance and retention of titer in cattle vaccinated with strain 19 *Brucella abortus* vaccine, *J. An. Vet. Med. Assoc.*, 91, 100
- Klesius P.H., Kramer T.T., Swann A.I., Christenberry C.C., 1978, Cell-mediated immune response after *Brucella abortus* S19 vaccination, *Am. J. Vet. Res.*, 39 (5) : 883-886
- Laemmli V.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227 : 680-685
- Limet J., Plommet A.-M., Dubray G. and Plommet M., 1987, Immunity conferred upon mice by anti-LPS monoclonal antibodies in murine brucellosis, *Ann. Inst. Pasteur/Immunol.*, 138 : 417-424
- Limet J.N., Bosseray N., Garin-Bastuji B., Dubray G. and Plommet M., 1989, Humoral immunity in mice mediated by monoclonal antibodies against the A and M antigens of *Brucella*, *J. Med. Microbiol.*, 30 : 37-43
- Limet J.N., Bosseray N., Garin-Bastuji B., Dubray G. and Plommet M., 1989, Humoral immunity in mice mediated by monoclonal antibodies against the A and M antigens of *Brucella*, *J. Med. Microbiol.*, 30 : 37-43
- Limet J.N., Cloeckaert A., Bezaud G., Van Broeck J. and Dubray G., 1992, Serological response to a 89 kDa membrane protein in bovine brucellosis, sous presse
- Limet J.N., Plommet A.-M., Dubray G. and Plommet M., 1987, Immunity conferred upon mice by anti-LPS monoclonal antibodies in murine brucellosis, *Ann. Inst. Pasteur/Immunol.* 138, 417-424
- Lin Jyhshiun, Adams L.G. and Ficht T.A., 1992, Characterization of the heat shock response in *Brucella abortus* and isolation of the genes encoding the GroE heat shock proteins, *Infect. Immun.*, 60 (6) : 2425-2431
- Mackness G.B., 1964, The immunological basis of acquired cellular resistance, *J. Exp. Med.*, 120 : 105-120
- Manthei C.A., 1952, Evaluation of vaccinated methods and dose of *Brucella abortus* strain 19, in Proc. 56th Annu. Meet. Livestock Saint. Assoc., 115
- Mc Diarmid A.A., 1957, The degree of duration of immunity in cattle resulting from vaccination with S19 Br. abortus vaccine and its implication in the future control and eventual eradication of brucellosis, *Vet. Rec.*, 69 : 877
- McCullough N.B., 1970, Microbiol and host factors in the pathogenesis of brucellosis. In "Infections agents and host reactions", Mudde S. and Saunders W.B. Co (Ed), Philadelphia, 324-345
- Nicoletti P., Jones L.M. and Berman D.T., 1978, Comparison of the subcutaneous and conjunctival route of vaccination with *Brucella abortus* strain 19 vaccine in adult cattle, *JAVMA*, 173 (11) : 1450-1456
- Nicolletti P. and Milward F.W., 1983, Protection by oral administration of *Brucella abortus* strain 129 against an oral challenge exposure with a pathogenic strain of *Brucella*, *Am. J. Vet. Res.*, 44 (9) : 1641-1643
- Nicolletti P., Jones L.M. and Berman D.T., 1978, Adult vaccination with standard and reduced doses of *Brucella abortus* strain 19 vaccine in a dairy herd infected with Brucellosis, *JAVMA*, 183 (11) : 1445-1449
- Nielsen J. and Duncan J.R., 1988, Antibody isotype response in adult cattle vaccinated with *Brucella abortus* S19, *Vet. Immunol. Immunopath.*, 19 : 205-214
- Pardon P., 1977, Resistance against a subcutaneous *Brucella* challenge of mice immunized with living or dead *Brucella* or by transfer of immune serum, *Ann. Inst. Pasteur/Immunol.*, 128c : 1025-1037
- Pavlov H., Hogarth M., McKenzie I.F.C. and Cheers C., 1982, In vivo and in vitro effects of monoclonal antibody to Ly antigens on immunity to infection, *Cell. Immunol.*, 71 : 127-138
- Plommet M. and Fensterbank R., 1976, Vaccination against bovine brucellosis with a low dose of strain 19 administered by the conjunctival route, *Ann. Rech. Vet.*, 7 : 9-23
- Plommet M. and Fensterbank R., 1984, La vaccination antibrucellique administrée par voie conjonctivale, *Dev. Biol. Stand.*, 56 : 681-687
- Plommet M. and Plommet A.-M., 1976, Vaccination against bovine brucellosis with a low dose of strain 19 administered by the conjunctival route, *Ann. Rech. Vet.*, 7 : 1-8
- Plommet M. and Plommet A.-M., 1983, Immune serum-mediated effects on brucellosis evolution in mice, *Infect. Immun.*, 41 : 97-105
- Plommet M., 1980, La vaccination conjonctivale par la souche B. abortus 19 contre le brucellose bovine principe et indications, 64 (10) 3-10
- Plommet M., and Plommet A.-M., 1984, Effet des sérums immuns sur l'évolution de la brucellose expérimentale de la souris, *Develop. Brd. Standard*, 56 : 271-281

- Plommet M., Bosseray N., Lantier F., Bernard F., Pardon P. and Rodolakis A., 1987, Simultaneous vaccination by three living attenuated strains of *Brucella*, *Salmonella* and *Chlamydia* in mice, *Vaccine*, 5 : 27-32
- Plommet M., Fensterbank R., Renoux G., Gestin J. and Philippon A., 1973, Brucellose bovine expérimentale - XII - Persistance à l'âge adulte de l'infection congénitale de la génisse, *Ann. Rech. Vét.*, 4 : 419-435
- Plommet M., Hue Isabelle and Plommet A.-M., 1986, L'immunité anti-*Brucella* transférée par sérum immun et l'immunité transférée par les lymphocytes spléniques ne s'additionnent pas, *Ann. Rech. Vét.*, 17 (2) : 169-175
- Plommet M., Serre A. and Fensterbank R., 1987, Vaccines, vaccination in brucellosis, *Ann. Inst. Pasteur/microbiol.* 138 : 117-121
- Raybould J.J.G. and Chantler S., 1980, Serological differentiation between infected and vaccinated cattle by using purified soluble antigens from *Brucella abortus* in a hemagglutination system, *Infect. Immun.*, 29 (2) : 435-441
- Raybould T.G., Beesley J.E., 1981, Ultrastructured localisation of characterized antigens of *B. abortus*, *Infect. Immun.*, 32 : 318-322
- Schoerner C., Wartenberg K. and Röllinghoff M., 1990, Differentiation of serological responses to *Yersinia enterocolitica* serotype O9 and *Brucella* species by immunoblot or enzyme-linked immunosorbent assay using whole bacteria and *Yersinia* outer membrane proteins, *J. Clin. Microbiol.*, 28 : 1570-1574
- Schurig G.G., Jones L.M., Speth L. and Berman D.T., 1978, Antibody response to antigens distinct from smooth lipopolysaccharide complex in *Brucella* infection, *Infect. Immun.*, 21 (3) : 994-1002
- Schurig G.G., Pringle A.T. and Breese S.S. Jr, 1981, Localization of *Brucella* antigens that elicit a humoral immune response in *Brucella abortus*-infected cattle, *Infect. Immun.*, 34 (3) : 1000-1007
- Serre A., 1992, In vitro antibody secretion by peripheral blood mononuclear cells as an expression of the immune response to *Brucella* spp. in humans, *J. Clin. Microbiol.*, 30 (8) : 220-2203
- Smith L.D. and Ficht T.A., 1990, Pathogenesis of *Brucella*, *Microbiol.*, 17 (3) : 209-230
- Sowa B.A., Kelly K.A., Ficht T.A., Frey M. and Adams L.G., 1991, SDS-soluble and peptidoglycan-bound proteins in the outer membrane-peptidoglycan complex of *Brucella abortus*, *Vet. Microbiol.*, 27 : 351-368
- Spink W.W., 1956, The pathogenesis of brucellosis in "The nature of brucellosis", University of Minnesota, Minneapolis, 114-144
- Sutherland S.S., Robertson A.G., Legras? D.V., Robertson G.M., Johnston J.M. and Evans R.J., 1981, The effect of challenge with virulent *Brucella abortus* on beef cattle vaccinated as calves or adults with either *Brucella abortus* strain 19 or 45/20, *Aust. Vet. J.*, 57 470
- Tabatabai L.B., Deyoe B.L. and Patterson J.M., 1989, Immunogenicity of *Brucella abortus* salt-extractable proteins, *Vet. Microbiol.*, 20 : 49-58
- Verstrete D.R. and Winter A.J., 1984, Comparison of sodium dodecyl surfate-polyacrylamide gel electrophoresis profiles and antigenic relatedness among outer membrane proteins of 49 *Brucella*.
- Verstrete D.R., Creasy M.T., Caveney N.T., Baldwin C.L., Blab M.W. and Winter A.J., 1982, Outer membrane proteins of *Brucella abortus* : isolation and characterization, *Infect. Immun.*, 35 (3) : 979-989
- Vincent P., Youbert L. and Prave M., 1970, Deux cas professionnels d'infection brucellique après inoculation de vaccin B19, *Bull. Acad. Vét. Pratique*, 43 : 89-97
- Wicken A.J., 1985, Bacterial cell walls and surfaces 3-Gram negative bacteria, in "Bacterial adhesion mechanisms and physiological significance", Savage? D.C. and Fletcher M. (eds), Plenum Press, New-York, 56-63
- Wilson G.S. and Miles A.A., 1932, The serological differentiation of smooth strains of the *Brucella* group, *Br. J. Exp. Pathol.*, 13 : 1-13
- World Health Organization, 1986, Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis, sixth report W.H.O. Tech. Rep. Ser. n° 740, Geneva
- Zygmunt M.S., Dubray G. Bundle D.R. and Perry M.B., 1988, Purified native haptens of *Brucella abortus* B19 and *Brucella melitensis* 16 M reveal the lipopolysaccharide origin of these antigens, *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.*, in press
- Zygmunt M.S., Martin J-C. and Dubray G., 1990, Analysis of immune response : comparison of immunoblots after isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis using cytoplasmic protein extract from *Brucella*, *Microbiol. Let.*, 70 : 263-268
- Zygmunt M.S., Gilbert F.B. and Dubray G., 1992, Purification, characterization and Seroactivity of a 20-Kilodalton *Brucella* Protein Antigen, *Y. Clin. Microbiol.*, 30 (10) : 2662-2667