

## THESIS / THÈSE

### LICENCE EN ZOOLOGIE

#### Caractérisation d'un antigène protéique de *Brucella* potentiellement utilisable pour le diagnostic de la brucellose et clonage du gène correspondant

Cailliau, Joël

*Award date:*  
1992

*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.

Caractérisation d'un antigène protéique de *Brucella*  
potentiellement utilisable pour le diagnostic de la  
brucellose et clonage du gène correspondant.

CAILLIAU Joël

Résumé

La brucellose, chez l'homme et chez l'animal domestique, est une maladie aux conséquences graves, tant sur le plan économique que sur celui de la santé publique. L'incapacité de distinguer un animal vacciné d'un animal infecté ralentit énormément l'éradication de la maladie.

Des travaux préliminaires indiquent que l'antigène reconnu par l'anticorps monoclonal Br25 (AgBr25) est exprimé par les trois souches de *Brucella abortus* rencontrées en Belgique. Un ELISA basé sur cet anticorps présente une sensibilité comparable à celle des tests classiques et une bonne spécificité. Nous avons confirmé la présence de l'antigène reconnu par cet anticorps dans toutes les espèces de *Brucella*, excepté *B. ovis*. L'antigène a été localisé dans la membrane externe de la bactérie. Le gène codant pour cet antigène a été cloné et séquencé.

L'obtention de la protéine recombinante purifiée permettra d'évaluer l'utilisation potentielle de cette protéine comme antigène de diagnostic. La délétion du gène dans une souche vaccinale, si elle n'altère ni sa viabilité, ni son pouvoir invasif et protecteur, permettrait la mise au point d'un vaccin et d'un diagnostic compatible avec un test ELISA basé sur l'AgBr25.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques (Zoologiques)

Décembre 1992

Promoteur : J.-J. Letesson

Cette page afin de signifier toute ma reconnaissance au Professeur J. -J. Letesson, qui m'a accueilli dans son laboratoire, pour la réalisation de ce travail de fin d'études.

Afin de témoigner ma gratitude envers le Docteur J. Limet, pour sa disponibilité et ses judicieux conseils.

Mes pensées vont tout particulièrement à A. Tibor, qui m'a initié aux joies de la génétique moléculaire. Merci pour ta patience et ta gentillesse.

Après une année passée ensemble, je voudrais remercier les membres du Laboratoire d'Immunologie des Facultés Notre Dame De la Paix pour leur sympathie et pour l'ambiance amicale qu'ils font régner dans le laboratoire.

Je voudrais saluer ici tous mes amis avec qui, depuis cinq ans maintenant, je partage ma vie universitaire.

Ce mémoire est dédiée à mes parents.

Merci à tous.

Joël .

J'ai toujours pensé que le Ciel avait inventé les problèmes et l'Enfer, les solutions. Les problèmes nous bousculent, nous malmènent, nous désarçonnent, nous font sortir de nous-même. Salutaire déséquilibre, c'est par les problèmes que toutes les espèces évoluent, c'est par les solutions qu'elles se figent et s'éteignent. Est-ce un hasard si le pire crime de notre mémoire s'est intitulé "solution" et "finale" ?

Amin Maalouf.

# TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS .....	1
<b>PARTIE I : INTRODUCTION</b> .....	<b>2</b>
1. IMPORTANCE ECONOMIQUE DE LA MALADIE .....	3
2. HISTORIQUE DE LA MALADIE .....	4
3. MANIFESTATIONS CLINIQUES ET MODES DE CONTAMINATION .....	5
3.1. LES BRUCELLOSES ANIMALES .....	5
a. la brucellose bovine .....	5
b. Les brucelloses ovine et caprine .....	6
c. La brucellose porcine .....	6
d. Autres espèces animales .....	6
1. <i>La brucellose canine</i> .....	6
2. <i>La brucellose équine</i> .....	7
3. <i>La brucellose galline</i> .....	7
4. <i>Autres espèces</i> .....	7
3.2. LA BRUCELLOSE HUMAINE .....	8
4. L'AGENT PATHOGENE .....	9
4.1. PLACE SYSTEMATIQUE .....	9
4.2. IDENTITE BACTERIOLOGIQUE .....	9
4.3. CARACTERISTIQUES GENETIQUES .....	10
4.4. LA STRUCTURE DES BRUCELLAE .....	10
a. Le cytoplasme .....	10
b. La membrane plasmique .....	11
c. L'espace périplasmique .....	11
d. Le peptidoglycane .....	12
e. La membrane externe .....	12
1. <i>Le lipopolysaccharide</i> .....	12
2. <i>Les protéines de la membrane externe</i> .....	14
3. <i>Les phospholipides</i> .....	16
4.5. PATHOGENIE .....	16
a. La prime infection brucellique .....	16
b. Extension de l'infection aux ganglions lymphatiques .....	17
c. Bactériémie et localisation secondaire .....	17
4.6. RESISTANCE INTRAPHAGOCYTAIRE .....	17
5. IMMUNITE EN BRUCELLOSE .....	19

5.1. IMMUNITE HUMORALE .....	19
5.2. IMMUNITE CELLULAIRE .....	20
6. TRAITEMENT ET PROPHYLLAXIE .....	22
7. LE DIAGNOSTIC DE LA BRUCELLOSE .....	23
7.1. DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE .....	23
7.2. DIAGNOSTIC IMMUNOLOGIQUE .....	23
a. Diagnostic basé sur la réponse humorale .....	23
b. Diagnostic basé sur la réponse cellulaire .....	25
8. LA VACCINATION ANTI BRUCELLIQUE .....	27
8.1. LES VACCINS VIVANTS .....	27
8.2. LES VACCINS TUES .....	28
8.3. LES VACCINS ACELLULAIRES .....	
8.4. LES VACCINS RECOMBINANTS .....	28
a. La délétion de gènes d'une souche vaccinale .....	28
b. L'élaboration de microorganismes transgéniques .....	29
9. A LA RECHERCHE D'ANTIGENES SPECIFIQUES .....	30
1. L'antigène A2 .....	30
2. L'antigène X (Rayboul et Chantler, 1981) .....	30
3. L'antigène PolyB .....	30
4. L'antigène reconnu par l'AcM Br25 .....	31
<b>PARTIE II : BUT DU TRAVAIL .....</b>	<b>33</b>
<b>PARTIE III : MATERIEL ET METHODE .....</b>	<b>36</b>
1. MATERIEL .....	37
1.1. SOUCHES, PLASMIDES ET BACTERIOPHAGES .....	37
a. Souches bactériennes .....	37
b. Plasmides bactériens .....	38
c. Phages .....	39
1.2. SOLUTIONS ET TAMPONS .....	40
a. solutions .....	40
b. Tampons .....	41
1.3. MILIEUX DE CULTURE .....	44
1.4. FOURNITURES .....	44
2. METHODES RELATIVES AUX PROTEINES .....	46
2.1. DOSAGE PROTEIQUE au BCA (Pierce) .....	46
2.2. ANALYSE DES PROTEINES SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRESENCE DE SDS (SDS-PAGE) .....	46
a. Principe .....	46
b. Mise en pratique .....	47

---

c. Coloration des protéines .....	48
2.3. IMMUNOBLOT AVEC UN ANTICORPS MONOCLONAL .....	48
a. Principe .....	48
b. Immunodétection des protéines transférées sur nitrocellulose .....	49
2.4. MISE EN EVIDENCE D'UNE PROTEINE PAR DOT BLOT .....	50
2.5. PREPARATION DE LYSATS BACTERIENS .....	50
2.6. FRACTIONNEMENT CELLULAIRE .....	51
3. METHODES RELATIVES AUX ACIDES NUCLEIQUES .....	53
3.1. CONSTITUTION DE LA BANQUE GENOMIQUE .....	53
3.2. TECHNIQUE DE CRIBLAGE IMMUNOLOGIQUE D'UNE BANQUE GENOMIQUE CONSTRuite DANS LE VECTEUR lambda gt11 .....	54
a. Principe .....	54
b. Protocole .....	54
1. Culture des E. coli Y 1090 .....	54
2. Estimation du titre de la banque .....	55
3. Criblage de la banque par l'anticorps monoclonal .....	55
4. Purification des phages immunopositifs .....	56
3.3. EXTRACTION DE L'ADN PHAGIEN .....	56
a. Principe .....	56
b. Protocole .....	56
1. Amplification des phages .....	56
2. Purification de l'ADN phagien .....	57
3. Récupération de l'ADN .....	57
3.4. ANALYSE DE L'ADN SUR GEL D'AGAROSE .....	58
a. Principe .....	58
b. Mode opératoire .....	59
c. Estimation de la taille et de la quantité d'un fragment d'ADN .....	59
1. La taille .....	59
2. La quantité .....	60
3.5. RESTRICTION DE L'ADN .....	60
3.6. EXTRACTION DE L'ADN A PARTIR D'UN GEL D'AGAROSE .....	61
3.7. LIGATION .....	62
3.8. TRANSFORMATION BACTERIENNE .....	63
a. Principe .....	63
b. Préparation des cellules compétentes .....	63
c. Transformation .....	63

---

3.9. EXTRACTION RAPIDE D'ADN PLASMIDIQUE D'E. COLI (MINIPREP) .....	64
3.10. EXTRACTION D'ADN SUR COLONNE QUIAGEN (MIDIPREP) .....	65
<b>PARTIE IV: RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>67</b>
1. DISTRIBUTION DE L'ANTIGENE DANS LES DIFFERENTES ESPECES ET BIOVARS DE BRUCELLA .....	68
2. CARACTERISATION DE L'ANTIGENE RECONNU PAR L'AcM Br25 .....	70
2.1. LOCALISATION INTRACELLULAIRE DE L'ANTIGENE .....	70
a. Localisation de l'AgBr25 par SDS-PAGE .....	70
b. Immunodétection de l'AgBr25 sur bactéries entières .....	70
2.2. INFLUENCE DE DIFFERENTS FACTEURS DENATURANTS SUR LE PROFIL D'IMMUNOBLLOT .....	72
3. RECHERCHE DU GENE CODANT POUR L'Ag Br25 .....	75
3.1. CRIBLAGE DE LA BANQUE DE B. ABORTUS .....	75
a. Titrage de la banque génomique de B. abortus établie dans lambda gt11 .....	75
b. Criblage de la banque à l'aide de l'AcM Br25 .....	76
c. Purification des phages recombinants immunopositifs .....	76
d. Effet de l'IPTG sur l'expression de l'AgBr25 .....	78
e. Analyse de l'ADN extrait des phages recombinants .....	79
3.2. CLONAGE DU FRAGMENT PORTEUR DU GENE CODANT POUR L'Ag Br25 .....	80
a. Clonage des trois fragments EcoRI dans le plasmide Bluescript .....	80
b. Etude de l'expression de l'Ag Br25 par les bactéries recombinantes .....	83
c. Etablissement de la carte de restriction de l'insert de 0,8 kb .....	84
3.3. SOUS-CLONAGE DE L'INSERT PAR DELETION DU FRAGMENT HindIII-HindIII .....	85
a. Sous clonage de l'insert .....	86
b. Test d'expression par les bactéries transformées par le plasmide pBBr25-2 .....	87
1. Vérification de l'expression après SDS-PAGE et immunoblot .....	87
2. Influence de l'IPTG sur l'expression de l'AgBr25 par le sous-clone pBBr25-2 .....	89

---

3.4. LOCALISATION DE L'AgBr25 CHEZ LES BACTERIES RECOMBINANTES .....	90
3.5. RECHERCHE D'ORF DANS LA SEQUENCE DE L'INSERT (49) .....	91
3.6. CONCLUSIONS .....	93
<b>PARTIE V : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>95</b>
<b>PARTIE VI : BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>99</b>

---

## ABREVIATIONS

AcM	anticorps monoclonal
AcM Br25	anticorps monoclonal Br25
ADN	acide désoxyribonucléique
AgBr25	antigène reconnu par l'AcM Br25
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomal
BSA	sérum albumine bovine
c-à-d	c'est-à-dire
Da	dalton
DO	densité optique
DTT	dithiothréitol
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GBr25	gène codant pour l'AgBr25
HSR	hypersensibilité retardée
IDR	intradermo réaction
Ig	immunoglobuline
IPTG	isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside
kb	kilopaires de bases
kDa	kilodaltons
LPS-R	lipopolysaccharide de souche rugueuse R
LPS-S	lipopolysaccharide de souche lisse S
$\mu$ g	microgramme
mg	milligramme
$\mu$ l	microlitre
ml	millilitre
ng	nanogramme
nm	nanomètre
Omp	protéine de la membrane externe
ORF	phase ouverte de lecture
pb	paire de bases
PG	peptidoglycane
RAM-phosphatase	anticorps de lapin anti-souris couplé à la phosphatase alcaline
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RPM	tour par minute
SD	Shine Dalgarno
SDS	dodécyl sulfate de sodium
SDS-I	fraction de protéines insolubles dans le SDS
SDS-PAGE	électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence SDS
de	
Xgal	5-bromo, 4-chloro, 3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside

---

**PARTIE I**

**INTRODUCTION**

---

## 1. IMPORTANCE ECONOMIQUE DE LA MALADIE

Sur base des dernières statistiques (6), on peut observer un net recul de la brucellose en Belgique. Au 31 décembre 1991, il y avait 230 foyers avec 19707 bovins sous contrôle pour brucellose bovine. Un an plus tôt, ce nombre était de 396 avec 32971 bovins. Le recul est net pour toutes les provinces et c'est toujours la province du Luxembourg qui détient le triste honneur de posséder le plus grand nombre d'animaux malades : 108 foyers avec 8342 animaux. Au niveau national, il y avait, au 31 décembre 1991, 0,33% de foyers sous contrôle (0,57% un an plus tôt), soit 0,61% du cheptel national.

Pour en arriver à ces résultats, il a fallu procéder à l'abattage de 24057 bovins en 1991. L'énoncé de ce dernier chiffre exprime à lui seul les conséquences dramatiques pour un éleveur de la présence de la maladie dans son troupeau. En effet, l'arrêté royal du 06 décembre 1978 stipule que si la prévalence de la maladie est inférieure à 2%, tous les bovins d'un foyer de brucellose devront être éliminés. Ce n'est que lorsque la prévalence est supérieure à 2% qu'une campagne de vaccination est recommandée pour éviter l'extension de la maladie. Même si des mesures d'indemnisation sont prévues, les dommages causés ne permettront pas à l'éleveur de redémarrer efficacement son élevage avant quelques années.

Sur le plan mondial (1), la menace tend à s'atténuer dans les pays développés, mais reste un fléau dans les pays en voie de développement, non seulement la brucellose bovine mais aussi les brucelloses ovine, caprine et porcine ainsi que la brucellose humaine. Dans les pays méditerranéens, l'accroissement de la population de chèvres et de moutons et un mode d'élevage extensif ont conduit à une augmentation de la prévalence de la maladie en général. La brucellose porcine est très présente en Asie du sud-est et en Amérique latine, on y note un développement de la brucellose humaine.

La brucellose reste aujourd'hui une zoonose dont l'importance économique et humaine est telle qu'elle justifie à elle seule tous les programmes de recherche qui se sont donnés l'objectif de la combattre.

---

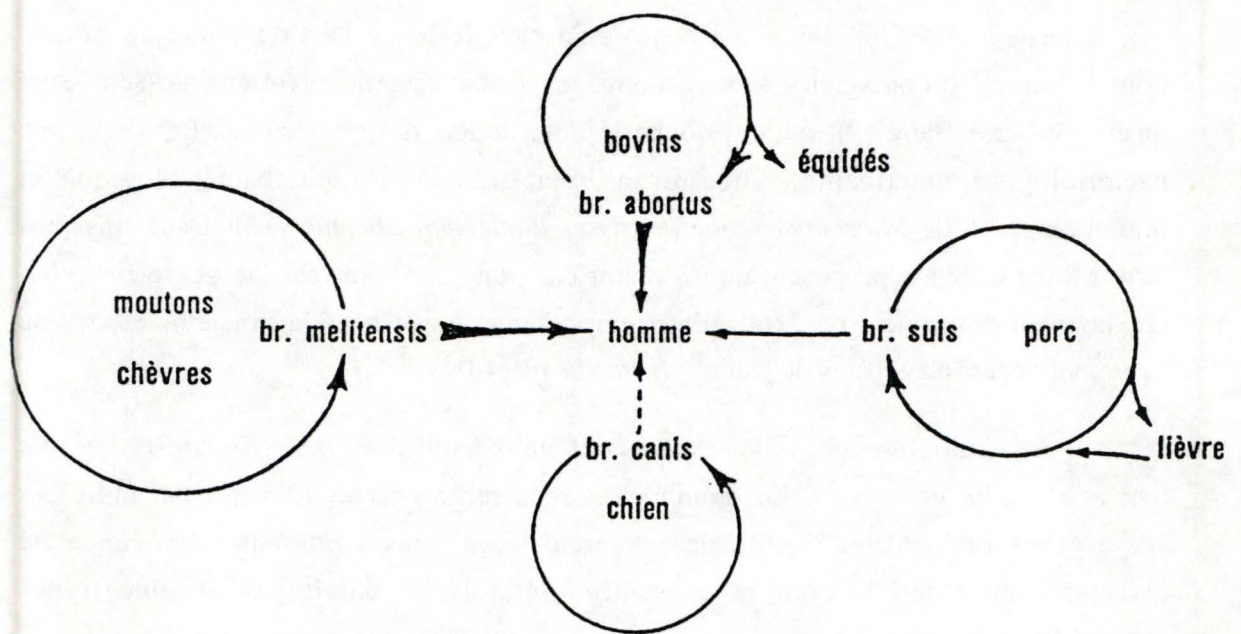
## 2. HISTORIQUE DE LA MALADIE

Hippocrate, en 450 avant Jésus Christ, est le premier à décrire les symptômes de la brucellose humaine (4), mais ce n'est qu'en 1887 que David Bruce, au cours de ses études sur la fièvre de Malte, isole l'agent infectieux de la rate d'un soldat mort et le dénomme *Micrococcus melitensis* (14). En 1905, Horrocks démontre que cette bactérie est responsable d'une maladie grave chez la chèvre et la brebis, qui constituent donc le réservoir de la maladie (45).

Depuis le 16<sup>ème</sup> siècle, on connaissait chez le bovin l'avortement épizootique, dont le caractère contagieux était reconnu, mais dont l'agent infectieux ne sera isolé qu'en 1896 par Bang (9), qui lui donne le nom de *Bacterium abortus*. En 1918, une bactériologiste américaine, Alice Evans, établit la similitude bactériologique et immunologique de *Micrococcus melitensis* et *Bacterium abortus* (12). Deux ans plus tard, Meyer et Shaw proposent de les réunir dans un genre nouveau, le genre *Brucella*, en l'honneur de David Bruce (60). Entretemps, Traum avait isolé la troisième espèce du genre, au départ d'avortons de truies : *Brucella suis* (4).

Par la suite trois nouvelles espèces ont été indentifiées : *Brucella canis*, *Brucella ovis* et *Brucella neotomae*. Les nombreuses recherches en vue de distinguer entre ces six espèces ont révélé, à côté de nombreux caractères communs, l'existence de caractères différentiels dont la constance toutefois ne paraît pas absolue (types intermédiaires).

---



**Figure I- 1.** Schéma épidémiologique de la brucellose.

### 3. MANIFESTATIONS CLINIQUES ET MODES DE CONTAMINATION

On regroupe sous le terme de brucellose des maladies contagieuses, aiguës ou chroniques, frappant les animaux tant sauvages que domestiques, transmissibles à l'homme et causées par des bactéries du genre *Brucella* (Figure I-1).

#### 3.1. LES BRUCELLOSES ANIMALES (34,71)

##### A. LA BRUCELLOSE BOVINE

Dans la très grande majorité des cas, la brucellose bovine est due à *Brucella abortus*. *Brucella melitensis* et *B. suis* interviennent dans de plus rares cas.

La dissémination du bacille s'opère surtout lors des avortements et des accouchements (exsudats utérins, enveloppes foetales, avortons), mais elle s'observe aussi dans d'autres cas : lait, excrétion vaginale, sperme, matières fécales. Lors d'un avortement, par exemple, il y a excrétion de milliards de *Brucellae*. Sachant qu'elles ont un grand pouvoir infectieux et qu'elles résistent aux conditions du milieu extérieur (3 mois à un an dans le fumier, dans des prairies humides, mais elles sont tuées à la lumière directe du soleil), on prend conscience du risque très élevé de transmission au reste de l'élevage : ingestion d'aliments souillés, accouplement, litière contaminée et même via les personnes en contact avec les animaux.

La maladie ne se déclare que chez les animaux de plus d'un an, en effet les *Brucellae* ne rencontrent pas chez les jeunes animaux les conditions favorables à leur activité pathogène et la maladie reste à l'état latent. Suivant la localisation de l'agent pathogène dans l'organisme (système génital, glandes mammaires, moëlle, rate, foie, articulations...), la symptomatologie peut varier :

- chez la femelle, les bactéries trouvent un terrain propice dans le placenta. La colonisation conduit à une inflammation (placentite) accompagnée d'altérations vasculaires, d'ischémie et d'une dérégulation hormonale aboutissant à la mort du fœtus et à l'avortement.
  - chez le mâle, les symptômes sont peu caractéristiques : moindre ardeur, diminution du taux de fécondation, épидидymite.
-

En plus de cela, dans les deux sexes, on observe aussi une inflammation des articulations (arthrite, bursite...).

#### B. LES BRUCELLOSES OVINE ET CAPRINE

*Brucella melitensis* est l'agent quasi exclusif de ces maladies. La transmission est surtout indirecte (aliments, boissons), mais parfois aussi directe (copulation).

Après contamination, la bactérie se répand dans tout l'organisme. La symptomatologie se traduit surtout par une épидидymite conduisant à la stérilité chez le mâle et par un avortement accompagné de mammite et de rétention d'arrière faix pour la femelle. Notons qu'une inflammation des articulations est aussi souvent observée.

Les ovins peuvent aussi être contaminés par *Brucella ovis*, qui est la moins infectieuse des six espèces. Elle a une plus grande affinité pour le tractus mâle, où elle conduit au développement d'une orchite-épididymite. La transmission vénérienne est pour cette dernière la plus importante.

#### C. LA BRUCELLOSE PORCINE

La brucellose porcine est causée par *Brucella suis*. La maladie est légèrement différente des précédentes dans la mesure où l'affection atteint plutôt les os et les articulations. Après une contamination orale ou vénérienne, les *Brucellae* se localisent préférentiellement dans l'épiphyse des vertèbres lombaires, amenant à la nécrose du disque intervertébral. Dès que la moëlle est touchée, les membres inférieurs sont paralysés. En cas d'infection du système génital femelle, l'avortement est plus rare que chez les bovins et on assiste plutôt à des mises bas difficiles de porcelets non viables. Chez le verrat, le système génital est plus souvent touché que chez la femelle et cela se traduit par une inflammation (orchite, épидидymite) et stérilité.

#### D. AUTRES ESPÈCES ANIMALES

##### 1. La brucellose canine

Le chien peut être contaminé par *Brucella abortus*, *B. melitensis* et *B. suis* après ingestion de matériel infecté. Cela se traduit par des avortements ou des épидидymites

---

suivant le sexe. Mais les chiens peuvent aussi être victimes de *Brucella canis*, par voie orale ou vénérienne. Dans ce cas on observe les mêmes symptômes que précédemment.

## 2. La brucellose équine

Le cheval est surtout sensible à *Brucella abortus*, d'origine alimentaire ou cutanée (litière souillée). Les signes pathologiques sont inconsistants et variables : fièvre, manifestations rhumatismales et surtout des accidents inflammatoires locaux (synovites, arthrite, ostéomyélite).

## 3. La brucellose galline

La réceptivité naturelle des gallinacées a été démontrée pour *Brucella abortus* et *melitensis*. L'infection se traduit par une pâleur de la crête, inappétence et diarrhée.

## 4. Autres espèces

Notons aussi la présence de *Brucellae* chez le gros gibier (bison, élan, caribou, cerf, antilope, buffle, renne...), chez les canidés sauvages (loup, renard...), chez les camélidés et chez les rongeurs.

---

### 3.2. LA BRUCELLOSE HUMAINE (71)

*Brucella melitensis*, *B. abortus* et *B. suis* se partagent la responsabilité des brucelloses chez l'homme. *Brucella melitensis* est douée de la virulence la plus grande et détermine les formes les plus graves, viennent ensuite *Brucella suis* et *Brucella abortus*.

La contagion directe, par voie transcutanée, est souvent la conséquence d'un contact avec un animal infecté, des cultures bactériennes ou du vaccin. Elle est donc limitée à certains groupes professionnels : vétérinaires, agriculteurs, personnel d'abattoir, bactériologistes, etc. La contagion indirecte se fait par voie digestive, elle est liée à la consommation de produits contaminés ingérés à l'état cru (lait et dérivés frais), mais aussi de légumes, fruits ou eaux de boissons souillées par un fumier contaminé. La viande et les produits carnés ne semblent pas jouer un rôle important.

D'un point de vue clinique, la symptomatologie est variable. L'évolution de la maladie chez l'homme est caractérisée par trois stades (60) :

- La prime infection brucellique.

Elle correspond à la période d'infection (3 à 21 jours) qui se caractérise par un chancre d'inoculation au niveau de la porte d'entrée.

- Stade de brucellose aiguë

La manifestation principale est une fièvre intermittente (40°C et plus), procédant par poussées successives de durée et d'intensité variables, entrecoupée de périodes d'accalmie, ce qui explique le terme de fièvre ondulante donné parfois à la maladie. Notons aussi des sudations nocturnes, des troubles respiratoires, urinaires et cardio-vasculaires, ainsi que des douleurs pseudo-rhumatismales.

- Stade de brucellose chronique

Cette phase survient lorsque la maladie n'a pas été traitée ou qu'elle a résisté au traitement. La localisation ostéo-articulaire est fréquente. Le foie peut constituer un site chronique d'infection. Ce stade se traduit par des troubles respiratoires, cardio-vasculaires, glandulaires, oculaires et cutanés. A noter aussi une asthénie et un état physique et psychique perturbés.

---

ESPÈCE	BIO-TYPE	BESOINS EN CO <sub>2</sub>	PRODUCTION DE H <sub>2</sub> S	POUSSE EN PRÉSENCE DE COLORANTS		SÉRUMS AGGLUTINANTS MONOSPECIFIQUES A M	PHAGE TB A LA DCE	EPREUVES MÉTABOLIQUES				RÉSERVOIR LE PLUS COURANT
				Thio-nine a b	Fuch-sine basique b			L-Acide gluta-mique	DL-Orni-thine	D-Ribose	L-Lysine	
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	++	+	++	-	+	-	-	-	ovins, caprins ovins, caprins
	2	-	-	++	+	++	-	+	-	-	-	
	3	-	-	++	+	++	-	+	-	-	-	
<i>B. abortus</i>	1	+ (-)	+	--	+	+-	+	+	-	+	-	bovins bovins bovins bovins bovins bovins bovins bovins bovins
	2	+	+	--	-	+-	+	+	-	+	-	
	3	+ (-)	+	++	+	+-	+	+	-	+	-	
	4	+ (-)	+	--	+	+-	+	+	-	+	-	
	5	-	-	--	+	+-	+	+	-	+	-	
	6	-	-	--	+	+-	+	+	-	+	-	
	7	-	- ou +	--	+	++	+	+	-	+	-	
	8	+	-	--	+	+-	+	+	-	+	-	
	9	-	+	--	+	+-	+	+	-	+	-	
<i>B. suis</i>	1	-	+ fort	++	-	+-	-	-	+	+	+	porcins porcins, lièvre porcins renne
	2	-	-	--	-	+-	-	+	+	+	-	
	3	-	-	++	+	+-	-	+	+	+	+	
	4	-	-	++	+	++	-	+	+	+	+	
<i>B. neotomae</i>	1	-	+	--	-	+-	-	+	-	(+ ou -)	-	néotome du désert
<i>B. ovis</i>		+	-	++	+	--	-	+	-	-	-	ovins
<i>B. canis</i>		-	-	++	-	--	-	-	+	+	+	chiens

Tableau I.1. Caractéristiques différentielles des espèces du genre *Brucella* et de leurs biotypes (d'après Bergey's).

## 4. L'AGENT PATHOGENE

### 4.1. PLACE SYSTEMATIQUE (47,62)

Depuis de nombreuses années, le genre *Brucella* était admis dans la famille des *Brucellaceae*, qui comportait de nombreux autres genres (*Bordetella*, *Pasteurella*, etc). Cependant l'avancée des techniques d'études (hybridation de l'ADN, par exemple) a permis de se rendre compte que tous les membres de cette famille n'avaient que peu de points en commun. Dans la dernière édition du "Bergey's manual", le genre n'est inféodé à aucune famille et reste à part dans un groupe de coques et bâtonnets Gram négatifs.

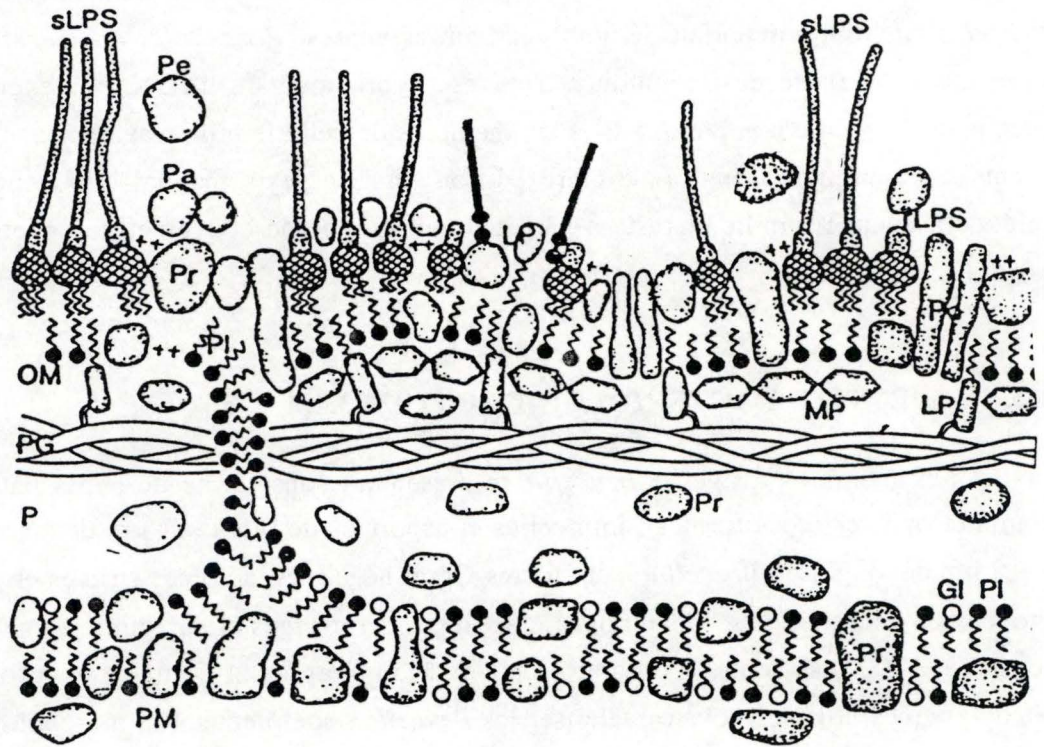
### 4.2. IDENTITE BACTERIOLOGIQUE (71,25,3,47)

Les membres du genre *Brucella* se présentent sous forme de petits bâtonnets, courts et ovoïdes (cocciformes), immobiles et asporulés de 0,5 à 0,7  $\mu\text{m}$  de large et 0,6 à 1,5  $\mu\text{m}$  de long. Les *Brucellae* sont toutes Gram négatives, aérobies strictes et ont une propension marquée à se développer dans les macrophages. Leur culture sur milieu solide à 37°C est lente : colonie de 1 à 2 mm après 4 jours. Les propriétés phénotypiques utilisées pour caractériser les *Brucellae* comprennent la morphologie des colonies, l'antigénicité, la virulence, le taux de croissance, la sensibilité aux bactériophages et aux sels, la résistance aux antibiotiques et aux colorants.

Ces caractéristiques, ainsi que l'adaptation aux différents hôtes ont servi à séparer le genre en six espèces, trois d'entre elles étant subdivisées en biovars : *Brucella abortus* (7 biovars), *B. suis* (4 biovars), *B. melitensis* (3 biovars), *B. canis*, *B. neotomae* et *B. ovis* (42) (Tableau I-1)

L'observation en transillumination oblique, après coloration au cristal violet, fait apparaître deux types de colonies. Le premier est rond, lisse et de couleur bleue à bleu-vert, on parle de colonies S (Smooth ou lisse). Le second est granuleux, rugueux et de couleur jaune, on parle de colonies R (Rough ou rugueux). Les colonies S peuvent subir des modifications en culture et devenir R, l'inverse est beaucoup plus rare (47). Ce changement s'accompagne d'une modification de la virulence et de l'antigénicité.

---



OM : membrane externe  
 P : espace périplasmique  
 PM : membrane plasmique  
 PI : phospholipides  
 sLPS : LPS en phase S  
 rLPS : LPS en phase R  
 PG : peptidoglycane  
 Pr : protéine

GI : glycolipides  
 ++ : cations divalents  
 LP : lipoprotéine  
 Po : porine  
 MP : protéine matricielle  
 Pa : protéine extrinsèque  
 Pe : protéine extracellulaire

**Figure I-2.** Représentation schématique de l'organisation de la paroi des bactéries à Gram négatif.

### 4.3. CARACTERISTIQUES GENETIQUES (80,47,43)

Toutes les études publiées à ce jour confirment que les membres du genre partagent plus de 90% d'homologie au niveau de leur ADN, avec un contenu en G+C (guanosine + cytosine) de 59. Cette similitude amène certains auteurs à regrouper toutes les bactéries du genre au sein d'une seule espèce. La taille globale du génome est de  $3,13 \cdot 10^6$  paires de bases, soit moins que *E. coli* ( $4,7 \cdot 10^6$  pb) (2). L'examen des profils de restriction montre une grande homogénéité au sein du genre, ce qui conforte l'idée de l'existence d'une seule espèce de *Brucella*. Cependant, avec certaines sondes de fragments d'ADN aléatoires en RFLP (restriction fragments length polymorphism), il apparaît un polymorphisme dans la taille des fragments. Cette différence de profil peut être corrélée avec les différences faites entre espèces et biovars (42).

### 4.4. LA STRUCTURE DES BRUCELLAE

La paroi des *Brucellae*, comme celle des autres bactéries Gram-négatives est constituée d'une membrane externe, de peptidoglycane (PG), d'un espace périplasmique et d'une membrane cytoplasmique (Figure I-2). Cependant, contrairement aux autres Gram négatives, elles ne forment pas de sphéroplastes dans les conditions classiques (Tris, EDTA et lysosyme). De même leur paroi est moins sensible à l'action des détergents non ioniques. Ces deux particularités ont énormément retardé l'étude structurelle des *Brucellae* (64).

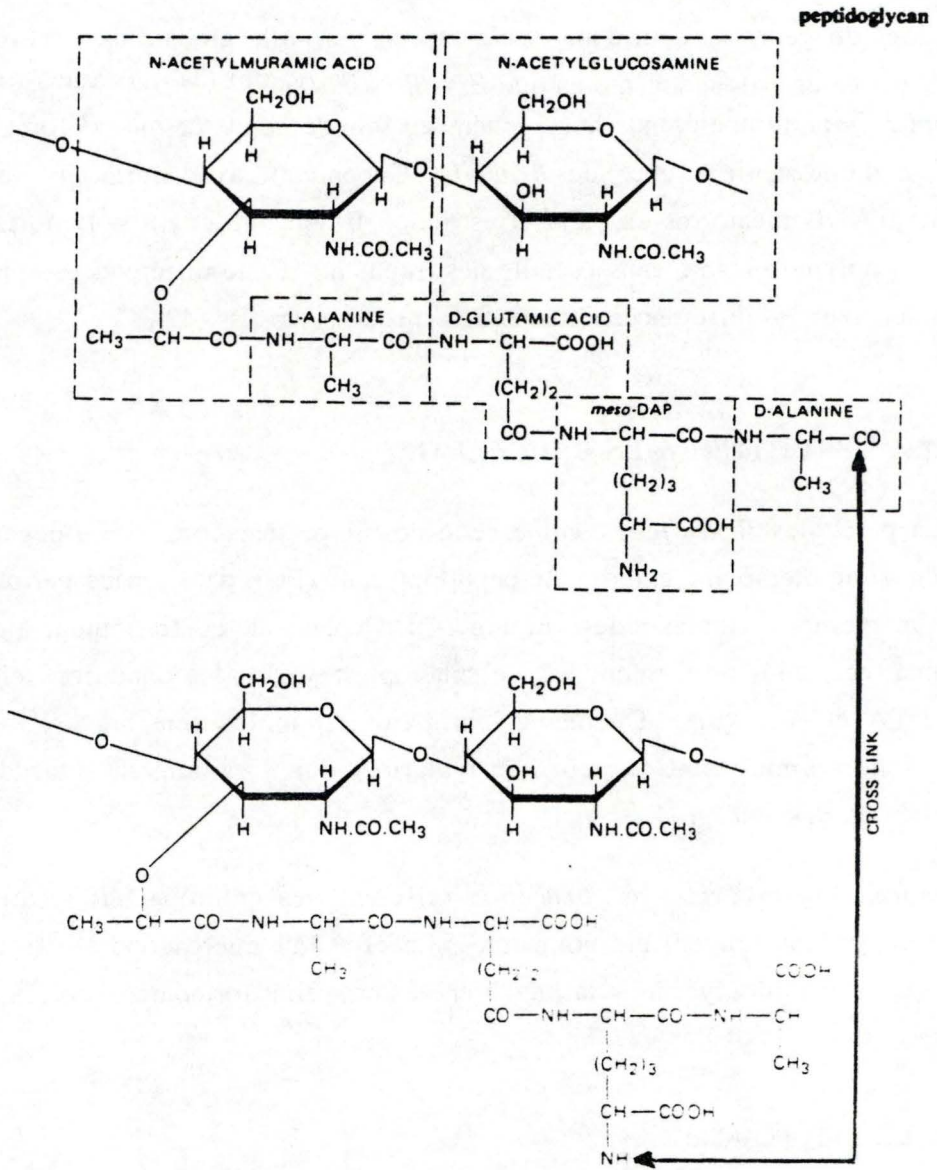
Morphologiquement, les *Brucellae* diffèrent des entérobactéries, auxquelles elles ont cependant souvent été comparées. En effet, au microscope électronique, il apparaît que le peptidoglycane et la membrane externe sont fortement associés chez les *Brucellae* (29).

#### A. LE CYTOPLASME

Le cytoplasme se présente sous la forme d'une masse homogène, dense aux électrons et parsemée de nombreux ribosomes. Le matériel chromosomique apparaît individualisé ou dispersé en filaments et il peut parfois être en contact avec des incurvations de la membrane, suivant la bactérie (29, 47).

Certaines protéines cytoplasmiques ont été identifiées par clonage de leur gène : une phosphomonoestérase de 120 kDa (69) et deux protéines de choc thermique, GroEL (57,5 kDa) et GroES (10 kDa), présentes aussi chez *E. Coli*. Une protéine de

---



**Figure I-3.** Structure du peptidoglycane des parois bactériennes Gram négatif.

choc thermique, est une protéine produite par un micro-organisme en condition de stress, induisant probablement un mécanisme adaptatif (53).

#### B. LA MEMBRANE PLASMIQUE

La membrane plasmique présente la structure traditionnelle de la bicouche lipidique. Des agrégations granulaires adjacentes à cette membrane marquent la présence de complexes polyribosomiaux (28).

#### C. L'ESPACE PÉRIPLASMIQUE

Propre aux bactéries Gram négatives, cet espace compris entre la membrane cytoplasmique et la membrane externe peut varier d'épaisseur en fonction de l'osmolarité du milieu. Il est caractérisé par la présence d'enzymes impliqués dans la synthèse et la dégradation de la paroi lors de la division, dans le transfert et la transformation des nutriments et encore beaucoup d'autres fonctions (47).

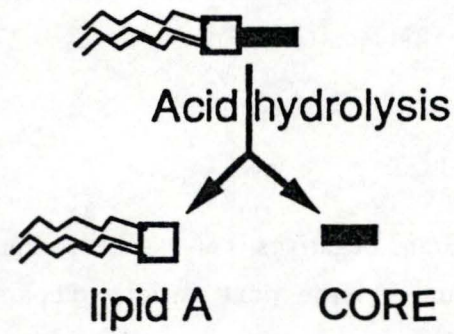
Parmi ces enzymes, citons une superoxydodismutase à cuivre et à zinc. Cette enzyme de 20 kDa, qui convertit les radicaux superoxyde en peroxide d'hydrogène et en oxygène, a été identifiée dans le périplasme de nombreuses espèces et biovars du genre *Brucella* (11). On ne connaît pas actuellement son importance fonctionnelle (48,74,78).

Mayfield (10,44,58,75,76) dirige, depuis 1988, l'étude approfondie d'une protéine de 31 kDa (BCSP 31) extractible en solution saline, probablement périplasmique et présente dans toutes les espèces sauf *B. ovis*. Son pouvoir antigénique en fait un bon candidat pour un futur vaccin, nous y reviendrons.

#### D. LE PEPTIDOGLYCANE

Le peptidoglycane ou PG est un polymère qui assure la relative rigidité et les propriétés protectrices de la paroi. Chez les entérobactéries, il consiste en un polymère de N-acétylglucosamine- $\beta$ 1,4-acide N-acétyl muramique. Un réseau tridimensionnel est réalisé grâce à l'intervention d'un térapeptide L-alanine, acide D-glutamique, acide diaminopimélique et D-alanine. L'acide diaminopimélique est un acide aminé dicarboxylique et diaminé. La fonction amine de cet acide est liée à un résidu carboxyl du dernier D-alanine d'un autre térapeptide attaché à une autre chaîne polysidique (Figure I-3).

R-LPS



S-LPS

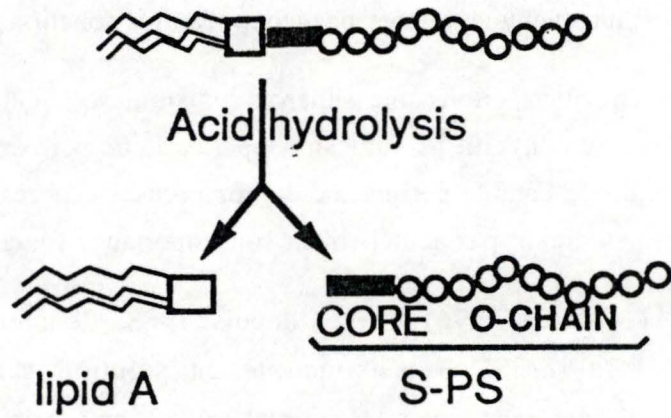


Figure I-4. Structure du LPS R et S.

Si, chez les *Brucellae*, les mêmes acides aminés ont été déterminés, il n'est pas certain que la structure soit la même que celle décrite ci-dessus pour les entérobactéries (29).

#### E. LA MEMBRANE EXTERNE

Elle est constituée de lipopolysaccharides (LPS), de protéines (Omp pour Outer membrane protein) et de phospholipides.

##### 1. Le lipopolysaccharide

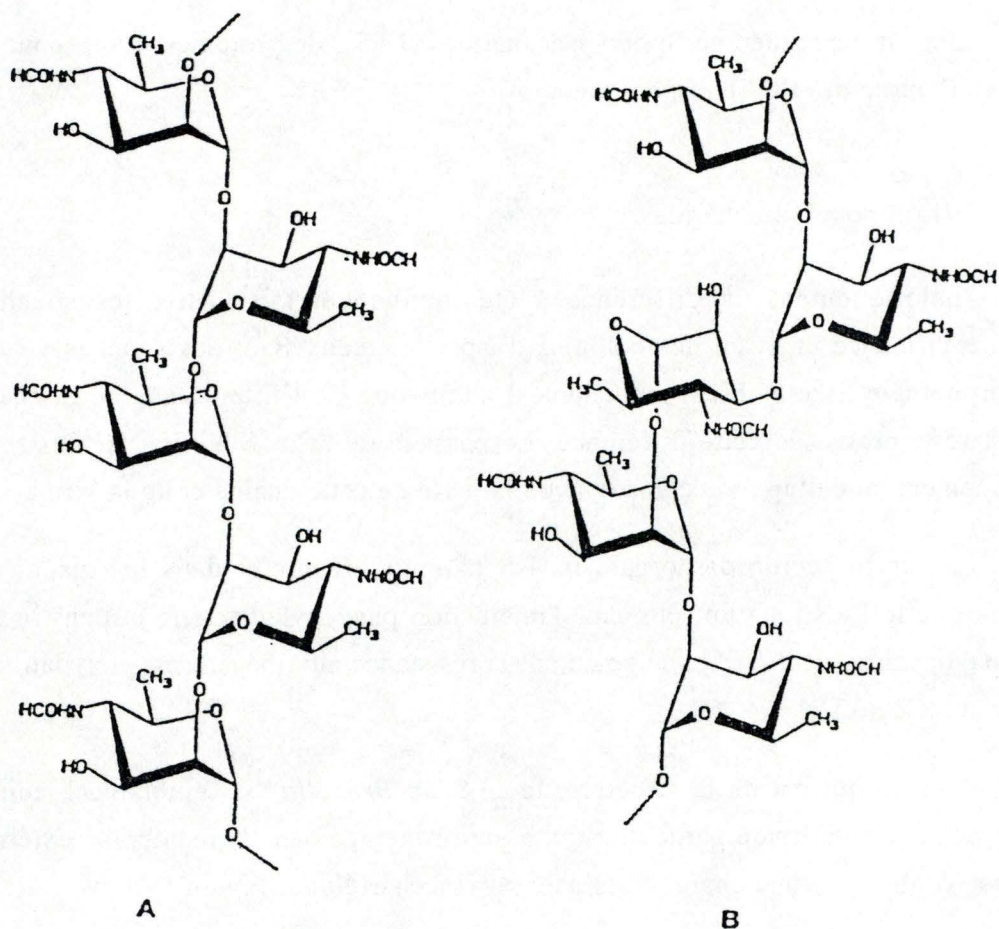
Historiquement, la différence a été rapidement faite entre les souches de moindre virulence et ayant des colonies d'aspect rugueux R et des souches virulentes de morphologie lisse S. Il est actuellement admis que c'est la présence de la chaîne O qui est responsable de cette différence. Le passage de l'état S à l'état R, qui survient spontanément en culture, s'accompagne de la perte de cette chaîne et de la virulence.

La survie accrue des organismes S par rapport aux R dans les macrophages suggère que le LPS joue un rôle dans l'interaction phagocyte/bactérie et dans la survie intraphagocytaire, peut-être en augmentant la résistance aux mécanismes oxydatifs de la cellule infectée(35).

Pour ce qui est de la structure, le LPS de *Brucella* est semblable à celui des entérobactéries : un lipide particulier qui assure l'ancrage dans la membrane externe, un core polysidique et une chaîne terminale polysaccharidique (Figure I-4).

##### *Le lipide A*

Ce lipide est enchâssé dans la bicouche lipidique dont est constituée la membrane externe. Au niveau de sa structure, le lipide A des *Brucellae* est très différent de celui des entérobactéries. Alors que celui d'*E. coli* est composé majoritairement d'acide hydroxymyristique, celui des *Brucellae* se compose d'un dimère de glucosamine et de 2,3-diaminoglucosamine, plus caractéristique des bactéries photosynthétiques. Sur ce squelette sont alors liés des acides gras à longues chaînes, acide palmitique ou stéarique (57).



**Figure I-5.** Structures chimiques des chaînes O des souches A>M (A) et M>A (B) (Dubray G, 1981).

- A. A>M : homopolymère de 4,6-didéoxy-4-formamido- $\alpha$ -D-mannopyranosyles unis par des liaisons  $\alpha$ -1,2.
- B. M>A : polymère linéaire d'unités répétitives composées de 4,6-didéoxy-4-formamido- $\alpha$ -D-mannopyranosyles dont quatre liaisons sont du type  $\alpha$ -1,2 et une du type  $\alpha$ -1,3.

*Le core*

Le core ou noyau est rattaché au lipide A par un lien covalent via du 2-kéto-3-déoxyoctulonate ou KDO.

Si sa composition a été identifiée chez *Brucella* par chromatographie en phase gazeuse (D-glucose, D-mannose et 2-amino-2,6 didéoxy D-glucose), sa structure reste inconnue (57).

*Le polysaccharide O*

C'est la présence de ce polysaccharide (PSO) qui détermine l'apparence R ou S de la colonie. Il s'agit d'un homopolymère (96 à 100 unités) de résidus 4,6-didéoxy-4-formamido- $\alpha$ -D-mannopyranosyl, proche de celui de *Yersinia enterocolitica* 0:9. Cette similitude explique les réactions sérologiques croisées observées entre ces deux espèces (16).

Le PSO est le porteur de deux types d'épitopes majeurs des *Brucellae* de type S : les antigènes A et M. En effet sur base de ces antigènes, une distinction peut être faite. En 1932, Wilson et Miles ont utilisé des sérums dirigés contre des souches de *B. abortus* et *B. melitensis* pour réaliser des épaissements croisés. Ils en ont déduit que les *Brucellae* portent des antigènes en proportion variable : *B. abortus* ayant plus de A que de M et *B. melitensis*, plus de M que de A (17). Cette différence sera confirmée par la suite même si elle ne s'est pas révélée absolue (Tableau I-1, colonne sérums agglutinants monospécifiques). Aujourd'hui l'analyse du LPS par électrophorèse en gel de polyacrylamide, en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE) permet de faire sans équivoque la différence : chez les souches A dominantes, on observe une succession de bandes clairement espacées tandis que chez les souches M dominantes c'est un motif de bandes en triplets qui apparaît (39). Il y a peu, des anticorps dirigés contre un épitope commun aux deux souches ont été obtenus (22).

Structurellement la distinction s'explique par le type de liaisons en jeux. Chez les souches à dominante A les résidus sont unis par des liens  $\alpha$ -1,2, avec un maximum de 2% de liaisons  $\alpha$ -1,3. Par contre pour les souches M dominantes, on retrouve une structure pentasaccharidique avec quatre liaisons  $\alpha$ -1,2 pour une liaison  $\alpha$ -1,3 (61) (Figure I-5).

Author	group 1	band I group 2	band II group 3	band III low MW
Dubray '80		37k'	25k'	15k'
Verstrete '82	94k	43, 41k'	30k'	
Dubray '83	94k	43k, 38, 37, 36k'	31, 27, 26, 25k'	
Douglass '84		37-42k'	26k'	
Santos '84	94-88k'	39-35k'	31-25k'	
Verstrete '84	94-88k'	40-38'	30-25'	
Gómez-Miguel '86				8k <sup>‡</sup>
Mayfield '88			31k <sup>‡</sup>	
Ficht '88		36k		

\*released from protein-peptidoglycan sacculi by lysozyme

†tryptic fragment

‡salt extracted, most likely periplasmic

**Tableau I. 2.** Synopsis de la découverte de Omps de *Brucella* depuis ces dix dernières années (d'après Adams G, 1990).

## 2. Les protéines de la membrane externe

L'étude des Omps est très importante. En effet la surface de la paroi constitue l'interface entre le pathogène et son hôte et c'est à ce niveau que se situent les propriétés qui caractérisent les *Brucellae*. Cette étude doit permettre d'identifier des antigènes qui pourraient faciliter la mise au point d'un vaccin et d'un diagnostic compatibles. Depuis une dizaine d'années, la connaissance des Omps de *Brucella* a fortement progressé. Le tableau I-2 présente une brève chronologie des recherches menées jusqu'à présent.

Dès 1974, Dubray et collègues (32) ont montré que, chez la souris, des fractions de la paroi, insolubles dans le SDS (SDS-I), composées de protéines fortement associées au PG, étaient capables d'induire une immunité protectrice comparable à celle provoquée par des bactéries entières. Il est probable que la publication de ces résultats a poussé nombre de scientifiques à utiliser la solubilisation dans des détergents pour isoler les Omps fortement liées au PG. Il en résulte que ce petit groupe d'Omps a été étudié en détail tandis que la majorité des Omps solubles dans le SDS restent peu caractérisées.

En 1980, Dubray et Bézard (30) ont isolé, par SDS-PAGE, trois antigènes à partir de la fraction SDS-I. Ces Omps présentaient des masses moléculaires moyennes de 37 kDa (bande I), de 25 kDa (bande II) et de 15 kDa (bande III). En raison de la coloration observée avec de la carbocyanine, ils ont suggéré la présence de composants de nature protéique dans la bande I, de nature glycoprotéique dans la bande II et de nature lipoprotéique dans la bande III.

Verstraete et collègues (82) ont démontré, par SDS-PAGE de bactéries traitées au lysosyme après extraction au N-laurylsarcosinate et un détergent ionique dipolaire, l'existence de trois groupes majeurs d'Omps ayant des masses moléculaires de 94, 41 à 43 et 30 kDa, et leur ont donné le nom de groupe 1, groupe 2 et groupe 3, respectivement. Les protéines du groupe 2 avaient une composition en acides aminés comparable à celle d'OmpF, une porine d'*E. coli*. La composition des protéines du groupe 3, quant à elle, les rapprochait plutôt des protéines de structure OmpA d'*E. coli*.

En 1983, Dubray et Charriaut (33), par solubilisation dans du SDS bouillant et analyse par SDS-PAGE de *Brucellae* traitées au lysosyme, mettent en évidence la présence de bandes protéiques majeures de masses moléculaires de 43, 36 à 38 et 25 à 27 kDa et des bandes mineures de 88 à 94, 31 et 15 kDa.

En 1984, Santos, Verstraete, Perera et Winter (70) ont comparé les Omps liées au PG de 15 souches R et 2 souches S de *Brucella abortus*, *B. canis*, *B. ovis* et *B. melitensis*. Chez les trois premières espèces, ils ont identifié les trois groupes comme suit : 94/88 kDa (groupe 1), 39/35 kDa (groupe 2) et 31/25 kDa (groupe 3). En plus de cela ils notèrent chez *B. melitensis* une bande majeure supplémentaire de 48 kDa.

Verstraete et Winter (81), en comparant le profil SDS-PAGE de 49 souches de *B. abortus*, ont observé les trois groupes majeurs d'Omps suivants dans toutes les souches : 94/88 kDa (groupe 1), 40/35 kDa (groupe 2) et 30/25 kDa (groupe 3).

Plus récemment, Sowa et collègues (73) ont identifié par SDS-PAGE du complexe OMP/PG, près de 67 protéines solubles dans le SDS, dont les membres des trois groupes précités. Ce nombre s'élève à 75 après traitement au lysosyme.

Cloekaert (20) a identifié, à l'aide d'anticorps monoclonaux produits par fusion de cellules spléniques de souris infectées par *Brucella*, une série de protéines dites mineures. Ce sont notamment les protéines de 10, 16.5, 19, 71 et 89 kDa. Ces protéines ne sont pas liées au PG (23).

Pour ce qui est de la fonction de ces Omps la première découverte revient à Douglas et collègues (27) qui, en 1984, ont démontré *in vitro* l'activité de porine des protéines du groupe 2 (masse moléculaire entre 37 et 42 kDa) par incorporation de celles-ci dans des liposomes. Des expériences analogues avec les protéines du groupe 3 ne donnent par contre aucun résultat similaire.

La fonction des protéines du groupe 3 et du groupe 1 reste à l'heure actuelle hypothétique.

Depuis quelques années, les progrès du génie génétique ont permis de cloner et de caractériser certaines de ces protéines. Ainsi, Ficht et collègues (36), grâce à une banque génomique construite dans le bactériophage  $\lambda$ gt11 et une sonde oligonucléotidique spécifique pour la partie N-terminale d'une Omp SDS insoluble de 36 kDa, ont cloné deux gènes homologues de *B. abortus* et les ont nommé Omp2A et Omp2B. Ces deux gènes codent pour des protéines de 36 et 33 kDa. La composition en acides aminés de ces deux protéines est similaire à celle rapportée par Verstraete pour les protéines du groupe 2. Les auteurs émettent plusieurs hypothèses pour expliquer la présence de deux gènes identiques : il s'agit soit d'une forme active et d'une forme silencieuse d'un même gène, soit de deux gènes codant pour la même fonction mais dans des conditions différentes (37).

---

de Wergifosse (26) a également cloné le gène codant pour la protéine de 36 kDa étudiée par Ficht. Par comparaison de séquence, il ne repère qu'une faible similitude entre la séquence de la protéine de 36 kDa (groupe 2) et la protéine d'OmpF d'*E. coli*. Il a aussi comparé les séquences de l'Omp de 25 kDa (groupe 3), qu'il a clonée, et de l'OmpA d' *E. coli*, mais il ne trouve aucune similitude significative entre les deux.

Enfin, notons que Gomez et Moriyon ont mis en évidence la présence chez *B. abortus* et *B. ovis* d'une lipoprotéine liée de manière covalente au PG. Le fragment obtenu après digestion à la trypsine a une masse de 8 kDa et ressemble, par sa taille, son point isoélectrique, sa composition en acides aminés et la présence de déterminants antigéniques communs, à la lipoprotéine de Braun présente chez *E. coli* (40).

### 3. Les phospholipides

La membrane externe des *Brucellae* est riche en phosphatidylcholine, ce qui est rare chez les entérobactéries qui servent de référence et qui elles sont majoritairement composées de phosphatidyléthanolamine (64). Cette composition marginale pourrait expliquer la résistance accrue des *Brucellae*, par rapport aux autres Gram négatives, à la polymixine B. Cet antibiotique interagit avec les phospholipides négatifs de la membrane (phosphotidyléthanolamine, cardiolipine) ce qui entraîne une déstructuration de la membrane et de sa perméabilité (38).

## 4.5. PATHOGENIE

L'infection par des *Brucellae* peut se résumer en trois étapes (34, 35, 63) : le stade de prime infection, la phase d'extension et la phase de bactériémie.

### A. LA PRIME INFECTION BRUCELLIQUE

Les *Brucellae* en contact avec une muqueuse doivent être capables de pénétrer l'épithélium et d'y établir une niche. Si de nombreuses études ont démontré la capacité de ces bactéries à s'en prendre aux muqueuses orale, pharyngée, intestinale, respiratoire, vaginale et préputiale, aucune n'indique comment se déroule ce phénomène.

---

### B. EXTENSION DE L'INFECTION AUX GANGLIONS LYMPHATIQUES

Les microorganismes qui ont échappé aux défenses de la muqueuse sont distribués par drainage lymphatique vers les ganglions lymphatiques. Les plus proches sont rapidement et abondamment envahis (moins d'une semaine), les plus éloignés, beaucoup moins. L'importance de l'infection dépend du nombre de bactéries qui sont rentrées dans la muqueuse au départ.

Le ganglion infecté est dilaté par une hyperplasie lymphoïde et réticuloendothéliale et une infiltration de cellules inflammatoires. Déjà après quatre jours, on observe des foyers inflammatoires (monocytes, macrophages, éosinophiles, neutrophiles ...). Les tissus avoisinants sont alors rapidement envahis.

### C. BACTÉRIÉMIE ET LOCALISATION SECONDAIRE

Lorsque les *Brucellae* ne sont pas détruites dans les ganglions, elles peuvent se retrouver dans le sang. Elles peuvent survivre dans les macrophages et les neutrophiles de l'hôte et les utiliser comme moyen de transport lors de leur expansion sanguine (bactériémie) mais aussi de bouclier pour se protéger des mécanismes bactéricides cellulaires et humoraux. Finalement, des bactéries se retrouvent dans un grand nombre de tissus : tissus lymphoïde, glandes mammaires, systèmes génitaux mâle et femelle, os, articulations, parfois aussi les yeux et le cerveau.

#### 4.6. RESISTANCE INTRAPHAGOCYTAIRE (34,35,63,15)

Les *Brucellae* sont des parasites intracellulaires facultatifs. Une fois passée la barrière épithéliale, elles sont captées par les globules blancs phagocytaires. L'infection ne persistera que si l'agent infectieux survit à la réaction de défense du phagocyte.

Différentes expériences ont montré que les souches S sont plus résistantes à l'inactivation par les radicaux libres que les souches R, ce qui laisse supposer que la chaîne O du LPS-S puisse jouer un rôle protecteur et accroître la survie intracellulaire. Notons que ni les souches R ni les souches S ne sont sensibles aux mécanismes indépendants de l'oxygène mais que les deux sont sensibles *in vitro* aux mécanismes dépendants de l'oxygène. En fait souches virulente et avirulente pourraient être détruites et l'invasion stoppée si le système antimicrobien était capable de fonctionner normalement.

---

Car c'est là que se situe le noeud du problème. Les *Brucellae* S développeraient une capacité d'inhibition de la fusion du phagosome et du lysosome ou dégranulation, qui est indispensable à la digestion intracellulaire. Une fraction inhibitrice a été isolée à partir du surnageant de culture de *B. abortus* souche 2308 et analysée. Cette fraction contenait du 5'-guanosine monophosphate (GMP) et de l'adénine. On sait que ces composants se retrouvent en surface de la bactérie mais on ignore leur mode d'action (15).

---

## 5. IMMUNITE EN BRUCELLOSE

Les interactions des *Brucellae* avec les cellules du système immunitaire sont de première importance dans la détermination de la résistance ou de la susceptibilité à la brucellose. L'équilibre entre les facteurs de l'hôte qui servent à éliminer la bactérie et les facteurs de virulence de celle-ci détermine *in fine* le devenir de l'infection (35). Les *Brucellae* étant des parasites intracellulaires, on considère depuis Mackaness (55) que l'immunité cellulaire joue un rôle prépondérant, cependant les effecteurs humoraux participent pour une large part dans la neutralisation des bactéries.

### 5.1. IMMUNITE HUMORALE

La souris est souvent utilisée dans des modèles de brucellose expérimentale. L'injection de sérums immuns chez la souris, avant le contact avec l'agent pathogène, peut empêcher la dissémination de l'infection.

Plommet et Plommet (68) ont réalisé des transferts, avant épreuve virulente, avec des sérums de souris infectées par des *Brucellae* ou vaccinées avec une fraction de protéines de la paroi fortement liées au PG (fraction SDS-I). Ce type de transfert permet d'arrêter la souche d'épreuve chez la souris receveuse. Ils ont aussi observé que des sérums anti-LPS ne font que diminuer l'extension des bactéries, sans l'arrêter. Avec les trois types d'anti-sérums (anti-SDS-I, anti-LPS ou d'infection), la colonisation de la rate diminue, par rapport au contrôle, au détriment du foie. Cet effet s'observe vers le 7<sup>ème</sup> jour après l'infection (effet précoce) et traduit une plus grande affinité du foie pour les bactéries opsonisées par les anticorps. Un effet tardif (noté au 21<sup>ème</sup> et 49<sup>ème</sup> jour après l'infection) apparaît uniquement suite à l'injection de sérums d'infection ou anti-SDS-I. Il s'agit d'une réduction du nombre de bactéries dans la rate et dans le foie pouvant aller jusqu'à la disparition des *Brucellae* dans ces deux organes. Le fait que seuls ces deux sérums induisent cet effet tardif suppose que le LPS seul ne peut suffire à supprimer l'infection. Les Omps, présentes dans la fraction SDS-I et sur les bactéries entières, susciteraient la protection à longue durée et probablement l'immunité cellulaire.

L'usage des anticorps monoclonaux (AcM) dans des expériences de protection passive a permis d'affiner l'étude des antigènes responsables.

Limet *et al* (50, 52) ont observé une diminution de la colonisation de la rate vers le 7<sup>ème</sup> jour et de la rate et du foie vers le 21<sup>ème</sup> jour lorsqu'ils provoquaient une

épreuve infectieuse après inoculation d'AcM dirigés contre les épitopes A ou M du LPS des souches S (LPS-S). Les AcM anti-M protégeaient mieux dans une souche M dominante et de même dans une souche A dominante pour les anti-A. De même, Cloeckart *et al* (22) ont obtenu des résultats semblables grâce à des AcM dirigés contre un épitope du LPS commun aux souches M et A-dominantes.

Tous ces AcM se sont révélés aussi efficace pour empêcher la colonisation que les sérums anti-fraction SDS-I et plus que les sérums anti-LPS. Ces résultats suggèrent que les effets mesurables au 7<sup>ème</sup> et au 21<sup>ème</sup> jour après l'infection dépendent surtout de l'antigène majeur (LPS) porté par la souche d'épreuve.

Winter *et al* (84) ont vérifié la protection induite par des AcM dirigés contre la chaîne O du LPS. Ils ont ainsi mis en évidence qu'en plus de l'antigène, l'isotypie de l'immunoglobuline est importante : une IgG2a est plus active qu'une IgG1, ce qu'ils expliquent par une plus grande affinité du complément pour le premier isotype.

Pour tenter d'étudier le rôle des anticorps anti-Omps, Cloeckart *et al* (21) ont testé, en protection passive, 36 AcM dirigés contre 7 Omps et ont ainsi montré que trois de ces AcM, dirigés contre des protéines de 16.5, 25 et 36 kDa, conféraient une protection inférieure à celle apportée par les AcM anti-LPS. Les auteurs supposent que cette faiblesse serait due à une accessibilité limitée de l'antigène sur les *Brucellae*, réduisant l'opsonification par les AcM. De plus, l'utilisation combinée des anticorps monoclonaux anti-LPS et des anti-Omps n'augmente pas l'effet protecteur observé au 49<sup>ème</sup> jour avec les anti-LPS seuls (46), les auteurs en déduisent que le rôle protecteur joué par les Omps est principalement basé sur l'immunité cellulaire.

## 5.2. IMMUNITE CELLULAIRE

Si l'immunité peut être transférée à des souris receveuses par des sérums immuns, elle peut l'être aussi par les lymphocytes spléniques de souris donneuses vaccinées ou infectées.

Plommet et Plommet (68) ont montré que les cellules spléniques ou ganglionnaires de souris vaccinées par la fraction SDS-I apportaient une bonne immunité à l'égard de *B. abortus*. Les cellules impliquées sont des lymphocytes T d'une part et des lymphocytes B d'autre part.

---

Les lymphocytes T sont divisés en deux sous populations phénotypiquement et fonctionnellement distinctes : les lymphocytes T exprimant le marqueur membranaire CD4, essentiellement régulateurs (Lymphocytes T helper CD4+) et les lymphocytes T exprimant le marqueur membranaire CD8 (lymphocyte T cytotoxique CD8+). Araya *et al* (7,8), par transfert de cellules T provenant de souris immunisées par *B. abortus* B19, ont démontré que la contribution dans l'immunité des lymphocytes CD8+ et des lymphocytes CD4+ était équivalente. Le mode d'action des lymphocytes se situe probablement au niveau de l'activation des macrophages et d'une activité cytotoxique

Pour ce qui est de la connaissance des cibles de l'immunité cellulaire en brucellose peu de choses sont connues. Brooks-Adler et Splitter (13) ont séparé les protéines solubles de *B. abortus* B19 par électrophorèse à deux dimensions suivie d'un blotting. Ils ont ainsi isolé 38 protéines capables d'activer *in vitro* des lymphocytes de bovins vaccinés par la souche B19 (test de transformation lymphoblastique ou TTL). Parmi toutes ces protéines, deux sont apparues très stimulatrices : une de 31 kDa et une de 12 kDa. Au CEB, la recherche se porte sur les protéines issues d'une préparation de protéines cytoplasmiques appelée Brucellergène, commercialisée par Rhône-Mérieux. Une protéine de 39 kDa est active en intradermo réaction chez le cobaye et le bovin infecté.

Il est clair aujourd'hui que les deux effecteurs de l'immunité, humoral et cellulaire, apportent chacun une large contribution à l'immunité. La question est de savoir comment ces deux effecteurs réagissent l'un avec l'autre. Plommet et Plommet (68) ont montré que si l'immunité induite par l'injection conjointe de sérum et de cellules peut accroître la protection pendant quelques jours, à terme elle est moins favorable que le sérum utilisé seul. Cette absence d'additivité suggère soit que les cellules effectrices (macrophages) ne peuvent être activées par les deux voies qu'à un niveau limité, soit que les facteurs transférés peuvent limiter l'induction de l'immunité vis-à-vis de l'infection expérimentale elle-même. Cependant Araya *et al* (8) trouvent une protection accrue en combinant des cellules et des sérums, avant l'épreuve infectieuse. L'interaction se traduit par une meilleure opsonisation et activation des macrophages.

---

## 6. TRAITEMENT ET PROPHYLLAXIE

Actuellement l'antibiothérapie est le seul traitement anti-brucellique connu. Cependant elle n'est d'application que chez l'homme, en raison du coût élevé des antibiotiques. Il n'y a donc aujourd'hui que des mesures de prophylaxie sanitaire ou médicale pour enrayer l'extension du mal chez les animaux.

Par les arrêtés royaux du 06 décembre 1978, du 08 avril 1988 et du 19 août 1992, une série de mesures sont mises en place pour lutter contre la brucellose. Ces mesures comprennent, entre autres, l'instauration d'un contrôle vétérinaire régulier; la mise en place du statut d'indemnité de brucellose, dit B4, indispensable à toute transaction de bétail; la division du pays en zones à risques et l'établissement des infrastructures nécessaires. En cas de déclaration de la maladie, c'est la quarantaine et l'abattage qui sont de vigueur (5).

La vaccination n'est recommandée que si la prévalence de la maladie est supérieure à 2%, ce qui n'est plus le cas aujourd'hui dans notre pays.

Pour assurer une politique d'éradication efficace, il faut associer prophylaxie sanitaire (diagnostic et abattage) et prophylaxie médicale (vaccination). Lorsqu'une telle politique est mise en place, elle se traduit en premier lieu par une campagne de vaccination systématique d'à peu près 5 ans suivie par une phase de diagnostic et d'abattage. Le problème rencontré avec la brucellose est dû au fait que les souches vaccinales utilisées génèrent une réponse humorale très proche de celle provoquée par une souche infectieuse. Dès lors, nombre d'animaux vaccinés apparaissent positifs au cours du dépistage, ce qui ne va pas sans causer de difficultés. Pour éviter cela il faut laisser suffisamment de temps entre vaccination et diagnostic pour que la réponse humorale s'atténue, soit à peu près un an. Pour réduire cette perte de temps et donc augmenter la vitesse d'éradication, il conviendrait d'élaborer un diagnostic et un vaccin compatible, c-à-d basé sur des antigènes différents.

## 7. LE DIAGNOSTIC DE LA BRUCELLOSE

Un diagnostic rapide et correct est essentiel pour une mesure de prophylaxie médicale efficace contre la maladie. Idéalement, une maladie infectieuse est identifiée par l'observation d'un symptôme typique, suffisamment précoce pour déceler la maladie à temps, et confirmée par la présence d'anticorps circulants dirigés contre l'agent causal ou par la détection directe du microorganisme. Parce que la brucellose chez l'animal n'est pas caractérisée par un symptôme typique et qu'elle est même parfois asymptomatique, le diagnostic repose traditionnellement sur l'identification des anticorps et est confirmé par l'isolement de la bactérie (59).

### 7.1. DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE

Des bactéries isolées à partir des sites probables d'infection chez l'hôte (sang, lait, sécrétion vaginale mais aussi rate, ganglions lymphatiques ou glandes mammaires) sont mises en culture sur des milieux sélectifs. Le diagnostic bactériologique a deux avantages : le premier étant d'avoir la certitude que la maladie est bien due à *Brucella* et le deuxième, la possibilité de permettre une étude épidémiologique, par biotypage des souches isolées. Cependant, il n'est pas applicable à grande échelle et demande des manipulations dangereuses pour l'investigateur (59).

### 7.2. DIAGNOSTIC IMMUNOLOGIQUE

#### A. DIAGNOSTIC BASÉ SUR LA RÉPONSE HUMORALE

Ces épreuves sérologiques sont exclusivement basées sur la mise en évidence des anticorps présents dans les sérums ou le lait. Les anticorps immunodominants détectés, IgM et l'une ou l'autre sous classe d'IgG, selon le test utilisé, sont dirigés quasi exclusivement contre le LPS-S des *Brucellae* (67). D'autres organismes présentent un LPS similaire du point de vue de la chaîne O, provoquant des réactions croisées faussant le test de diagnostic. Parmi ces organismes citons *Yersinia enterocolitica* 0:9, *E. Coli* 0:116 et 0:157, *Salmonella urbana*, *Pseudomonas maltophilica* et *Vibrio cholerae* (77). Tous produisent des IgM ou des IgG dirigées contre le LPS. Le manque de spécificité des IgM entraîne une diminution importante de la sensibilité (seuil élevé) et de la spécificité des tests de diagnostic.(77).

---

Les principaux tests sont (54,3) :

- Séroagglutination lente en tube

Une suspension de *Brucellae* est agglutinée par les anticorps (IgM et IgG2) présents dans des dilutions du sérum suspect. Ce test est le plus utilisé en raison de son coût peu élevé et de sa mise en oeuvre aisée.

- Test au rose bengale

Une agglutination rapide par les IgM et les IgG1, à pH 3,65, de bactéries tuées et colorées. Ce test peu coûteux est souvent utilisé pour le criblage des sérums.

- Fixation du complément

Ce test est basé sur la propriété qu'a le complément de se fixer sur les complexes immuns formés d'antigènes bactériens solubles et des IgM et IgG1 anti-*Brucella* du sérum à tester. En absence d'anticorps, le complément se fixe sur des érythrocytes de moutons couverts d'anticorps anti-globules rouges de moutons, ajoutés comme système révélateur, et provoque leur lyse. Le degré d'hémolyse du sérum est inversement proportionnelle à la quantité d'anticorps présents dans le sérum testé. Ce test, plus délicat et plus coûteux dans sa mise en oeuvre, est considéré comme le plus spécifique et le plus sensible des tests classiques. Il est utilisé comme test de confirmation.

- Test de coombs

Un second anticorps anti-IgG ou anti-IgM rend agglutinant les anticorps dits incomplets, c-à-d incapables d'agglutiner bien qu'ayant fixé l'antigène. Ce test est peu utilisé car demande une mise en oeuvre laborieuse. Récemment, ce test a été perfectionné pour permettre spécifiquement la détection des IgG. Après traitement au DTT (dithiotréitol), qui inactive les IgM, les IgG sont rendues agglutinantes par le facteur rhumatoïde. Ce facteur ne reconnaît que les fragments constants des IgG associés à leur antigène. Le test n'est dès lors plus influencé par la présence d'IgG libres ou d'IgM présentes dans le sérum. De ce fait, les étapes de centrifugation ne sont plus nécessaires et le test se réalise comme une simple agglutination (79).

- Milk ring test

Il consiste à ajouter une goutte de bactéries colorées à un millilitre de lait. Si le lait est contaminé, les anticorps présents, principalement IgA et IgM, et les bactéries

---

colorées forment des anneaux de crème colorés. Cette méthode est la plus facile et la plus économique pour assurer le suivi d'un troupeau.

Cependant, l'augmentation de la taille du troupeau réduit énormément la possibilité de détection (dilutions des échantillons contaminés). Il est dès lors important de posséder une technique plus sensible encore.

Actuellement, l'utilisation de l'ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) tend à s'étendre. Dans ce test, le lait ou le sérum est mis en présence de l'antigène (LPS purifié ou extraits riche en LPS) adsorbé sur une plaque de microtitration. Ce test ne détecte que les IgG. S'ils sont présents, ils se fixent sur le support solide et sont révélés par un anticorps anti-IgG couplé à une enzyme marqueur, peroxydase ou phosphatase. Ce test est actuellement le plus sensible. Sa spécificité est toutefois diminuée par rapport à celle des tests classiques, lorsqu'il est utilisé sur des sérums provenant de région contaminée par *Yersinia enterocolitica* 0:9. En effet, les IgG induites par ce microorganisme interfèrent avec le test ELISA.

#### B. DIAGNOSTIC BASÉ SUR LA RÉPONSE CELLULAIRE (65, 51,3)

L'injection intradermique de protéines cytoplasmiques de *Brucellae* (brucellergène) peut entraîner une réaction d'hypersensibilité retardée (HSR). Celle-ci est provoquée par la stimulation de lymphocytes sensibilisés par une première rencontre avec l'antigène (réaction spécifique).

##### - Intradermo réaction ou IDR

L'IDR est utilisée pour détecter l'infection sur base de cette réaction HSR. L'IDR n'induit pas de production d'anticorps détectables par les épreuves sérologiques classiques chez les individus sensibilisés. Elle constitue donc un complément incontournable des tests classiques.

Une réaction IDR positive est visualisée par une réaction cutanée (induration et rougeur) au site d'inoculation de l'allergène. Ce test a l'avantage d'être facilement applicable en routine et d'être le plus spécifique des tests disponibles actuellement. Des animaux infectés expérimentalement par *Salmonella urbana* et *E. coli* ne donnent aucune réponse dans ce test. Cependant, la sensibilité du test IDR n'est pas parfaite. En effet, la réponse d'HSR suite à l'injection de brucellergène est en moyenne deux à trois

---

fois plus faible (épaississement de la peau) que celle induite par la tuberculine (CEB 1991). Le test IDR constitue donc le complément idéal de l'ELISA.

Le brucellergène, commercialisé par la firme Rhône Mérieux, semble être le plus efficace des allergènes, dans la détection de l'HSR, disponibles actuellement. Il s'agit d'une préparation de protéines cytoplasmiques d'une souche R de *B. melitensis*. Elle n'induit pas de réponse humorale pouvant interférer avec des tests sérologiques, elle est spécifique des *Brucellae* et ne sensibilise pas les animaux. Quelques problèmes pourraient être induits dans certains lots d'allergène, suite à la présence intracellulaire, en faible quantité, de la chaîne O du LPS chez la souche utilisée pour cette préparation (24).

- Test de transformation lymphoblastique ou TTL

Son principe repose sur l'induction par un antigène d'un effet mitogène sur les lymphocytes sensibilisés à cet antigène. Ce test est principalement d'usage en laboratoire.

---

**Tableau I-3 : Les différents vaccins anti-brucelliques (d'après Dubray, 1981)**

<b>Vaccins</b>	<b>Caractéristiques</b>	<b>Animaux vaccinés</b>
B. abortus B19 (souche lisse)	Cellule vivante atténuée	bovins
B. melitensis ReV 1 (souche lisse)	cellule vivante atténuée, isolée d'un mutant streptomycino indépendant	ovins et caprins
B. suis 2 (souche lisse)	cellule vivante atténuée	ovins et caprins
B. melitensis H38 (souche lisse)	cellule tuée adjuvée	bovins, ovins et caprins
B. abortus 45/20 (souche rugueuse)	cellule tuée adjuvée	bovins

## 8. LA VACCINATION ANTI-BRUCELLIQUE

Les différentes souches utilisées en vaccins sont reprises dans le tableau I-3.

### 8.1 LES VACCINS VIVANTS (66,18)

Parmi les différents vaccins vivants testés, seuls deux sont utilisés à grande échelle :

- *B. abortus* souche 19 ou B19.

Cette souche S a été isolée par Buck en 1923 à partir du lait d'une vache infectée. Après un an de culture à température ambiante, elle avait perdu de façon spontanée et stable sa virulence.

- *B. melitensis* souche rev1.

Souche S atténuée dont la découverte fut rapportée en 1957 par Helberg. Il possède l'inconvénient d'être contagieux pour l'homme.

Ces deux vaccins offrent une protection relative (60 à 75 %), mais l'immunité induite est proche de celle issue d'une infection. Il est dès lors difficile de différencier un animal infecté d'un animal vacciné par les tests classiques de diagnostic. Des essais ont été fait afin de limiter cette interférence : diminution de la dose, inoculation par voie conjonctivale, vaccination d'animaux entre 4 et 6 mois. Aucun ne donne de résultats parfaitement satisfaisants. L'utilisation de dose réduite (< 800 10<sup>6</sup> bactéries) et l'utilisation de test d'agglutination en présence de facteur rhumatoïde, après traitement des sérums au DDT, permet de faire la différence entre animaux infectés et animaux vaccinés, excepté pour un faible pourcentage d'animaux beaucoup plus sensibles à la souche vaccinale B19 et qui présentent, dès lors, un profil sérologique d'infection (CEB 1991).

Notons que de plus, la souche B19 peut induire la maladie chez l'homme et l'animal. Cependant ces deux vaccins sont les seuls à être utilisés de façon courante.

---

## 8.2. LES VACCINS TUES (66, 18)

Il s'agit de vaccins composés de germes tués, administrés en adjuvant huileux. Deux souches sont concernées :

- *B. abortus* 45/20.

Il s'agit d'une souche R avirulente. La vaccination n'interfère pas avec un test de diagnostic basé sur la détection d'anticorps anti LPS-S. Cependant la protection est faible et nécessite de fréquents rappels. Son efficacité peut être accrue par la présence de traces de LPS-S, mais se repose alors le problème des réactions croisées avec le diagnostic.

- *B. melitensis* souche H38.

Elle confère une très bonne protection mais n'est pas utilisée en raison d'une réaction inflammatoire aigüe au niveau du site d'injection et surtout des réactions sérologiques durables incompatibles avec le diagnostic.

## 8.3. LES VACCINS ACELLULAIRES

Il a été montré, dans le modèle souris, qu'une fraction de paroi extraite au SDS bouillant (Fraction SDS-I) (32), contenant deux protéines majeures ( 25 et 36 KDa) liées au peptidoglycane était aussi efficace que la vaccination par la souche H38. Des traces de LPS-S contaminant cette fraction, induisent des anticorps anti LPS-S qui interfèrent avec le test de diagnostic (52). Toutefois, la combinaison vaccination SDS-I et diagnostic par IDR au Brucellergène semble efficace pour différencier un animal vacciné d'un animal infecté (CEB 1991).

## 8.4. LES VACCINS RECOMBINANTS

Les vaccins recombinants constituent une nouvelle approche offerte par les progrès du génie génétique. Deux approches sont envisageables.

### A. LA DÉLÉTION DE GÈNES D'UNE SOUCHE VACCINALE.

En fait cette approche consiste à identifier des antigènes non indispensables à la capacité de survie et de prolifération des *Brucellae* dans l'organisme, ni au pouvoir protecteur du vaccin. La délétion, dans la souche vaccinale, de gènes codant pour ces protéines permettrait de développer un vaccin vivant délété et de baser le test de

---

diagnostic sur la détection des anticorps ou des cellules T induits par les antigènes toujours présents dans les souches infectieuses.

Le gène codant pour la superoxydodismutase à cuivre et à zinc de 20 Kd, présent dans le périplasme de nombreuses espèces et biovars du genre *Brucella* (11) a été délété. Le rôle éventuel de cette enzyme dans la pathogénicité reste à établir. L'hypothèse que cette enzyme puisse intervenir dans la résistance de la bactérie aux systèmes de défense de l'hôte a été un moment admise, mais il est actuellement connu qu'il n'y a pas de différence dans l'activité dismutasique des souches pathogènes et non pathogènes (74) et que l'inactivation du gène ne réduit pas la virulence (48). Cependant, Tatum *et al* ont montré dernièrement que si la disruption du gène n'altère pas la persistance des *Brucellae* chez la souris, elle diminue grandement le nombre de bactéries dans la rate au cours de la phase initiale de l'infection (78).

Mayfield et collègues ont cloné le gène codant pour une protéine de 31 kDa, extractible en solution saline. Sa fonction est encore inconnue. La délétion du gène dans la souche vaccinale B19 n'altère en rien la capacité de croissance ou de survie intracellulaire(44). Ces résultats sont un prérequis pour la mise au point d'un vaccin vivant compatible avec un diagnostic.

#### B. L'ÉLABORATION DE MICROORGANISMES TRANSGÉNIQUES.

Il s'agit ici de provoquer l'expression de gènes propres aux *Brucellae* dans d'autres microorganismes invasifs mais non pathogènes tels *Escherichia coli* ou *Salmonella typhimurium* atténuée. Ces bactéries servent alors de vecteurs à travers l'organisme. L'immunité serait donc stimulée par des antigènes connus, il serait dès lors facile de trouver un test de diagnostic compatible.

Dans cette optique, Mayfield et collègues ont cloné le gène de la protéine de 31 kDa dans le génome d'une souche atténuée de *Salmonella typhimurium*. Au cours d'infections provoquées avec la bactérie transgénique, l'immunité anti-31 est activée chez la souris (76) et chez le porc (75). Cette approche n'est cependant pas encore applicable sur le terrain, dans la mesure où les bovins ayant développé une immunité vis-à-vis des vecteurs pré-cités, la vaccination avec ces souches ne sera pas efficace. De plus, aucun des deux vecteurs précités n'exprime de LPS, antigène très protecteur. Cet inconvénient pourrait être levé par l'utilisation comme vecteur d'un microorganisme présentant des similitudes dans la structure du LPS de *Brucella*, comme *Yersinia enterocolitica*.

## 9. A LA RECHERCHE D'ANTIGENES SPECIFIQUES

Il apparaît donc clairement que vaccination et diagnostic ne sont pas compatibles, l'un interférant avec l'autre, ce qui pose des problèmes dans la lutte antibrucellique. Dès lors force recherches ont pour but l'identification des antigènes spécifiques au genre *Brucella* ou du moins aux souches infectieuses. Nous ne décrivons ici que les antigènes qui nous semblent les plus intéressants (17).

### 1. L'ANTIGÈNE A2

L'antigène A2 a été identifié par immunoélectrophorèse et décrit par Berman en 1975. Des anticorps anti-A2 se trouvent dans des sérums de bovins et de caprins infectés. L'antigène A2 serait une glycoprotéine thermorésistante, de masse moléculaire estimée à 20 kDa. Son utilisation en IDR détecte les animaux infectés avec une sensibilité moyenne (55%) mais une bonne spécificité (99%). Aucun anticorps anti-A2 n'est trouvé dans des sérums de veaux infectés par *Yersinia enterocolitica* 0:9. Malheureusement la vaccination du bétail par *B. abortus* B19 ou *B. melitensis* rev1 induit des anticorps anti-A2 qui peuvent persister pendant 7 mois après l'inoculation.

### 2. L'ANTIGÈNE X (RAYBOULT ET CHANTLER, 1981)

Cet antigène a été identifié dans des extraits SDS de *B. abortus* 544. Il permet d'après les auteurs la propriété de différencier les animaux vaccinés des animaux infectés, mais cette affirmation n'a jamais été confirmée.

### 3. L'ANTIGÈNE POLY B

Diaz et al, en 1979, ont détecté, par immunodiffusion, des anticorps dirigés contre l'antigène PolyB dans des sérums d'animaux infectés par *B. abortus*, mais pas dans des sérums d'animaux vaccinés. Le polysaccharide B ou PolyB est un polymère cyclique de glucopyranosyl présent chez toutes les espèces de *Brucella*. Cependant le glucane purifié n'apparaît pas comme immunogène et la réaction observée est sans doute liée à la présence de la chaîne O du LPS dans la fraction.

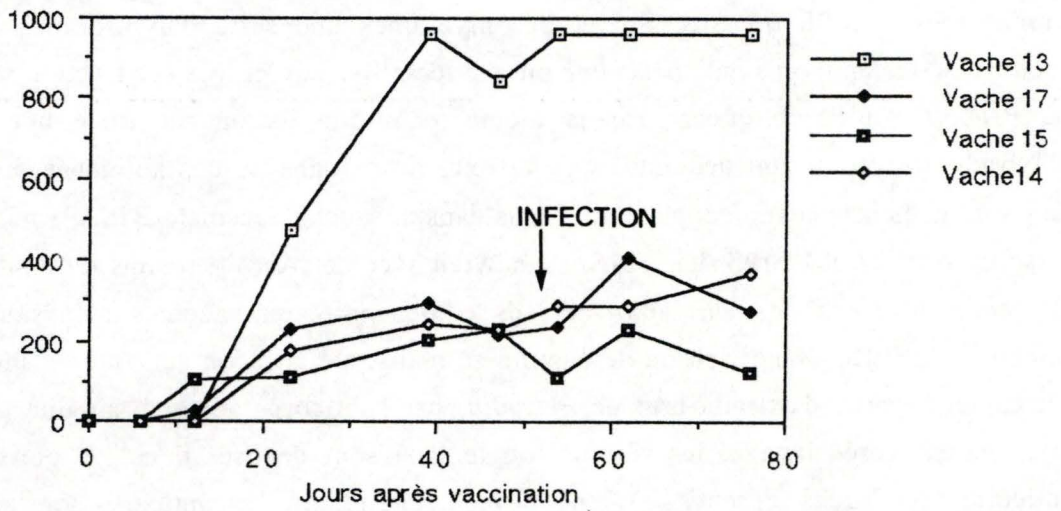
## 4. L'ANTIGÈNE RECONNU PAR L'ACM BR25

Gorrell *et al* (41) ont obtenu par fusion entre des cellules spléniques de souris immunisées avec *B abortus* 544 et des myélomes une série d'hybridomes. Ceux produisant des anticorps anti-*Brucellae* ont été identifiés par ELISA sur fraction soluble de *Brucellae* ultrasoniquées. Par la même technique, ils ont identifié une série d'hybridomes produisant des anticorps capables de reconnaître des antigènes présents dans certaines souches infectieuses mais pas dans la souche vaccinale B19. Parmi ceux-ci se trouvait l'AcM Br25. Un ELISA sandwich avec cet AcM a permis de distinguer efficacement entre des animaux vaccinés et des animaux vaccinés subissant une infection. L'ELISA sandwich ou de capture se réalise de la façon suivante : l'antigène est capté, à partir d'extraits brut de *Brucella*, par l'anticorps adsorbé sur une plaque micropuits. Après lavage, les sérums (ou le lait) sont déposés dans les puits. Les anticorps spécifiques présents se fixent sur l'antigène retenu. Les anticorps sont ensuite identifiés, après lavage, par un anti-anticorps couplé au système de révélation.

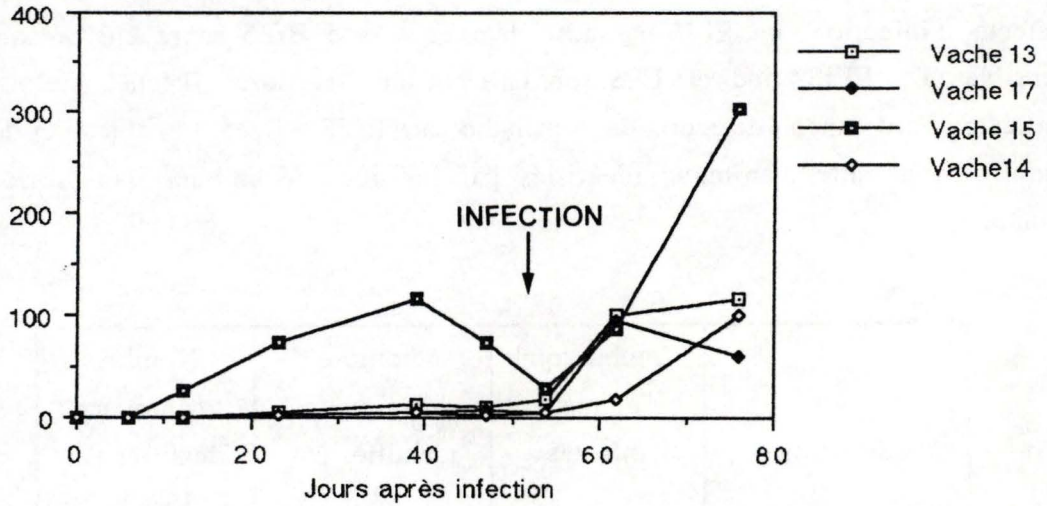
Limet *et al* (communication personnelle) ont essayé de reproduire les résultats obtenus par Gorrell. Par les mêmes techniques, ils ont confirmé que l'antigène reconnu par l'AcM Br25 ou AgBr25 est spécifique du genre *Brucella*. Par contre, ils ont trouvé qu'il n'était pas totalement absent de la souche B19. En ce qui concerne sa capacité à détecter l'infection, un ELISA sandwich avec l'AcM Br25 se révèle presque aussi sensible qu'un ELISA indirect LPS, tout en étant plus spécifique. Il faut toutefois noter un léger retard dans la détection de la maladie par l'ELISA Br25. Le tableau ci-dessous montre le nombre d'animaux identifiés par les deux techniques dans différentes situations.

Situation	Nombre total d'animaux infectés	Nombre d'animaux identifiés par ELISA LPS	Nombre d'animaux identifiés par ELISA Br25
Infection expérimentale	20	19	18
Infection naturelle	28	28	21
Vaccination par B19 puis infection naturelle	28	28	26

Unités arbitraires



Unités arbitraires



**Figure I-6.** Evolution du taux d'anticorps d'animaux vaccinés par la souche *B. melitensis* H38, mesuré par les deux tests ELISA indirect LPS (en haut) et ELISA sandwich Br25 (en bas) (Limet *et al*, communication personnelle).

Pour ce qui est de la discrimination entre animal vacciné et animal infecté, l'ELISA basé sur l'AcM Br25 semble très intéressant. Limet *et al* (communication personnelle) ont vacciné des génisses avec la souche *B. melitensis* H 38 (3 ml du vaccin commercial Aborlane Mérieux) puis les ont infectées avec une souche sauvage *B. abortus* 3. L'évolution du taux d'anticorps de ces génisses au cours du temps est représenté à la figure I-6.

La partie supérieure de la figure illustre les résultats du dosage des anticorps dirigés contre le LPS (ELISA indirect classique). Tous les animaux présentent une augmentation plus ou moins importante du taux d'anticorps, celui-ci atteignant ensuite un plateau. Peu de variations sont observées après l'infection.

La vaccination à l'aide du vaccin tué H 38 n'a induit la production d'anticorps à titre élevé que chez une génisse sur 4 et une nette variation du taux d'anticorps est observée une semaine après l'infection chez tous les animaux.

---

**PARTIE II**

**BUT DU TRAVAIL**

---

La politique d'éradication de la brucellose actuellement appliquée dans les zones où la prévalence est supérieure à 2 % consiste en une campagne de vaccination systématique de tous les animaux, pendant quelques années, suivie d'un arrêt de la vaccination et d'un remplacement par des mesures sanitaires (diagnostic et abattage).

Cependant, les seuls vaccins utilisés couramment sont des souches de *Brucella* qui induisent des réponses sérologiques proches de celles provoquées par les organismes infectieux, ce qui complique énormément le diagnostic.

Cette influence de la vaccination sur le diagnostic ne permet pas d'identifier les animaux infectés avec certitude pendant la période de vaccination et retarde l'entrée en vigueur des mesures sanitaires d'à peu près un an (le temps nécessaire à la disparition de la réponse humorale induite par les souches vaccinales) et donc diminue l'efficacité des campagnes anti-brucellose. De plus cette limitation ne permet pas d'utiliser la vaccination dans les pays indemnes de la maladie, en raison de la difficulté de préciser l'état sanitaire des cheptels vaccinés, en vue de la commercialisation.

Le but des recherches menées au Centre d'Etude de la Brucellose (CEB) et par l'équipe de l'INRA de Nouzilly (France) est de mettre au point un vaccin et des tests de diagnostic compatibles, soit un vaccin qui n'induit ni d'anticorps détectés par le test de diagnostic humoral, ni de réponse cellulaire mise en jeu dans le diagnostic cutané. Dès lors vaccin et diagnostic doivent être basé sur des antigènes différents.

Dans ce cadre, notre travail consiste à approfondir nos connaissances à propos d'un antigène particulier, reconnu par l'AcM Br25. Cet AcM, d'après les études préliminaires de Gorrell *et al* et de Limet *et al*, permet d'identifier un antigène présent dans les trois souches virulentes rencontrées en Belgique (*B. abortus*, biovar 1, 3 et 9) et qui semble être spécifique du genre *Brucella* en général. De plus, le test de détection basé sur l'AcM Br25 mis au point par Limet *et al* est d'une sensibilité comparable à celle de l'ELISA détectant les anticorps anti-LPS.

Notre travail consiste à tester la présence de l'AgBr25 dans une plus large gamme de souches virulentes, à caractériser cet antigène et à tenter de le localiser dans la bactérie. De même, nous allons cloner dans un vecteur le gène codant pour cet antigène, que nous aurons au préalable isolé à partir d'une banque génomique de *B. abortus* construite dans le bactériophage  $\lambda$ gt11. Grâce à ce plasmide, nous pourrions ensuite tenter de faire exprimer cet antigène par des bactéries recombinantes.

Si l'évaluation de l'immunogénicité de la protéine recombinante purifiée confirme les résultats précédents, il sera éventuellement possible d'élaborer un vaccin et un diagnostic compatible, par délétion du gène chez la souche vaccinale.

---

---

**PARTIE III**

**MATERIEL ET METHODES**

---

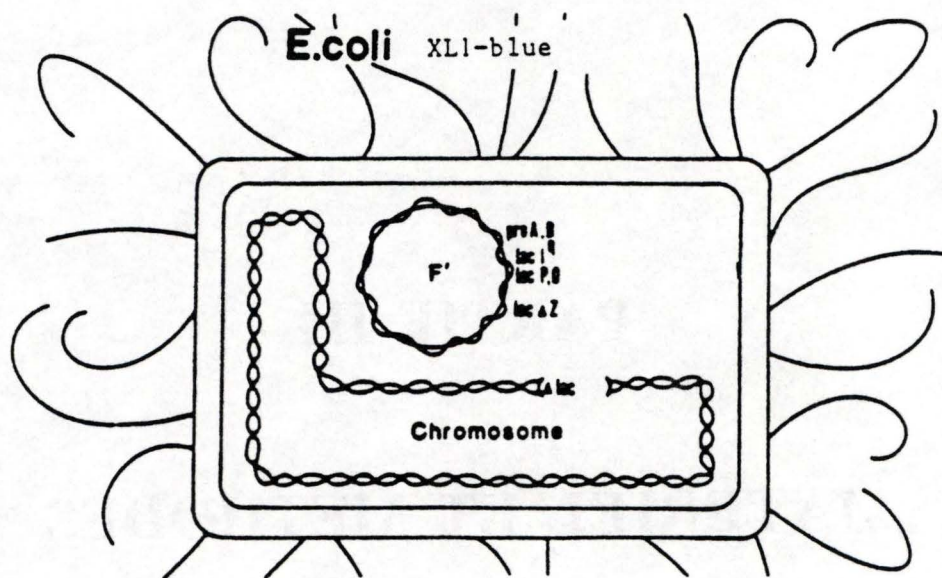


Figure III-1. Représentation schématique d'une bactérie *E. coli* XL1 Blue.

# 1. MATERIEL

## 1.1. SOUCHES, PLASMIDES ET BACTERIOPHAGES

### A. SOUCHES BACTÉRIENNES

#### a. Souche *E. coli* 1090

Elle est utilisée lors du criblage de la banque d'expression de *Brucella abortus* établie dans  $\lambda$ gt11.

Le génotype de la souche est  $\Delta$  lac U 169, Pro A+,  $\Delta$  lon, ara D 139, Str A, Sup F (Trp22 : Tn 10) (PMC 9). Cela signifie qu'elle possède les propriétés suivantes :

- une délétion dans l'opéron lactose ( $\Delta$  lac U 169);
- la mutation lac Iq portée par le plasmide PMC 9. Celle-ci accroît d'un facteur dix la puissance du promoteur du gène codant pour le répresseur de l'opéron lactose;
- la mutation Sup F qui supprime la mutation ambre (UAG) présente dans le gène de lyse S du phage  $\lambda$ gt11;
- une déficience pour la protéase lon (D lon), ce qui augmente la stabilité d'une éventuelle protéine de fusion;
- un gène de résistance à la tétracycline, porté par le Tn 10.
- un gène de résistance à l'ampicilline porté par le PMC9.

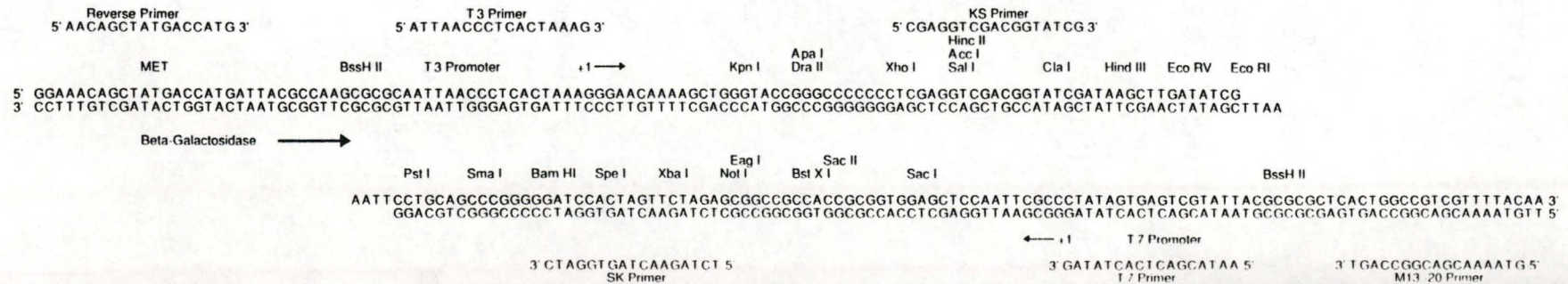
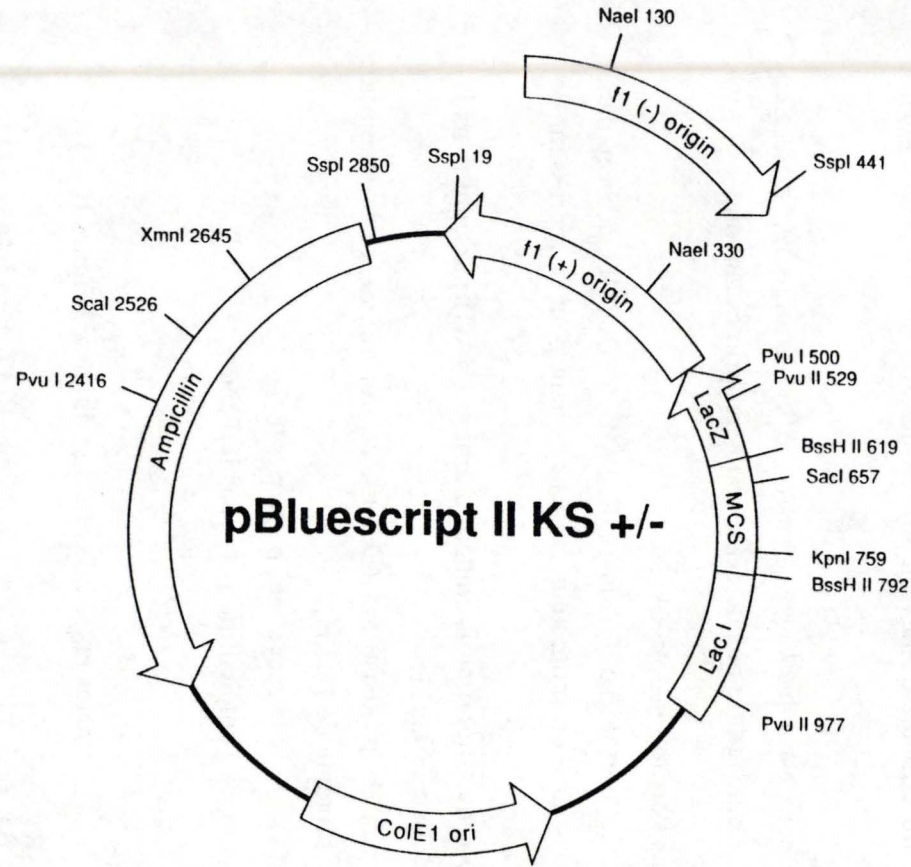
#### b. Souche *E. coli* XL1 Blue

Elle est utilisée pour les différentes étapes de clonage du gène (Figure III-1).

Son génotype est rec A1, end A1, gyr A96, thi-1, hsd R-17, Sup E44, rel A1,  $\Delta$  lac, (F', pro AB, Lac Iq Z $\Delta$ M15, Tn 10).

- rec A1 réduit au millième le taux de recombinaison entre ADN exogène et endogène;
  - end A1 entraîne une diminution du taux d'endonucléases, réduisant le risque de dégradation lors de l'extraction d'ADN plasmidique;
  - gyr A96 est une mutation qui touche la sous unité A de l'ADN gyrase;
  - thi-1, ces mutants requièrent de la vitamine B1 dans leur milieu de culture;
  - hsd R-17, mutation dans les gènes codant pour des endonucleases de restriction. L'absence de cette activité facilite le maintien d'ADN exogène;
  - Sup E44 est un suppresseur de la mutation ambre;
-

**Figure III-2.** Carte du phagémide pBluescript, et de son site multiple de clonage (Stratagène).



- rel A1 permet la synthèse d'ARN en absence de synthèse protéique;
- $\Delta$  lac, délétion de l'opéron lactose qui la rend incapable de métaboliser le lactose.

L'épisome F' (facteur de conjugaison bactérienne) porte les propriétés suivantes:

- résistance à la tétracycline (Tn10);
- pro AB signifie que la souche nécessite de la proline dans son milieu de culture;
- lac Iq renforce la production du répresseur de l'opéron lactose;
- lac Z $\Delta$ M15, délétion du gène entraînant la disparition de la partie N-terminale de la  $\beta$ -galactosidase, c'est-à-dire l' $\alpha$ -peptide.

#### B. PLASMIDES BACTÉRIENS

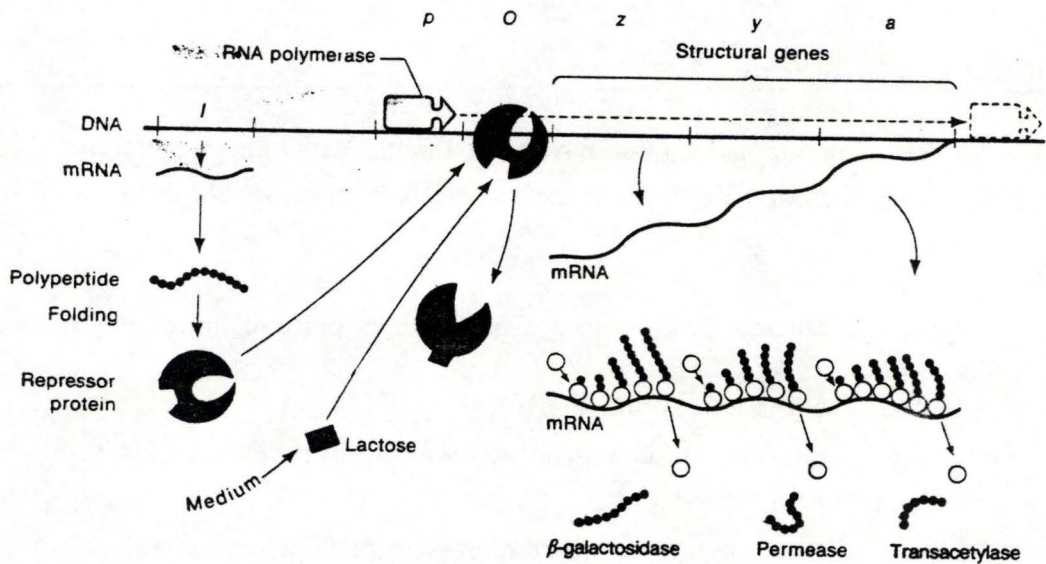
Le plasmide sert de vecteur de clonage. Nous utilisons le plasmide pBluescript, commercialisé par la firme Stratagène, dont la carte est représentée à la figure III-2. Pour être exact, il s'agit plutôt d'un phagemide, c'est-à-dire un hybride entre un phage (il contient l'origine de répllication f1 du phage M13) et un plasmide (il contient l'origine de répllication Col E1 d'*E. coli*). Il peut donc se répliquer sous forme de simple ou de double brin, selon les conditions de culture.

Ce phagemide de 2964 paires de bases possède en outre les propriétés suivantes:

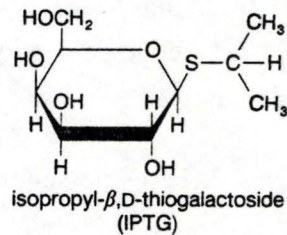
- un gène de résistance à l'ampicilline;
- un fragment du gène lacZ, dit lacZ', qui porte le promoteur l'opérateur et une partie du gène lacZ codant pour la partie N-terminale de la  $\beta$ -galactosidase ou  $\alpha$ -peptide.
- un fragment non opérationnel du gène régulateur de l'opéron lactose lacI;

Les particularités de la régulation de l'opéron lactose sont à l'origine d'un test coloré d'identification des recombinants appelé **la sélection blanc bleu**.

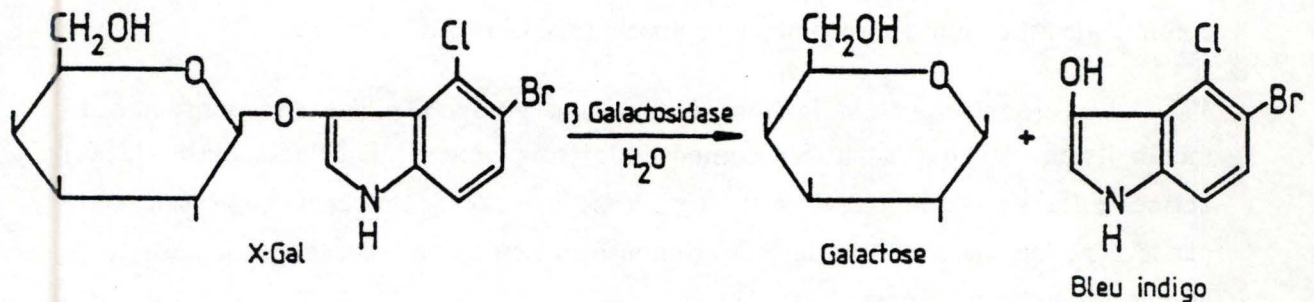
L'opéron lactose est le nom donné à un groupe de gènes responsables du métabolisme du lactose. Il est composé de trois gènes :  $\beta$ -galactosidase (lacZ), perméase (lacY) et transacétylase (lacA). L'ensemble est régulé par un répresseur codé par le gène lacI de sorte que la transcription n'ait lieu qu'en présence de lactose et en absence de glucose (Figure III-3).



**Figure III-3.** Régulation de l'opéron lactose. Le gène I exprime constitutivement le répresseur qui s'attache à la région O (opérateur) en empêchant l'ARN polymérase, liée au promoteur P, de transcrire les gènes adjacents. L'inducteur (lactose ou IPTG) se fixe au répresseur et change sa conformation de sorte, qu'il ne puisse plus se lier au site O. L'ARN polymérase est alors capable de transcrire les gènes Z, Y et A de sorte que les trois enzymes sont produites (Zuzuki et al, 1989).



**Figure III-4.** Structure de l'inducteur de l'opéron lactose IPTG. Le lien  $\beta$ -D-thiogalactoside n'est pas clivé par la  $\beta$ -galactosidase (Zuzuki et al, 1989).



**Figure III-5.** Dégradation du 5-bromo, 4-chloro, 3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (Xgal). Le Xgal est un analogue du lactose : le glucose est remplacé par le 5-bromo, 4-chloro, 3-indole. L'hydrolyse du Xgal par la  $\beta$ -galactosidase libère le galactose et un composé 5-bromo, 4-chloro, 3-indole, qui est de couleur bleue.

Le contrôle négatif de l'opéron est assuré par la protéine répresseur codée par le gène *lacI*. Ce répresseur se lie à l'ADN au site opérateur et empêche l'initiation de la transcription de l'opéron. Le gène *lacIq*, porté par l'épisome F, est caractérisé par la force de son promoteur. Celui-ci augmente d'un facteur dix la synthèse du répresseur. Il n'y a donc pas expression des gènes de l'opéron. La répression est levée uniquement par la présence dans le milieu d'un inducteur naturel, le lactose, ou artificiel comme l'isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside ou IPTG (Figure III-4).

Le plasmide Bluescript possède le gène *lacZ'* qui code pour l' $\alpha$ -peptide de la  $\beta$ -galactosidase. Lorsqu'un tel vecteur transforme une bactérie XL1 Blue, la complémentation intragénique entre l' $\alpha$ -peptide, codé par le plasmide, et le gène *lacZDM15*, porté par l'épisome, permet d'obtenir une activité  $\beta$ -galactosidase mise en évidence par un test coloré. En condition inductrice (IPTG), un analogue du lactose, le 5-bromo, 4-chloro, 3-indolyl,  $\beta$ -D-galactoside ou X-gal, est ajouté au milieu de culture et dégradé par l'enzyme en galactose et en 5-bromo, 4-chloro, 3-indole, un composé de couleur bleue (Figure III-5).

Une batterie de sites de restriction a été introduite dans l'extrémité N-terminale du gène *lacZ'*. Cette insertion n'altère pas la capacité de complémentation de l' $\alpha$ -peptide. Cependant lors du clonage d'un fragment d'ADN dans un des sites de restriction, il y a disruption du gène *lacZ'* et la complémentation ne se fait plus. Les colonies de bactéries transformées par ce plasmide restent blanches.

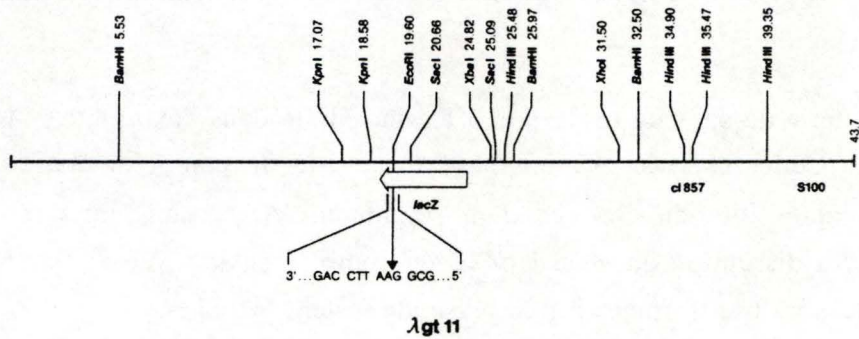
Ce test permet donc de distinguer entre les colonies possédant un plasmide natif et celles possédant un plasmide recombinant.

La batterie de sites de clonage est orientée de telle sorte que la transcription de *lacZ* se fasse dans le sens *Kpn1* vers *Sac1* (appellation KS). Elle est flanquée des promoteurs phagiens T3 et T7 permettant la transcription de l'insert par les polymérases phagiennes.

### C. PHAGES

Le phage  $\lambda$ gt11 est un vecteur d'expression à ADN bicaténaire de 43700 paires de bases, possédant le génotype *lac 5*, *C 1857*, *nin 5*, *Sam 100*.

- *C 1857* est une mutation qui rend un répresseur de lyse thermosensible, actif à 32°C et inactif à 42°C;



**Figure III-6.** Carte physique du phage  $\lambda$ gt11. La localisation des sites de restriction est exprimée en kb à partir de l'extrémité gauche. L'orientation de *lacZ* est montrée par la flèche horizontale. Le détail de la séquence du site EcoRI est donné en dessous de la carte (Stratagène).

- Sam 100 est une mutation ambre dans un gène de lyse. La lyse n'est possible que dans une souche bactérienne qui supprime cette mutation (mutation Sup F chez *E. coli* XL1 Blue).

La carte du phage  $\lambda$ gt11 est montrée à la figure III-6.

Le site de clonage qui a servi pour l'insertion de l'ADN de *Brucella abortus* est le site unique Eco R1, localisé à l'intérieur de la région codante du gène lacZ. Lorsque des bactéries, déficientes pour le métabolisme du lactose et infectées par le phages  $\lambda$ gt11, sont étalées sur milieu contenant du Xgal et de l'IPTG, les plages de lyse qui se forment apparaissent bleues, suite à l'activité de la  $\beta$ -galactosidase codée par le gène lacZ présent chez le phage. Les phages recombinants sont identifiés par leur capacité à former des plages de lyse incolores.

## 1.2. SOLUTIONS ET TAMPONS

### A. SOLUTIONS

- solution d'ampicilline (Boehringer) : 100 mg/ml.
- solution d'isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) (BRL) : 100 mM dans de l'eau distillée.
- solution de 5-Bromo-chloro-3-indolyl- $\beta$ -galactopyranoside (Xgal) (BRL) : 2% dans N,N, diméthylformamide.
- solution de lysosyme (Merck) : 10 mg/ml de Tris.HCl 10 mM pH 8.0 (Merck).

Ces solutions sont stérilisées par filtration et conservées à -20°C.

- solution de bromure d'éthidium (Sigma) : 2 mg/ml d'eau.
- solution de bleu de coomasie :
  - bleu de coomasie brillant blue R250 (Merck): 0,25%
  - méthanol (UCB) : 45%
  - eau distillée : 45%
  - acide acétique (VEL) : 10%
- solution d'amidoschwartz :
  - amidoschwartz : 0,1%
  - méthanol : 45%
  - acide acétique : 10%
  - eau distillée : 45%

- solution de décolorant :
  - méthanol (Merck) :30%
  - acide acétique : 10%
  - eau distillée : 60%
- solution d'alourdisseur :
  - sucrose 50%
  - EDTA 100 mM
  - SDS 1%
  - Bleu de bromophénol 0,1%
- solution de phénol/chloroforme :
  - 1/phénol saturé au TEN buffer (10 mM Tris.HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl). Ajouter un volume de phénol à un volume de TEN. Mélanger et centrifuger, éliminer la phase supérieure et recommencer jusqu'à ce le pH du mélange soit supérieur à 7,8.
  - 2/ajouter alors à ce mélange un même volume de chloroforme (UCB) +alcool isoamylique (UCB) (24/1).
- solution de PEG 8000 : polyéthylène glycol (PEG) 8000 (Sigma) : 30% dans une solution de NaCl 1.5 M.
- solution de 5-bromo-3-indolylphosphate (BCIP) (Sigma) : 0,5 % de BCIP disodium salt dans du diméthylformamide 100%
- solution de révélation OPD. Pour 10 ml, 9 ml de tampon citrate phosphate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M, acide citrique 0,1M, pH 5,0), 1 ml d'une solution d'OPD (O-phénylènediamine dihydrochloride) à 4 mg/ml et 2 µl d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- solution d'iodoacétamide : 10 mM d'iodoacétamide (sigma) dans de l'eau distillée.

#### B. TAMPONS

- tampon stacking :
  - Tris.HCl 0,5 M pH 6,8
  - SDS 4%
- tampon running :
  - Tris.HCl 1,5 M pH 8,8
  - SDS 4%
- tampon d'électrophorèse :
  - Tris HCl 25 mM pH 8,3
  - glycine (UCB) 192 mM
  - SDS 0,1%

- tampon de blotting :
    - Tris.HCl 25 mM
    - glycine 192 mM
    - méthanol 20%
  - tampon TBS :
    - Tris.HCl 20 mM pH 7,5
    - NaCl 500 mM
  - tampon TTBS : idem TBS + 0,05% de Tween 20 (Fluka)
  - tampon pour échantillon en électrophorèse (cinq fois concentré) :
    - Tris.HCl : 250 mM pH 6.8
    - SDS (Merck) : 10%
    - 2-b-mercaptoéthanol (Fluka) : 10%
    - glycérol (UCB) : 50%
    - bleu de bromophénol : 0,25%
  - tampon TRIS :
    - Tris.HCl 200 mM
    - MgCl<sub>2</sub> (Merck) 4 mM
  - tampon de lyse TES :
    - Tris.HCl 50 mM
    - EDTA (UCB) 50 mM
    - sucrose (Merck) 15%
  - tampon PBS (10 fois concentré) :
    - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15 mM
    - NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 74 mM
    - NaCl 1,37 M
    - KCl 27 mM, pH 7,4
  - tampon STET :
    - sucrose 8%
    - lysosyme 6,25 mg/10 ml
    - Triton X100 (Serva) 1%
    - EDTA 50 mM
    - Tris.HCl 50 mM pH 8,0
  - tampon TAE :
    - Tris.HCl 0,04 M pH 8.0
    - EDTA 0,002 M
-

- tampon Sm :
    - NaCl 1 M
    - MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (UCB) 0,2%
    - Tris.HCl 1M
    - gélatine (UCB) 2%
  - phage buffer :
    - Tris.HCl 20 mM pH 7,4
    - NaCl 100 mM
    - MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 10 mM
  - release buffer :
    - Tris.HCL 10 mM pH 7,8
    - EDTA 10 mM
  - tampon de lyse A :
    - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck) 10 mM
    - NaCl 30 mM
    - Tween 20 0,025%
    - EDTA 10 mM pH 8,0
    - EGTA (UCB) 10 mM pH 7,0
  - tampon de lyse B :
    - Tris HCl 30 mM pH 8,0
    - sucrose 20%
    - EDTA 1 mM pH 8,0
  - P1 :
    - RNase (Boehringer) 10 mg/ml
    - Tris.HCl 50 mM pH 8,0
    - EDTA 10 mM
  - P2 :
    - NaOH 200 mM
    - SDS 1%
  - P3 :
    - KAc (Sigma) 3 M pH 8,0
  - QBT :
    - NaCl 50 mM
    - 3-N-Morpholinopropan-sulfonic acid (MOPS) (Sigma) 50 mM
    - pH 7,0
    - éthanol 15%
    - Triton X100 0,15%
-

- QC :
  - NaCl 1 M
  - Tris.HCl 50 mM pH 7,0
  - éthanol 15%
- QF :
  - NaCl 1,25 M
  - MOPS 50 mM PH 8,2
  - éthanol 15%

Ces solutions et tampons sont préparés dans de l'eau distillée. Les tampons et solutions commerciales sont décrites dans les protocoles.

### 1.3. MILIEUX DE CULTURE

- milieu de Luria-Bertani (LB) :
  - tryptone (Difco) : 10 g/L
  - extrait de levure (Gibco BRL) : 5 g/L
  - NaCl 5 g/L
- milieu LBC : idem LB +
  - MgSO<sub>4</sub> (UCB) 10 mM
  - maltose (Merck) 0,2%
- milieu solide : LB ou LBC + 20 g/L d'agar (Gibco BRL)
- top agar : LB + 8 g/L d'agar

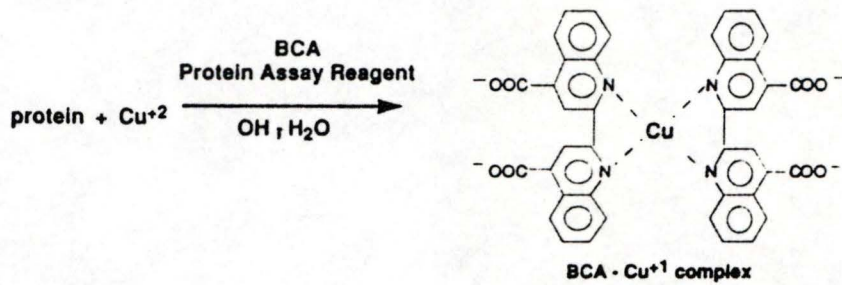
Les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage (20 minutes à 120°C).

- milieu sélectif : ajouter au LB après autoclavage de l'ampicilline pour une concentration finale de 100  $\mu\text{g/ml}$
- milieu pour la sélection blanc bleu : ajouter au LB + ampicilline de l'IPTG (concentration finale = 23  $\mu\text{g/ml}$ ) et du Xgal (concentration finale = 40  $\mu\text{g/ml}$ ).

### 1.4. FOURNITURES

- calibration kit for molecular weight determination of low molecular weight protein (Pharmacia AB).
  - DNA molecular weight II et VIII (Boehringer).
  - nitrocellulose pour immunoscreening : Hybridization transfer membrane Hybond C Extra, pore size = 0,45  $\mu\text{m}$  (Amersham).
-

- alkaline phosphatase conjugated affinity immunoglobins to mouse immunoglobins (Prosan).
  - Whatman chromatography paper (Whatman).
  - anticorps monoclonal AMD BR25 (Silénus).
  - T4 DNA ligase et tampon de ligation (Boehringer).
  - enzymes de restriction et tampons correspondants (Boehringer)
  - affinity purified antibody to bovine IgG goat, phosphatase labeled (KPL)
  - Quiagen tip 100 , Quiagen.
  - Geneclean Kit, BIO 101 Inc.
-



**Figure III-7.** Principe du dosage protéique au BCA. Les protéines réagissent avec les ions  $\text{Cu}^{2+}$  en solution alcaline pour produire des ions  $\text{Cu}^+$ . Il se forme alors un composé pourpre, résultat de la réaction de deux molécules de BCA (Bicinchoninic acid) avec un ion  $\text{Cu}^+$  (Pierce).

## 2. METHODES RELATIVES AUX PROTEINES

### 2.1. DOSAGE PROTEIQUE AU BCA (PIERCE)

#### A. PRINCIPE

Son principe est basé sur la réduction de l'ion cuivre. L'ion cuivre  $\text{Cu}^{++}$  en solution donne une couleur verte. Mais il peut être réduit par certains acides aminés (cystéine, cystine, tryptophane et tyrosine) en ion  $\text{Cu}^{+}$  qui dans les mêmes conditions est incolore. Deux molécules d'acide bicinchoninique (BCA) peuvent chélater un ion  $\text{Cu}^{+}$ ; il se forme alors un composé pourpre ayant une forte absorbance à 550 nm (Figure III-7).

#### B. PROTOCOLE

- Le dosage se réalise dans une plaque micropuits.
- A la solution à tester (10  $\mu\text{l}$ ), ajouter le BCA et le sulfate de cuivre dans une proportion 50/1, soit 200  $\mu\text{l}$  de réactif A et 14  $\mu\text{l}$  de réactif B.
- Incuber 30 minutes à 37°C.
- Lire l'absorbance à 550 nm sur un lecteur ELISA (microplate EL 340 de BIO-TEK instruments).
- La droite d'étalonnage est réalisée à partir de dilutions d'une solution de BSA de concentration connue.

### 2.2. ANALYSE DES PROTEINES SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRESENCE DE SDS (SDS-PAGE)

#### A. PRINCIPE

En présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS), les protéines prennent une charge négative et sont séparées électrophorétiquement sur gel de polyacrylamide.

Les gels de polyacrylamide sont le résultat de la polymérisation du monomère d'acrylamide, en présence d'un agent bifonctionnel qui relie les chaînes polymériques entre elles (le N, N' méthylène bisacrylamide). La réaction est initiée par du persulfate d'ammonium (APS), et catalysée grâce à l'intervention de N, N, N', N' tétraméthyléthylamine ou TEMED (Figure III-8). L'avantage présenté par les gels de polyacrylamide est la possibilité de sélectionner la taille des pores ; celle-ci est fonction

---



de la concentration totale en acrylamide et inversement proportionnelle à la quantité d'agent réticulant.

#### B. MISE EN PRATIQUE

La composition du gel de séparation ou running gel est fonction de la densité de polymérisation désirée.

% d'acrylamide	12%	15%
Acrylamide + Bisacrylamide (1)	4,0 ml	5,0 ml
Tampon running	2,5 ml	2,5 ml
eau distillée	3,0 ml	2,0 ml
APS (2)	0,5 ml	0,5 ml
Temed	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l

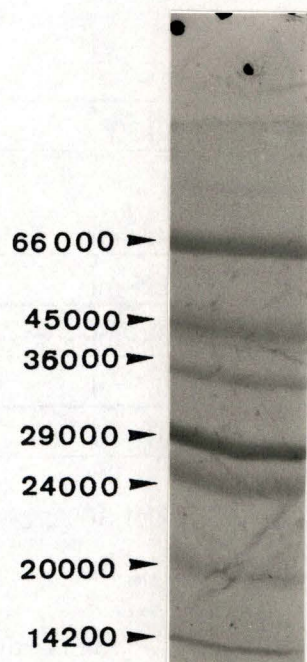
(1) Solution stock d'acrylamide (BRL) 30%, bisacrylamide (BRL) 0,8% dans de l'eau distillée.

(2) Solution d'APS (Merck) 1% dans de l'eau distillée, préparée extemporanément.

Le stacking gel ou gel de tassement, qui a pour rôle de concentrer les protéines avant la séparation.

acrylamide +bisacrylamide	0,5 ml
tampon stacking	1,25 ml
eau distillée	2,75 ml
Temed	5 $\mu$ l
APS	0,5 ml

Les échantillons sont préparés dans le tampon d'électrophorèse et placés cinq minutes à 100°C (dénaturation des protéines).



**Figure III-9.** Etalon de poids moléculaire utilisé en SDS-PAGE après blotting et coloration à l'amidoschwartz.

Les poids moléculaires sont estimés à partir de l'étalon suivant commercialisé par Pharmacia AB (Figure III-9).

Protéines	Poids moléculaire (dalton)
sérum albumine bovine	66000
ovalbumine	45000
glycéraldéhyde-3-P-déhydrogénase	36000
anhydrase carbonique	29000
trypsinogène	24000
inhibiteur de la trypsine	20000
$\alpha$ -lactalbumine	14200

La migration se fait jusqu'à ce que le bleu de bromophénol ait parcouru l'entièreté du gel.

### C. COLORATION DES PROTÉINES

#### a. Bleu de coomassie

Après migration, le gel est plongé 20 minutes dans la solution de bleu de coomassie. Cette coloration est non spécifique. Le gel est décoloré par plusieurs lavages successifs dans la solution de décolorant.

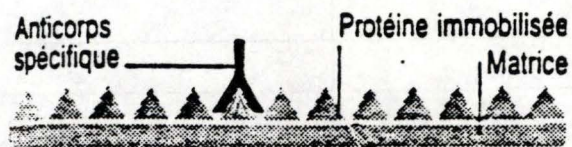
#### b. Amidoschwartz

Après transfert sur une membrane de nitrocellulose, les protéines sont révélées par un bain de 5 minutes dans la solution d'amidoschwartz. La membrane est ensuite décolorée. Cette méthode est utilisée pour la coloration des protéines étalons de poids moléculaires après un blotting.

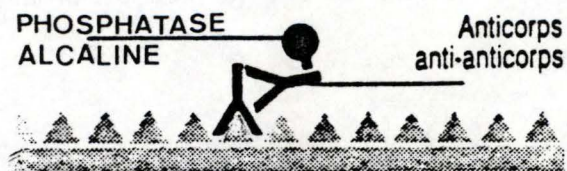
## 2.3. IMMUNOBLOT AVEC UN ANTICORPS MONOCLONAL

### A. PRINCIPE

Dans la procédure du Western blot, les protéines sont transférées du gel de polyacrylamide à la feuille de nitrocellulose par électrophorèse transverse.



1<sup>re</sup> étape : fixation de l'anticorps spécifique sur la matrice



2<sup>e</sup> étape : fixation de l'anti-anticorps

**Figure III-10.** Immunodétection des protéines transférées sur nitrocellulose. Le premier anticorps reconnaît spécifiquement la protéine immobilisée sur la matrice. Un second anticorps anti-immunoglobuline couplé au marqueur permet la localisation de la protéine d'intérêt.

Le tampon de blotting doit être de basse force ionique pour éviter les courants parasites qui génèreraient une augmentation de la température néfaste au transfert. La présence de méthanol dans le tampon accroît la capacité de fixation de la nitrocellulose en renforçant les interactions hydrophobes.

Après Western blot, la protéine intéressante est localisée sur la nitrocellulose à l'aide d'un anticorps monoclonal et d'un deuxième anticorps, anti-immunoglobuline couplé à la phosphatase alcaline (Figure III-10).

#### B. IMMUNODÉTECTION DES PROTÉINES TRANSFÉRÉES SUR NITROCELLULOSE

- Découper la partie de la nitrocellulose sur laquelle se trouvent l'étalon de poids moléculaire et la colorer à l'amidoschwartz.
- Saturer le reste dans du TBS + BSA 3% pendant une heure à température ambiante.
- Incuber avec l'AcM par la méthode du sandwich.
  - +Déposer la nitrocellulose sur une plaque de verre dégraissée à l'alcool.
  - +Recouvrir de papier Whatman.
  - +Imbiber le papier de l'anticorps dilué 2000 fois dans du TBS + BSA 1%.
  - +Laisser 3 heures à température ambiante ou une nuit à 4°C.
- Laver trois fois cinq minutes dans du TTBS.
- Incuber avec le conjugué anti-immunoglobuline couplé à la phosphatase alcaline diluée 500 fois dans du TTBS + BSA 1%, pendant une heure, par la méthode du sandwich.
- Laver deux fois dans du TTBS.
- Laver une fois dans du tampon TRIS.
- Mettre la nitrocellulose en présence du réactif : pour 10 ml de TRIS, 12  $\mu$ l de BCIP et 1 mg de NBT.

Les substrats 5-bromo, 4-chloro, 3-indolyl-phosphate / nitrobleu tetrazolium (BCIP/NBT) sont convertis par l'enzyme en un composé bleu intense.

- Placer à l'obscurité pendant 20 minutes.
  - Arrêter la réaction à l'eau de ville.
-

## 2.4. MISE EN EVIDENCE D'UNE PROTEINE PAR DOT BLOT

Cette méthode permet de rapidement mettre en évidence la présence de l'antigène reconnu par un AcM dans un lysat bactérien.

### A. PRÉPARATION DU LYSAT BACTÉRIEN

- Préparer une culture de bactéries, une nuit à 37°C, dans du LB + ampicilline.
- Récolter les bactéries par centrifugation (12000 RPM, Hermle Z229).
- Le culot obtenu est resuspendu dans du tampon STET : 50 µl de ce tampon pour 1 ml de culture d'une DO<sub>540</sub>=1.
- Laisser la lyse se faire une heure à température ambiante.

### B. PROCÉDURE DU DOT BLOT

- Monter l'appareil à Dot Blot (Proto Blot Apparatus de BIO-RAD) de la façon suivante :
  - +placer dans l'appareil un filtre de nitrocellulose humidifié dans du TBS .
  - +sècher par une pompe à vide.
  - +Une fois la membrane sèche, fermer l'appareil pour maintenir le vide à l'intérieur.
- Déposer alors 10 microlitres du lysat et laisser sécher 3 heures à température ambiante.
- Récupérer la nitrocellulose et suivre le protocole "Immunodétection des protéines transférées sur nitrocellulose".

## 2.5. PREPARATION DE LYSATS BACTERIENS

Ces extraits SDS totaux de *Brucella* ont été mis à notre disposition par J. M. Verger, INRA, Nouzilly, France.

Ces échantillons ont été préparés de la façon suivante. A un volume de suspension bactérienne (concentration  $1 \cdot 10^{11}$  bactéries/ml), ajouter un volume de tampon bouillant (glycérol 10%, SDS 2% et TrisHCL 0,0625 M, pH 6,8). Laisser 10 minutes dans un bain-marie bouillant

## 2.6. FRACTIONNEMENT CELLULAIRE

### A. PRINCIPE

Le but de cette manipulation est de séparer les différents composants protéiques d'*E. coli*. Par cette méthode, on isole trois fractions :

PI : protéines insolubles dont celles de la paroi.

PS : protéines solubles, entre autres les protéines cytoplasmiques

PP : protéines périplasmiques.

### B. PROTOCOLE

Diviser en deux parties, A et B, 100 ml d'une culture d'une nuit de *E. coli* XL1 Blue dans du LB + ampicilline.

- Récupérer les corps bactérien par 10 minutes de centrifugation à 5000 RPM (Sorvall, rotor SS34).

- Pour A :

- +Resuspendre le culot dans 5 ml de tanpon de lyse A.

- +Congeler à - 80°C.

- +Décongeler dans de l'eau froide.

- +Soniquer ( 75 Watts, sonicateur Branson Sonic Power) 5 fois 8 secondes.

- +Centrifuger 20 minutes à 10000 RPM (Sorvall, rotor SS34).

- +Le surnageant constitue la fraction PS.

- +Le culot est resuspendu dans 5 ml de tampon de lyse A + 0,1% de Triton X100.

- +Centrifuger dans les mêmes conditions que précédemment.

- +Resuspendre le culot dans du NaCl 0,9%, Tris 20 mM pH 7,4, SDS 1%. Ceci constitue la fraction PI

- Pour B :

- +Resuspendre le culot bactérien dans 10 ml de tampon de lyse B.

- +laisser 5 à 10 minutes à température ambiante.

- +Centrifuger 10 minutes à 9000 RPM, à 4°C(Sorvall, rotor SS34).

+Éliminer le surnageant.

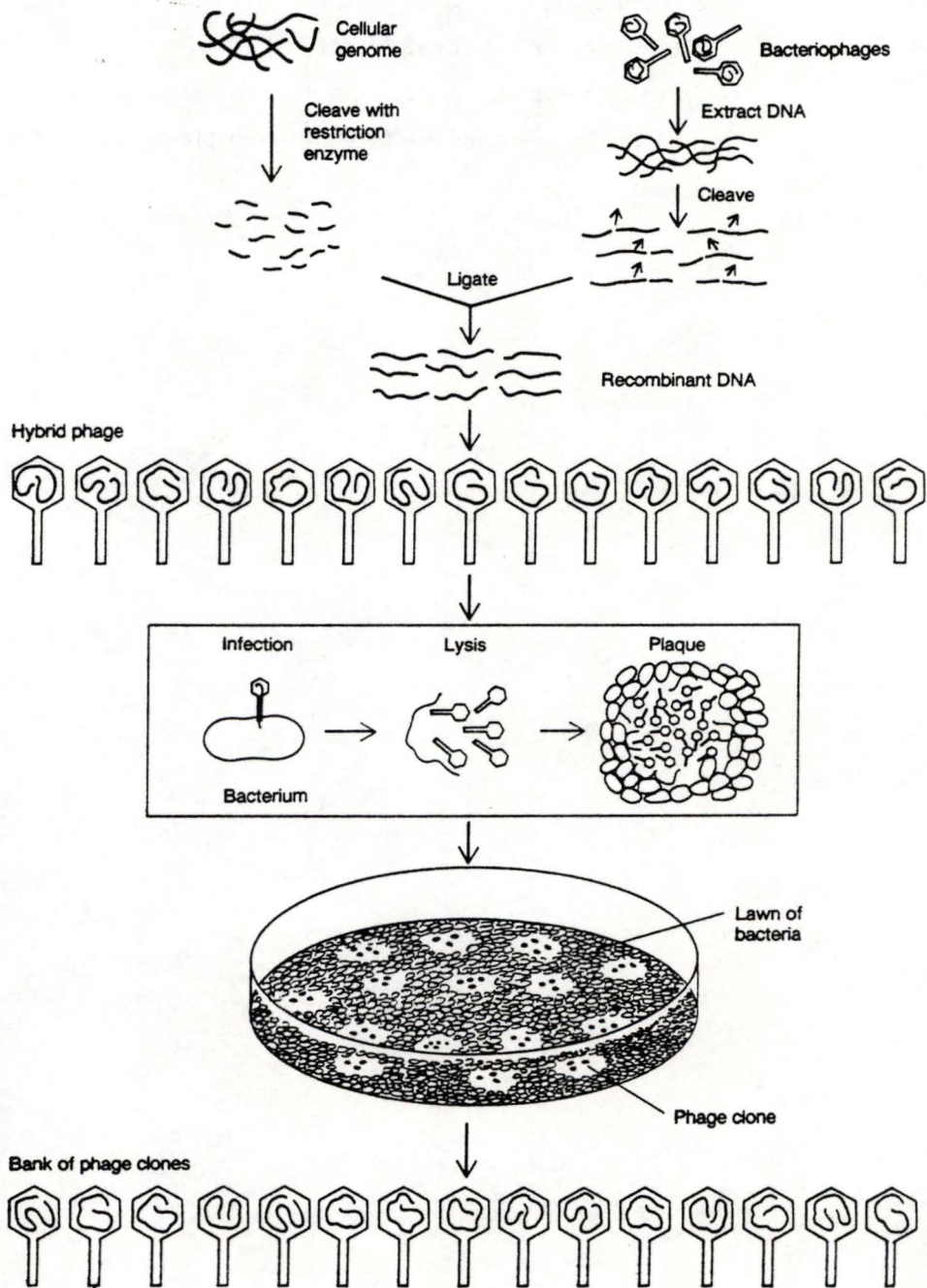
+Resuspendre le culot dans 10 ml de  $MgSO_4$  5 mM, à 0°C.

+Agiter 10 minutes dans la glace.

+Centrifuger dans les mêmes conditions.

Cette fraction contient les protéines péripasmiques libérées par choc osmotique.

---



**Figure III-11.** Construction d'une banque génomique dans le phage lambda. L'ADN phagien est restreint enzymatiquement. L'ADN génomique est restreint et modifié pour présenter des extrémités compatibles à celles de l'ADN phagien. Les deux ADN sont ensuite liés avant d'être encapsidés *in vitro*. Les phages obtenus servent ensuite à infecter un tapis bactérien. Chaque plaque de lyse est occupée par des clones ayant pour origine un phage hybride original (Zuzuki et al, 1989).

### 3. METHODES RELATIVES AUX ACIDES NUCLEIQUES

#### 3.1. CONSTITUTION DE LA BANQUE GENOMIQUE

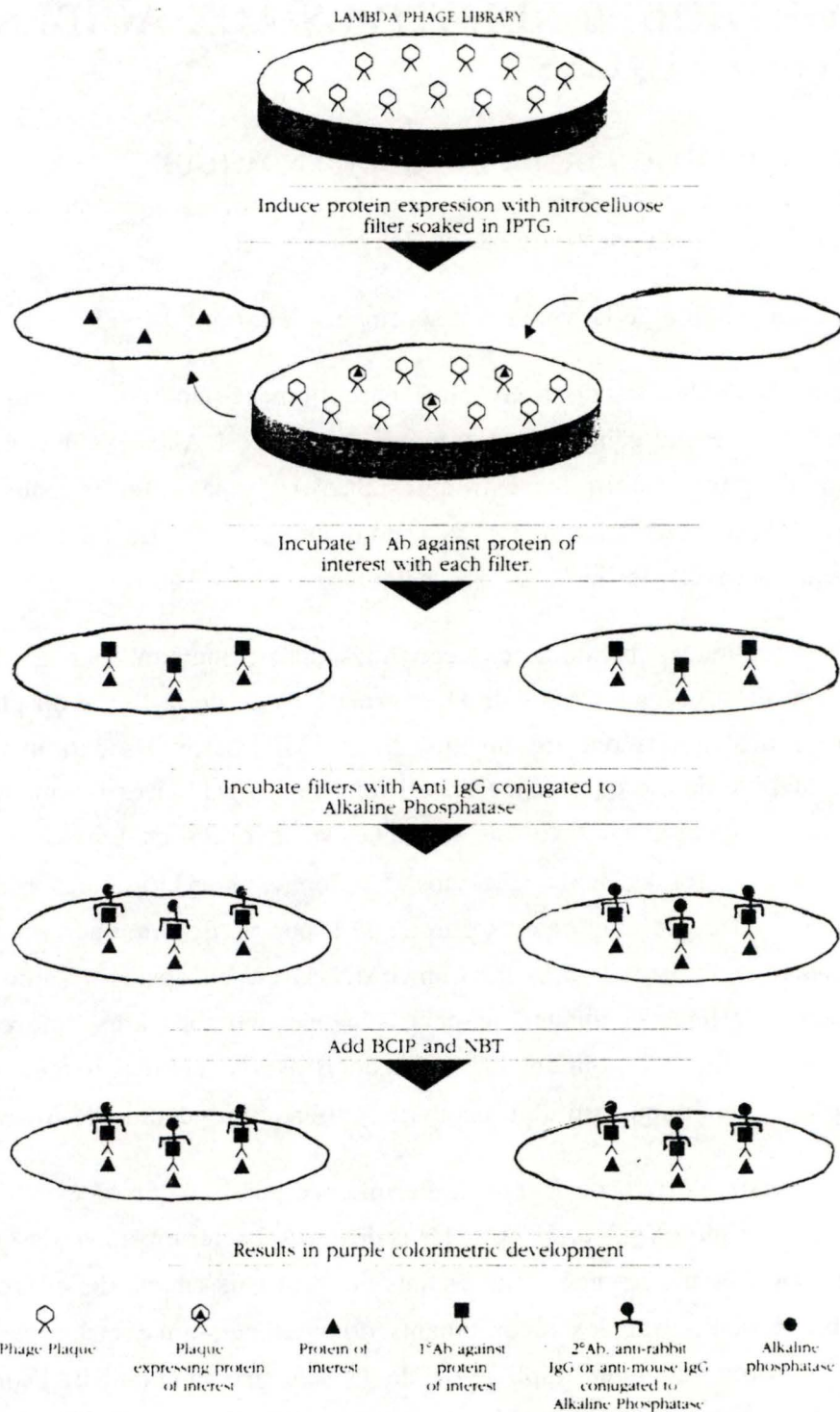
La banque a été construite par de Wergifosse (62).

La constitution de la banque est schématisé à la figure III-11.

L'ADN de *B. abortus* a été clivé partiellement par Sau3A1, qui reconnaît la séquence GATC et qui génère des extrémités cohésives. L'ADN polymérase de Klenow a été utilisée pour remplir les extrémités Sau3AI et les sites obtenus par clivage mécanique lors de l'extraction de l'ADN génomique. Les sites EcoR1 internes de l'ADN de *Brucella* sont méthylés par l' EcoR1 méthylase.

Des séquences bicaténares reconnues spécifiquement par EcoR1 appelées "linkers" ont été liguées à l'ADN de *B. abortus* à l'aide de la ligase du phage T4. Les sites EcoR1 des linkers ont été ensuite clivés pour libérer des extrémités cohésives complémentaires au site de clonage EcoRI du phage  $\lambda$ gt11. Les fragments d'ADN de taille comprise entre 2 et 7 kb ont été ligués à un excès de bras de phages  $\lambda$ gt11 restreints par EcoR1 et déphosphorylés. La déphosphorylation des bras du phage empêche ceux-ci de se réassocier. Cette étape a permis de diminuer la proportion de phages non recombinants. Après ligation, l'ADN a été encapsidé à l'aide des extraits commerciaux de têtes et queues de phages. Nous obtenons ainsi une collection de phages dont la majorité contient un insert de *Brucella*. cette collection constitue la banque d'ADN génomique qui doit recouvrir l'entièreté du génome de *Brucella*.

La souche Y 1090 de *E. coli* a été infectée par la banque et étalée sur milieu sélectif (ampicilline, Xgal et IPTG). Dans le tapis bactérien apparaissent alors des plages de lyse. Les phages non recombinants donnent naissance à des plages de lyse de couleur bleue tandis que les recombinants donnent naissance à des plages de lyse blanches. Il s'agit ici d'une application de la sélection blanc/bleu. Dans un phage recombinant, le gène lacZ de  $\lambda$ gt11 est interrompu par l'insert d'ADN de *Brucella*. le bactériophage est un vecteur d'expression, c-à-d qu'il est possible de voir la synthèse d'une protéine de fusion entre la  $\beta$ -galactosidase du phage et un fragment protéique codé par l'insert. Cette éventualité se présente lorsque les deux séquences codantes sont dans la même phase. Al'aide d'un anticorps, il est possible de repérer dans une plage de lyse la présence de cette protéine de fusion. Cette technique du criblage immunologique



**Figure III-12.** Technique de criblage immunologique d'une banque génomique construite dans le phage lambda. Au cours de l'infection, l'expression des protéines recombinantes est induite par la présence d'IPTG, lors de la prise de l'empreinte. Les protéines adsorbées sur la nitrocellulose sont localisées par un anticorps monoclonal et un anti-anticorps couplé à la phosphatase alcaline. La révélation se fait grâce aux substrats 5-bromo, 4-chloro, 3-indolyl-phosphate (BCIP) et nitrobleu tetrazolium (NBT), qui sont convertis par l'enzyme en un composé bleu intense (Stratagène).

permet d'isoler dans une banque un phage exprimant en tout ou en partie la séquence codante pour la protéine d'intérêt.

### 3.2. TECHNIQUE DE CRIBLAGE IMMUNOLOGIQUE D'UNE BANQUE GENOMIQUE CONSTRuite DANS LE VECTEUR LAMBDA GT11(5 6)

#### A. PRINCIPE

Des bactéries *E. coli* Y 1090 sont infectées par la banque de phages dans des conditions favorisant la lyse :

- à 37°C, soit une température à laquelle le gène de lyse du phage  $\lambda$ gt11 est actif;
- avec la souche de *E. coli* Y 1090 qui supprime la mutation Sam 100 du gène de lyse du phage;
- dans un milieu contenant du maltose. Ce dernier induit chez les bactéries une porine à maltose qui sert de récepteur d'adsorption au phage.

Lors de la lyse, il y a libération du contenu bactérien qui se retrouve alors au niveau des plages de lyse. Cependant, l'activation du promoteur lacZ se fait après l'induction des plages de lyse, pour éviter les effets toxiques éventuels de la production d'une protéine de fusion sur la croissance bactérienne. La présence d'une protéine, ou d'un épitope, au niveau des plages de lyse est identifiée à l'aide d'un anticorps monoclonal et d'un anti-anticorps couplé au système de révélation, après imprégnation sur nitrocellulose (Figure III-12).

#### B. PROTOCOLE

##### 1. Culture des *E. coli* Y 1090

- Réaliser une préculture à partir d'une colonie de *E. coli* Y 1090 dans du LB + ampicilline. Une nuit à 37°C.
- A partir de cette préculture, ensemercer 50 ml de LB + ampicilline et incubé une nuit à 37°C, à forte agitation.
- Récolter les bactéries par centrifugation : 5 minutes à 5000 RPM (Sorvall, rotor SS34).
- Laver le culot deux fois dans du tampon Sm.

La suspension est conservée à 4°C.

---

## 2. Estimation du titre de la banque

- Diluer la banque génomique de *Brucella abortus* de dix en dix dans du tampon Sm.
- 100  $\mu$ l de ces dilutions sont mis en présence de 100  $\mu$ l de la suspension de *E. coli* Y 1090 amenée à une DO<sub>540</sub>=1.
- Placer les tubes 20 minutes à 37°C (infection).
- Rajouter 2,5 ml de top agar liquide ( $\pm$  50°C) à chaque tube.
- Homogénéiser.
- Etaler le contenu sur une boîte de pétri de 9 cm de diamètre contenant du LBC solide + ampicilline.
- Retourner les boîtes et les incuber dans une étuve à 37°C pour une nuit.

Le lendemain matin, les plages de lyse sont bien visibles dans le top agar. Le titre de la banque est exprimé en plages de lyse formées par ml de solution de phages (pfu / ml).

## 3. Criblage de la banque par l'anticorps monoclonal

- Infecter 600  $\mu$ l de la suspension de *E. coli* Y 1090 par 330  $\mu$ l de la dilution adéquate de phages.
- Laisser 20 minutes à 37°C.
- Rajouter 15 ml de top agar fondu.
- Etaler sur milieu LBC solide + ampicilline (grande boîte 22\*22 cm).
- Incuber à 37°C pour une nuit.
- Déposer un filtre de nitrocellulose (20\*20cm) imbibé d'IPTG 10 mM.
- Laisser imprégner durant 3 heures à température ambiante.

Notons qu'il est très important de faire des marques sur le filtre et sur la boîte afin de retrouver facilement la bonne orientation de l'un par rapport à l'autre.

- Laver deux fois la nitrocellulose cinq minutes dans du TBS.
- Saturation de la nitrocellulose : 30 minutes dans du TBS + BSA 3%.

Pour la suite suivre le protocole "Immunodétection des protéines transférées sur nitrocellulose".

---

#### 4. Purification des phages immunopositifs

- Superposer les plages de lyse à la feuille de nitrocellulose (attention la bonne orientation).
- Prélever avec une pipette pasteur stérile le top agar au niveau des plages de lyse positives.
- Déposer l'agar dans 500 ml de tampon Sm, laisser les phages diffuser pendant une heure.
- Déposer dans chaque eppendorf une goutte de chloroforme pour assurer une bonne conservation à 4°C.

A partir de ces prélèvements, de nouvelles infections et de nouveaux criblages sont réalisés jusqu'à obtention de suspensions avec 100% de plages de lyse reconnues par l'AcM Br25.

### 3.3. EXTRACTION DE L'ADN PHAGIEN

#### A. PRINCIPE

Le  $\lambda$ Sorb, commercialisé par la firme Proméga, est basé sur le principe de la chromatographie d'affinité. Des anticorps de lapins spécifiques du phage  $\lambda$  sont adsorbés sur des particules de *Staphylococcus aureus*. Une simple centrifugation suffit alors pour isoler le complexe phages/immunoansorbant du reste du milieu. Un chauffage dans un tampon adéquat permet de libérer l'ADN.

#### B. PROTOCOLE

##### 1. Amplification des phages

- Infecter 100  $\mu$ l d'une suspension d'*E coli* Y 1090 (DO<sub>540</sub>=1) avec 100  $\mu$ l de dilutions sériées de la solution de phages. Ajouter 2,5 ml de top agar. Etaler sur boîtes de pétri (90 mm de diamètre). Une nuit à 37°C.
  - Utiliser 300  $\mu$ l de la dilution donnant des plages de lyse confluentes pour infecter 300  $\mu$ l de la suspension de bactéries.
  - Etaler sur grandes boîtes de pétri (180 mm de diamètre, quatre boîtes fournissent une quantité de phages suffisante). Incuber une nuit à 37°C.
  - Déposer sur chaque boîte 8 ml de tampon Sm.
  - Laisser les phages diffuser dans le tampon pendant 4 heures à 4°C en agitant de temps en temps.
-

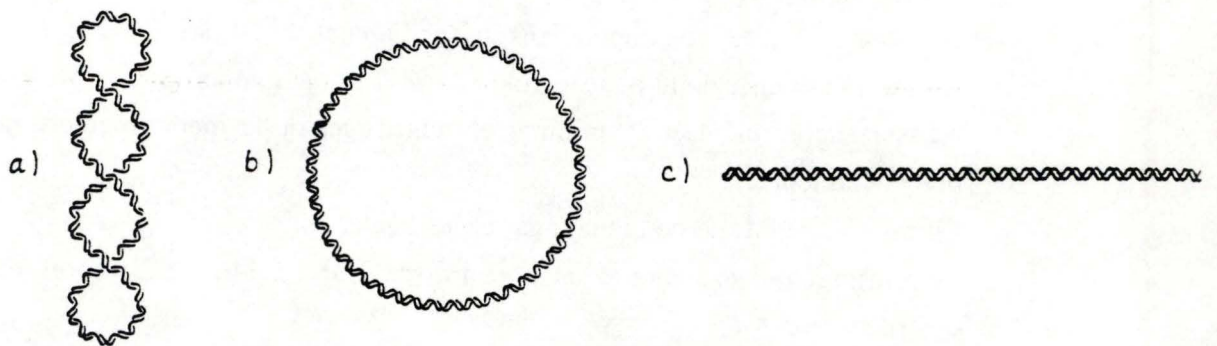
- Prélever le tampon, centrifuger la suspension 5 minutes à 5000 RPM (Sorvall rotor SS34) et récupérer le surnageant.
- Verser de nouveau sur chaque boîte 3 ml de tampon Sm et agiter pendant 30 minutes. Verser ce tampon dans un tube à centrifugation.
- Gratter le top agar de la boîte et rincer avec 2 ml de tampon Sm.
- Laisser encore diffuser 30 minutes et centrifuger de la même manière que précédemment.
- Eliminer le culot qui contient l'agar et les bactéries.
- Le surnageant est ajouté aux 8 ml de surnageant de la première centrifugation.

### 2. Purification de l'ADN phagien

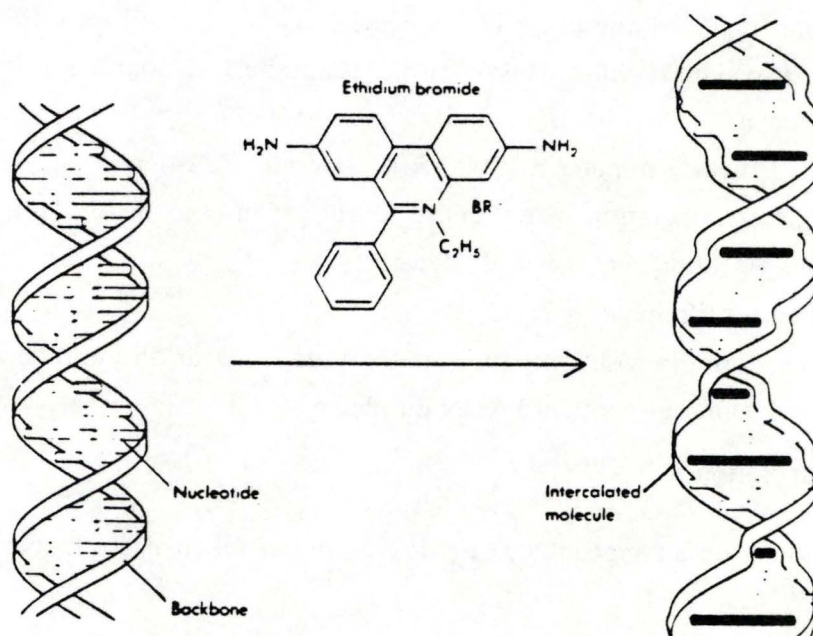
- Centrifuger les aliquots de  $\lambda$ Sorb 5 minutes à 4000 RPM (Hermle Z229).
- Resuspendre le culot dans une quantité de tampon Sm identique à celle de tampon de stockage éliminé.
- Ajouter alors 100  $\mu$ l de la solution  $\lambda$ Sorb pour 10 ml de surnageant de phages.
- Agitation pour permettre la fixation pendant 1 à 2 heures (rotation) puis une nuit dans de la glace.
- Le lendemain matin, nouvelle agitation par rotation pendant 2 heures.
- Centrifuger 20 minutes à 13000 RPM et à 4°C (Sorvall rotor SS34).
- Resuspendre le culot dans 1 ml de "phage buffer" pour 1 ml de surnageant de départ.
- Centrifuger 3 minutes à 12000 RPM (Hermle Z229).
- Répéter l'opération et reprendre le culot dans 0,5 ml de "release buffer" pour 10 ml de surnageant de départ.
- Chauffer 5 minutes à 70°C.
- Une dernière centrifugation permet de séparer l'immunoabsorbant du surnageant qui contient l'ADN du phage.

### 3. Récupération de l'ADN

- Ajouter au surnageant 100  $\mu$ g de RNase par ml final et incubé 30 minutes à 37°C.
  - Extraction au phénol-chloroforme : ajouter à la suspension un même volume de la solution de phénol-chloroforme.
  - Une minute de vortex et centrifuger à 12000 RPM (Hermle Z229) durant 5 minutes.
-



**Figure III-13.** L'ADN plasmidique se présente sous trois configurations différentes.  
 a. La forme CCC (covalently closed circular) : forme superenroulée.  
 b. La forme OC (open circular) : plasmide circulaire sans superenroulement.  
 c. La forme L (linear) : plasmide linéarisé par restriction.



**Figure III-14.** Visualisation de l'ADN au bromure d'éthidium. Les molécules de bromure d'éthidium s'intercalent entre les bases azotées de la double hélice.

- Récolter la phase aqueuse supérieure et recommencer l'opération.
- Ajouter ensuite à la phase aqueuse un même volume d'une solution chloroforme-alcool isoamylique 24/1 .
- Passer au vortex et centrifuger.
- Ajouter 1/2 volume de NaCl 5 M et 1/3 volume de la solution de PEG 8000.
- Mélanger et incuber 30 minutes dans la glace.
- Centrifuger 5 minutes à 12000 RPM (Hermle Z229).
- Eliminer le surnageant.
- Laver l'ADN en déposant dans chaque eppendorf 1 ml d'éthanol 70% pour 10 ml de la solution de phages de départ.
- Incuber 15 minutes à 0°C.
- Centrifuger 25 minutes à 12000 RPM.
- Eliminer le surnageant.
- Recommencer cette étape en centrifugeant 15 minutes seulement.
- Eliminer le surnageant et sécher le culot, couvercle ouvert, dans une centrifugeuse.
- Resuspendre le culot dans 50 ml d'eau distillée stérile.

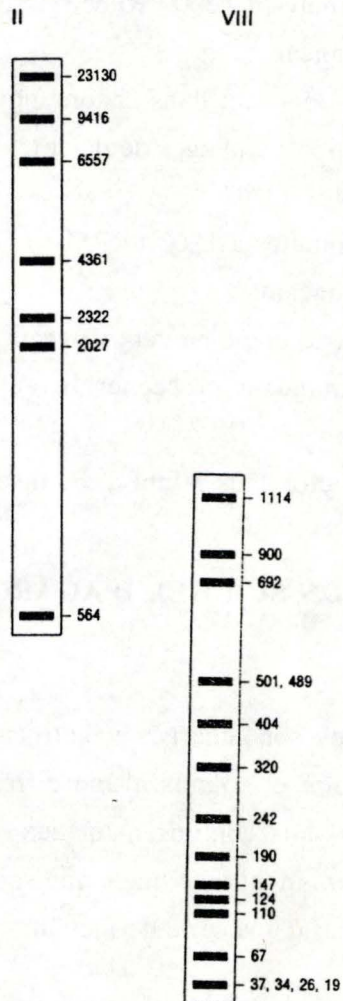
### 3.4. ANALYSE DE L'ADN SUR GEL D'AGAROSE(56)

#### A. PRINCIPE

Les acides nucléiques sont chargés négativement au niveau de leurs groupes phosphates. Placés en solution et soumis à une différence de potentiel, ils vont donc migrer vers le pôle positif. Mais contrairement aux protéines, le rapport charge nette électrique et taille est toujours identique, quels que soient les brins d'ADN. En pratique, la vitesse de migration dépend d'une série de facteur :

- la taille du fragment. La vitesse est inversement proportionnelle à la taille du fragment.
- la conformation de l'ADN. La vitesse est inversement proportionnelle au logarithme du poids moléculaire du fragment linéaire.

Mais l'ADN peut se présenter sous une forme circulaire ouverte (forme OC pour open circular) qui migre plus vite que la forme L (linear) mais moins que la forme superenroulée (forme CCC pour covalently closed circular), plus compacte (Figure III-13)



**Figure III-15.** Etalons de taille pour gel d'agarose II et VIII (Boehringer). Les valeurs sont données en paires de bases (pb).

- la concentration en agarose du gel. Plus elle est élevée, plus la vitesse est lente et la résolution meilleure.
- le voltage appliqué. La vitesse est proportionnelle au voltage, mais si ce dernier est trop élevé, on observe une diminution de la résolution.

La visualisation de l'ADN dans le gel se fait à l'aide du bromure d'éthidium. Celui s'intercale entre les bases de la double hélice de l'ADN. Comme cette molécule est fluorescente, l'ADN ainsi marqué est visible sous illumination UV (Transluminateur longueur d'onde = 302 nm) (Figure III-14).

#### B. MODE OPÉRATOIRE

- Préparer un gel d'agarose (Sigma) : 0,8% ou 1,2% dans du tampon TAE.
- Faire bouillir jusqu'à ce que la solution devienne limpide.
- Laisser refroidir ( $\pm 50^{\circ}\text{C}$ ) et verser dans un moule en plexiglass.
- Placer un peigne pour former les puits.
- Les échantillons sont préparés dans une solution d'alourdisseur.
- Le gel est déposé dans une cuve à électrophorèse remplie de TAE contenant des 5  $\mu\text{l}$  de bromure d'éthidium pour 100 ml de tampon. Les échantillons sont déposés dans les puits.

#### C. ESTIMATION DE LA TAILLE ET DE LA QUANTITÉ D'UN FRAGMENT D'ADN

##### 1. La taille

Dans un des puits, déposer un étalon de taille commercialisé par la firme Boehringer. Les étalons II et VIII sont utilisés (Figure III-15)

- étalon II : L'ADN du phage  $\lambda$  coupé par Hind III donne des fragments de taille 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 et de 125 paires de bases.
- étalon VIII : L'ADN de pUCBM21 coupé par HpaII, DraI et HindIII donne des fragments de taille 1114, 900, 692, 501, 489, 404, 320, 242, 190, 147, 124, 110, 67, 37, 34, 26, et 19 paires de bases.

Il est évident que plus un fragment est petit, moins il est visible sur gel.

Il est ensuite aisé d'établir une droite d'étalonnage du logarithme du poids moléculaire en fonction de la distance de migration et d'estimer la taille d'un fragment inconnu à partir de celle-ci.

---

Enzymes de restriction	Site de clivage
BamHI	G*GATCC
EcoRI	G*AATTC
EcoRV	GAT*ATC
HindIII	A*AGCTT
KpnI	GGTAC*C
SacI	GAGCT*C
Sall	G*TCGAC
XbaI	T*CTAGA

**Figure III-16.** Site de restriction des différents enzymes utilisés au cours de ce travail. L'astérisque marque le site de clivage.

## 2. La quantité

La fluorescence d'un fragment est proportionnelle à sa taille (c-à-d du nombre de molécules de bromure intercalées dans les bases) mais aussi, évidemment à la quantité d'ADN présente. Connaissant la quantité d'ADN dans les étalons, il suffit de comparer l'intensité de la fluorescence pour avoir une estimation.

### 3.5. RESTRICTION DE L'ADN(56)

#### A. PRINCIPE

Les endonucléases de restriction sont des endodéoxy-ribonucléases qui coupent l'ADN double brin au niveau des séquences nucléotidiques spécifiques en clivant deux liens phosphodiesters, un sur chaque brin. Ces enzymes font partie du système de défense bactérien contre les invasions d'ADN exogène.

La majorité des sites spécifiques reconnus par ces enzymes sont des séquences palindromiques. Ces enzymes coupent pour générer une extrémité 5' phospho ou 3' hydroxy cohésive (bouts collants) ou pour donner des bouts francs. Les sites des enzymes utilisés au cours de ce travail sont présentés à la figure III-16.

L'activité catalytique de ces enzymes est mesurée en unité enzymatique : une unité, correspond à l'activité d'une enzyme qui coupe complètement un microgramme d'ADN du phage I en une heure, à la température appropriée et sous les conditions optimales définies par la firme.

#### B. MODE OPÉRATOIRE

Tous les enzymes utilisés ici, de même que les tampons, proviennent, de la firme Boehringer.

- Tampon A =  
33 mM Tris Acétate, 10 mM Mg Acétate, 66 mM K Acétate, 0,5 mM DTT, ph = 7,9
  - Tampon B =  
10 mM Tris HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl, 1 mM b-mercaptoéthanol, ph=8,0.
  - Tampon L =  
10 mM Tris HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTE ph=7,5.
-

- Tampon H =  
50 mM Tris HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1 mM DTE,  
pH=7,5.

Enzymes	Tampon	Concentration (U/ $\mu$ l)
Sma	A	10
SacI	A	8
BamHI	B	10
EcoRV	B	11
HindIII	B	10
KpnI	L	10
XbaI	H	10
EcoRI	H	10
Sall	H	20

Les doubles restrictions EcoRI/HindIII et EcoRI/Sall se font dans du tampon H, la double restriction HindIII/BamHI, dans le tampon B.

Déposer dans un eppendorf stérile :

- l'ADN à restreindre
- le tampon (1/10 du volume final)
- l'enzyme (10 U/ $\mu$ g d'ADN)

Amener à volume avec de l'eau distillée stérile.

Incuber 1h30 à 37°C.

L'ADN est alors analysé par électrophorèse sur gel d'agarose.

### 3.6. EXTRACTION DE L'ADN A PARTIR D'UN GEL D'AGAROSE

#### A. PRINCIPE DU GENECLEAN (BIO 101 INC)

Il s'agit ici d'extraire du gel d'agarose un fragment d'ADN après que celui-ci ait été restreint par une enzyme et séparé par électrophorèse. Un cube d'agarose contenant la bande d'ADN d'intérêt est découpée hors du gel, l'ADN en est extrait et purifié grâce à une matrice de silice qui adsorbe spécifiquement l'ADN en solution saline.

### B. MISE EN PRATIQUE

- Séparer les fragments d'ADN après restriction par électrophorèse sur gel d'agarose.
- Visualiser la bande intéressante sous U.V. et découper le gel à ce niveau à la lame de rasoir.
- Placer le morceau d'agarose dans un eppendorf et ajouter 3 volumes d'une solution NaI 6 M.
- Incuber 5 minutes à 55°C, pour faire fondre l'agarose et libérer l'ADN.
- Ajouter ensuite 5  $\mu$ l de la solution de Glassmilk. Homogénéiser..
- Laisser 5 minutes à température ambiante.
- Centrifuger pour culotter le complexe ADN/silice (5 secondes, Hermle Z229). Le surnageant est éliminé.
- Resuspendre le culot dans 700  $\mu$ l d'une solution glacée de New Wash (NaCl, Tris HCl, EDTA, éthanol 100%).
- Centrifuger quelques secondes.
- Répéter deux fois cette étape.
- Resuspendre le dernier culot dans 10  $\mu$ l d'eau distillée stérile.
- Un dernier chauffage de 5 minutes à 55°C permet de dissocier l'ADN de la silice.
- Centrifuger 30 secondes.
- Cette étape est répétée et on obtient ainsi un volume final de 20  $\mu$ l.

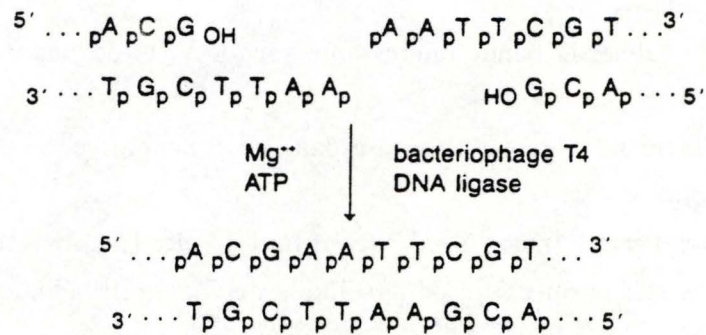
L'efficacité de la purification est vérifiée en déposant quelques microlitres sur gel.

## 3.7. LIGATION(56)

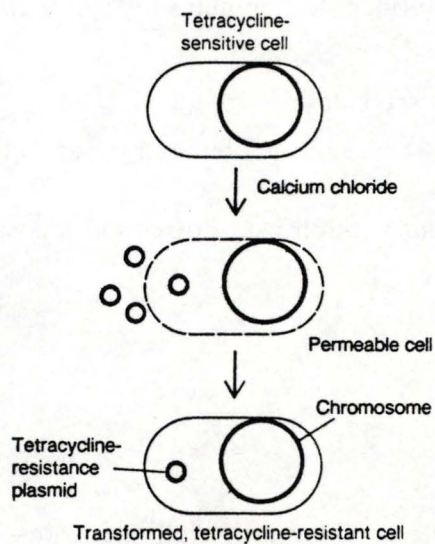
### A. PRINCIPE

Cette étape permet de créer artificiellement des liens covalents entre deux fragments d'ADN. Il est ainsi possible, par exemple, d'introduire un insert dans un plasmide ou de refermer un plasmide linéarisé (selfligation). A cette fin, l'enzyme du phage T4, la T4 DNA Ligase, commercialisée par la firme Boehringer, est utilisée. Elle catalyse, en présence d'ATP et d'ions  $Mg^{++}$ , la formation de liens phosphodiester entre l'hydroxyle 3' d'une extrémité et le phosphate 5' de l'autre (Figure III-17).

---



**Figure III-17.** Réaction de la T4 DNA ligase. La T4 DNA ligase, en présence d'ATP et d'ions  $\text{Mg}^{++}$  crée des liens covalents entre des extrémités 3'-hydroxyl et 5'-phosphate (Maniatis *et al*, 1989).



**Figure III-18.** Exemple de transformation. Un plasmide porteur d'un gène de résistance à la tétracycline peut pénétrer par choc thermique dans une bactérie perméabilisée au chlorure de calcium (bactérie compétente). Les bactéries transformées sont sélectionnées par leur capacité à croître en présence de tétracycline (Zuzuki *et al*, 1989)..

### B. MISE EN PRATIQUE

- Ajouter à l'ADN récupéré lors du geneclon, le plasmide Bluescript restreint, dans la proportion 3 molécules d'insert pour une de plasmide.
- Placer le tout à 65°C pendant 10 minutes et puis sur glace.
- Ajouter ensuite 1  $\mu$ l de T4 DNA Ligase et 2  $\mu$ l de tampon de ligation (660 mM Tris HCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTE, 10 mM ATP).
- Incuber une nuit à 16°C.

## 3.8. TRANSFORMATION BACTERIENNE (56)

### A. PRINCIPE

Transformer une bactérie signifie introduire de l'ADN étranger (souvent un plasmide) à l'intérieur de cette bactérie. Pour ce faire, elle doit être perméabilisée par un passage dans une solution hypotonique de chlorure de calcium CaCl<sub>2</sub>, qui déstabilise la paroi et la membrane. La bactérie est alors dite compétente. Lors d'un choc thermique, l'ADN pénètre, non sans avoir auparavant formé avec le calcium un complexe résistant aux DNases bactériennes. Les bactéries transformantes sont identifiées par la sélection blanc / bleu (Figure III-18).

### B. PRÉPARATION DES CELLULES COMPÉTENTES

- Centrifuger une culture de 50 ml de *E. coli* XL1 Blue en phase exponentielle de croissance dans du LB + Tétracycline 5 minutes à 4000 RPM et à 4°C (Sorvall, rotor SS34).
- Le culot est resuspendu dans la moitié du volume initial de CaCl<sub>2</sub> 250 mM.
- Laisser incuber 20 minutes sur glace.
- Centrifuger dans les mêmes conditions.
- Resuspendre le culot dans un volume de CaCl<sub>2</sub> 50 mM + glycérol 15% égal au 1/10 volume de départ.
- Répartir en aliquots et stocker à -80°C.

### C. TRANSFORMATION

- Ajouter à 130  $\mu$ l de bactéries compétentes la moitié du mélange de ligation (soit 10  $\mu$ l).
  - Laisser incuber 30 minutes sur glace.
  - Placer 2 minutes à 42°C.
  - Ajouter 500  $\mu$ l de LB.
-

- Incuber 30 minutes à 37°C.
- Etaler ensuite sur boîtes de pétri contenant du LB + ampicilline + Xgal + IPTG.

Parallèlement sont réalisés des témoins :

- de compétence des cellules; Même protocole avec un plasmide non restreint efficace pour la transformation.
- de viabilité; des bactéries non transformées, subissant le même traitement et étalées sur LB seul.
- de résistance à l'ampicilline; des bactéries non transformées sont étalées sur du milieu LB + ampicilline, pour vérifier la validité du test de sélection et le taux de mutants spontanés.

### 3.9. EXTRACTION RAPIDE D'ADN PLASMIDIQUE D'*E. COLI* (MINIPREP)

- Inoculer 5 ml de LB + ampicilline avec une colonie de bactéries transformantes. Incuber une nuit à 37°C avec une forte agitation.
  - Prélever 1,5 ml de cette culture dans un eppendorf.
  - Centrifuger 5 minutes à 12000 RPM (Hermle Z229).
  - Eliminer le milieu.
  - Resuspendre le culot dans 150  $\mu$ l de tampon TES.
  - Ajouter 25  $\mu$ l de la solution de lysosyme.
  - Homogénéiser.
  - Laisser 15 minutes sur table.
  - Additionner 400  $\mu$ l d'eau stérile froide.
  - Laisser 5 minutes sur glace puis 15 minutes à 72°C.
  - Centrifuger 15 minutes dans une microfuge (Hawksley) pour bien tasser le culot.
  - Récupérer celui-ci avec un cure-dents stérile.
  - Ajouter 25 ml de NaCl 5 M (concentration finale d'environ 0,2 M) et 400 ml d'isopropanol.
  - Homogénéiser.
  - Centrifuger 15 minutes à 12000 RPM.
  - Eliminer le surnageant et déposer sur le culot 400  $\mu$ l d'éthanol 70% glacé.
  - Centrifuger dans les mêmes conditions.
-

- Eliminer le surnageant et sécher le culot, couvercle ouvert dans la centrifugeuse.
- Resuspendre le culot dans 40  $\mu$ l d'eau distillée stérile.

Cette méthode permet de récupérer 1 à 2  $\mu$ g de plasmides à partir d'un millilitre de culture.

### 3.10. EXTRACTION D'ADN SUR COLONNE QUIAGEN (MIDIPREP)

#### A. PRINCIPE

Les colonnes Quiagen sont des échangeuses d'anions. Par un processus spécial, un silicagel macroporeux, avec des particules de taille voisine de 100 nm, est recouvert avec une substance hydrophille qui empêche les fixations non spécifiques. La résine est traitée de telle sorte que la densité de charges est maximale en surface. Il en résulte une capacité de séparation très large, allant jusqu'à 1,4 M en sel, concentration qui est le point d'éluion de l'ADN double brin. Toutes les autres biomolécules sont éluées à des molarités inférieures.

Les quantités récoltées par cette méthode approximent les 100  $\mu$ g, à partir de 30 à 150 ml de culture.

#### B. PROTOCOLE

- Inoculer 50 à 150 ml de LB + ampicilline avec une colonie de bactéries transformantes. Une nuit de culture à 37°C avec une forte agitation.
  - Récolter les bactéries par centrifugation à 5000 RPM (Sorvall, rotor SS34).
  - Resuspendre le culot dans 4 ml de P1 froid.
  - Ajouter 4 ml de P2. Homogénéiser avec précaution.
  - Incuber 5 minutes à température ambiante.
  - Ajouter 4 ml de P3 froid. Homogénéiser avec précaution.
  - Laisser 15 minutes sur glace en mélangeant de temps en temps.
  - Centrifuger alors 15 minutes à 12000 RPM (Sorvall, rotor SS34).
  - Récupérer rapidement le surnageant et recentrifuger dans les mêmes conditions.
  - Equilibrer la colonne Quiagen Tip 100 avec 3 ml de QBT. Laisser le tampon entrer par gravité.
  - Déposer le surnageant et laisser pénétrer.
-

- 
- Laver la colonne avec deux fois 10 ml de QC.
  - Finalement l'ADN est élué avec 5 ml de QF.
  - Précipiter l'ADN en additionnant 0,70 volume d'isopropanol.  
Homogénéiser.
  - Centrifuger 30 minutes à 12000 RPM (Hermle Z229).
  - Eliminer le surnageant.
  - Laver l'ADN en déposant 1 volume d'éthanol 70% glacé sur le culot.  
Centrifuger 3 minutes à 12000 RPM.
  - Eliminer l'éthanol.
  - Sècher le culot.
  - Resuspendre le culot dans 20  $\mu$ l d'eau distillée stérile.
-

---

**PARTIE IV**

**RESULTATS ET DISCUSSION**

---

## 1. DISTRIBUTION DE L'ANTIGÈNE DANS LES DIFFÉRENTES ESPÈCES ET BIOVARS DE *BRUCELLA*

Localiser l'antigène reconnu par l'AcM Br25 (AgBr25) dans une série de souches de *Brucellae* nous permettra d'avoir une estimation de la masse moléculaire de l'AgBr25 et de connaître sa distribution inter et intra-spécifique. L'AgBr25 ne pourra être utile que s'il est présent dans la majorité des souches infectieuses existantes de *Brucellae* afin de pouvoir identifier les animaux infectés par ces souches s'il est utilisé en diagnostic.

Des lysats SDS totaux de 32 souches de référence représentant les 6 espèces de *Brucella* existantes et leurs biovars ont été examinés.

De plus, nous avons testé deux souches vaccinales (*B. abortus* 45/20 et *B. abortus* B19) et une série d'extraits ultrasoniqués de microorganismes connus pour engendrer des réactions sérologiques croisées avec *Brucella* : *Yersinia enterocolitica* O:15, *E. coli* O : 157, *Salmonella urbana*, *Pasteurella multocida* et *Pseudomonas maltophilia*. Pour tous les extraits cités, nous avons analysé en SDS-PAGE 20 à 30 µg de protéines. Après électrophorèse, l'AgBr25 est localisé par un immunoblot avec l'AcM Br25.

Le tableau IV-1 reprend tous les échantillons testés. La figure IV-1 montre les résultats obtenus.

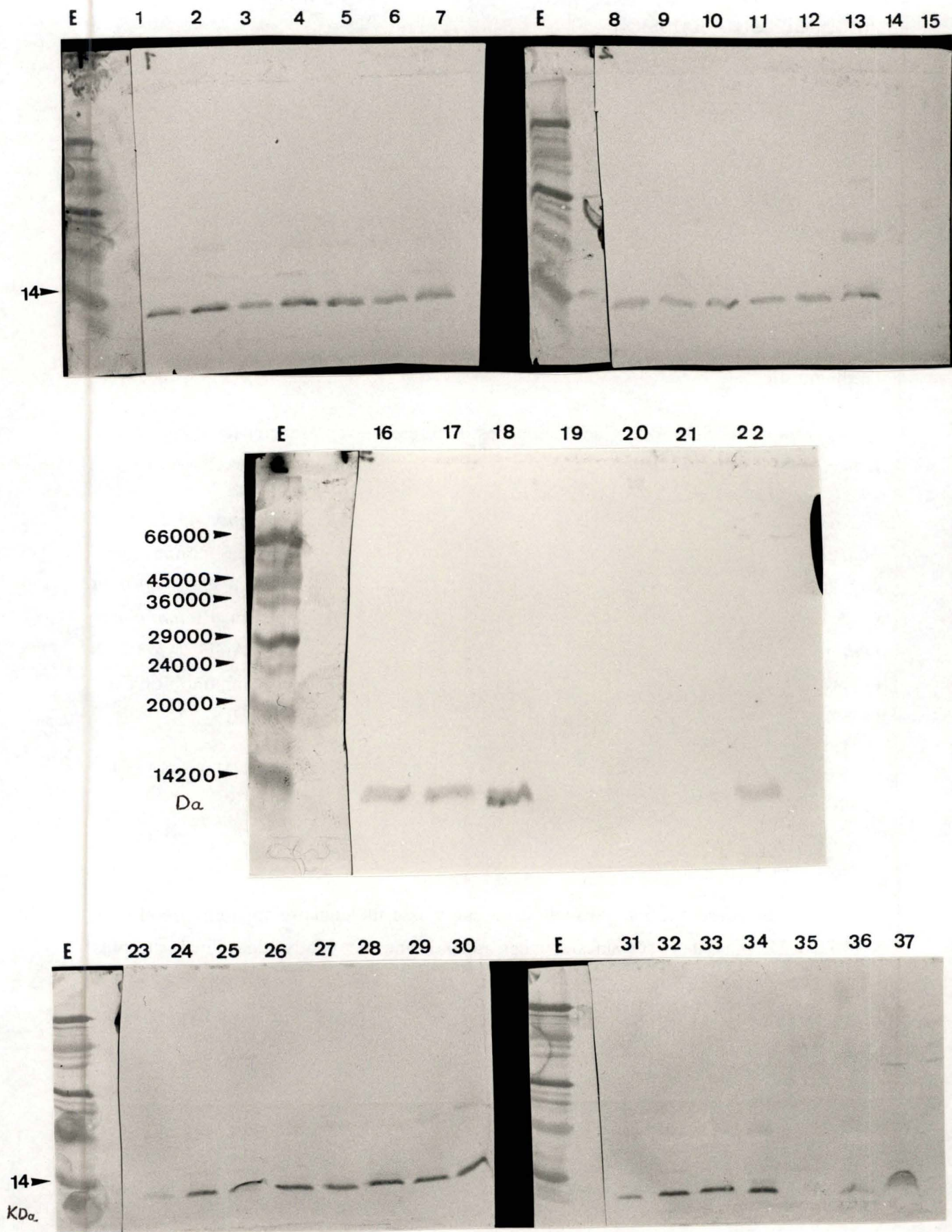
Il ressort de ces résultats que :

1/ L'antigène Br25 se présente avec une masse moléculaire apparente inférieure à 14 kDa. De plus, dans certaines souches apparaît une seconde bande à l'intensité plus faible et d'une masse moléculaire estimée de 20 kDa.

2/ *B. abortus*, *B. suis* et *B. melitensis* présentent un signal correspondant à l'AgBr25, approximativement de même intensité dans tous les biovars.

3/ *B. neotomae* et *B. canis* présentent un signal beaucoup plus faible au niveau de l'AgBr25.

4/ Nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence de l'AgBr25 dans la souche de *B. ovis*. L'antigène, ou l'épitope reconnu par l'anticorps, semble donc être absent ou exprimé beaucoup plus faiblement.



**Figure IV.1.** SDS-PAGE suivi d'un immunoblot avec l'AcM Br25 et RAM-phosphatase réalisé sur 32 souches de *Brucella* (espèces et biovars). Chaque piste correspond au numéro de piste repris dans le tableau IV-1. Les pistes 14, 15, 19, 20 et 21 correspondent à des contrôles. E : étalon de masse moléculaire.

Numéro de la piste	Espèce de <i>Brucella</i>	Biovar	Désignation de la souche
1	<i>B. abortus</i>	1	544
2	<i>B. abortus</i>	2	86/8/59
3	<i>B. abortus</i>	3	Tulya
4	<i>B. abortus</i>	4	292
5	<i>B. abortus</i>	5	B 3196
6	<i>B. abortus</i>	6	870
7	<i>B. abortus</i>	9	C 68
8	<i>B. suis</i>	1	1330
9	<i>B. suis</i>	2	Thomsen
10	<i>B. suis</i>	3	686
11	<i>B. suis</i>	4	40
12	<i>B. suis</i>	5	513
13	<i>B. abortus</i>	1	45/20 (vaccinal)
16	<i>B. melitensis</i>	1	16 M
17	<i>B. melitensis</i>	2	63/9
18	<i>B. melitensis</i>	3	Ether
22	<i>B. canis</i>	-	R M-6/6
23	<i>B. neotomae</i>	-	5 K 33
24	<i>B. abortus</i>	6	80-236
25	<i>B. abortus</i>	6	89-43
26	<i>B. abortus</i>	9	75-60
27	<i>B. abortus</i>	9	76-299
28	<i>B. abortus</i>	9	77-9
29	<i>B. abortus</i>	9	80-133
30	<i>B. abortus</i>	5	B 3196
31	<i>B. abortus</i>	9	87-46
32	<i>B. abortus</i>	9	90-64
33	<i>B. abortus</i>	9	91-28
34	<i>B. abortus</i>	9	91-135
35	<i>B. ovis</i>	-	Bow 63-290
36	<i>B. abortus</i>	1	B 19 (vaccinal)
37	<i>B. abortus</i>	5	B 3196
14	<i>Yersinia enterocolytica</i>		
15	<i>Pseudomonas maltophilia</i>		
19	<i>Salmonella urbana</i>		
20	<i>Pasteurella multosida</i>		
21	<i>Escherichia coli</i> O : 157		

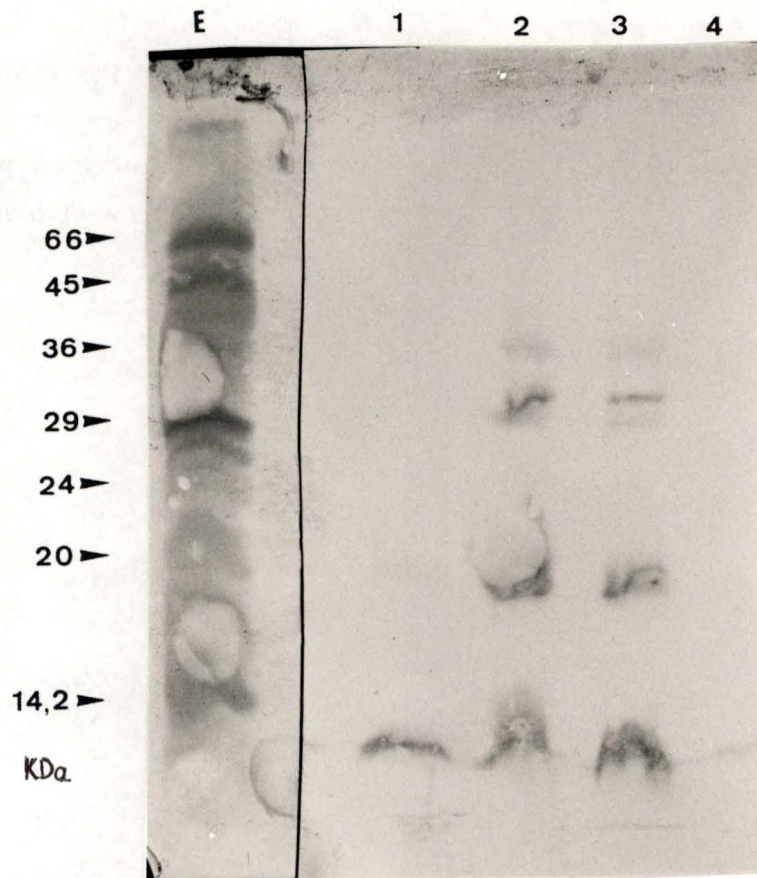
**Tableau IV-1** : Espèce, biovar et désignation de la souche de toutes les *Brucella* et autres espèces testées en SDS-PAGE.

5/ L'intensité du signal correspondant à l'AgBr25 détecté dans la souche vaccinale 45/20 est comparable à celle des autres souches de *B. abortus*. Par contre l'intensité du signal détecté chez B19 est plus faible que la moyenne. L'AgBr25 est donc présent dans les souches vaccinales, ce qui confirme les résultats obtenus par Limet *et al* (communication personnelle).

6/L'AgBr25 n'a été mis en évidence dans aucune des souches engendrant des réactions croisées avec *Brucella*.

**En conclusion, l'AgBr25 pourrait être très intéressant par le fait qu'il est présent dans les 5 espèces principales de *Brucella*, dans tous les biovars testés et dans les deux souches vaccinales testées. De plus cet antigène n'est pas présent dans les différentes souches responsables des réactions croisées avec *Brucellae*.**

---



**Figure IV.2.** SDS-PAGE suivi d'un immunoblot avec l'AcM Br25 et RAM-phosphatase réalisé sur des fractions de protéines solubles et insolubles obtenues après centrifugation de *B. abortus* 45/20 lysées à la presse de French. Piste 1, témoin positif, *B. abortus* biovar 5 B3196, 25 µg de protéines. Piste 2 et 3, 50 et 25 µg de protéines insolubles. Piste 4, 25 µg de protéines solubles. E : étalon de masse moléculaire.

## 2. CARACTERISATION DE L'ANTIGENE RECONNU PAR L'ACM BR25

### 2.1. LOCALISATION INTRACELLULAIRE DE L'ANTIGENE

#### A. LOCALISATION DE L'AGBR25 PAR SDS-PAGE

Nous avons tenté de localiser l'antigène dans la bactérie, de savoir s'il s'agit d'une protéine soluble ou non, ce qui nous donnera des indications sur sa position, cytoplasmique ou pariétale.

Des extraits de *Brucella* 45/20, obtenus par broyage à la presse de French, sont centrifugés 20 minutes à 17000 g, à 4°C. Le culot est mis en suspension dans du PBS. La quantité de protéines dans chaque fraction est mesurée par la méthode au BCA. Cinquante et 25 µg de protéines du culot (piste 2 et 3) et 25 µg de protéines du surnageant (piste 4) sont analysés en SDS-PAGE suivi d'un immunoblotting avec l'AcM Br25. Le témoin positif est constitué par un extrait total de *B. abortus* biovar 5 souche B3196 (Figure IV-2).

Il est manifeste que l'antigène se trouve dans le culot, donc dans les protéines insolubles, ce qui nous laisse penser que l'antigène puisse être associé à des éléments de la paroi. Mais, contrairement à l'extrait total où n'apparaît qu'une bande, dont le poids moléculaire est inférieur à 14000 Da (comme estimé précédemment), dans les extraits insolubles, l'AcM Br25 révèle cinq bandes. Les masses moléculaires estimées de ces bandes sont : inférieur à 14 kDa et aux environs de 20 kDa pour les deux bandes les plus intenses, un doublet composé d'une bande intense et d'une bande inférieure plus faible, situé entre 29 et 36 kDa, et une bande faible située entre 36 et 45 kDa. Cette disposition pourrait laisser penser à un schéma monomère, dimère, trimère et tétramère, en supposant que le monomère ait une masse de 10 ou 11 kDa. Cette disposition peut être le résultat de la dénaturation d'une association protéique ou d'une association entre protéines et composants de nature non-protéiques, sous l'influence de facteurs dénaturants utilisés en SDS-PAGE (SDS, β-mercaptoéthanol). Nous avons déjà remarqué la présence d'une bande de poids moléculaire proche de 20 kDa lors des SDS-PAGE réalisés sur les différentes souches.

#### B. IMMUNODÉTECTION DE L'AGBR25 SUR BACTÉRIES ENTIÈRES

Pour confirmer la présence de l'antigène dans la paroi des *Brucellae* et tester s'il se localise en membrane externe, nous avons essayé de le mettre en évidence

directement sur la bactérie entière avec l'AcM Br25. Cette méthode s'inspire de l'immunodétection de protéines sur nitrocellulose, si ce n'est que l'anticorps se fixe sur la bactérie entière.

Un ml de suspension de *B. abortus* 45/20 dont la  $DO_{420}=40$  est centrifugé (Hermle Z229, 5 minutes à 12000 RPM). Le culot bactérien est lavé trois fois dans du TBS. Les bactéries sont incubées pendant trois heures avec 100  $\mu$ l d'AcM Br25 dilué 2000 fois dans du TBS + BSA 1%. Elles sont ensuite lavées trois fois dans du TTBS avant d'être incubées une heure à température ambiante dans 100  $\mu$ l d'un conjugué anti-anticorps couplé à la peroxidase, dilué 500 fois dans du TTBS + BSA. Après trois lavages dans du TTBS, le culot est resuspendu dans 100  $\mu$ l de la solution de révélation OPD. Après 20 minutes de réaction, le surnageant est récupéré après centrifugation et transféré dans une microplaque 96 puits afin de pouvoir lire l'absorbance à 492 et 620 nm.

Le témoin positif est constitué d'un anticorps dirigé contre l'Omp de 16,5 kDa de *Brucella*. Le témoin négatif est constitué d'un anticorps monoclonal du même isotype que l'AcM Br25, soit une IgG2a, mais n'ayant aucune affinité pour les *Brucellae* (l'AcM 7C7, spécifique d'un antigène du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II bovin).

Le tableau ci-dessous donne les absorbances enregistrées.

Anticorps	Absorbance
Témoin négatif	0,289
7C7	0,388
Témoin positif	1,013
anti-16,5	0,883
AcM Br25	1,137
	1,042

L'absorbance induite par les bactéries qui ont été mises en présence de l'AcM Br25 est aussi élevée que celle induite par le contrôle positif.

Ces résultats nous permettent de penser que l'antigène AgBr25 est en surface de la bactérie et donc accessible directement aux anticorps circulants. Cependant il nous manque un contrôle de viabilité qui nous assurerait que l'antigène reconnu n'est pas

libéré lors de la lyse de certaines bactéries au cours des manipulations. La microscopie électronique nous permettrait assurément de localiser l'antigène dans la bactérie entière ou sur coupe, par immunodétection avec l'AcM Br25 et des anti-IgG couplé à de l'or colloïdal.

**L'AgBr25 est localisé, chez les *Brucellae*, dans la fraction des protéines insolubles, et donc très probablement dans la paroi. Ceci est confirmé par le test d'immunodétection sur bactéries entières. Dans ce test, les bactéries en présence d'AcM Br25 développent une absorbance égale à celle induite en présence de l'anticorps dirigé contre l'Omp de 16,5 kDa. L'AcM Br25 décèle dans les extraits SDS insolubles de *Brucella abortus* 45/20 une série de cinq bandes qui peuvent nous laisser penser à une protéine multimérique.**

## **2.2. INFLUENCE DE DIFFERENTS FACTEURS DENATURANTS SUR LE PROFIL D'IMMUNOBLOT**

L'apparition de bandes multiples en conditions dénaturantes est relativement difficile à expliquer. Le SDS dénature les protéines et défait les associations protéiques non covalentes existantes. Nous avons testé l'influence de conditions dénaturantes plus drastiques, afin de vérifier si ce profil persistait.

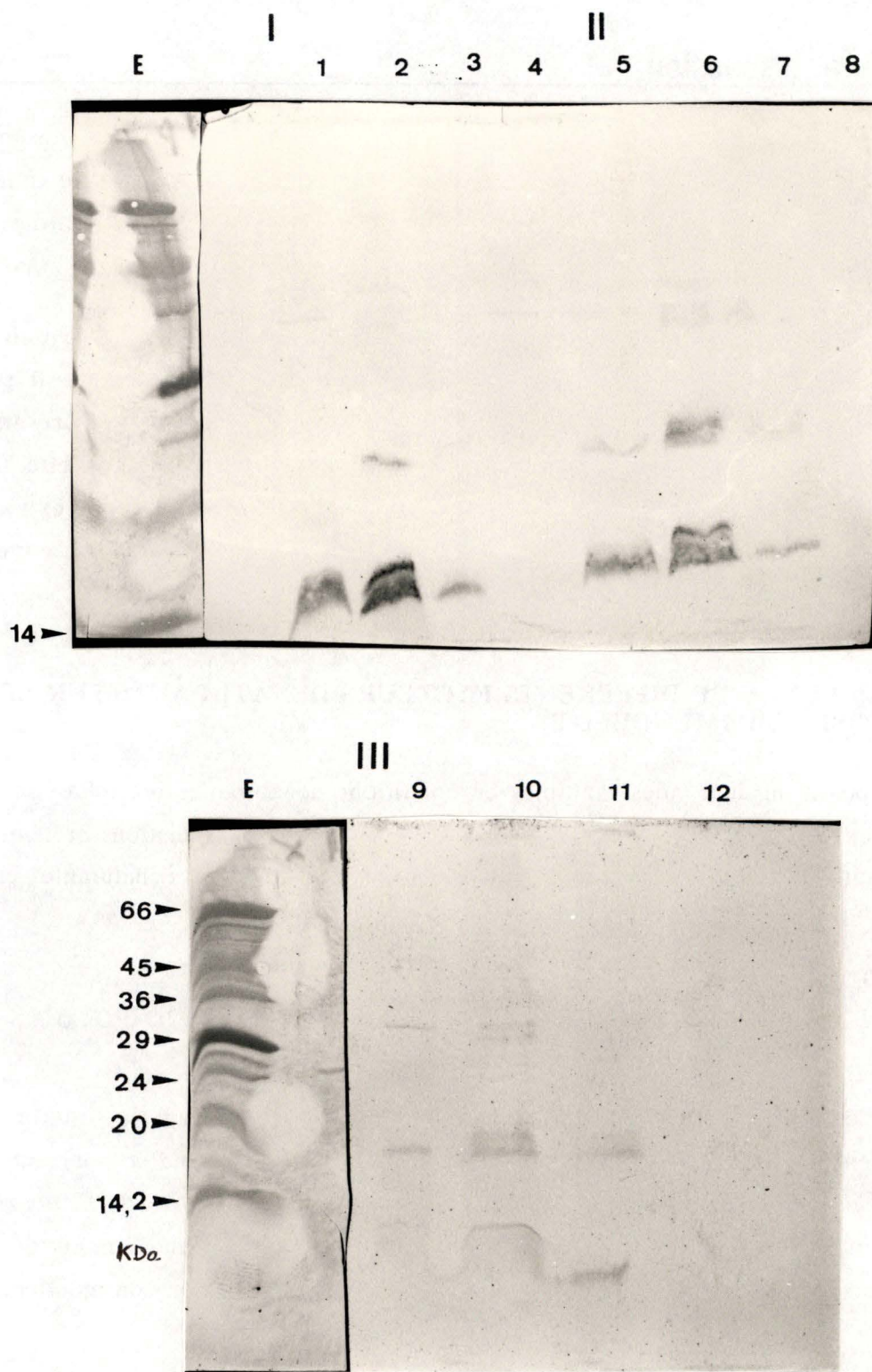
### A. L'INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SDS LORS DE LA PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS POUR UN SDS-PAGE.

Au cours d'un SDS-PAGE, les échantillons sont préparés dans la solution de bleu pour électrophorèse contenant 2% de SDS. Nous avons augmenté ce pourcentage jusqu'à 10% lors de la préparation des échantillons (un lysat total SDS de *B. abortus* biovar 5 souche B3196). Nous avons observé un élargissement et une diminution de l'intensité des bandes situées en dessous de 14 et à 20 kDa (observation non montrée).

### B. INFLUENCE DU TEMPS D'ÉBULLITION.

Lors de la préparation d'un SDS-PAGE, après que les échantillons aient été préparés dans la solution de bleu pour électrophorèse, ils sont chauffés à 100°C. Nous n'observons pas de différence entre les profils des extraits de *B. abortus* biovar 5 souche B3196 chauffés 3 ou 5 minutes (observation non montrée).

Aucun des facteurs dénaturants cités ci-dessus n'influence le profil de bandes multiples observé auparavant. La question de la nature de l'association existant entre les



**Figure IV.3.** SDS-PAGE suivi d'un immunoblot avec l'AcM Br25 et RAM-phosphatase réalisé sur le témoin positif *B. abortus* biovar 5 B3196 (piste 1,5,9), sur un extrait total d'*E. coli* recombinant pBBr25-1 (voir chapitre 3.2.) (piste 2,6,10), sur une fraction de protéines insolubles isolées à partir des bactéries recombinantes pBBr25-1 (voir chapitre 3.4.) (piste 3,7,11) et sur des bactéries non recombinantes (voir chapitre 3.2.) (piste 4,8,12). E : étalon de masse moléculaire. I, SDS-PAGE en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol. II, SDS-PAGE en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol et d'iodoacétamide. III, SDS-PAGE sans  $\beta$ -mercaptoéthanol.

monomères éventuels se pose donc. Une hypothèse envisageable est la possibilité de ponts disulfures entre des cystéines présentes dans les sous-unités. Ces ponts disulfures se créent entre deux cystéines dans une protéine repliée.

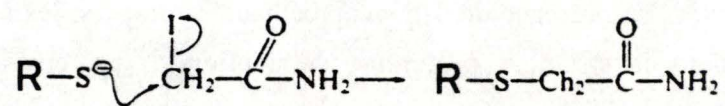
### C. EFFET DU $\beta$ -MERCAPTOÉTHANOL

Le  $\beta$ -mercaptoéthanol réduit les ponts disulfures présents dans une protéine ou entre sous-unités. La présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol permet, si les ponts disulfures sont accessibles dans la structure protéique, de déplier les protéines ou de défaire les associations lors de la dénaturation de sorte que la chaîne d'acides aminés puisse se tapisser de molécules de SDS et migrer dans le gel de polyacrylamide en fonction du poids moléculaire uniquement. Le  $\beta$ -mercaptoéthanol doit donc dissocier toutes les protéines polymériques associées par un ou plusieurs ponts disulfures. Cependant la dissociation n'est pas irréversible et des protéines peuvent se réassocier.

Jusqu'à présent, dans toutes les séparations en SDS-PAGE réalisées, les échantillons contenaient 2% de  $\beta$ -mercaptoéthanol. La présence de ce réducteur ne semble donc pas suffire à dissocier le multimère éventuel, puisque la présence de plusieurs bandes est toujours observée (Figure IV-3). Cela peut être attribué au fait que la réduction induite par le  $\beta$ -mercaptoéthanol est réversible. L'alkylation, par de l'iodoacétamide, des radicaux thiols (-SH) libérés par l'effet du  $\beta$ -mercaptoéthanol rend irréversible la dissociation (Figure IV-4). Après dénaturation thermique, de l'iodoacétamide 10 mM est rajouté à l'échantillon. Ce traitement devrait donc faire disparaître, si la réduction est complète, toute bande de poids moléculaire supérieur au monomère.

Pour comparaison, nous avons réalisé un SDS-PAGE sans  $\beta$ -mercaptoéthanol. Dans ces conditions non réductrices, les bandes correspondant aux multimères devraient s'intensifier, au dépend de la bande à 14000, considérée comme étant le monomère.

La figure IV-3 montre des échantillons identiques traités avec et sans  $\beta$ -mercaptoéthanol, et avec  $\beta$ -mercaptoéthanol et iodoacétamide Sans  $\beta$ -mercaptoéthanol, nous observons une diminution drastique de l'intensité des bandes, mais le profil de bandes multiple est toujours présent. En présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol, les deux bandes (inférieure à 14 kDa et d'environ 20 kDa) apparaissent nettement.



**Figure IV.4.** Alkylation des radicaux thiols par l'iodoacétamide.

Paradoxalement l'iodoacétamide renforce l'intensité de la bande de 20 kDa au détriment de la bande de poids moléculaire inférieur. Ce qui est contraire à notre hypothèse.

Il est donc difficile de déduire si les ponts disulfures interviennent réellement dans l'association de monomères éventuels. La persistance de ce motif de bandes multiples peut s'expliquer de plusieurs façons.

1/ Les ponts disulfures sont situés au centre du multimère. Dès lors, les conditions utilisées ne sont pas assez drastiques que pour assurer un dépliement suffisant et une bonne accessibilité des agents réducteurs aux ponts disulfures. En parlant de conditions plus drastiques, nous pouvons envisager un temps d'ébullition plus long (30 minutes), l'usage de dithiothréitol (DTT) dont le pouvoir réducteur est supérieur à celui du  $\beta$ -mercaptoéthanol. De même, une électrophorèse en conditions natives permettrait de connaître la masse moléculaire de la protéine native.

2/ Les différentes bandes observées ne constituent pas l'assemblage multimérique de plusieurs protéines identiques, mais les différentes étapes de maturation d'une grande protéine. La taille du gène, cloné dans la partie suivante du travail, dément cette hypothèse.

3/ Il s'agit de la même protéine mais associée à différents composants bactériens, protéiques ou autres (glycoprotéine, lipoprotéine...). Ceci expliquerait le fait que l'AcM Br25 reconnaisse ces plusieurs bandes. L'utilisation de coloration spécifique permettrait de confirmer cette hypothèse. Il ne s'agit probablement pas d'une protéine liée au PG. En effet, les protéines connues de ce type ne manifestent pas ce type de profil (20).

4/ La nature des liens existants est autre.

De nombreuses expériences complémentaires seraient nécessaires pour éclaircir cette énigme.

---

### 3. RECHERCHE DU GENE CODANT POUR L'AG BR25

#### 3.1. CRIBLAGE DE LA BANQUE DE *B. ABORTUS*

Nous utilisons la banque génomique de *B. abortus* construite dans le vecteur d'expression  $\lambda$ gt11 et amplifiée.

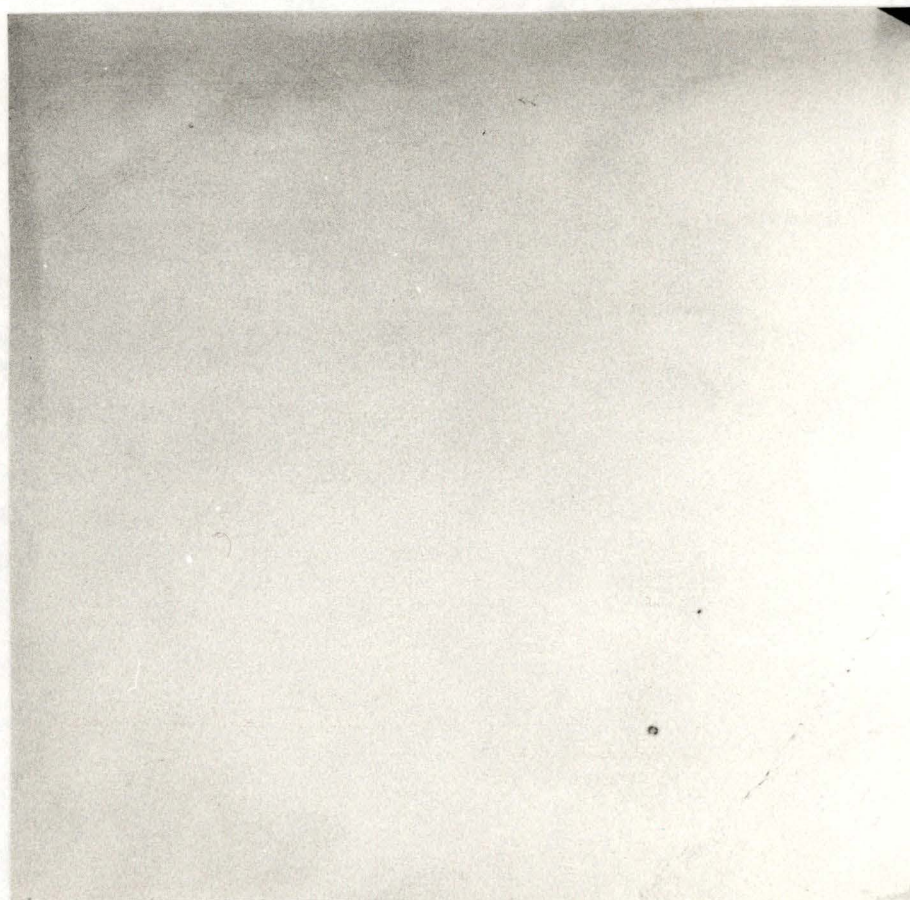
##### A. TITRAGE DE LA BANQUE GÉNOMIQUE DE *B. ABORTUS* ÉTABLIE DANS LAMBDA GT11

La première étape consiste à déterminer le titre de la banque, c-à-d la concentration en phages dans la suspension. Le titre de la banque s'exprime en unité formant plaque de lyse (plaque forming unit) par ml ou pfu/ml.

Afin de déterminer le titre de la banque, nous réalisons des dilutions successives de  $10^{-1}$  à  $10^{-10}$  de la banque dans du tampon Sm. Après une nuit de croissance sur LBC + ampicilline, les plages de lyse sont comptabilisées.

Dilutions	Plages de lyse/boîte
$10^{-10}$	0
$10^{-9}$	0
$10^{-8}$	4
$10^{-7}$	39
$10^{-6}$	291
$10^{-5}$	Plages de lyse en excès
$10^{-4}$	
$10^{-3}$	
$10^{-2}$	
$10^{-1}$	

A partir des dilutions  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  et  $10^{-8}$ , nous établissons une moyenne qui nous donne  $3,6 \cdot 10^8$  plages de lyse pour  $100 \mu\text{l}$ , soit un titre de  $3,6 \cdot 10^9$  pfu/ml.



**Figure IV.5.** Filtre de nitrocellulose après imprégnation, avec IPTG, sur boîte contenant un nombre théorique de 30000 plages de lyse. Criblage AcM Br25 et RAM-phosphatase. Deux plages de lyse expriment l'AgBr25 P1 et P2.

### B. CRIBLAGE DE LA BANQUE À L'AIDE DE L'ACM BR25

Pour avoir une chance de retrouver le phage contenant le gène qui nous intéresse, il nous faut savoir quelle quantité de phages est nécessaire pour représenter l'entièreté du génome de *B. abortus*.

L'équation suivante permet de trouver le nombre théorique N de plages de lyse à cribler pour avoir une probabilité p égale à 0,99% de trouver le gène, connaissant la taille des inserts et la taille du génome de *Brucella* qui est évaluée à  $3,1 \cdot 10^6$  pb.

$$N = \ln(1-p) / \ln(1-f)$$

$$p = 0,99$$

$$f = \text{taille insert} / \text{taille génome}$$

La taille des inserts variant dans notre cas entre 2000 et 7000 pb, nous estimons qu'il faut cribler entre 7204 et 2056 plages de lyse de la banque. Cependant, comme nous utilisons une banque amplifiée, nous sommes obligé de cribler un nombre plus grand de plages de lyse.

Pour s'assurer de la réussite du criblage, les bactéries infectées sont étalées sur une grande boîte (22\*22 cm) formant une quantité théorique de 30.000 plages de lyse. Après une nuit de croissance, l'empreinte des plages de lyse est prise en déposant sur la boîte un filtre de nitrocellulose imbibé d'IPTG 10 mM, afin d'induire l'expression d'une éventuelle protéine en fusion avec la  $\beta$ -galactosidase. Le filtre est ensuite criblé avec l'AcM Br25. Après révélation de l'activité phosphatase, deux taches positives apparaissent sur la nitrocellulose. En superposant les plages de lyse et le filtre, les deux plages de lyse où s'expriment l'antigène reconnu par l'AcM Br25 (AgBr25) sont localisées et nommées P1 et P2 (Figure IV-5).

### C. PURIFICATION DES PHAGES RECOMBINANTS IMMUNOPOSITIFS

A l'aide d'une pipette pasteur stérile, nous avons réalisé 5 prélèvements de top agar au niveau de P1 et deux au niveau de P2. Sept prélèvements sont nécessaires, car il est difficile de prélever avec précision les phages au niveau du top agar. Le top agar récolté est déposé dans du tampon Sm. Après une nuit de diffusion, la suspension est diluée de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ . Une culture d' *E. coli* Y 1090 diluée à une  $DO_{540}=1$  est infectée par les dilutions  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-6}$  de la suspension. Après une nuit de croissance sur

LBC + ampicilline, nous réalisons une empreinte des plages de lyse en y déposant un filtre de nitrocellulose. Le filtre de nitrocellulose est ensuite soumis à un criblage par l'AcM Br25. En superposant le filtre et les plages de lyse, nous constatons qu'il y a un pourcentage non négligeable de phages n'exprimant pas l'AgBr25 dans nos récoltes.

Plage d'origine	Prélèvements	dilutions	Nb total de plages de lyse	Nb de plages positives	% de positif
P1	A	10 <sup>-2</sup>	580	268	46
P1	B	10 <sup>-2</sup>	840	255	30
P1	C	10 <sup>-2</sup>	1680	1418	84
P1	D	10 <sup>-4</sup>	76	40	52
P1	E	10 <sup>-2</sup>	1600	7	0,4
P2	F	10 <sup>-2</sup>	600	576	96
P2	G	10 <sup>-2</sup>	1120	303	27

En fonction qu'ils expriment ou non l'AgBr25, les phages seront désignés, par la suite, comme étant positifs ou négatifs.

Ces résultats s'expliquent par la difficulté de ne prélever que des phages positifs. En effet, d'une part la précision des prélèvements n'est pas suffisante et d'autre part les phages diffusent dans le milieu. Nos sept prélèvements contiennent donc un mélange de phages positifs et négatifs, en proportions variables. Il faut donc procéder à des étapes de purifications successives pour obtenir une suspension pure de phages contenant l'insert d'intérêt. A partir de cette suspension pure nous pourrions passer à l'étape de récupération de l'ADN phagien.

Quelques plages de lyse positives isolées sont repérées. Le top agar est prélevé au niveau de ces plages de lyse. Après diffusion dans du tampon Sm, nous procédons à de nouvelles infections avec une série de dilutions de ces seconds prélèvements. Le criblage et la révélation se réalisent dans les mêmes conditions que précédemment. Les cycles de purification se poursuivent jusqu'à obtention de suspensions phagiennes donnant, après infection et criblage, 100% de plages de lyse positives.

Nous avons obtenu, par purifications successives, quatre suspensions pures à partir de divers prélèvements réalisés au départ. Les phages présents dans ces suspensions contiennent tous l'insert codant pour l'AgBr25.

Suspension phagienne	Prélèvement d'origine	titre (pfu/ml)
I	D	6,8 10 <sup>6</sup>
II	D	6,1 10 <sup>6</sup>
III	F	5,8 10 <sup>6</sup>
IV	C	4,1 10 <sup>5</sup>

Pour s'assurer de la spécificité de l'immunodétection de l'antigène d'intérêt par l'AcM Br25, nous réalisons un contrôle négatif. Il consiste à cribler des plages de lyse positives avec un AcM dirigé contre un antigène tout à fait différent, afin de vérifier que l'antigène exprimé au niveau des plages de lyse ne fixe pas de manière aspécifique n'importe quelle immunoglobuline. Des infections sont réalisées avec une dilution de la suspension phagienne positive II. Les plages de lyse ( $\pm 600$  plages sur une petite boîte de Pétri) sont criblées avec un anticorps du même isotype que Br25, IgG2a, (l'AcM 7C7, utilisé précédemment). La nitrocellulose restant blanche lors de la révélation, nous pouvons confirmer la spécificité de la relation antigène exprimé/AcM Br25.

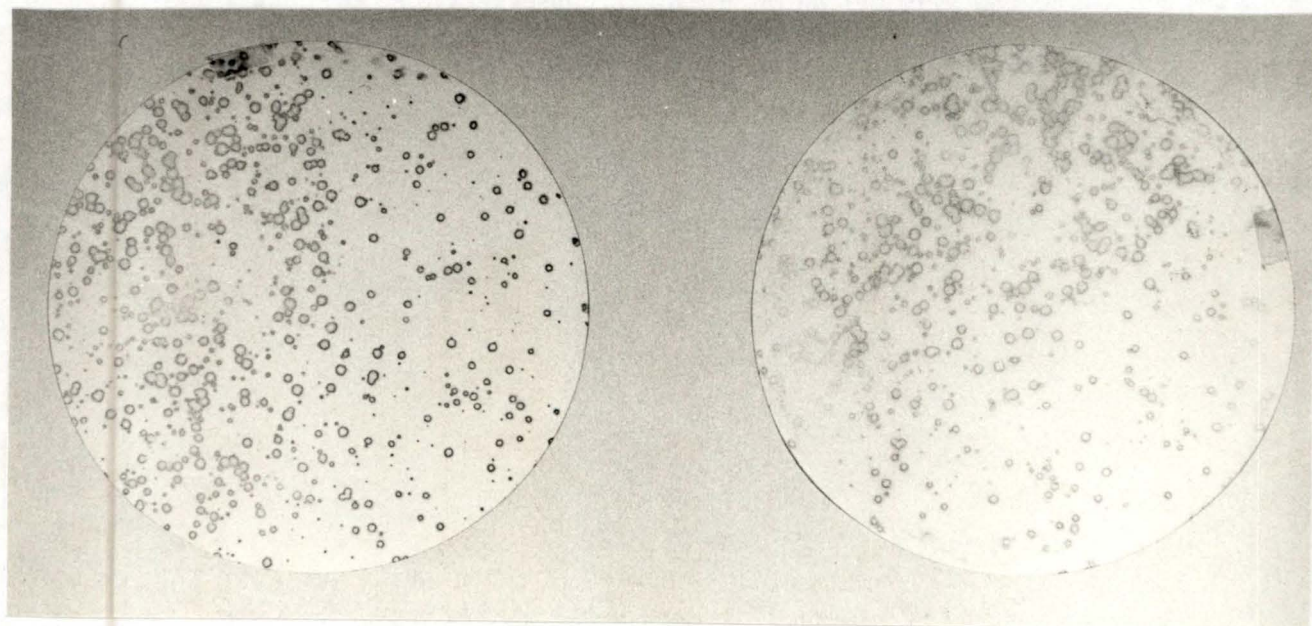
#### D. EFFET DE L'IPTG SUR L'EXPRESSION DE L'AGBR25

L'expression d'une protéine de *B. abortus* chez *E. coli* à partir d'un gène présent dans un insert cloné dans  $\lambda$ gt11 ne peut se faire que dans deux conditions :

- soit le gène est sous la dépendance du promoteur/opérateur de lacZ. L'expression d'une protéine de fusion entre la  $\beta$ -galactosidase et une portion de la protéine de *Brucella* est alors possible si les ORF des deux gènes sont dans la même phase de lecture.
- soit le gène est présent, en entier ou en partie, avec ses propres signaux d'initiation de la transcription. Si les signaux d'expression de *B. abortus* sont reconnus par les machineries transcriptionnelle et traductionnelle d'*E. coli*, la protéine de *Brucella* s'exprimera indépendamment de la régulation de lacZ.

Dans la première hypothèse, l'expression de l'antigène de *Brucella* est dépendante de la présence d'IPTG dans le milieu de culture. L'IPTG n'a par contre pas d'influence sur l'expression de l'antigène dans la seconde hypothèse. Nous avons testé l'influence de l'inducteur de lacZ sur l'expression de l'AgBr25.

Des bactéries *E. coli* Y 1090 ont été infectées par la suspension phagienne I et étalées sur deux boîtes LBC + ampicilline. Après une nuit d'incubation à 37°C, les

**A****B**

**Figure IV.6.** Filtre de nitrocellulose après imprégnation sur boîte contenant un nombre théorique de 600 plages de lyse. A. imprégnation sans IPTG. B. imprégnation avec IPTG 10 mM. Criblage AcM Br25 et RAM-phosphatase.

plages de lyse sont visibles ( $\pm 600$ /boîte). L'empreinte de chaque boîte a été prélevée sur un filtre de nitrocellulose, l'un des deux étant imbibé d'IPTG 10 mM. Après 3 heures d'incubation à température ambiante, les deux nitrocelluloses ont été criblées par l'AcM Br25. Comme le montre la figure IV-6, l'antigène Br25 est exprimé indépendamment de la présence d'IPTG. Il est donc vraisemblable que le gène soit transcrit à partir de son propre promoteur.

Plusieurs auteurs ont déjà rapportés que les promoteurs de gènes de *Brucella* sont reconnus comme tels par la machinerie de transcription d'*E. coli* (58, 11, 26, et une série de gènes clonés au CEB). Pour pouvoir affirmer sans ambiguïté que le promoteur de *Brucella* est présent et fonctionnel, des expériences complémentaires pourraient être réalisées. Elles viseraient à montrer que l'expression de l'AgBr25 par l'insert est indépendante à la fois de l'orientation de clonage et du plasmide utilisé. La fonction promotrice de la partie située en amont de l'ORF peut être démontrée chez *E. coli* en la clonant en amont d'un gène "reporter" (il est possible d'étudier son rôle dans l'expression de la  $\beta$ -galactosidase par exemple).

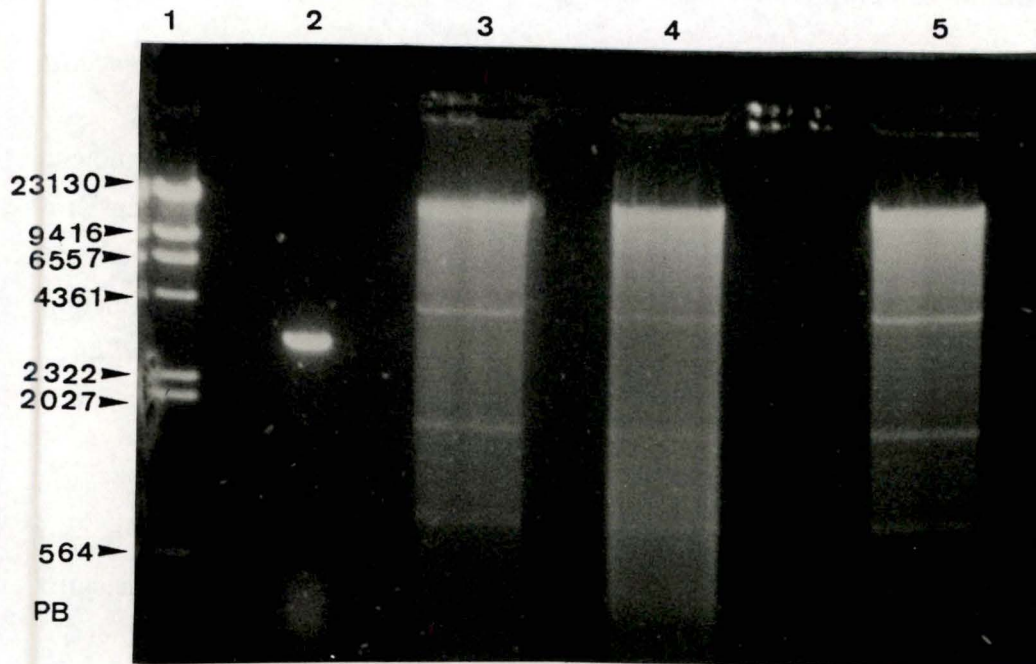
#### E. ANALYSE DE L'ADN EXTRAIT DES PHAGES RECOMBINANTS

L'ADN phagien a été extrait par immunoaffinité (technique du  $\lambda$ Sorb), à partir d'une culture d'*E. coli* Y 1090 infectée par les suspensions phagiennes I, III et IV diluées de manière à obtenir des plages de lyse confluentes.

L'ADN purifié a été restreint par l'enzyme de restriction EcoRI, afin de libérer l'insert cloné au site unique de clonage du bactériophage. Le mélange de restriction a été analysé par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% (Figure IV-7).

Quel que soit le phage considéré (I, III ou IV), le profil de restriction est identique. Outre les deux bras du phage dont la taille est de 19 et 24 kb, nous observons trois fragments provenant de l'insert. Ces trois phages, et par conséquent les deux phages P1 et P2 responsables des deux plages de lyse positives lors du criblage de la banque, contiennent donc probablement le même insert avec 2 sites EcoRI internes.

La taille des fragments de restriction a été estimée à partir d'une droite d'étalonnage établie à partir de l'étalon de taille II (Boehringer). Les valeurs estimées sont présentées dans le tableau suivant.



**Figure IV.7.** Analyse en gel d'agarose 0,8% de l'ADN phagien isolé, par la technique du  $\lambda$ Sorb., restreint par EcoRI . Piste 1, Etalon de tailleII. Piste 2, Bluescript natif restreint EcoRI. Piste 2,3 et 4, ADN phagien isolé à partir des suspensions pures III, IV et I, dans l'ordre.

Fragment	taille estimée (pb)
Fragment 1	3700
Fragment 2	1700
Fragment 3	830

La somme de la taille estimée des trois fragments nous donne la taille approximative de l'insert qui est de 6200 pb.

Au terme de cette première étape, nous disposons d'un phage recombinant, isolé en trois exemplaires et codant pour l'AgBr25. L'insert, extrait du phage, à une taille approximative de 6,2 kb et possède deux sites EcoRI internes. A ce stade, nous ignorons si le gène est présent en entier ou pas. L'indépendance vis-à-vis de l'IPTG nous permet de penser que l'extrémité 5' est présente, mais nous ignorons si le gène est complet en 3'. Dans l'étape suivante, nous avons tenté de cloner séparément dans le plasmide Bluescript chacun des 3 fragments, issus de la restriction EcoRI, afin de localiser le gène sur l'un d'eux.

### 3.2. CLONAGE DU FRAGMENT PORTEUR DU GENE CODANT POUR L'AG BR25

Le clonage dans un plasmide permet une manipulation plus aisée de l'insert que s'il était resté dans le phage. La purification de l'ADN plasmidique est plus facile. Le plasmide utilisé, pBluescript, est conçu, grâce à son site multiple de clonage, pour faciliter l'établissement d'une carte de restriction. Il possède en outre des propriétés qui peuvent être exploitées en de diverses occasions (transcription, production d'ADN simple brin, etc). Nous avons tenté de cloner chacun des trois fragments d'ADN obtenus par restriction EcoRI de l'ADN du phage recombinant au site EcoRI du plasmide Bluescript.

#### A. CLONAGE DES TROIS FRAGMENTS ECORI DANS LE PLASMIDE BLUESCRIPT

Après restriction de l'ADN phagien par EcoRI, la totalité du mélange de restriction a été déposée sur gel afin de séparer les différents fragments par électrophorèse. Les fragments de l'insert ont été extraits du gels séparément par la méthode du GeneClean. Le dixième du volume récupéré pour chaque fragment a été analysé par électrophorèse en gel d'agarose de manière à quantifier l'ADN récupéré. Les

quantités d'ADN récupérées étant faibles (< 50 ng) pour les fragments issus des phages III et IV, ceux-ci ont été regroupés dans un même échantillon.

Chaque fragment d'ADN a ensuite été incubé en présence de la T4 DNA ligase et d'un excès de plasmide Bluescript KS (250 ng), restreint par EcoRI.

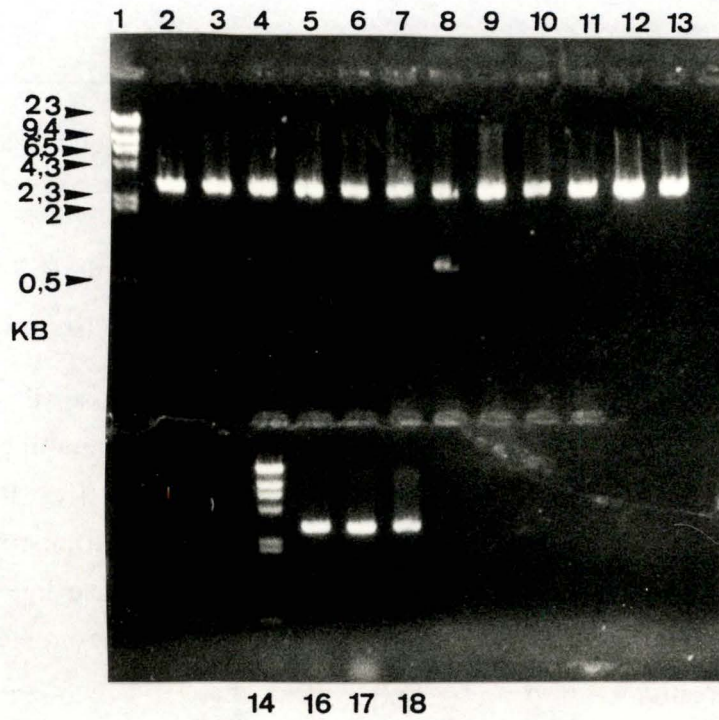
Parmi les constructions obtenues sous l'action de la ligase, il se trouve des plasmides contenant avec un insert dans leur site de clonage (plasmide recombinants) et des plasmides recircularisés sans insert. De façon à identifier les plasmides recombinants des autres, il nous faut passer par une étape de transformation, ceci consiste à isoler chacune des constructions plasmidiques, obtenues par ligation, dans une bactérie compétente. Pour ce faire, des bactéries *E. coli* XL1 Blue ont été transformées par le mélange de ligation.

Par la suite, 100 ou 150  $\mu$ l des bactéries ont été étalées sur milieu sélectif (ampicilline, Xgal et IPTG) pour une nuit de croissance à 37°C. Seules les bactéries transformées par un plasmide pourront croître sur ce milieu car le plasmide Bluescript apporte à la bactérie le gène de résistance à l'ampicilline.

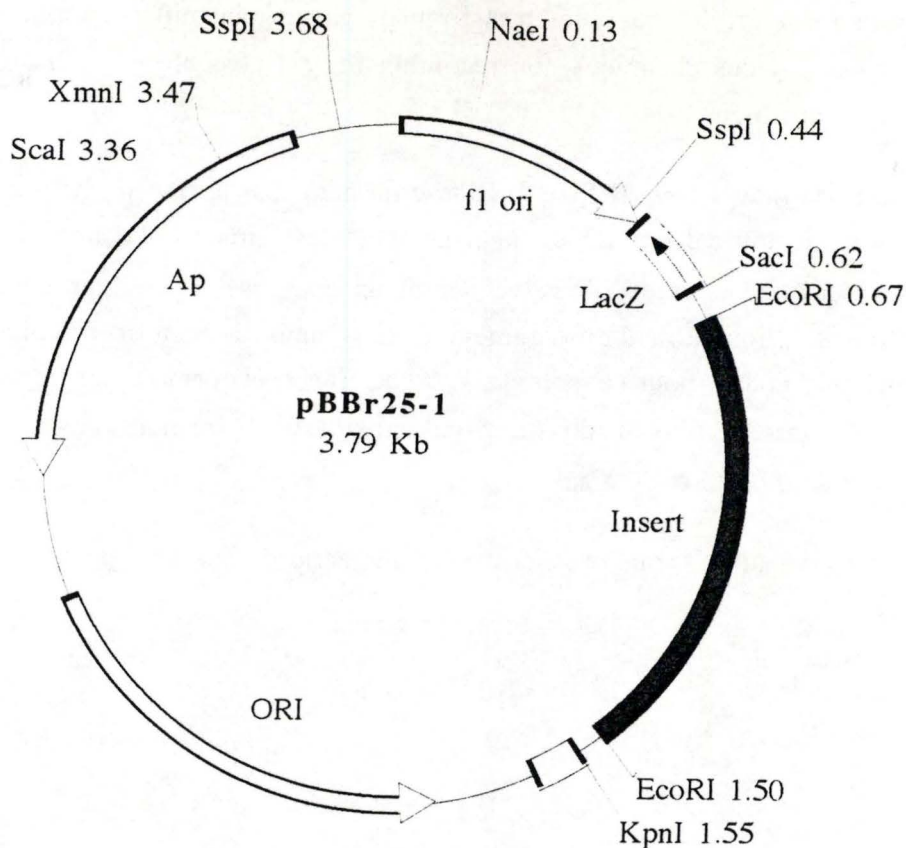
La distinction entre les bactéries transformées par un plasmide recombinant et celles transformées par des plasmides non recombinants est possible grâce au test de sélection colorée blanc/bleu.

En conditions inductrices (IPTG), le Bluescript natif, par la transformation d'une cellule XL1 Blue, restaure l'activité de la  $\beta$ -galactosidase grâce à l' $\alpha$ -peptide pour lequel il code. L'enzyme dégrade l'Xgal générant un composé de couleur bleue qui colore les colonies. L'insertion d'un fragment d'ADN dans la batterie du plasmide disrute le gène lacZ' codant pour l' $\alpha$ -peptide. Les bactéries transformées par un vecteur recombinant ne montrent plus d'activité  $\beta$ -galactosidase et forment des colonies blanches en présence d'IPTG et de Xgal.

Après transformation, nous obtenons donc une série de colonies blanches et de colonies bleues.



**Figure IV.8.** Analyse en gel d'agarose 0,8% de l'ADN plasmidique, isolé par miniprep à partir des 15 colonies blanches, restreint EcoRI. Piste 1 et 14, étalon de taille II.



**Figure IV.9.** Carte de la construction pBBr25-1. Les sites de restriction sont exprimés en kb à partir de l'origine de réplcation phagienne f1 (f1 ori). Ap, gène de résistance à l'ampicilline. ORI, origine de réplcation. LacZ, gène de la  $\beta$ -galactosidase. Insert, fragment d'ADN de 0,83 kb isolé à partir de la banque génomique de *B. abortus* et portant le GBr25.

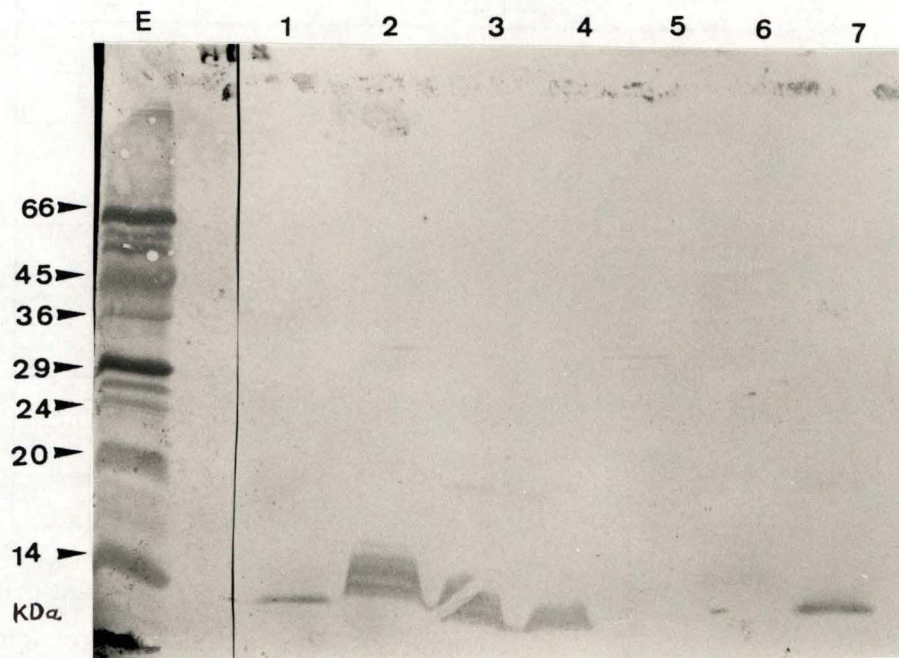
Suspension phagienne d'origine	Taille du fragment (kb)	Volume de transformants étalé ( $\mu$ l)	Colonies blanches	Colonies bleues
I	3,7	100	0	50
		150	0	75
	1,7	100	0	34
		150	1	68
	0,83	100	0	33
		150	0	108
III/IV	3,7	100	0	106
		150	3	150
	1,7	100	0	56
		150	4	117
	0,83	100	3	86
		150	4	170

La grande majorité des colonies contient un plasmide non recombinant (bleues), nous n'avons obtenu que 15 colonies susceptibles de contenir un plasmide recombinant (blanches).

Les 15 colonies blanches ont été récupérées et amplifiées par culture dans du milieu sélectif liquide (LB + ampicilline). L'ADN plasmidique a été extrait par miniprep des bactéries. Un échantillon de l'ADN récupéré a été restreint par EcoRI, afin de vérifier, par électrophorèse en gel d'agarose, la présence d'un insert dans les plasmides (Fig IV-8).

Dans tous les échantillons d'ADN plasmidique issus des colonies apparaît une bande majeure à environ 2900 pb qui correspond à la matrice du plasmide natif restreint par EcoRI. Dans un seul plasmide apparaît un fragment supplémentaire situé à une hauteur correspondant à la taille du plus petit fragment à cloner ( $\pm$  830 pb) (piste 8). Ce plasmide recombinant avec un plasmide Bluescript contenant un insert d'environ 0,83 kb est appelé pBBr25-1 (Figure IV-9).

Comme la masse moléculaire de l'AgBr25 a été estimée, par immunoblotting, à une valeur inférieure à 14 kDa, il est mathématiquement possible que ce fragment de 0,83 kb contienne l'entièreté du gène codant pour l'AgBr25 (GBr25). En effet, la masse



**Figure IV.10.** SDS-PAGE suivi d'un immunoblot avec l'AcM Br25 et RAM-phosphatase réalisé sur des extraits totaux des bactéries recombinantes pBBR25-1 (20, 5 et 2,5  $\mu$ l, piste 2, 3 et 4). Témoin négatif, bactéries portant un plasmide Bluescript non recombinant (20 et 10  $\mu$ l, piste 5 et 6). Témoin positif, *B. abortus* biovar 5 B3196 (piste 1 et 7). E, étalon de poids moléculaire.

moléculaire moyenne d'un acide aminé étant de 100 Da, nous pouvons prédire grossièrement que la taille de la protéine est inférieure à 140 acides aminés. Sachant que trois nucléotides codent pour un acide aminé, la phase codante du gène de l'AgBr25 devrait compter moins de 420 pb.

Le fragment EcoRI-EcoRI, ayant une taille estimée de 830 pb, est donc suffisamment grand pour contenir le gène en entier. Il est dès lors probable de trouver le gène GBr25 sur cet insert. Nous avons vérifié cette hypothèse en testant l'expression de l'AgBr25 par des bactéries recombinantes.

#### B. ETUDE DE L'EXPRESSION DE L'AG BR25 PAR LES BACTÉRIES RECOMBINANTES

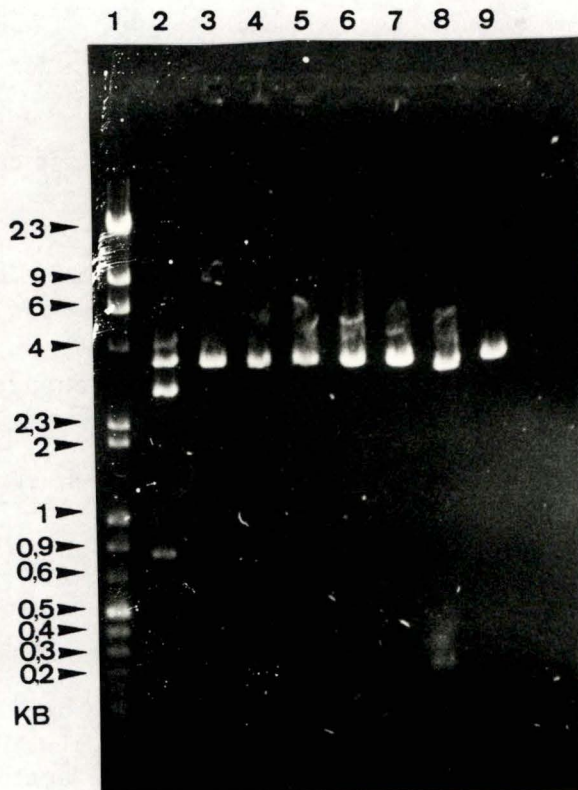
Comme nous l'avons dit précédemment un gène étranger peut s'exprimer dans *E. coli* soit à partir de ses propres signaux d'expression, si la bactérie les reconnaît, soit à partir des signaux présents sur le plasmide (opérateur et promoteur de lacZ en conditions inductrices, par exemple).

L'expression de l'AgBr25 par les bactéries transformées avec le plasmide recombinant est examinée par SDS-PAGE suivi d'un immunoblot avec l'AcM Br25 d'extraits bactériens totaux.

Un ml d'une culture  $DO_{540}=1$  de la colonie contenant le pBBr25-1 est centrifugé. Les extraits totaux ont été obtenus par la resuspension du culot bactérien dans 100  $\mu$ l de bleu pour électrophorèse, suivi d'une dénaturation à 100°C pendant 5 minutes. Différentes quantités de ce lysat (20, 5 et 2,5  $\mu$ l) sont séparées par SDS-PAGE. Le témoin négatif est constitué d'extraits de bactéries XL1 Blue transformées par un plasmide Bluescript sans insert. Un lysat total SDS de *B. abortus* biovar 5 souche B3196 constitue le témoin positif de la réaction immunologique (Fig IV-10).

Une bande ayant une masse moléculaire inférieure à 14 kDa est présente dans l'extrait de *B. abortus* (piste 1 et 7), mais pas chez le témoin négatif (colonne 5 et 6). Dans les extraits d'*E. coli* recombinantes apparaît une large bande située à même hauteur que la bande native de *B. abortus* (colonne 2, 3 et 4). La bande s'amincit en déposant moins d'antigène et se localise exactement au même niveau que la protéine native.

Ces résultats confirment l'hypothèse émise précédemment, selon laquelle l'expression de l'AgBr25 serait indépendante de lacZ et initiée par les signaux de *Brucella*, reconnus par la machinerie transcriptionnelle d'*E. coli*.



**Figure IV.11.** Analyse en gel d'agarose 0,8% de l'ADN plasmidique pBBr25-1 après restriction EcoRI (piste 2), SacI (piste 3), KpnI (piste 4), SmaI (piste 5), EcoRV (piste 6), XbaI (piste 7), HindIII (piste 8) et BamHI (piste 9). Piste 1, étalon de taille II et VIII.

La protéine recombinante codée par l'insert présente la même masse moléculaire apparente que la protéine native. Il semble donc que l'insert de 0,83 kb contienne bien l'entièreté du gène GBr25.

C. ETABLISSEMENT DE LA CARTE DE RESTRICTION DE L'INSERT DE 0.8 KB

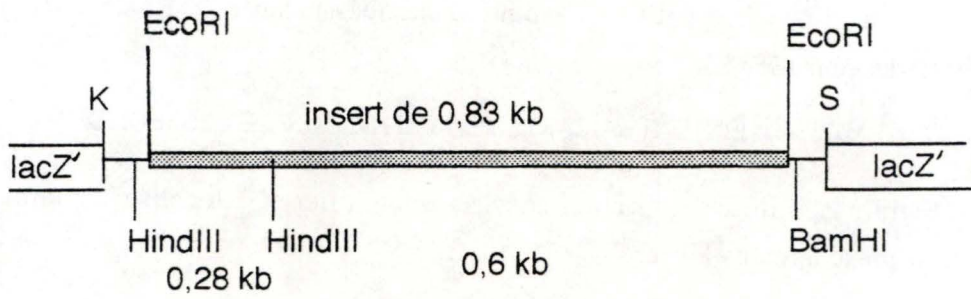
Etablir la carte de restriction consiste à identifier et à localiser certains sites de restriction présents dans l'insert.

L'ADN plasmidique utilisé dans ces restrictions a été obtenu par midiprep, selon la méthode Quiagen.

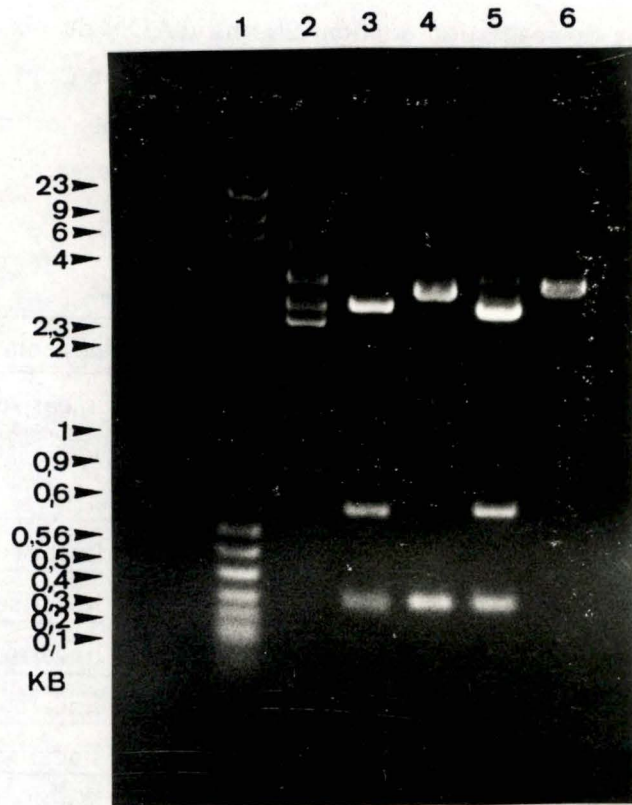
Les enzymes sélectionnées pour dresser la carte de restriction reconnaissent des sites uniques présents dans le site multiple de clonage du Bluescript. Si l'insert ne contient pas de site reconnu par une enzyme donnée, le plasmide sera simplement linéarisé. Si un second site est présent dans l'insert, un fragment, dont la taille est égale à la distance séparant ces deux sites, sera libéré.

Chaque mélange de restriction contient 200 ng d'ADN du plasmide pBBr25-1. Huit endonucléases ont été testées. Les mélanges de restriction ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose 0,8%. Les tailles des fragments, estimées à partir des étalons de taille II et VIII (Boehringer) (Fig IV-11) sont présentées dans le tableau suivant.

Enzyme	Restriction	taille estimée des fragments (kb)
EcoRI	partielle	3,7 = plasmide linéarisé 2,9 = matrice 0,8 = insert
SacI	totale	3,7 = plasmide linéarisé
KpnI		3,7 = plasmide linéarisé
SmaI		3,7 = plasmide linéarisé
EcoRV		3,7 = plasmide linéarisé
XbaI		3,7 = plasmide linéarisé
HindIII		3,5 = matrice du plasmide (2,9) et morceau de l'insert (0,6) 0,28 = fragment de restriction
BamHI		3,7 = plasmide linéarisé



**Figure IV.12.** Schéma de l'insert EcoRI-EcoRI d'environ 830 pb bordé du site de clonage du vecteur Bluescript. Les sites de restriction utilisés sont représentés. Les tailles en kb sont approximatives. K : KpnI. S : SacI.



**Figure IV.13.** Analyse en gel d'agarose 1,2% de l'ADN plasmidique pBBr25-1 restreint EcoRI (piste 2), EcoRI-HindIII (piste 3), HindIII (piste 4), EcoRI-BamHI (piste 5) et BamHI (piste 6). Piste 1, étalon de taille II et VIII.

L'insert ne contient donc qu'un site de restriction HindIII à plus ou moins 280 pb du site de la batterie de Bluescript. Les autres sites sont absents de l'insert.

Pour confirmer ce résultat, nous réalisons les doubles restrictions EcoRI-HindIII et HindIII-BamHI. La carte de la figure IV-12 permet de localiser ces différents sites sur l'insert. Le tableau ci-dessous donne les tailles des fragments attendus.

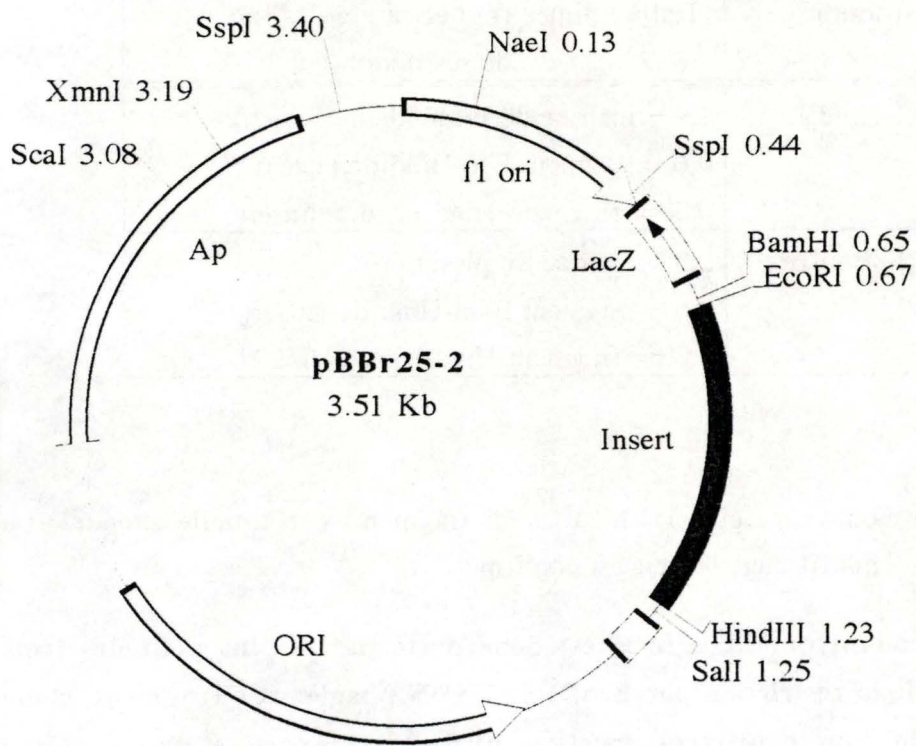
Restriction	Taille estimée (kb) et nature des fragments de restriction
EcoRI-HindIII	2,9 = matrice du plasmide 0,6 = fragment Eco-Hind de l'insert 0,28 = fragment Hind-Hind de l'insert
HindIII-BamHI	2,9 = matrice du plasmide 0,6 = fragment Bam-Hind de l'insert 0,28 = fragment Hind-Hind de l'insert

Comme le montre la figure IV-13, tous les fragments ont la taille attendue. La localisation du site HindIII dans l'insert est confirmée.

**Le gène codant pour l'AgBr25 est donc porté par le plus petit des trois fragments issus de la restriction par EcoRI de l'ADN phagien. Ce fragment, cloné dans le plasmide Bluescript (construction pBBR25-1) exprime une protéine reconnue par l'AcM Br25 qui présente un poids moléculaire identique à celui de la protéine native. Un site HindIII est présent dans l'insert, à environ 280 pb du site HindIII du site multiple de clonage du plasmide.**

### 3.3. SOUS-CLONAGE DE L'INSERT PAR DELETION DU FRAGMENT HINDIII-HINDIII

Le but de cette étape est de localiser le gène sur l'insert en éliminant le fragment HindIII-HindIII de 280 pb par la méthode de la self-ligation et de vérifier si l'insert réduit possède toujours le gène en entier, si donc des bactéries transformées par ce plasmide sont capables d'exprimer l'AgBr25.



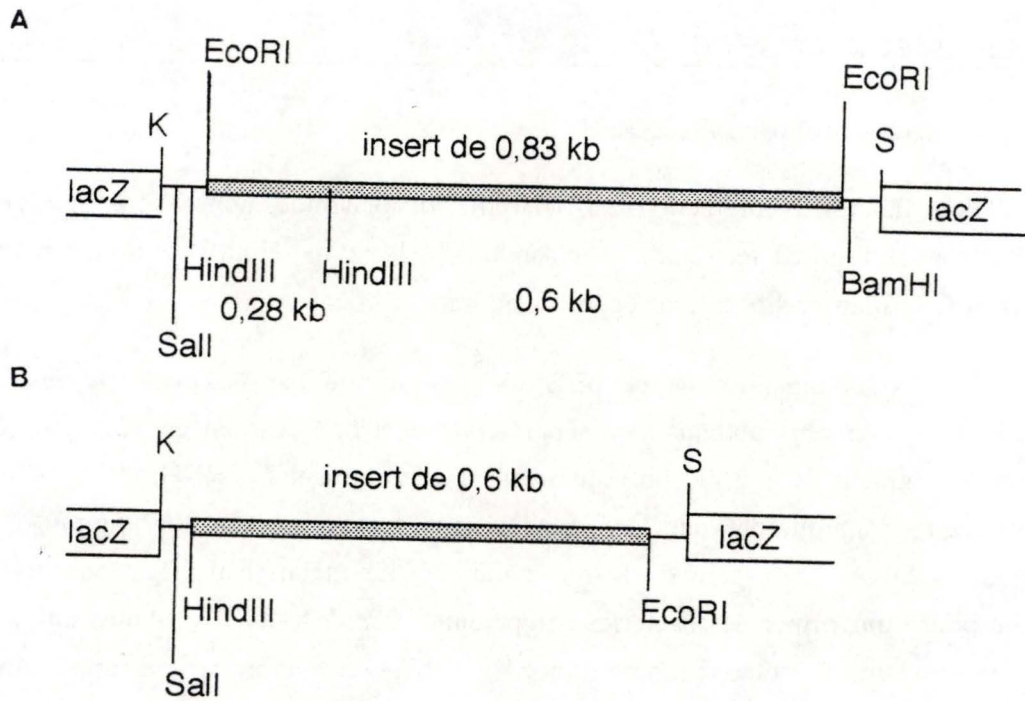
**Figure IV.14.** Carte de la construction pBBR25-2, obtenu par self-ligation de la construction pBBR25-1, après délétion du fragment HindIII-HindIII. Les sites de restriction sont exprimés en kb à partir de l'origine de réplication phagienne f1 (f1 ori). Ap, gène de résistance à l'ampicilline. ORI, origine de réplication. LacZ, gène de la  $\beta$ -galactosidase. Insert, fragment d'ADN de 0,6 kb résultant de la délétion.

#### A. SOUS CLONAGE DE L'INSERT

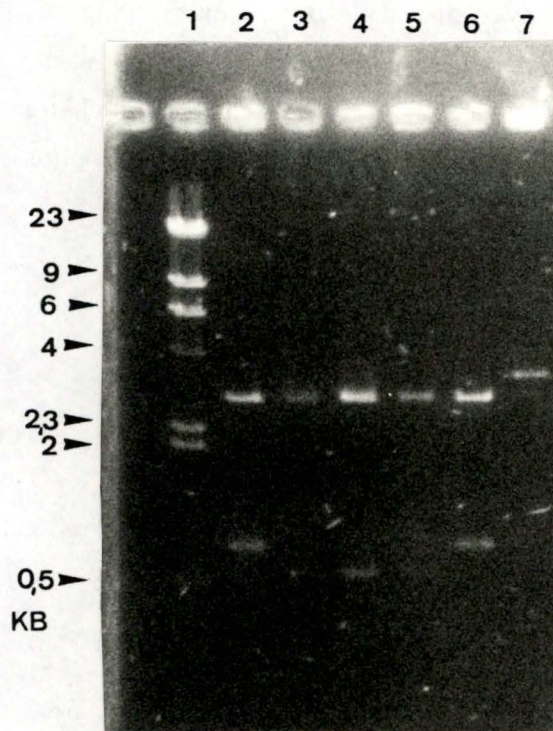
Pour déléter le fragment HindIII-HindIII du plasmide, nous avons opté pour la self-ligation. Il s'agit de restreindre le plasmide par l'enzyme HindIII et de recirculariser par ligation la matrice libérée par cette restriction.

De l'ADN plasmidique de pBBr25-1 est digéré par l'enzyme de restriction HindIII. Les fragments obtenus sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose 0,8%. Le grand fragment de  $\pm 3500$  pb (Bluescript avec fragment EcoRI-HindIII) est extrait du gel par la technique du geneclon. L'ADN ainsi récupéré est incubé une nuit à 16°C avec la T4 DNA ligase afin de le recirculariser. Le mélange de ligation est utilisé ensuite pour transformer des bactéries compétentes *E. coli* XL1 Blue. Après une nuit de croissance sur milieu sélectif (ampicilline, Xgal, IPTG), nous ne voyons apparaître que 8 colonies blanches et aucune bleue. Ceci s'explique par le fait que toutes les constructions devraient être recombinantes.

L'ADN plasmidique est extrait de ces colonies par miniprep et analysé par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%. Les plasmides extraits des huit colonies ont un même profil de migration qui diffère de celui du plasmide Bluescript natif. Nous en concluons que les huit colonies possèdent un plasmide recombinant. Nous décidons donc de poursuivre l'étude avec une seule des colonies. Pour vérifier la nature de la construction obtenue par self-ligation, des restrictions, simple et double, sont réalisées à la fois sur le plasmide pBBr25-1 et le plasmide obtenu par self-ligation (pBBr25-2-Fig IV-14). Les mélanges de restriction sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose 1,2%.



**Figure IV.15.** Schéma (A) de l'insert EcoRI-EcoRI d'environ 830 pb et (B) de l'insert EcoRI-HindIII de 0,6 kb, bordés du site de clonage du vecteur Bluescript. Les sites de restriction utilisés sont représentés. Les tailles en kb sont approximatives. K : KpnI. S : SmaI.



**Figure IV.16.** Analyse en gel d'agarose 1,2% de l'ADN plasmidique pBBr25-1 (piste 2,4,6) et pBBr25-2 (piste 3,5,7) restreint par EcoRI-SmaI (piste 2 et 3), EcoRI-HindIII (piste 4 et 5) et EcoRI (piste 6 et 7). Piste 1, étalon de taille II.

La figure IV-15 localise, dans les deux inserts, les sites de restriction utilisés. Les résultats sont présentés à la figure IV-16 et résumés dans le tableau ci-dessous.

Enzymes de restriction	Taille (kb) et nature des fragments	
	pBBR25-1	pBBR25-2
EcoRI	2,9 = matrice 0,83 = insert EcoRI-EcoRI	3,5 = Bluescript avec insert
EcoRI/HindIII	2,9 = matrice 0,6 = fragment EcoRI-HindIII 0,28 = fragment HindIII-HindIII (invisible)	2,9 = matrice 0,6 = fragment EcoRI-HindIII
EcoRI/Sall	2,9 = matrice 0,83 = fragment EcoRI-Sall	2,9 = Bluescript 0,6 = fragment EcoRI-Sall

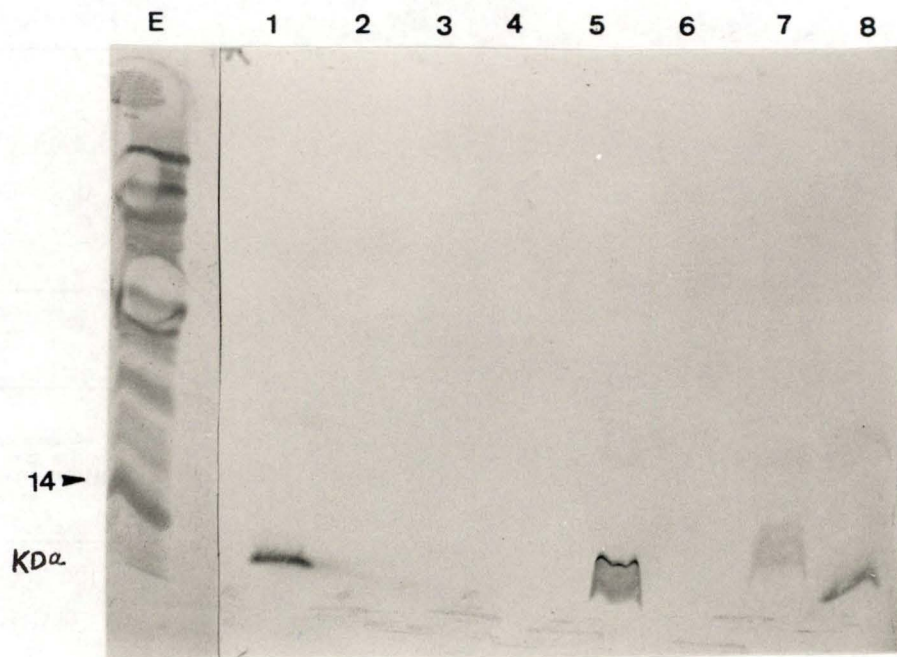
Ces résultats nous permettent d'affirmer que le sous-clone contient bien l'insert HindIII-EcoRI d'environ 0,6 kb. Dans l'étape suivante, nous avons testé l'influence de la délétion sur l'expression de l'AgBr25.

#### B. TEST D'EXPRESSION PAR LES BACTÉRIES TRANSFORMÉES PAR LE PLASMIDE PBBR25-2

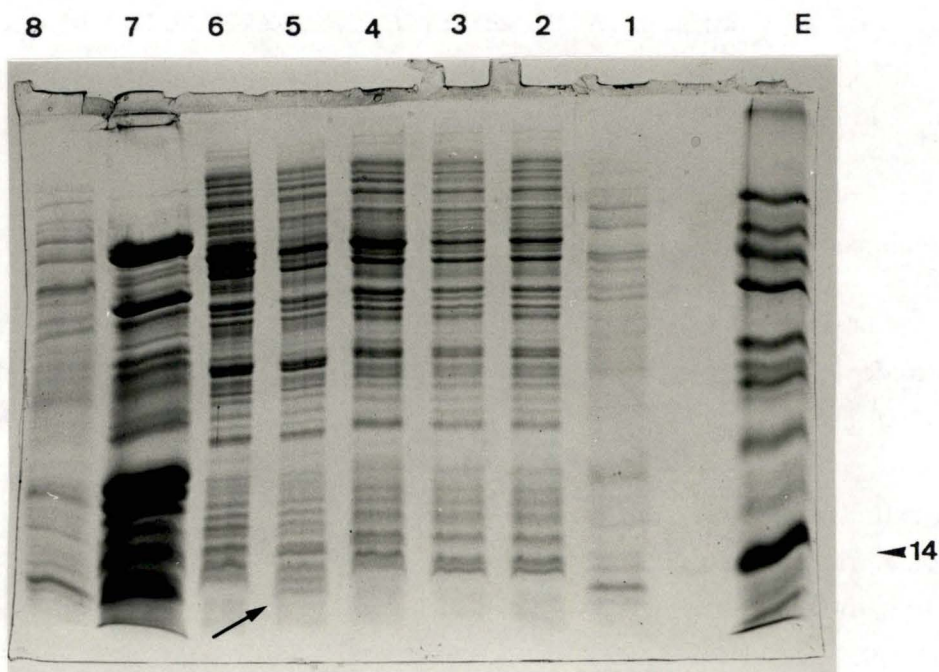
##### 1. Vérification de l'expression après SDS-PAGE et immunoblot

Comme précédemment, pour tester l'expression de l'AgBr25 par les bactéries recombinantes pBBR25-2, deux SDS-PAGE sont réalisés.

Les échantillons sont des extraits totaux de la colonie transformée par le plasmide pBBR25-2, préparés comme décrit dans la partie "Matériel et méthodes". Différentes quantités de cet échantillon sont déposées sur gel (10, 5 et 3  $\mu$ l). Les témoins positifs sont constitués du lysat SDS de *B. abortus* biovar 5 souche B3196 et des extraits ultrasoniqués de *B. melitensis* B115, d'une part, et de l'extrait total de la colonie transformée par pBBR25-1, d'autre part. Le témoin négatif est constitué de l'extrait total de la colonie transformée par le Bluescript déjà utilisé précédemment. Après électrophorèse, un des deux gels de polyacrylamide est coloré au bleu de coomassie, et l'autre est soumis à un immunoblot avec l'AcM Br25.



**Figure IV.17.** SDS-PAGE suivi d'un immunoblot avec l'AcM Br25 et RAM-phosphatase réalisé des extraits totaux de la colonie recombinante pBBr25-2 (20, 10 et 5  $\mu$ l de l'extrait, piste 2,3 et 4). Témoin positif, extrait total de la colonie recombinantes pBBr25-1 (piste 5) , extraits SDS de *B. abortus* biovar 5 B3196 (piste 1 et 8) et extraits ultrasoniqué de *B. melitensis* B115(7). Témoin négatif, colonie non recombinante(6)E, étalon de poids moléculaire.



**Figure IV.18.** Gel de polyacrylamide 15% après SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie. Mêmes échantillons et même disposition que la figure IV.17.

\*L'immunoblotting (Fig IV-17) montre que l'AcM Br25 ne reconnaît aucune bande dans l'extrait pBBR25-2 alors qu'il reconnaît la bande habituelle dans les témoins positifs.

\*La coloration au bleu de coomassie (Fig IV-18) ne révèle pas de différence de profil de migration entre les extraits de la colonie recombinante pBBR25-2 et les *E. coli* témoins. Seul l'extrait de la colonie recombinante pBBR25-1 (piste 5) contient une bande protéique supplémentaire de masse moléculaire inférieure à 14 kDa. Cette bande est absente des extraits de la colonie recombinante pBBR25-2 (pistes 2, 3 et 4) et du témoin négatif Bluescript (piste 6). Cette bande correspond donc probablement à l'AgBr25.

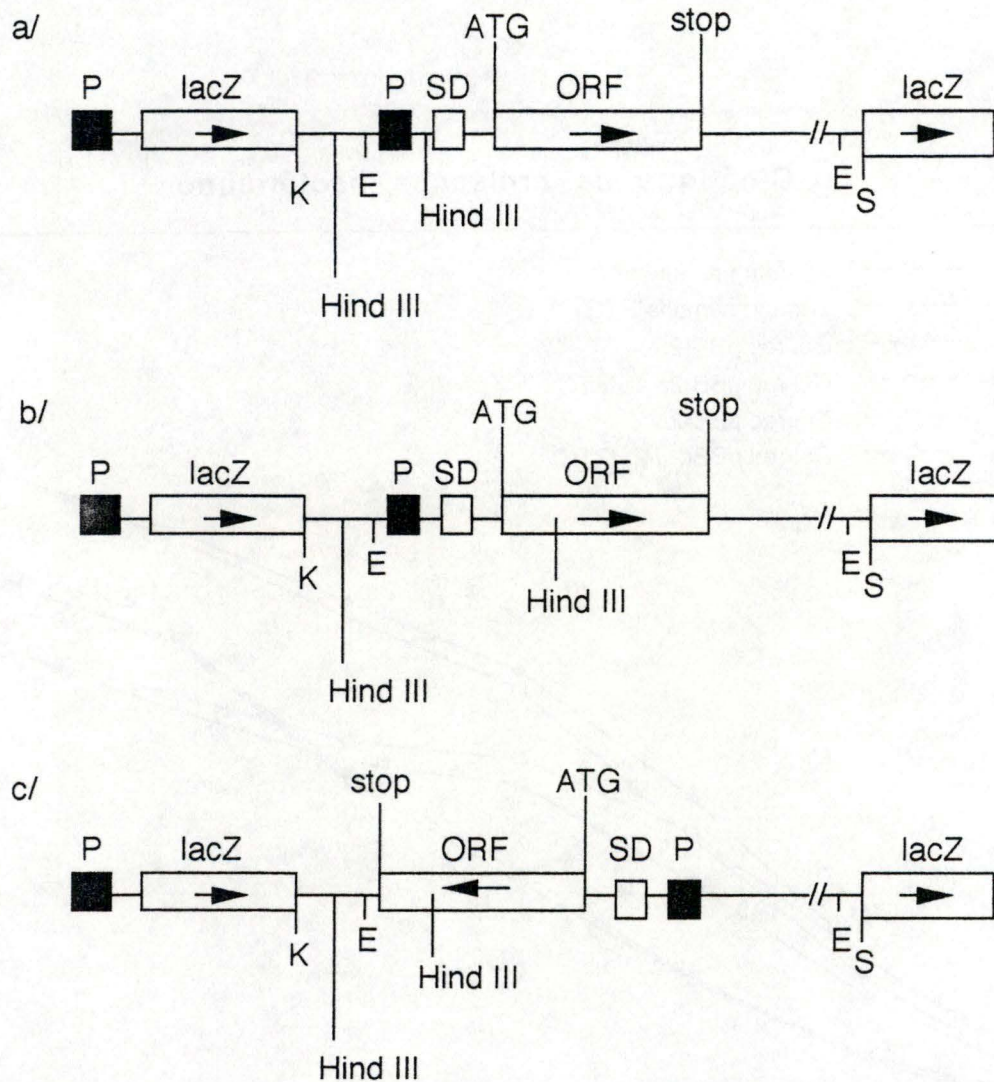
L'épitope reconnu par l'AcM Br25 n'est pas exprimé par la colonie recombinante pBBR25-2. Nous pouvons donc conclure que la délétion du fragment HindIII-HindIII altère d'une façon ou d'une autre l'intégrité du gène Br25. En fonction de l'orientation dans laquelle le gène a été cloné, par rapport au sens de lecture de l'ORF de lacZ, plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer l'absence d'expression de l'épitope reconnu par l'AcM Br25.

a/L'orientation des ORF de GBr25 et de lacZ est la même.

- La délétion du fragment HindIII-HindIII supprime le promoteur du GBr25, sans altérer ni l'ORF, ni l'ATG (premier codon), ni la séquence Shine-Dalgarno (signal pour le ribosome). Dès lors la phase ouverte de lecture est placée sous le contrôle du promoteur/opérateur de lacZ et l'expression de l'AgBr25 devient IPTG dépendante (Fig IV-19 a).
- La délétion du fragment HindIII-HindIII ôte à la fois la séquence promotrice et l'extrémité 5' de l'ORF. IL n'y a plus de possibilité d'obtenir un protéine entière. Cependant, et à la condition unique que les deux ORF soient dans la même phase de lecture, il peut y avoir expression, en conditions inductrices, d'une protéine de fusion entre l'AgBr25 et la  $\beta$ -galactosidase. Si c'est le cas, l'AcM Br25 ne reconnaîtra la protéine que si la partie codante pour l'épitope n'a pas disparu avec la délétion (Fig IV-19 b).

b/ Les deux ORF sont en sens opposé.

Dans ce cas, il y a délétion d'un fragment à l'extrémité 3' du gène. L'expression est maintenue à partir du promoteur propre de GBr25, mais



**Figure IV.19.** Schéma de la position hypothétique du gène GBr25 dans l'insert EcoRI-EcoRI, bordé du gène lacZ' du Bluescript. a/ et b/, ORF de GBr25 et de lacZ dans le même sens. c/ les deux ORF sont en sens opposé.

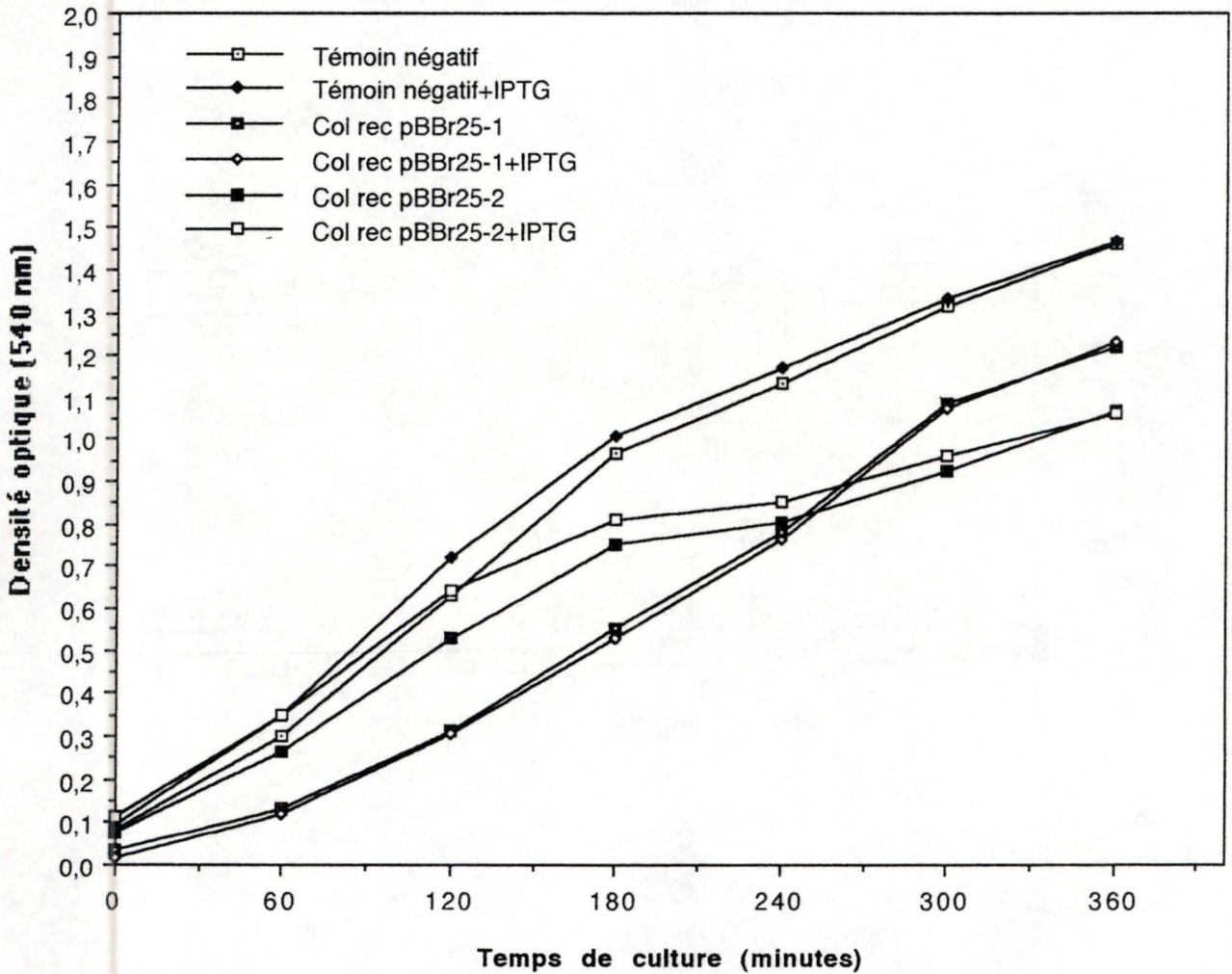
a/Site HindIII de l'insert localisé entre le promoteur et la séquence SD de GBr25.

b/Site HindIII localisé dans l'ORF du gène GBr25.

c/Les deux ORF sont en orientation opposée. Le site HindIII situé dans l'ORF de Gbr25.

E : EcoRI; K : KpnI; S : Sac I; P : promoteur; SD : séquence Shine Dalgarno; ATG : codon initiateur; STOP : terminateur de traduction. Les proportions des différents fragments ne sont pas respectées.

### Cinétique de croissance bactérienne



**Figure IV.20.** Cinétique de croissance bactérienne pour les différentes colonies. Témoin négatif, *E. coli* compétentes transformées par un plasmide non recombinant. Col rec pBBr25, colonie de bactéries transformées par le plasmide pBBr25-1. Col rec pBBr25-2, colonie de bactéries transformées par le plasmide pBBr25-2. + IPTG, addition d'IPTG 1,5 mM lorsque la DO dépasse 0,3.

la disparition de la séquence codant pour l'épitope de l'AcM Br25 ne permet plus de mettre l'antigène en évidence (Figure IV-19 c)

## 2. Influence de l'IPTG sur l'expression de l'AgBr25 par le sous-clone pBBr25-2

Pour tester l'hypothèse selon laquelle la délétion du fragment HindIII-HindIII prive le gène de l'AgBr25 de son promoteur et le place sous la dépendance du promoteur de lacZ, nous avons étudié l'évolution de la croissance et de l'expression de l'antigène par les différentes constructions obtenues jusqu'à présent en fonction du temps de culture et de la présence d'IPTG, inducteur de lacZ.

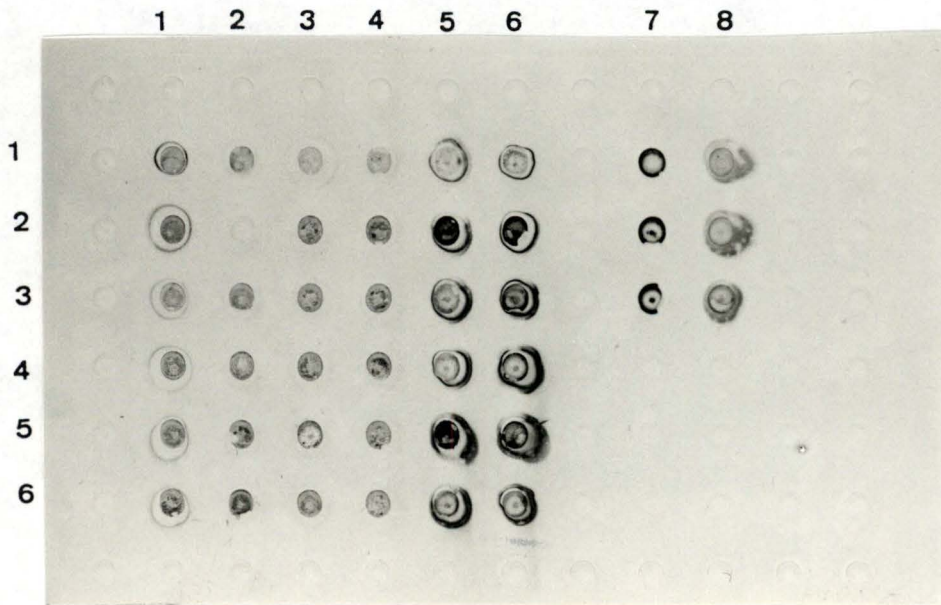
Pour ce faire, nous avonsensemencé 40 ml de milieu liquide (LB + ampicilline) avec quelques ml d'une préculture des colonies recombinantes pBBr25-1, pBBr25-2 et du témoin négatif transformé par le Bluescript natif. Lorsque la DO<sub>540</sub> approche 0,3, les cultures sont réparties en deux fioles, l'une recevant de l'IPTG à une concentration finale de 1,5 mM. Toutes les heures un échantillon est prélevé et la DO<sub>540</sub> est mesurée. La présence de l'AgBr25 est analysée, après lyse, par Dot Blot sur ces échantillons.

### - Etude de la cinétique de croissance bactérienne

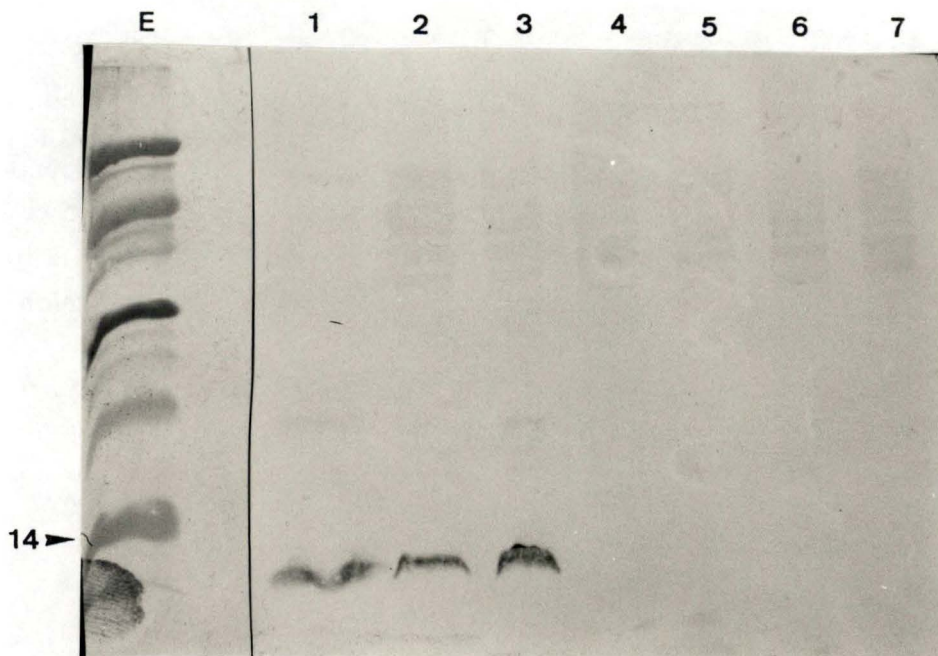
La figure IV-20 montre qu'il n'y a pas d'influence de l'IPTG sur la croissance, quelles que soient les bactéries transformantes. Par contre si nous comparons les transformants entre-eux, les bactéries recombinantes marquent un retard de croissance par rapport à la non-recombinante. Cependant, la croissance n'a pas encore atteint de plateau et il est possible que les 6 cultures bactériennes atteignent la même DO après des temps de culture différents.

### - Etude de l'expression

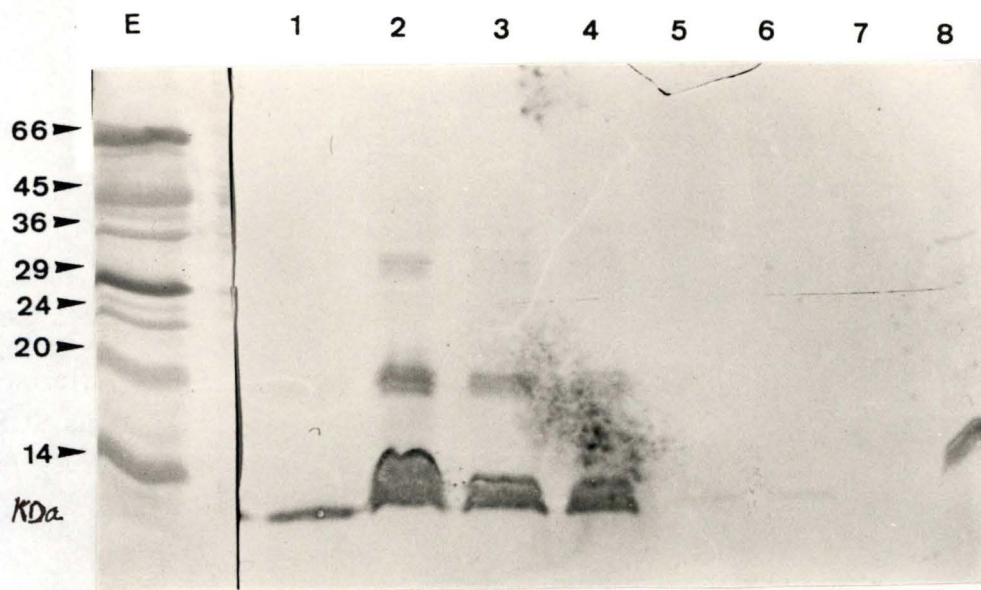
La présence de l'AgBr25 dans les différentes colonies est étudiée par la méthode du Dot Blot. Toutes les heures, un ml de chaque culture est prélevé et centrifugé. Le culot bactérien est lysé par du tampon STET. Dix  $\mu$ l du lysat sont déposés sur la nitrocellulose. La membrane est alors criblée par l'AcMBr25. La fig IV-21 montre que le recombinant pBBr25-1 est le seul à exprimer l'AgBr25 et que la quantité exprimée augmente avec le temps (colonne 5 et 6). Aucune expression n'est détectée dans les extraits des bactéries recombinantes pBBr25-2, ni dans les extraits bactériens témoins. L'anneau visible à la colonne 1 est un artéfact, ceci est



**Figure IV.21.** Dot Blot criblé à l'AcM Br25 et RAM-phosphatase, réalisé à partir des colonies recombinantes pBBR25-1 (colonne 5 et 6), pBBR25-2 (colonne 1 et 2) et non recombinantes (colonne 3 et 4). De la ligne 1 à la ligne 6, prélèvements effectués de la 1<sup>ère</sup> à la 6<sup>ème</sup> heure. 10  $\mu$ l de lysat sont déposés. Témoin positif, extraits SDS de *B. abortus* biovar 5 B3196 (colonne 7) et extraits ultrasoniqués de *B. melitensis* B115 (colonne 8); 100, 50 et 20  $\mu$ g de protéines déposés (ligne 1,2,3).



**Figure IV.22.** SDS-PAGE suivi d'un immunoblot avec l'AcM Br25 et RAM-phosphatase réalisé sur les extraits de colonies récoltés à la 5<sup>ème</sup> heure de culture du Dot Blot. Colonie recombinante pBBR25-1 et équivalent avec IPTG (piste 2 et 3). Colonie recombinante pBBR25-2 et équivalent avec IPTG (piste 4 et 5). Colonie non recombinante et équivalent avec IPTG (piste 6 et 7). Piste 1, témoin positif *B. abortus* biovar 5 B3196. E. étalon de poids moléculaire.



**Figure IV.23.** SDS-PAGE suivi d'un immunoblot avec l'AcM Br25 et RAM-phosphatase réalisé sur les fractions obtenues à partir de la colonie recombinante pBBr25-1. Piste 1 et 8, témoin positif *B. abortus* biovar 5 B3196. 30, 15 et 7,5  $\mu\text{g}$  de protéines de la fraction PI (piste 2, 3 et 4). 30 et 15  $\mu\text{g}$  de protéines de la fraction PS (piste 5 et 6). 50  $\mu\text{g}$  de protéines de la fraction PP (piste 7). E : étalon de poids moléculaire.

confirmé par immunoblot (Figure IV-22). Ces résultats confirment ceux obtenus lors de l'immunoblot.

Aux temps de culture et aux concentrations d'IPTG utilisées, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'expression de l'AgBr25 par le recombinant pBBr25. Il est donc vraisemblable que le sous-clone n'exprime pas l'épitope reconnu par l'AcM Br25. Nous pouvons donc dire que le site HindIII se localise à l'intérieur de l'ORF de GBr25.

**Pour résumer cette partie, nous avons obtenu par délétion du fragment HindIII-HindIII présent sur l'insert initial, un sous-clone contenant un fragment de 0,6 kb. L'AgBr25 n'est plus identifié dans des extraits de bactéries transformées avec ce sous-clone. L'IPTG n'influence ni la croissance bactérienne ni l'expression de l'antigène par les bactéries recombinantes. Il est dès lors probable que le site HindIII se localise dans l'ORF de GBr25.**

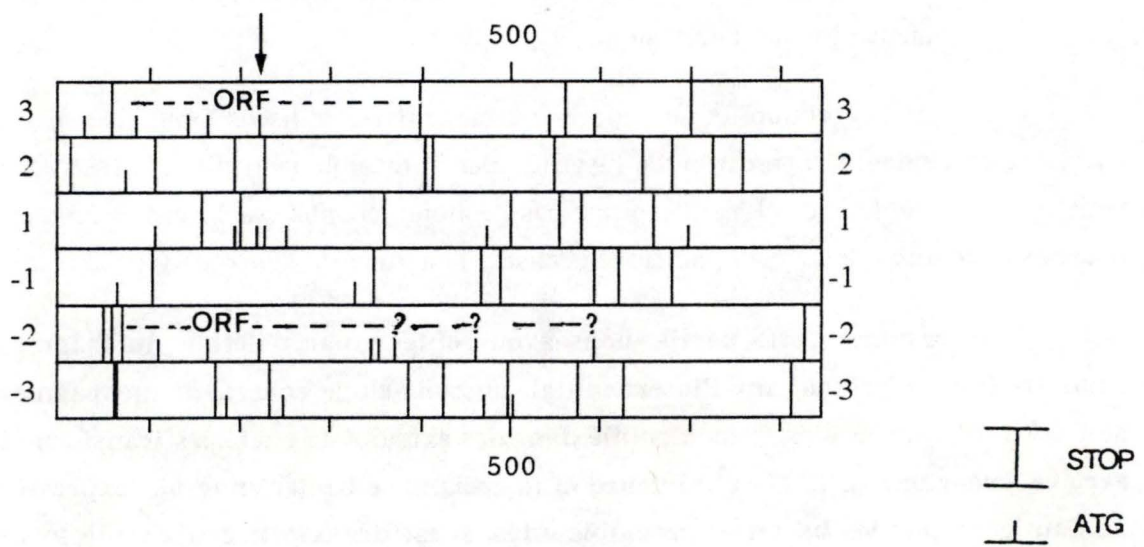
### **3.4. LOCALISATION DE L'AGBR25 CHEZ LES BACTERIES RECOMBINANTES**



Des arguments expérimentaux indiquent que l'AgBr25 serait localisé en surface de *B. abortus* 45/20 entières. Nous avons tenté de vérifier si l'antigène exprimé par les bactéries recombinantes pBBr25-1 conserve les mêmes propriétés de localisation en surface.

Quarante ml d'une culture d'*E. coli* recombinantes sont utilisés dans un fractionnement, afin de séparer en trois fractions distinctes les protéines insolubles (fraction PI - majoritairement protéines de la paroi), les protéines solubles (fraction PS - protéines cytoplasmiques) et les protéines périplasmiques (PP).

Différentes quantités de protéines issues de ces fractions sont déposées sur gel (concentration protéique estimée par dosage au BCA). Après SDS-PAGE, un immunoblot est réalisé avec l'AcM Br25. Un extrait total de bactéries recombinantes pBBr25-1, et un extrait SDS de *B. abortus* biovar 5 B3196 sont utilisés comme témoins positifs (Fig IV-23).

L'AgBr25 se retrouve majoritairement dans la fraction PI. Par contre il n'y a aucun signal significatif dans les deux autres fractions. Comme dans le cas de *B. abortus* 45/20, nous retrouvons une série de trois bandes, ayant des masses moléculaires



**Figure IV.24.** Résultats schématique de la recherche d'ORF dans la séquence de l'insert EcoRI-EcoRI d'environ 830 pb. Position des codons ATG (  ) et des codons STOP -TGA, TAG, TAA- (  ) dans les six phases de lecture.

500, position du nucléotide dans la séquence.

3 à -3, numéro de phase de lecture.

La flèche indique la position du site HindIII dans la séquence.

Phase de lecture	Nombre d'ORF	Taille approximative de la protéine (Da)	Séquence de Shine Dalgarno AGGAGG
+3	1	11200	AT <b><u>GGAGATTGGAAATG</u></b>
-2	1	19400	GGC <b><u>GGATTGCCATG</u></b>
		14300	ATGCGTAAAG <b><u>ATG</u></b>
		10922	GTGCGCAGCC <b><u>GATG</u></b>

**Tableau IV-2.** Résultats de la recherche d'ORF, après séquençage. Seules deux ORF sont possibles, dont une de taille imprécise. L'ATG considéré comme début d'ORF est en gras. Les séquences Shine Dalgarno conservées sont en gras et souligné.

estimées du même ordre de grandeur que chez *B. abortus* : inférieur à 14 kDa, 20 kDa et supérieur à 29 kDa.

Des essais de localisation de l'antigène sur bactéries entières avec l'AcM Br25, qui avaient clairement localisé l'AgBr25 en surface de *Brucella abortus* 45/20, n'ont donné aucun résultat significatif chez *E. coli*. La confirmation de la localisation pourrait être apportée par microscopie électronique.

**La fraction des protéines insolubles est enrichie en AgBr25. Ceci signifie que, très probablement, l'antigène est localisé en paroi chez les bactéries recombinantes pBBR25-1, comme il l'est chez *B. abortus*, mais nous ignorons s'il est exprimé en surface chez *E. coli* recombinante.**

### 3.5. RECHERCHE D'ORF DANS LA SEQUENCE DE L'INSERT (49)

L'insert de 0,83 kb a été séquencé par Innogenetics s.a. (Ghent), sous la direction du Dr Saman.

Les résultats du séquençage étant confidentiels, nous n'exposons qu'une recherche d'ORF. La figure IV-24 présente les résultats de la recherche effectuée dans les six phases de lecture possibles (trois phases de lecture par brin d'ADN). La taille estimée de l'ORF codant pour l'AgBr25 étant de 420 pb, nous ne considérerons que les ORF suffisamment grandes.

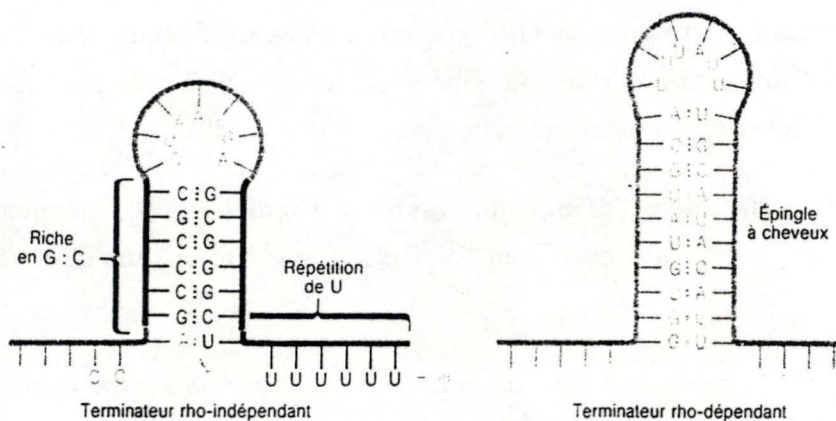
Le tableau IV-2 résume les ORF possibles. Deux ORF sont présentes, une dans la phase +3 et l'autre dans la phase -2. Une seule de ces ORF code pour l'AgBr25. La suite du travail consistera à identifier cette ORF.

Les résultats de la délétion du fragment HindIII-HindIII ne peuvent nous indiquer laquelle de ces ORF code pour l'AgBr25, car le site se situe dans chacune des deux.

Trois ATG (premier codon traduit) peuvent être considérés comme étant le début de l'ORF située en phase -2. Ne pouvant définir quel ATG est effectivement le premier, trois tailles d'ORF sont possibles, donnant des protéines de taille décroissante (19,4, 14,3 et 10,9 kDa). La recherche d'une séquence de Shine-Dalgarno nous donnera des informations supplémentaires sur le rôle éventuel de chaque ATG dans la traduction.

séquence en amont de l'ATG initiateur	gène
TGTAAGGAGAATGCC ATG	OMP25 (de Wergifosse, 1992)
GACTGGAGGTCAGAA ATG	OMP36 2b (Ficht <i>et al.</i> , 1989)
GACTGGAGGTCAGAA ATG GGAAGAGGACTGGTATT ATG TTCCCAGGAGAGTAAA ATG CCAAGGGTTATACC ATG	OMP36 2a (Ficht <i>et al.</i> , 1989) 31 kDa (Mayfield <i>et al.</i> , 1988) GroEL (Lin <i>et al.</i> , 1992) GroES (Lin <i>et al.</i> , 1992)
AAGGAGCTCTGGCCC ATG	OMP 16,5 (Tibor, com. pers.)
CAAATGGAGAACCTG ATG	OMP 19 3d ATG (Tibor, com. pers.)

**Tableau IV-3.** Homologies entre les séquences en amont de l'ATG initiateur des gènes de *Brucella* séquencés et l'extrémité 3' de l'ARNr 16S de *E. coli* (3' AUUCCUCCA 5').



**Figure IV.25.** Exemple de terminateur de transcription rho dépendant, et rho indépendante chez *E. coli*.

Les sites d'initiation de la traduction des ARNm de *E. coli* contiennent une séquence complémentaire d'une partie d'un hexanucléotide (3'..UCCUCC..5') situé près de l'extrémité 3' de l'ARNr 16S d'*E. coli*. Ainsi l'ARNm bactérien contient une partie au moins de l'hexamère (le plus couramment 4 à 5 bases) 5'...AGGAGG...3'. Cette séquence est connue sous le nom de séquence de Shine-Dalgarno (SD). Elle se situe environ 7 bases avant l'ATG initiateur. Elle sert probablement au positionnement du ribosome sur l'ARNm lors de l'initiation de la traduction.

Le tableau IV-3 montre les homologies de séquence avec la Shine-Dalgarno présentent en amont de l'ATG initiateur des gènes de *Brucella* séquencés. Ces données nous permettent de penser qu'une séquence équivalente à la séquence SD serait présente chez *Brucella*. De plus, tout comme GBr25, ces gènes de *Brucella* clonés dans *E. coli* s'y expriment. La machinerie traductionnelle d'*E. coli* trouve donc sur les ARNm transcrits à partir des gènes de *Brucella* les signaux nécessaires à son fonctionnement

En recherchant en amont des quatre ATG des homologies avec la séquence de Shine-Dalgarno, nous constatons que la plus grande des ORF de la phase -2 et l'ORF présente dans la phase +3 montrent respectivement 3 et 4 bases homologues à SD et placées à une distance adéquate de l'ATG.

Nous avons aussi exploité la séquence nucléotidique de l'insert en la soumettant à une recherche de terminateur de transcription (Terminator GCG program). Les séquences de terminateurs de transcription d'*E. coli* contiennent des régions palindromiques (répétitions inversées séparées par une courte distance) qui forment des épingles à cheveux (de longueur variant entre 7 et 20 pb) dans la structure secondaire de l'ARN qui est en train d'être transcrit (Fig. IV-25).

Dans la séquence de l'insert, un terminateur potentiel est mis en évidence 26 nucléotides en aval du codon STOP de l'ORF de la phase +3. Les répétitions inversées pourraient former la tige longue de 12 pb (dont 7 G-C) d'une épingle à cheveux dont la boucle serait faite de 3 bases. Ce palindrome se termine par la répétition de 4 résidus T, alors que les terminateurs dits rho-indépendants sont suivis d'une queue d'environ 6 résidus T.

On peut considérer que la présence de 4 nucléotides homologues à la SD en amont de l'ATG et d'un terminateur potentiel en aval du codon STOP sont 2 arguments en faveur de l'ORF de la phase +3.

Des expériences complémentaires (voir Perspectives) apporteront une réponse définitive à cette identification d'ORF.

Les séquences protéiques déduites de chaque ORF ont été comparées à la banque de séquences Swissprot (FastA GCG program). Aucune homologie significative n'est apparue. Ajoutons encore qu'aucune des séquences déduites ne présente du côté N-terminal les caractéristiques d'un peptide signal d'exportation.

**A partir de la séquence, nous avons localisé deux ORF codant pour des protéines de masse moléculaire supérieure à 10000 Da et ayant des phases de lecture différentes. L'une d'elle contient trois ATG codons initiateurs potentiels de traduction. Il n'est pas possible actuellement de savoir quelle ORF exprime effectivement l'AgBr25, car le site Hind III se localise dans chacune d'elles. La présence éventuelle d'une séquence SD et d'un terminateur de transcription est discutée. Des expériences en cours et développées dans le chapitre "Perspectives" permettront d'identifier l'ORF codant pour l'AgBr25.**

### 3.6. CONCLUSIONS

Nous avons, isolé à partir d'une banque génomique de *B. abortus* construite dans  $\lambda$ gt11, deux phages porteurs d'un insert identique d'environ 6 kb. Cet insert code pour l'AgBr25. La restriction de l'ADN phagien par EcoRI coupe l'insert en trois fragments. En tentant de cloner chacun des trois fragments dans le plasmide Bluescript, nous n'avons obtenu qu'une seule construction recombinante. Le plasmide contenait au site EcoRI le fragment le plus petit, dont la taille est estimée à 830 pb. Cette construction est appelée pBBr25-1. Les bactéries transformées par ce plasmide recombinant expriment l'AgBr25. Le profil d'expression est le même que celui observé à partir de *Brucella*. L'expression de l'AgBr25 est indépendante de l'IPTG, ce qui suppose que la région promotrice du gène est présente sur l'insert et que l'expression est initiée à partir de celle-ci. La carte de restriction de ce fragment localise un site HindIII à 280 pb du site HindIII présent dans le site multiple de clonage du Bluescript.

Par délétion, chez pBBr25-1, de ce fragment HindIII-HindIII de 0,28 kb, nous obtenons la construction pBBR25-2. Les bactéries transformées par cette construction n'expriment plus l'AgBr25. L'IPTG ne peut restaurer l'expression de l'antigène. Nous en concluons que le site HindIII se situe dans la phase codante de GBr25.

L'antigène exprimé par les bactéries transformantes pBBR25-1 se localise, comme chez les *Brucellae*, dans la fraction des protéines insolubles, ce qui indique que l'antigène est présent dans la paroi de ces deux bactéries Gram négatives.

Le séquençage a permis de localiser deux ORF potentielles codant pour une protéine de taille supérieure à 10000 Da. Le site HindIII est présent dans chacune d'elle, il est dès lors trop tôt pour se prononcer sur l'ORF réellement exprimée, toutefois des signaux d'expression potentiels (SD et terminateur) sont présents pour une des ORF seulement.

---

---

**PARTIE V**

**CONCLUSIONS ET  
PERSPECTIVES**

---

## CONCLUSIONS GÉNÉRALES

### 1/ DISTRIBUTION DE L'AGBR25 DANS LES DIFFÉRENTES SOUCHES DE *BRUCELLA*.

Nous avons mis en évidence l'AgBr25 dans les souches de *Brucella* testées, représentant toutes les espèces et leurs biovars, excepté chez *B. ovis*. Cet AgBr25 n'est pas détecté chez *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella urbana*, *Pseudomonas maltophilia*, *Pasteurella multocida* ni chez *Escherichia coli* O:157, bactéries susceptibles d'engendrer des réactions croisées avec les bactéries du genre *Brucella*. L'antigène est présent dans deux souches vaccinales : *B. abortus* 45/20 et B19.

### 2/ CARACTÉRISATION DE L'AGBR25

Nous avons localisé l'AgBr25 dans la fraction des protéines insolubles après la lyse des *Brucellae*, mais l'antigène est solubilisé, en partie du moins, dans le SDS. L'antigène se trouve donc probablement associé à des éléments de la paroi solubles dans le SDS. L'immunodétection sur *Brucellae* entières semble indiquer que l'AgBr25 est localisé en surface des bactéries. Ces résultats nécessitent confirmation par d'autres techniques.

L'immunoblotting avec l'AcM Br25 des protéines solubles dans le SDS fait apparaître un profil de bandes multiples. Soumettre les échantillons à des conditions plus dénaturantes (temps d'ébullition, concentration en SDS) ne modifie pas ce profil. De même, il est conservé en présence d'agent réducteur ( $\beta$ -mercaptoéthanol) ou d'agent bloquant les radicaux thiols, responsables des ponts disulfures (iodoacétamide). Ces données ne nous permettent pas de conclure à l'existence d'une association multimérique par liaisons faibles ou ponts disulfures. La nature de ces bandes multiples reste donc indéterminée.

### 3/ CLONAGE DU GÈNE

A partir d'une banque génomique de *B. abortus* construite dans  $\lambda$ gt11, nous avons isolé deux phages recombinants exprimant l'épitope reconnu par l'AcM Br25.

L'insert présent dans ces phages, d'une taille approximative de 6 kb, contient deux sites EcoRI internes. Nous avons réalisé le clonage dans le plasmide Bluescript du plus petit fragment issu de la restriction EcoRI de l'ADN phagien. Les bactéries transformées par ce plasmide recombinant expriment un antigène reconnu par l'AcM

Br25. Cet antigène a un poids moléculaire estimé identique à celui de la protéine native et il semble qu'il s'exprime à partir de son propre promoteur.

Cet insert possède un site de restriction HindIII situé à environ 280 pd du site HindIII du plasmide. Après délétion de ce fragment HindIII-HindIII, nous ne détectons plus l'expression de l'AgBr25, pas même en présence d'IPTG, inducteur de lacZ. Nous en concluons que le site HindIII est situé dans le gène.

L'antigène produit par les bactéries recombinantes se localise comme chez *Brucella* au niveau de la paroi et présente en immunoblot le même profil de bandes multiples.

## PERSPECTIVES

L'anticorps monoclonal Br25 permet d'identifier un épitope localisé sur une protéine présente chez les principales espèces infectieuses de *Brucella*. D'après les résultats de Limet *et al* (communication personnelle) l'efficacité de l'ELISA sandwich utilisant l'AcM Br25 est comparable à celle de l'ELISA LPS, avec toutefois un léger retard dans la détection. La même équipe a montré, par ELISA, que le taux d'anticorps sériques dirigés contre l'AgBr25 augmentait de façon significative après infection, chez des animaux vaccinés par *B. melitensis* H38. Ces résultats expliquent l'intérêt porté à l'AgBr25.

Le séquençage de l'insert codant pour l'AgBr25 a permis de localiser deux ORF. Deux approches seront utilisées pour identifier l'ORF codant pour l'AgBr25. Chaque ORF est sous-clonée dans un vecteur d'expression. La reconnaissance du produit d'expression par l'AcM Br25 sera testée et permettra de définir l'ORF.

D'autre part, la bande protéique supplémentaire présente dans les extraits d'*E. coli* recombinantes correspond probablement à l'AgBr25 recombinant. Cette bande protéique peut être extraite d'un gel polyacrylamide puis son extrémité NH<sub>2</sub>-terminale séquencée. La protéine peut aussi être clivée et des fragments internes séquencés. La séquence en acides aminés obtenue permettra d'identifier l'ORF codant pour l'AgBr25.

Une fois l'ORF identifiée, il sera possible de localiser les différents signaux de transcription (promoteur, signaux de terminaison) et de traduction. Ceci permettra de confirmer l'une ou l'autre hypothèse émise au cours du travail.

La conservation de cette séquence entre les espèces et les biovars pourra être testée par la technique du RFLP. La comparaison des profils de restriction permettra peut être d'expliquer les variations d'expression observées par immunoblot sur les souches testées.

Le gène cloné dans un vecteur d'expression permettra de surexprimer la protéine et de la purifier. L'immunogénicité de l'AgBr25 pourra alors être évaluée.

La capacité à détecter une infection pourra être testée par ELISA indirect sur des sérums d'animaux infectés. Par la même technique, la précocité et la sensibilité du test pourra être comparée à celle de l'ELISA LPS, afin de confirmer les résultats préliminaires. De même, l'usage de sérums d'animaux infectés par les souches connues pour croiser avec *Brucella* permettra d'éprouver la spécificité de la technique. La comparaison des résultats obtenus sur des sérums d'animaux infectés et d'animaux vaccinés et infectés permettra d'estimer le pouvoir discriminatif de l'ELISA Br25. Si l'AgBr25 ne se révélait pas spécifique, il resterait la possibilité d'identifier les épitopes.

L'essai en intradermoréaction de l'AgBr25 sur des animaux infectés permettrait d'évaluer la réponse cellulaire induite contre cet antigène.

La délétion du gène chez une souche vaccinale est l'approche la plus probable pour l'établissement d'un vaccin et d'un diagnostic compatible. Si les délétants sont viables et que le pouvoir protecteur de la souche vaccinale n'est pas altéré, le diagnostic pourra être basé, en partie, sur cet antigène. La délétion d'un gène chez une souche infectieuse est un des moyens utilisés pour étudier la fonction de la protéine chez *Brucella*. Si la délétion du gène codant pour l'AgBr25 réduit la pathogénicité, nous pourrions conclure que l'AgBr25 est un facteur responsable de la virulence.

Le travail présenté ici complète les résultats de Limet *et al* à propos de l'AgBr25. Les informations obtenues permettent d'envisager l'étape suivante qui consiste à éprouver l'AgBr25 comme outil de diagnostic ou de vaccination. S'il s'avère efficace, nous aurons effectué un grand pas vers la résolution du problème posé par la brucellose

---

**PARTIE VI**

**BIBLIOGRAPHIE**

---

1. Adams G. 1990.  
Advances in brucellosis research.  
Texas A & M University Press.
  2. Allardet Servent A. J., Carles Nurit M. J., Bourg M., Michaut S. and Ramuz M. 1991.  
Physical map of the *Brucella melitensis* 16 M chromosome.  
Journal of Bacteriology, 173 : 2219-2224.
  3. Alton G. G., Jonas L. M., Angus R. D. and Verger J. M. 1988.  
Techniques for the brucellosis laboratory.  
INRA, Paris.
  4. Anonyme. 1977.  
Brucellosis : a veterinarian's guide to the litterature.  
Ministry of agriculture and fisheries. New Zealand.
  5. Anonyme. 1992.  
Brucellose bovine : nouvelles mesures de lutte de puis le 1<sup>er</sup> octobre.  
Le Sillon Belge du 09-10-92.
  6. Anonyme. 1992.  
La lutte contre la leucose et la brucellose bovine  
Le Sillon Belge du 04-09-92.
  7. Araya L. N. and Winter A. J. 1990.  
Comparative protection of mice against virulent and attenuated strains of *B. abortus*  
by passive transfer of immune T cells or serum.  
Infect Immun, 58 : 254-256.
  8. Araya L. N., Elzer P. H., Rowe G. E., Enright F. M. and Winter A. J. 1989.  
Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in BalB/C  
mice infected with *B. abortus*.  
The Journal of Immunology, 143 : 3330-3337.
  9. Bang B. 1897.  
The ethiology of epizootic abortion.  
J. Comp Path, 10 : 125-149.
  10. Bricker B. J., Tabatabaï L. B., Deyoe B. L. and Mayfield J. E. 1988.  
Conservation of antigenicity in a 31 kDa protein.  
Vet Microbiol, 18 : 313-325.
  11. Bricker B. J., Tabatabaï L. B., Judge B. A., Deyoe B. L. and Mayfield J. E. 1990.  
Cloning, expression and occurrence of the *Brucella* copper-zinc superoxyde  
dismutase.  
Infect Immun, 58 : 2935-2939.
  12. Brocard H. 1955.  
Les brucelloses.  
In "Maladies infectieuses", Bastin R. Editions Flammarion, 1155-1219.
-

13. Brooks-Worrell B. M. and Splitter G. A. 1992.  
Antigens of *Brucella abortus* S 19 immunodominant for bovine lymphocytes as identified by one and two dimensional cellular immunoblotting.  
*Infect Immun*, 60 : 2459-2464.
  14. Bruce D. 1887.  
Notes on the discovery of a microorganism in Malta fever.  
*Practitioner*, 39 : 161-170.
  15. Canning P.C.  
Phagocyte fusion in resistance to brucellosis.  
*In "Advances in brucellosis research"*, Adams L. G., Texas A & M, University Press : 157-163.
  16. Caroff M., Bundle B. R., Perry M. B., Cherwonogrodzky J. W. and Duncan J. R. 1984  
Antigenic S-type lipopolysaccharide of *Brucella abortus* 1119-3.  
*Infect Immun*, 46 : 384-388.
  17. Cherwonogrodzky J. W.  
Antigens of *Brucella*.  
*In "Animal Brucellosis"*, Nielsen K. and Duncan J., 1990, CRC Press : 19-64
  18. Clements J. D., Plommet M., Huber J. D. and Adams L. G.  
Vaccination against brucellosis.  
*In "Advances in brucellosis research"*, Adams L. G., Texas A & M, University Press : 199-289.
  19. Cloeckaert A. 1992.  
Identification, à l'aide d'anticorps monoclonaux, d'antigènes de la membrane externe de *Brucella* utilisables pour le développement d'un vaccin ou d'un test de diagnostic.  
Thèse de doctorat. UCL.
  20. Cloeckaert A., de Wergifosse P., Dubray G. and Limet J. 1990.  
Identification of seven surface-exposed *Brucella* outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies : immunogold labeling for electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay.  
*Infect Immun*, 58 : 3980-3987.
  21. Cloeckaert A., Jacques I., Bosseray N., Limet J., Bowden R., Dubray G. and Plommet M. 1991.  
Protection conferred on mice by monoclonal antibodies directed against outer membrane proteins antigens of *Brucella*.  
*J. Med Microbiol*, 34 : 175-180.
  22. Cloeckaert A., Jacques I., de Wergifosse P., Dubray G; and Limet J. 1992.  
Protection against *Brucella abortus* or *Brucella melitensis* in mice with immunoglobulins G (IgG), IgA and IgM monoclonal antibodies specific for a common epitope shared by the *Brucella abortus* and *melitensis* S-LPS.  
*Infect Immun*, 60 : 312-315.
  23. Cloeckaert A., Zygmunt M. S., de Wergifosse P., Dubray G. and Limet J. 1992.  
Demonstration of peptidoglycan associated *Brucella* outer membrane proteins by
-

- use of monoclonal antibodies.  
Soumis pour publication.
24. Cloeckert A., Zygmunt M. S., Nicolle J. C., Dubray G. and Limet J. 1992.  
O-chain expression in the rough *B. melitensis* strain B115 : induction of O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies and intracellular localization demonstrated by immuno electron microscopy.  
Journal of general Microbiol, 138 : 1-9.
  25. Corbel M. J. 1987.  
*Brucella* phages : advances in the development of a reliable phage typing system for smooth and non smooth *Brucella* isolates.  
2nd Forum in Microbiology. Ann Inst Pasteur/Microbiol, 138, 69-144.
  26. de Wergifosse P. 1992.  
Analyse génétique et immunologique de deux protéines de la membrane externe de *Brucella abortus* : l'Omp 25 et l'Omp 36.  
Thèse de doctorat. UCL.
  27. Douglas J. T., Rosenberg E. Y., Nikaïdo H., Verstraete D. R. and Winter A. J. 1984.  
Porins of *Brucella* species.  
Infect Immun, 44 : 16-21.
  28. Dubray G. 1972.  
Etude ultrastructurale des bactéries de colonies lisses (S) et rugueuse (R) du genre *Brucella*.  
Ann Inst Pasteur/Microbiol, 123 : 171-193.
  29. Dubray G. 1981.  
Etude ultrastructurale et biochimique des enveloppes des bactéries du genre *Brucella*.  
Thèse de doctorat. Université de Paris Sud.
  30. Dubray G. and Bézard G. 1980.  
Isolation of three protective cell-wall antigens of *Brucella* in experimental brucellosis in mice.  
Ann Rech Vet, 11 : 367-373.
  31. Dubray G. and Limet J. 1987.  
Evidence of heterogeneity of lipopolysaccharides among *Brucella* biovars in relation to A and M specificities.  
Ann Inst Pasteur/microbiol, 138 : 27-37.
  32. Dubray G., Plommet M. and Bosseray N. 1974.  
Propriétés vaccinales de fractions de *Brucella*.  
C. R. Acad, Paris, 279 : 1805-1808.
  33. 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.
-

34. Enright A. M.  
The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infections in domestic mammals.  
In "Animal brucellosis", Nielsen K. and Duncan J., 1990, CRC Press : 301-320.
  35. Ficht T. A. 1990  
Pathogenesis of *Brucella*.  
Critical reviews in microbiology. 17 : 209-230.
  36. Ficht T. A., Bearden S. W., Sowa B. A. and Adams L. G. 1988.  
A 36 kDa *Brucella abortus* cell envelope protein is encoded by repeated sequences closely linked in the genomic DNA.  
Infect Immun, 56 : 2036-2046.
  37. Ficht T. A., Bearden S. W., Sowa B. A. and Adams L. G. 1989.  
DNA sequence and expression of the 36 kDa outer membrane protein gene of *Brucella abortus*.  
Infect Immun, 57 : 3281-3291.
  38. Gale E. F., Cundliffe E., Reynolds P. E., Richmond M. H. and Waring M. J. 1981.  
The molecular basis of antibiotic action.  
Wiley Interscience Publication, 2<sup>nd</sup> Ed.
  39. Garin-Bastuji B., Bowden R. A., Dubray G. and Limet J. 1990  
SDS-PAGE and immunoblotting analysis of smooth lipopolysaccharide heterogeneity among *Brucella* biovars related to A and M specificities.  
J. Clin. Microbiol, 28 : 2169-2174.
  40. Gomez Miguel M. J., Moriyon I. and Lopez J. 1987.  
*Brucella* outer membrane lipoprotein shares antigenic determinants with *E. Coli* Braun lipoprotein and is exposed on the cell surface.  
Infect Immun, 55 : 258-262.
  41. Gorrell M. D., Milliken G. L., Anderson B. J. and Pucci A. 1983.  
An enzyme immunoassay for bovine brucellosis using a monoclonal antibody specific for field strains of *Brucella abortus*.  
Third International Symposium on Brucellosis, Algiers, April 1983, 18-20, page 491, Editeur : Karger S.
  42. Grimont F. *et al.* 1992.  
Molecular typing with cloned DNA probes.  
Ann Inst Pasteur/Microbiol, 143 : 55-65.
  43. Halling S. M. and Zehr E. 1990.  
Polymorphism in *Brucella* spp. due to highly repeated DNA.  
Journal of Bacteriology, 172 : 6637-6640.
  44. Halling S. M., Dettleux P. G., Tatum F. M., Judge B. A. and Mayfield J. E. 1991.  
Deletion of the BCSP31 gene of *Brucella abortus* by replacement.  
Infect Immun, 59 : 3863-3868.
  45. Horrocks W. H. 1905.  
preliminary note on goats as a means of propagation of mediterranean fever.
-

34. Enright A. M.  
The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infections in domestic mammals.  
In "Animal brucellosis", Nielsen K. and Duncan J., 1990, CRC Press : 301-320.
  35. Ficht T. A. 1990  
Pathogenesis of *Brucella*.  
Critical reviews in microbiology. 17 : 209-230.
  36. Ficht T. A., Bearden S. W., Sowa B. A. and Adams L. G. 1988.  
A 36 kDa *Brucella abortus* cell envelope protein is encoded by repeated sequences closely linked in the genomic DNA.  
Infect Immun, 56 : 2036-2046.
  37. Ficht T. A., Bearden S. W., Sowa B. A. and Adams L. G. 1989.  
DNA sequence and expression of the 36 kDa outer membrane protein gene of *Brucella abortus*.  
Infect Immun, 57 : 3281-3291.
  38. Gale E. F., Cundliffe E., Reynolds P. E., Richmond M. H. and Waring M. J. 1981.  
The molecular basis of antibiotic action.  
Wiley Interscience Publication, 2<sup>nd</sup> Ed.
  39. Garin-Bastuji B., Bowden R. A., Dubray G. and Limet J. 1990  
SDS-PAGE and immunoblotting analysis of smooth lipopolysaccharide heterogeneity among *Brucella* biovars related to A and M specificities.  
J. Clin. Microbiol, 28 : 2169-2174.
  40. Gomez Miguel M. J., Moriyon I. and Lopez J. 1987.  
*Brucella* outer membrane lipoprotein shares antigenic determinants with *E. Coli* Braun lipoprotein and is exposed on the cell surface.  
Infect Immun, 55 : 258-262.
  41. Gorrell M. D., Milliken G. L., Anderson B. J. and Pucci A. 1983.  
An enzyme immunoassay for bovine brucellosis using a monoclonal antibody specific for field strains of *Brucella abortus*.  
Third International Symposium on Brucellosis, Algiers, April 1983, 18-20, page 491, Editeur : Karger S.
  42. Grimont F. *et al.* 1992.  
Molecular typing with cloned DNA probes.  
Ann Inst Pasteur/Microbiol, 143 : 55-65.
  43. Halling S. M. and Zehr E. 1990.  
Polymorphism in *Brucella* spp. due to highly repeated DNA.  
Journal of Bacteriology, 172 : 6637-6640.
  44. Halling S. M., Detilleux P. G., Tatum F. M., Judge B. A. and Mayfield J. E. 1991.  
Deletion of the BCSP31 gene of *Brucella abortus* by replacement.  
Infect Immun, 59 : 3863-3868.
  45. Horrocks W. H. 1905.  
preliminary note on goats as a means of propagation of mediterranean fever.
-

- In "Reports Med Fever Commission" Part III. Harrison and Sons (Ed), St Martins  
Lowe, London : 84-90.
46. Jacques I., Cloeckart A., Limet J. and Dubray G. 1992.  
Protection conferred on mice by combination of monoclonal antibodies directed  
against *Brucella* outer membrane proteins or smooth LPS.  
Journal of Medical Microbiology. Accepted for publication.
47. Krieg N. R. and Holt J. G. 1984.  
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol I.  
Williams & Wilkins Ed. Baltimore, USA.
48. Latimer E., Simmers J., Sriranganathan N., RoopII R. M., Schurig G. and Boyle  
S. M. 1992.  
*Brucella abortus* deficient in Cu-Zn superoxyde dismutase is virulent in BalB/C  
mice.  
Microbial Pathogenesis, 12 : 105-113.
49. Lewin B. 1983.  
Gene III.  
Wiley J. & Sons, Inc. New York.
50. Limet J. N., Bosserey 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.
51. Limet J., O Vo T. K., Saegerman C. et Letesson J. J. 1991.  
La recherche entreprise au CEB.  
Les élevages belges, 6 : 17-23.
52. 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.
53. Lin J., Adams L. G. and Ficht T. A. 1992.  
Characterization of the Heat shock response in *B. abortus* and isolation of genes  
encoding the GroE Heat shock proteins.  
Infect Immun, 60 : 2425-2431.
54. Mac Millan A.  
Conventional serological tests.  
In "Animal brucellosis", Nielsen K. and Duncan J., 1990, CRC Press : 153-197.
55. Mackaness G. B. 1964.  
The immunological basis of acquired resistance.  
Journal Exp Medecine, 120 : 105-120.
56. Maniatis T., Fritsch E. F. and Sambrook J. 1989.  
Molecular cloning, a laboratory manual.  
Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2<sup>nd</sup> Ed.
57. Martin N. L. and Hancock R. E. W.  
Membrane functions of Gram negative Bacteria.
-

- In "Advances in brucellosis research", Adams L. G., Texas A & M, University Press : 77-88.
58. Mayfield J. E., Bricker B. J., Godfrey H., Crosby R. M., Knight D. J., Halling S. M., Balinsky D. and Tabatabaï L. B. 1988.  
The cloning, expression and nucleotide sequence of a gene coding for an immunogenic *Brucella abortus* protein.  
Gene, 63 : 1-9.
59. Mayfield J. E.  
Detection of *Brucella* cells and cell components.  
In "Animal brucellosis", Nielsen K. and Duncan J., 1990, CRC Press : 97-120.
60. Mazaré Y. 1971.  
Les brucelloses.  
In "Maladies infectieuses", Bastin R., Editions Flammarion, 698-738.
61. Meickle P. J., Perry M. P., Cherwonogrodzky J. W. and Bundle D. 1989.  
Fine structure of A and M antigens from *Brucella* biovars.  
Infect Immun, 57 : 2820-2828.
62. Meyer M. E.  
Currents concepts in the taxonomy of the genus *Brucella*.  
In "Animal brucellosis", Nielsen K. and Duncan J., 1990, CRC Press : 2-13.
63. Mins C. A. 1988.  
The pathogenesis of infectious disease.  
3<sup>rd</sup> edition, Academic press, London.
64. Moriyon I. 1987.  
Properties of the outer membrane of *Brucella*.  
2nd Forum in Microbiology. Ann Inst Pasteur/Microbiol, 138, 69-144.
65. Nicoletti P. and Winter A. J.  
The immune response to *Brucella abortus* : cell-mediated response to infection.  
In "Animal brucellosis", Nielsen K. and Duncan J., 1990, CRC Press : 83-95.
66. Nicoletti P.  
Vaccination.  
In "Animal brucellosis", Nielsen K. and Duncan J., 1990, CRC Press : 283-296.
67. Phillips M., Pugh G. W. and Deyoe B. L. 1989.  
Chemical and protective properties of *Brucella* lipopolysaccharides obtained by butanol extraction.  
Am J. Vet Res, 50 : 311-317.
68. Plommet M. and Plommet A. M. 1983.  
Immune serum mediated effects on brucellosis evolution in mice.  
Infect Immun, 41 : 97-105.
69. Saha A. K., Mukhopadhyay N. K., Dowling J. N., Ficht T. A., Adams L. G. and Glew R. H. 1990.
-

- Characterization of a phosphomonoestérase from *Brucella abortus*.  
Infect Immun, 58 : 1153-1158.
70. Santos J. M., Verstraete D. R., Perera V. Y. and Winter A. J. 1984.  
Outer membrane proteins from rough strains of four *Brucella* species.  
Infect Immun, 46 : 188-194.
71. Schoenaers F., Koeckenberg A. 1972.  
Maladies des animaux domestiques.  
Editions Derouaux, Liège.
72. Serre A. 1987.  
Human immune response to *Brucella* infections.  
2nd Forum in Microbiology. Ann Inst Pasteur/Microbiol, 138, 69-144.
73. 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 : 351-369.
74. Sriranganathan N., Boyle S. M., Schurig G. and Missa H. 1991.  
Superoxyde dismutases of virulent and avirulent strains of *Brucella abortus*.  
Veterinary Microbiol, 26 : 359-366.
75. Stabel T. J., Mayfield J. E., Tabatabai L. B. and Wannemuehler M. J. 1991.  
Swine immunity to an attenuated *Salmonella Typhimurium* mutant containing a  
recombinant plasmid which codes for production of a 31 kDa protein of *Brucella  
abortus*.  
Infect Immun, 59 : 2941-2947.
76. Stabel T. J., Mayfield J. E., Tabatabai L. B. Wannemuehler M. J. 1990.  
Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella Typhimurium* containing a  
recombinant plasmid which codes for production of a 31 kDa protein of *Brucella  
abortus*.  
Infect Immun, 58 : 2048-2055.
77. Sutherland S. S. and Searson J.  
The immune response to *Brucella Abortus* : the humoral response.  
In "Animal Brucellosis", Nielsen K. and Duncan J., 1990, CRC Press : 65-81.
78. Tatum F. M., Detilleux P. G., Sacks J. M. and Halling S. M. 1992.  
Construction of Cu-Zn superoxyde dismutase deletion mutants of *Brucella abortus* :  
analysis of survival in epithelial and phagocytic cells and *in vivo* in mice.  
Infect Immun, 60 : 2863-2869.
79. Tihange P., Sagerman C, Botton and Limet J. 1992.  
Brucellose bovine : le test d'agglutination en présence de facteur rhumatoïde après  
traitement du sérum au dithithréitol dans la différenciation des animaux vaccinés et  
infectés.  
Ann Med Vet, à paraître.
80. Verger J. M. 1987.  
Taxonomy of the genus *Brucella*.  
Ann Inst Pasteur/Microbiol. 138 : 235-238.
-

81. Verstraete D. R. and Winter A. J. 1984.  
Comparison of SDS-PAGE profiles and antigenic relatedness among outer membrane proteins of 49 *Brucella abortus* strains.  
*Infect Immun*, 46 : 182-187.
  82. Verstraete 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 : 979-989.
  83. Winter A. J. 1987.  
Outer membrane proteins of *Brucella abortus*.
  84. Winter A. J., Duncan J. R., Santistebane C. G., Douglass J. T. and Adams L. G. 1989.  
Capacity of passively administered antibodies to prevent establishment of *B. abortus* infection in mice.  
*Infect Immun*, 57 : 3438-3444.
  85. Zuzuki et al. 1989.  
An introduction to genetic analysis.  
4th Ed. W H Freeman and company.
-