UNIVERSITÉS FRANCOPHONES

Papa El Hassane Diop
Albert Kaeckenbeeck

BIOTECHNOLOGIES DU DIAGNOSTIC ET DE LA PRÉVENTION DES MALADIES ANIMALES

actualité scientifique

AUPELF•UREF

JL John Libbey EUROTEXT

BIOTECHNOLOGIES DU DIAGNOSTIC ET DE LA PRÉVENTION DES MALADIES ANIMALES

British Library Cataloguing in Publication Data
A catalogue record for this book is available from the British library.

ISBN 2.7420.0074-7

Éditions John Libbey Eurotext
127, avenue de la République, 92120 Montrouge, France. Tél. : (1) 46.73.06.60.

John Libbey & Company Ltd
13, Smiths Yard, Summerley Street, London SW18 4HR, England.
Tel. : (01) 947.27.77.

John Libbey CIC
Via L. Spallanzani, 11, 00161 Rome, Italy. Tel. (06) 862.289.

© John Libbey Eurotext, 1994, Paris

Il est interdit de reproduire intégralement ou partiellement le présent ouvrage – loi du 11 mars 1957 – sans autorisation de l'éditeur ou du centre français du Copyright, 6 *bis*, rue Gabriel-Laumain, 75010 Paris

BIOTECHNOLOGIES DU DIAGNOSTIC ET DE LA PRÉVENTION DES MALADIES ANIMALES

IIes Journées Scientifiques du Réseau
Biotechnologies Animales de l'UREF
(Université des Réseaux d'expression française)
Liège (Belgique) 13-15 octobre 1993

SOUS LA DIRECTION DE :

Papa El Hassane Diop
Albert Kaeckenbeeck

John Libbey
EUROTEXT

Les collections « *Universités francophones* » de l'UREF : un instrument vital pour l'évolution de l'espace scientifique francophone.

L'Université des réseaux d'expression française (UREF), créée au sein de l'Association des Universités partiellement ou entièrement de langue française (AUPELF), est l'opérateur des Sommets francophones pour l'enseignement supérieur et la recherche.

Dans cette perspective, la collection ***Universités francophones*** que nous avons lancée en 1988 s'affirme aujourd'hui comme l'un des vecteurs essentiels d'une francophonie active et rayonnante.

Plus de 70 titres ont d'ores et déjà été publiés. Ce sont des ouvrages didactiques (manuels), des monographies faisant le point sur la recherche (série *Sciences en marche*) ou des actes de colloques organisés par les réseaux de l'UREF (série *Actualité scientifique*). Tous s'efforcent de répondre à des besoins identifiés dans des domaines prioritaires : santé, droit, sciences, économie, environnement, aménagement linguistique et sciences humaines. Tous abordent également des thématiques intéressant l'ensemble de la communauté scientifique universitaire. Dans ce but, nous nous efforçons de réunir des équipes de rédacteurs à caractère multilatéral.

Enfin, ce dispositif éditorial serait incomplet sans une politique de prix réaliste, tenant compte des différentes facettes économiques de la communauté francophone. Ainsi, les ouvrages font-ils l'objet d'une tarification préférentielle dans les pays du Sud.

Aux livres de la collection s'ajoutent trois revues de synthèse *(Sécheresse, Santé, Agricultures)* ainsi que des référentiels utilisant les supports les plus modernes de l'édition (cassette vidéo, vidéodisque, disque compact).

Avec ***Universités francophones***, l'AUPELF/UREF contribue efficacement à la circulation de l'information scientifique et technique. Elle apporte sa pierre à l'édification d'une bibliothèque scientifique universelle, dans laquelle la langue française se propose doublement et définitivement comme langue de culture et de science.

Professeur Michel Guillou
Recteur de l'UREF
(Université des réseaux d'expression française)

Sommaire

Liste des auteurs IX
Avant-propos XV

1. **Biotechnologie des moyens de diagnostic et de prévention des maladies animales.**
J. Blancou 1
2. **Apports de la biotechnologie au diagnostic des maladies animales.**
A. Benkirane, M.M. Rweyemanie, K.J. Wojciechowski, Y. Cheneau. 7
3. **De nouveaux outils pour le diagnostic et l'épidémiologie de la trypanosome animale africaine.**
G. Duvallet, Z. Bengaly, J.M. Reifenberg, L. Argiro. 19
4. **Caractérisation et typage de souches de *Clostridium perfringens* par la méthode ELISA.**
A. Ginter, K. Renier, A. Collard, B. Limbourg, G. Daube, P. Simon, C. Manteca, P. Coppe 31
5. **Le ribotypage est-il intéressant pour la recherche d'un marqueur épidémiologique dans les souches de *Bordetella bronchiseptica* ?**
S. Vandevenne, J. Mainil, A.Kaeckenbeeck. 49
6. **Utilisation de la méthode d'amplification génétique (PCR) pour la détermination des types toxiques de *C. perfringens* et la recherche de son entérotoxine.**
B. Kadra, J.P. Guillou, A. Chikhi 57
7. **La détection, au moyen de sonde(s) génétique(s), potentiellement attachantes et effaçantes d'*Escherichia coli* (AEEC) isolées de veaux, de porcelets et de carnivores domestiques.**
J.G. Mainil, E. Jacquemin, P.Pohl, A. Kaeckenbeeck. 73
8. **Etudes épidémiologiques sur la theilériose bovine à *Theileria annulata* : application à la caractérisation du type endémique et à la définition d'une stratégie de lutte.**
M.E.A. Darghouth, A. Bouattour, L. Ben Miled, M. Kilani, C.G.D. Brown. 81
9. **Identification d'un antigène cytoplasmique de bas poids moléculaire de *Brucella* potentiellement utilisable pour le diagnostic allergique de la brucellose.**
P.A. Denoel, M.S. Zygmunt, V.E. Weynants, A. Tibor, G. Dubray, J.N. Limet, J.J. Letesson. 89
10. **Situation actuelle de l'immunité naturelle vis-à-vis du virus de la fièvre de la vallée du Rift chez les ruminants domestiques du Sénégal.**
Y. Thiongane, M.M. Lo, H. Zeller, J.A. Akakpo 103

11. Différenciation de la réponse sérologique induite par *Brucella* et *Yersinia enterocolita* O:9 en utilisant les *Yersinia Outer Proteins* (YOPs).
V. Weynants, C. Saergeman, P.A. Denoel, A. Tibor, J.N. Limet, J.J. Letesson. 113

12. Epidémiologie des affections abortives des ruminants au Togo : enquête sérologique sur la brucellose, la chlamydiose, la fièvre Q et la fièvre de la Vallée du Rift.
A.J. Akakpo, K.L. Teou, T. Kponmassi, H.G. Zeller 125

13. Le diagnostic génomique de la BLAD (*Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency*) et ses applications.
L. Grobet, C. Charlier, R. Hanset 139

14. Développement d'un test cellulaire *in vitro* permettant le diagnostic spécifique de la brucellose sur base de la production d'Interféron gamma.
V. Weynants, J. Dufey, C. Saegerman, P. Denoel, A. Tibor, J. Limet, J.J. Letesson. 147

15. Apports de la génétique moléculaire dans la caractérisation de l'espèce *Clostridium perfringens.*
G. Daube, P. Simon, B. Limbourg, K.Renier, A. Kaeckenbeeck 159

16. Mise au point et validation d'un ELISA sandwich pour la détection d'antigène viral dans les leucocytes des bovins infectés de manière persistante par le virus de la diarrhée virale bovine.
B. Mignon, J. Dubuisson, S. Waxweiler, E. Thiry, P.P. Pastoret 177

17. Etude par ELISA de compétition de l'immunité contre le virus de la peste bovine chez les bovins du Sénégal.
J. Sarr, M. Diop 183

18. Utilisation de l'amplification en chaîne par polymérase pour la détection du virus de la peste équine à partir d'échantillons cliniques.
S. Zientara, C. Sailleau, S. Moulay. 189

19. Les vaccins produits par ingéniérie génétique.
P.P. Pastoret, B. Brochier, D. Boulanger, M. Denis, E. Thiry 199

20. LEUCOGEN : un exemple de vaccin sous-unité.
P. Baychelier 205

21. Séroprotection virale bovine chez le veau : application, cas.
I. Turki, Y. Elazhary, R. Elazhary. 209

22. Evaluation de l'activité protectrice de la fraction de la paroi de *Brucella* insoluble dans le SDS et identification d'antigènes de *Brucella* utilisables pour le diagnostic.
C. Saegerman, V. Weynants, T.K.-O. Vo, L. De Waele, A. Tibor, P.A. Denoel, J. Godfroid, P. Michel, E. Saman, J.J. Letesson, J.N. Limet. 221

23 **Atténuation de 4 isolats de *Theileria annulata* en culture cellulaire à long terme : résultats préliminaires d'une étude *in vitro* du polymorphisme parasitaire par des marqueurs enzymatiques, antigéniques et génomiques, et *in vivo* du degré d'atténuation et du pouvoir protecteur.**
M.E.A. Darghouth, L. Ben Miled, A. Bouattour, M. Kilani. 235

24. **Les glycoprotéines des herpès virus bovins 1 et 4.**
E. Thiry, E. Baranowski, P. Lomonte, A. Vanderplasschen, M. Bublot, J. Dubuisson, P.P. Pastoret 245

25. ***Eimeria tenella* : vaccinatioon des poulets au niveau local et caractérisation des antigènes immunodominants.**
A. Rhalem, H. Sahibi, B. Berrag, P. Pery 259

26. **Essai de vaccination chez les petits ruminants contre la PPR : utilisation du vaccin homologue.**
K. Bidjeh, M. Ouagal, A. Diallo 267

27. **Essai de vacination contre le charbon symptomatique en milieu réel.**
A. Ranaivoson. 275

28. **Les stratégies de modifications du patrimoine génétique des animaux domestiques, destinées à les rendre plus résistants aux maladies infectieuses et parasitaires : l'apport de la zootechnie des animaux de laboratoire.**
J.L. Guénet 283

29. **Résistance génétique des animaux aux maladies : cas de parasitoses gastro-intestinales chez les petits ruminants.**
A. Lahlou-Kassi, S. Tembely, R.L. Baker 295

30. **Résistance génétique à la cowdriose.**
L. Pépin, J.C. Maillard, G. Ruff, D. Vaiman, S. Kemp, E. Camus, A. Bensaid 305

31. **L'utilisation du test de détection des antigènes trypanosomiens pour l'amélioration génétique du bétail trypanotolérant.**
G. d'Ieteren. 313

Liste des auteurs

Akakpo J.A., Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaire (EISMV), BP 5077, Dakar, Sénégal.

Argiro L.,, CRTA/CIRDES, 01 BP454, Bobo Dioulasso 01, Burkina Faso.

Baker R.L., Centre International pour l'Elevage en Afrique (CIPEA), Nairobi, Kenya.

Baranowski E.,Département de Virologie et d'Immunologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, B43, Sart-Tilman, B4000 Liège, Belgique.

Baychelier P., Laboratoires Virbac, Carros, France.

Bengaly Z., CRTA/CIRDES, 01 BP454, Bobo Dioulasso 01, Burkina Faso.

Benkirane A., Service de la Santé Animale, Division de la Production et de la Santé animales, FAO, via delle terme di Caracalla, Rome, Italie.

Ben Miled L., Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire, 2020 Sidi Thabet, Tunisie.

Bensaid A., EMVT-CIRAD, 10 rue Pierre Curie, 94704 Maisons-Alfort, France. Mission Antilles Guyane, BP 1232, Pointe à Pitre, Guadeloupe

Berrag B., IAV Hassan II, Département de Parasitologie, BP 6202, Rabat, Maroc.

Bez S.,Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Service de Bactériologie et des Maladies Bactériennes, 20 bd de Colonster, B43 Sart Tilman, 4000 Liège, Belgique.

Bidjeh K., Laboratoire de Recherches Zootechniques et Vétérinaires de Farcha, BP 433, Ndjaména, Tchad.

Blancou J., Office International des Epizooties, 12 rue de Prony, 75017, Paris, France.

Bouattour A., Institut Pasteur, Tunis, Tunisie.

Boulanger D., Département de Virologie et d'Immunologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, B43, Sart-Tilman, B4000 Liège, Belgique.

Brochier PB., Département de Virologie et d'Immunologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, B43, Sart-Tilman, B4000 Liège, Belgique.

Brown C.G.D., CTVM, Université d'Edimbourg, Ecosse, Grande Bretagne.

Bublot M., Rhône Mérieux, Laboratoire IFFA, 69432 Lyon, France.

Camus E., EMVT-CIRAD, 10 rue Pierre Curie, 94704 Maisons-Alfort, France. Mission Antilles Guyane, BP 1232, Pointe à Pitre, Guadeloupe

Charlier C., Génétique Factorielle et Moléculaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, ULG, Bd de Colonster 20, B4000 Liège, Belgique.

Cheneau Y., Service de la santé Animale, Division de la Production et de la Santé animales, FAO, via delle terme di Caracalla, Rome, Italie.

Collard A., Division Immunologie Animale, Centre d'Economie Rurale, 1 rue du Carmel, 6900 Marloie, Belgique.

Coppe P., Division Immunologie Animale, Centre d'Economie Rurale, 1 rue du Carmel, 6900 Marloie, Belgique.

Darghouth M.E.A., Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire, 2020 Sidi Thabet, Tunisie

Daube G., Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Service de Bactériologie et des Maladies Bactériennes, 20 bd de Colonster, B43 Sart Tilman, 4000 Liège, Belgique.

Denis M., Département de Virologie et d'Immunologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, B43, Sart-Tilman, B4000 Liège, Belgique.

Denoel A., Laboratoire d'Immunologie et de Microbiologie, FUNDP, 61 rue de Bruxelles, 5000 Namur, Belgique.

De Waele L., Laboratoire d'Immunologie et de Microbiologie, FUNDP, 61 rue de Bruxelles, 5000 Namur, Belgique.

Diallo A., IEMVT-CIRAD, 10 rue Pierre Curie, 94704 Maisons Alfort, France.

Diallo M., , Laboratoire de Recherches Zootechniques et Vétérinaires de Farcha, BP 433, Ndjaména, Tchad.

Diop M., Institut de Recherches Agricoles (ISRA), Dakar, Sénégal.

Dubray G., Laboratoire de Pathologie Infectieuse et Immunologie, INRA, Nouzilly, France.

Dufey J.,,Laboratoire d'Immunologie et de Microbiologie, FUNDP, 61 rue de Bruxelles, 5000 Namur, Belgique.
Ministère de l'Agriculture, Administration de l'Elevage et du Service Vétérinaire, Bruxelles, Belgique.

Dubuisson J.,Département de Virologie et d'Immunologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, B43, Sart-Tilman, B4000 Liège, Belgique.
Department of Molecular Microbiology, Washington University, School of Medicine, Saint Louis, MO 63110-1093, USA.

Duvallet G., CRTA/CIRDES, 01 BP454, Bobo Dioulasso 01, Burkina Faso.

Elazhary R., Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire, 2020 Sidi Thabet, Tunisie.
Faculté de Médecine Vétérinaire, Saint Hyacinthe, Canada.

Elazhary Y., Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire, 2020 Sidi Thabet, Tunisie.
Faculté de Médecine Vétérinaire, Saint Hyacinthe, Canada.

El Hassane Diop P., Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaire, BP 5077, Dakar, Sénégal.

Ginter A., Division Immunologie Animale, Centre d'Economie Rurale, 1 rue du Carmel, 6900 Marloie, Belgique.

Godfroid J., Institut National de Recherches Vétérinaires, Bruxelles, Belgique.

Grobet L., Génétique Factorielle et Moléculaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, ULG, Bd de Colonster 20, B4000 Liège, Belgique.

Guénet J.L., Institut Pasteur, Paris, France.

Hanset R., Génétique Factorielle et Moléculaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, ULG, Bd de Colonster 20, B4000 Liège, Belgique.

d'Ieteren G., Centre National pour l'Elevage en Afrique, Po Box 46847, Nairobi, Kenya.

Jacquemin E.,Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Service de Bactériologie et des Maladies Bactériennes, 20 bd de Colonster, B43 Sart Tilman, 4000 Liège, Belgique.

Kaeckenbeeck A., Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Service de Bactériologie et des Maladies Bactériennes, 20 bd de Colonster, B43 Sart Tilman, 4000 Liège, Belgique.

Kemp S., ILRAD, Po Box 30709, Nairobi, Kenya.

Kilani M., Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire, 2020 Sidi Thabet, Tunisie.

Kponmassi T., Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaire (EISMV), BP 5077, Dakar, Sénégal.

Lahlou-Kassi A., Centre International pour l'Elevage en Afrique (CIPEA), Addis Ababa, Ethiopie

Letesson J.J., Laboratoire d'Immunologie et de Microbiologie, FUNDP, 61 rue de Bruxelles, 5000 Namur, Belgique.

Limbourg B., Fédération de Lutte contre les Maladies Animales, 604 Chaussée de Marche, 5101 Erpent, Belgique.

Limet J.N., Laboratoire d'Immunologie et de Microbiologie, FUNDP, 61 rue de Bruxelles, 5000 Namur, Belgique.

Lo M.M., Laboratoire National de l'Elevage et de Recherches Vétérinaires de Dakar-Hann (LNERV), Institut de Recherches Agricoles (ISRA), BP2075, Dakar, Sénégal.

Lomonte P., Département de Virologie et d'Immunologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, B43, Sart-Tilman, B4000 Liège, Belgique.

Maillard J.C., EMVT-CIRAD, 10 rue Pierre Curie, 94704 Maisons-Alfort, France. Mission Antilles Guyane, BP 1232, Pointe à Pitre, Guadeloupe

Mainil J., Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Service de Bactériologie et des Maladies Bactériennes, 20 bd de Colonster, B43 Sart Tilman, 4000 Liège, Belgique.

Manteca C., Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Service de Bactériologie et des Maladies Bactériennes, 20 bd de Colonster, B43 Sart Tilman, 4000 Liège, Belgique.

Michel P., Institut National de Recherches Vétérinaires, Bruxelles, Belgique.

Mignon B., Service de Parasitologie et de Parasitologie Parasitaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, B43, Sart-Tilman, B4000 Liège, Belgique.

Moulay S., CNEVA, Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires, 22 rue Pierre Curie, 94703 Maisons-Alfort, France.

Ouagal M., , Laboratoire de Recherches Zootechniques et Vétérinaires de Farcha, BP 433, Ndjaména, Tchad.

Pastoret P.P., Département de Virologie et d'Immunologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, B43, Sart-Tilman, B4000 Liège, Belgique.

Pépin L;, EMVT-CIRAD, 10 rue Pierre Curie, 94704 Maisons-Alfort, France.
Mission Antilles Guyane, BP 1232, Pointe à Pitre, Guadeloupe.
INRA, Laboratoire de Génétique Biochimique, 78352 Jouy en Josas, France.

Pery P., INRA, Unité de Virologie et d'Immunologie Moléculaire, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy en Josas, France.

Pohl P., Institut National de Recherches Vétérinaires, B1180, Bruxelles, Belgique.

Ranaivoson A., Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques, Université d'Antananarivo, BP 175, Antananarivo, Madagascar.

Reifenberg J.M., CRTA/CIRDES, 01 BP454, Bobo Dioulasso 01, Burkina Faso.

Renier K., Division Immunologie Animale, Centre d'Economie Rurale, 1 rue du Carmel, 6900 Marloie, Belgique.
Fédération de Lutte contre les Maladies Animales, 604 Chaussée de Marche, 5101 Erpent, Belgique.

Rhalem A., IAV Hassan II, Département de Parasitologie, BP 6202, Rabat, Maroc.

Ruff G., Université de Berne, Ecole Vétérinaire, Bremgartenstrasse 109a, 3012, Suisse.

Rweyemanu M.M., Service de la Santé Animale, Division de la Production et de la Santé animales, FAO, via delle terme di Caracalla, Rome, Italie

Saegerman C.,Laboratoire d'Immunologie et de Microbiologie, FUNDP, 61 rue de Bruxelles, 5000 Namur, Belgique.
Ministère de l'Agriculture, Administration de l'Elevage et du Service Vétérinaire, Bruxelles, Belgique.

Sailleau C., CNEVA, Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires, 22 rue Pierre Curie, 94703 Maisons-Alfort, France.

Saman E., Innogenetic, Gent, Belgique.

Sarr J., Institut de Recherches Agricoles (ISRA), Dakar, Sénégal.

Simon P., Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Service de Bactériologie et des Maladies Bactériennes, 20 bd de Colonster, B43 Sart Tilman, 4000 Liège, Belgique.

Tembely S., Centre International pour l'Elevage en Afrique (CIPEA), Addis Ababa, Ethiopie

Teou K.L., Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaire (EISMV), BP 5077, Dakar, Sénégal.

Thiongane Y., Laboratoire National de l'Elevage et de Recherches Vétérinaires de Dakar-Hann (LNERV), Institut de Recherches Agricoles (ISRA), BP2075, Dakar, Sénégal.

Thiry E., Département de Virologie et d'Immunologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, B43, Sart-Tilman, B4000 Liège, Belgique.

Tibor A., Laboratoire d'Immunologie et de Microbiologie, FUNDP, 61 rue de Bruxelles, 5000 Namur, Belgique.

Turki I., Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire, 2020 Sidi Thabet, Tunisie.

Vaiman D., INRA, Laboratoire de Genetique Biochimique, 78352 Jouy en Josas, France.

Vanderplasschen A., Département de Virologie et d'Immunologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, B43, Sart-Tilman, B4000 Liège, Belgique.

Vandevenne S., Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Service de Bactériologie et des Maladies Bactériennes, 20 bd de Colonster, B43 Sart Tilman, 4000 Liège, Belgique.

Vo T.K.-O., Laboratoire d'Immunologie et de Microbiologie, FUNDP, 61 rue de Bruxelles, 5000 Namur, Belgique.

Waxweiler S.,Département de Virologie et d'Immunologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, B43, Sart-Tilman, B4000 Liège, Belgique.

Weynants V., Laboratoire d'Immunologie et de Microbiologie, FUNDP, 61 rue de Bruxelles, 5000 Namur, Belgique.

Wojciechowski K.J., Service de la Santé Animale, Division de la Production et de la Santé animales, FAO, via delle terme di Caracalla, Rome, Italie.

Zeller H., Institut Pasteur, BP 220, dakar, Sénégal.

Zientara S., CNEVA, Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires, 22 rue Pierre Curie, 94703 Maisons-Alfort, France.

Zygmunt M.S., Laboratoire de Pathologie Infectieuse et Immunologie, INRA, Nouzilly, France.

Avant-propos

Les deuxièmes Journées Scientifiques du Réseau Biotechnologies Animales de l'UREF ont eu lieu du 13 au 15 octobre 1993 dans la magnifique Université de Liège, grand bastion de la Francophonie.

Le problème des biotechnologies des moyens de diagnostic et de prévention des maladies animales a été abordé à travers une trentaine de communications de grande qualité scientifique. Ces journées ont été réparties en quatre sessions avec des conférences introductives portant sur :

- les biotechnologies des moyens de diagnostic et de prévention des maladies animales par le Docteur Blancou, Directeur Général de l'OIE,

- les biotechnologies et les moyens de diagnostic par le Docteur Benkirane, de la FAO,

- la résistance génétique des animaux aux maladies par le Professeur Guenet, de l'Institut Pasteur de Paris.

- Les Laboratoires Rhône-Mérieux et Virbac ont donné le point de vue des industriels.

Ces journées ont montré que le chemin parcouru est assez important.
Cependant, il reste beaucoup à faire, à savoir renforcer la sensibilité et la capacité des outils biotechnologiques et élargir leur champ d'application.

La volonté de créer et de diffuser en français est devenue une réalité : les chercheurs du Nord et du Sud ont exprimé leur grand désir d'échanger et de dialoguer, d'où notre optimisme pour l'avenir de la Francophonie scientifique.

Papa El Hassane Diop
Albert Kaeckenbeeck

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 1-5.

1

Biotechnologie des moyens de diagnostic et de prévention des maladies animales

J. BLANCOU

Office International des Epizooties, Paris, France.

Avant de décrire l'apport de la biotechnologie au diagnostic et à la prévention des maladies animales, il convient de bien définir le terme "biotechnologie" et ses limites.

Si de nombreuses définitions ont été données, selon que l'on accepte le terme au sens large, ou qu'on le restreint aux seules manipulations génétiques, nous nous référerons ici à celles adoptées lors de la 58^{e} Session générale de l'Office International des Epizooties [1] : "L'application pratique de l'ensemble de nos connaissances en biologie, microbiologie ou biologie moléculaire à l'accroissement des potentialités des animaux ou à l'accroissement de leur résistance aux agressions du milieu où ils vivent."

Car les biotechnologies sont rarement issues d'une seule discipline ou d'une seule découverte mais, au contraire, de l'application simultanée de ces découvertes en vue de résoudre un problème précis.

On peut, ensuite, distinguer parmi ces méthodes biotechnologiques celles qui s'appliquent au diagnostic des maladies animales, à la prévention de ces maladies ou à un traitement.

Diagnostic des maladies animales

Deux méthodes peuvent être employées selon que l'on veut effectuer un diagnostic direct ou indirect.

Diagnostic direct

Aux méthodes traditionnelles qui mettaient en évidence l'agent pathogène par sa morphologie, ses caractères culturaux ou pathogènes, ou sa réaction vis-à-vis des sérums (polyclonaux) d'animaux vaccinés ou convalescents, vont se substituer des méthodes plus précises :

Les anticorps monoclonaux

Produits à partir d'une seule cellule immunitaire de souris, rendue "immortelle" par fusion avec une cellule cancéreuse, ces anticorps ont l'avantage de n'être dirigés que contre une fraction antigénique très précise (épitope) de l'agent pathogène. Cela permet de reconnaître des variants antigéniques et d'effectuer ainsi des surveillances épidémiologiques très fines, de remonter la trace d'une infection, ou encore de distinguer les souches sauvages des souches vaccinales, etc.

Les tests immuno-enzymatiques

Ils permettent de visualiser les réactions antigènes-anticorps, mieux que les anciennes techniques d'agglutination directe ou indirecte, de précipitation, de fixation du complément, etc. Ces divers avantages tiennent à la fixation (spontanée) de l'antigène ou de l'anticorps sur un support plastique solide, au déclenchement d'une réaction colorée suite à la dégradation d'un substrat par une enzyme couplée à l'anticorps et à la possibilité de quantifier cette réaction par un spectrophotomètre, éventuellement couplé à un ordinateur.

Le succès de ces méthodes, et notamment celle du test *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) ne cessera de se développer car ses variantes sont multiples (ELISA bloquant, ELISA sandwich, ELISA indirect, etc.), et l'immunocapture de l'antigène lui donne une très grande spécificité.

Les tests utilisant la digestion par des enzymes bactériennes puis leur repérage par des anticorps marqués (*Western blot*) seront aussi très utilisés.

Test d'hybridation : les sondes nucléiques

Ce test, basé sur la reconnaissance, par un acide nucléique (connu : sonde) d'un acide nucléique complémentaire inconnu, permet de détecter la présence du génome d'un agent pathogène dans un prélèvement suspect. Si le génome est, préalablement, digéré par des enzymes bactériennes, cela permet une identification encore plus précise (*Southern blot*).

Test d'amplification : la polymerase chain reaction

Cette technique permet d'amplifier la réplication des parties caractéristiques du génome d'un agent pathogène, grâce à l'emploi d'amorces choisies dans ces parties, puis de repérer le génome ainsi amplifié à l'aide de sondes nucléiques.

Diagnostic indirect

Ce diagnostic est basé, non plus sur la détection de l'agent pathogène lui-même, mais sur celle des traces qu'il a laissées dans l'organisme au contact des cellules immunitaires sécrétant des anticorps (immunité humorale) ou non (immunité cellulaire).

Ce diagnostic utilise l'outil biotechnologique pour repérer, soit les anticorps naturels (par capture ou compétition avec des anticorps monoclonaux), le plus souvent par des tests immuno-enzymatiques ou par recombinaison génétique avec l'antigène, soit les cellules sensibilisées par l'antigène.

Prévention des maladies animales

Deux stratégies sont possibles pour prévenir la maladie chez les animaux, qui toutes deux peuvent tirer profit des progrès de la biotechnologie : immuniser activement les animaux en les vaccinant, ou sélectionner leur capacité de résistance naturelle (génétique) à la maladie.

Immunisation active des animaux

Elle peut être assurée par l'administration de vaccins rendus plus purs et plus efficaces par les méthodes de la biotechnologie.

Parmi ces vaccins, on peut citer :

Les vaccins vivants

Ils utilisent des souches de microbes modifiées non plus empiriquement comme par le passé (par passages sur animaux ou cellules) mais par mutations génétiques induites puis sélectionnées. L'induction peut être assurée par des produits chimiques, par la température (mutants froids ou chauds), par des anticorps monoclonaux, etc. Certains de ces vaccins, obtenus par délétion des gènes les plus dangereux, ont l'avantage d'être bien connus et de permettre la distinction entre anticorps post-vaccinaux et post-infectieux. Le plus utilisé de ces vaccins est celui de la maladie d'Aujeszky, obtenu par délétion des glycoprotéines gx et gl.

Les vaccins recombinants

Ils sont obtenus par introduction des acides nucléiques codant pour la fraction immunogène d'un agent pathogène dans le génome d'un "vecteur" vivant (cellules, levures, bactéries, virus...). Ce dernier, en se multipliant chez l'animal vacciné, entraîne la production d'anticorps contre lui, mais aussi contre la fraction immunogène qu'il exprime. Le plus utilisé de ces vaccins est celui de la rage, produit par le virus de la vaccine.

On peut aussi utiliser le recombinant après inactivation, ce qui permet d'obtenir de grandes quantités d'antigènes, pur, *in vitro*. C'est la production de ces antigènes dans les bactéries *Escherichia coli*, les levures ou les bacculovirus qui est la plus étudiée, quoique encore peu utilisée.

Les vaccins sous-unitaires

Ils consistent en une (des) simple(s) fraction(s) antigénique(s) colorée(s) de l'agent pathogène, ce qui assure une innocuité totale. Souvent peu immunogène(s), cette (ou ces) fraction(s) est (sont) additionnée(s) d'adjuvants de l'immunité, soit chimiques, soit biochimiques (liposomes, ISCOM).

Les vaccins synthétiques

Les déterminants antigéniques choisis sont obtenus par synthèse *in vitro*, généralement celle de peptides couplés à des protéines "porteuses" et additionnés d'adjuvant de l'immunité. C'est le vaccin chimique purifié idéal, déjà rêvé par Louis Pasteur il y a un siècle, mais encore loin de pouvoir concurrencer les vaccins produits par des cellules vivantes.

Les vaccins anti-idiotypes

L'anticorps étant l'image interne de l'antigène, les anti-corps devraient pouvoir se comporter comme des antigènes d'une innocuité parfaite. Malheureusement, leur pouvoir immunogène reste très faible, surtout lors de la primo-vaccination.

Les vaccins génétiques

L'insertion, dans le génome d'un animal, de l'acide nucléique codant pour un agent pathogène devrait permettre à cet animal de résister, ultérieurement, à cet agent.

Augmentation de la résistance naturelle

La nature, aidée par les éleveurs, a depuis longtemps avantagé la survie des animaux génétiquement plus résistant aux maladies. Certains des gènes de ces résistances ayant pu être identifiés, il est théoriquement possible de les transférer à des animaux pour les rendre résistants.

Selon que le gène est transféré dans les cellules somatiques ou germinales de cet animal, la résistance sera individuelle ou transmissible (héritable) d'une génération à l'autre.

C'est surtout dans le domaine de la résistance aux parasites (contre lesquels il est très difficile de vacciner) que cette recherche est actuellement développée, mais aussi pour développer la résistance à certaines maladies à virus (ex : maladie de Marek).

Traitement des maladies animales

Si l'une des premières applications de la biotechnologie a été la production, par culture *in vitro*, de champignons producteurs d'antibiotiques, les recherches ultérieures de traitements plus efficaces et plus sûrs des maladies animales ont été nombreuses. Les premiers ont concerné l'emploi des anticorps monoclonaux, qui ont l'avantage sur les anciens sérums thérapeutiques d'être purs et spécifiques. Leur production, longtemps obligatoire sur souris, peut maintenant être assurée *in vitro* ou à partir de cellules de l'espèce cible

(bovins, porcs, etc.). Le coût de ces produits reste, toutefois, un facteur limitant leur usage courant.

Parmi les autres productions d'avenir, on doit signaler celles des immunostimulants ou des immunomodulateurs, notamment les lymphokines (interférons, interleukines, etc.) qui peuvent être produits *in vitro* par des cellules. Ces molécules et certaines autres protéines de valeur thérapeutique pourraient même être secrétées directement dans le lait par des animaux transgéniques (*Transgenic farming*).

Conclusion

L'ensemble des techniques issues de l'essor récent de la biotechnologie concourt à améliorer sans cesse les productions des animaux, directement ou en protégeant leur santé. Si certaines de ces techniques ouvrent des perspectives qui pourraient être inquiétantes quant à leur impact sur l'environnement, les équilibres démographiques ou la santé des consommateurs, la plupart apportent, au contraire, une amélioration incontestable par rapport à certaines techniques empiriques de la biologie. Mais un tri s'effectuera sans doute au cours du temps entre ces techniques, soit du fait du rejet spontané par le milieu naturel de certains organismes ou micro-organismes artificiellement manipulés par l'Homme, soit du fait de l'Homme lui-même, pour des raisons socio-économiques évidentes.

Bibliographie

1. Office international des Epizooties (1990). Numéro spécial : "Biotechnologie et Science vétérinaire". *Rev Sci Tech Off Int Epiz* ; 9(3) : 615 - 915.
2. McCullough (1992). The application of biotechnology to the diagnosis and control animal diseases. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* ; 12(1) : 325 - 353.
3. Desmettre Ph. (1992). Biotechnologie et santé animale. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* ; 12(1) : 355 - 368.
4. Animal Pharm (1991). Future prospects for veterinary biotehnology. PJ3/Publication, Richmond.

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 7-17.

2

Apports de la biotechnologie au diagnostic des maladies animales

A. BENKIRANE, M.M. RWEYEMANU, K.J. WOJCIECHOWSKI, Y. CHENEAU

Service de la Santé Animale, Division de la Production et de la Santé Animales, FAO, Rome, Italie.

Résumé

Depuis environ deux décennies, un certain nombre de techniques nouvelles ont vu le jour, contribuant à une amélioration sensible de la sensibilité et de la spécificité des tests de diagnostic des maladies humaines et animales. Ces techniques sont le résultat d'un certain nombre de progrès déterminants, parmi lesquels il convient de citer : la maîtrise des techniques de cultures cellulaires, l'avènement des tests immuno-enzymatiques, la technologie de production des anticorps monoclonaux et les différentes étapes d'exploration du code génétique.

Les outils de diagnostic dont on dispose aujourd'hui permettent de poser un diagnostic individuel plus précis, et surtout, de conduire des programmes rationnels de suivi et de surveillance de nombreuses maladies infectieuses et parasitaires. Sans vouloir renier les précieux services rendus à la médecine par les méthodes conventionnelles de diagnostic direct (isolement et identification de l'agent pathogène) et indirect (mise en évidence des témoins de l'infection à l'aide d'antigènes bruts et d'anticorps polyclonaux), tout porte à croire qu'elles seront progressivement supplantées par des manipulations issues de la biotechnologie, ces dernières promettant d'être plus précises, plus rapides et plus facile-

ment standardisables. En outre, elles présentent moins de risques pour le manipulateur et nécessitent un degré de technicité moindre, ainsi que du matériel et des installations moins coûteux.
L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, avec la collaboration des autres organisations internationales et le soutien actif de certains laboratoires, pôles d'excellence en biotechnologie, poursuit l'objectif d'opérer un transfert de ces technologies vers les pays en développement.

Au sens large, le terme biotechnologie s'applique à l'utilisation des systèmes biologiques ou de leurs constituants pour la production de biens ou de services. Au sens strict (biotechnologie nouvelle), ce terme est réservé à l'utilisation de l'ADN recombinant et des technologies associées.

Comme toute technologie, cette "technologie du vivant" est destinée à être exploitée, notamment à des fins commerciales; c'est ainsi qu'à titre d'exemple, pour le seul Japon, on estimait en 1992 le marché des produits issus de la biotechnologie (sens large) à 40 milliards d'ECU, tandis que les prévisions pour l'an 2000 du marché mondial de la nouvelle biotechnologie représenteraient un chiffre d'affaires de 80 milliards d'ECU.

En tant que moyen de production, la biotechnologie fait coopérer en harmonie de nombreuses disciplines scientifiques : de la chimie à la biologie moléculaire, de la génétique à la virologie et à l'immunologie, etc.

Les domaines d'application de la biotechnologie couvrent tous les secteurs de l'économie :
a) Agriculture : productions animales et végétales brutes, produits alimentaires.
b) Médecine (humaine et vétérinaire) : diagnostic et produits médicamenteux (hormones, produits thérapeutiques, vaccins).
c) Industrie : produits chimiques et agro-industriels.
d) Environnement : traitement des déchets résiduels et/ou toxiques.

En santé animale, la biotechnologie trouve des applications dans :
- le diagnostic des maladies, la pathogénie, l'épidémiologie et le contrôle de qualité des vaccins;
- la mise au point des vaccins de type nouveau, d'utilisation plus commode;
- la thérapeutique et l'hormonologie;
- la résistance génétique aux maladies.

Avant d'aborder l'application de la biotechnologie au diagnostic, il convient de donner, en préambule, quelques rappels sur la notion de diagnostic en médecine vétérinaire :

1) Diagnostic vétérinaire (animaux de rente) et diagnostic en médecine humaine
Le premier est le plus souvent collectif, il vise à diagnostiquer une maladie pour prévenir de nouveaux cas; en revanche, le second est généralement individuel, visant à diagnostiquer une maladie en vue de la traiter. Cette distinction se reflète sur les qualités exigées d'un test de diagnostic.

2) Diagnostic, dépistage (screening), suivi (monitoring) et surveillance
- Diagnostic : le point de départ est un (ou des) individu(s) malade(s).

- Dépistage : le point de départ est constitué par des individus présumés sains, il est conduit dans les opérations de :

• suivi : il vise alors à s'assurer, selon les cas, que les individus sont toujours sains, ou qu'ils bénéficient toujours d'un état de grâce (exemple : protection contre une maladie infectieuse conférée par la vaccination);

• surveillance : cette méthode de screening consiste à instaurer une vigilance vis à vis d'infections menaçant une population, en s'assurant que les unités de cette population sont toujours à l'abri du risque (surveillance clinique et/ou microbiologique, sérologique, allergique...).

3) Qualité des test de diagnostic

Elle est est mesurée par leur sensibilité (capacité de détection des cas), leur spécificité (capacité de distinction entre les cas et les non-cas), ainsi que leurs valeurs prédictives positive et négative, celles-ci étant variables en fonction de la prévalence de la maladie dans une population. L'efficacité d'un test exprime la somme de ses performances globales et permet de le situer par rapport à l'"étalon or".

L'étalon or se définit comme un outil de contrôle de qualité qui fournit la base de détermination de la valeur d'un test de diagnostic. C'est le test de référence par rapport auquel la sensibilité et la spécificité des autres test sont évaluées.

Le Tableau I présente les paramètres permettant de juger la qualité d'un test de diagnostic et leurs méthodes de mesure.

Tableau I. Méthodes d'évaluation des tests de diagnostic.

Paramètre	Méthode de mesure	Expression
Valeur	table de contingence (2x2)	sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positive et négative, efficacité
Seuil optimum	courbe d'étalonnage	valeur optimale positive/négative
Comparaison des tests	courbe de Bayes	probabilité post./ probabilité ant.
Intérêt clinique	taux de vraie positivité/ taux de fausse positivité taux de fausse négativité/ taux de vraie négativité	ratio probable pour la positivité ou la négativité d'un test

Les tests hautement sensibles sont plus utiles quand leurs résultats sont négatifs; ils sont recommandés lorsqu'on atteint la phase d'éradication d'une maladie. Au contraire, les tests ayant une bonne spécificité sont souhaitables lorsque leurs résultats sont positifs; ils sont recommandés en phase de démarrage d'un programme de prophylaxie.

La distribution des fréquences des résultats d'un test dans des populations animales normales et malades oblige à faire un choix entre un test doué d'une très bonne sensibili-

té et un test doué d'une très bonne spécificité, car très peu de tests réunissent ces deux qualités. L'un des objectifs de la biotechnologie est de tendre vers cet idéal.

4) Niveaux de diagnostic

Il existe au moins cinq échelles de niveau de diagnostic d'une maladie animale :
- Centres de Référence Internationaux : leur rôle est dans l'innovation et la recherche d'approches fondamentales et/ou appliquées visant la conception de nouvelles technologies ou méthodes de diagnostic, ainsi que dans le diagnostic de référence officiel des épizooties majeures et l'épidémiologie moléculaire, pour la caractérisation et la classification des souches responsables des foyers d'épizooties.
- Laboratoire National Central : dans chaque pays, il devrait exister une structure pour l'adaptation des techniques nouvelles aux conditions du pays, leur expérimentation et éventuellement la confection de trousses de diagnostic (kits).
- Laboratoire Provincial/de District : sa mission est d'appliquer les techniques de laboratoire proposées et standardisées par le Laboratoire National Central.
- Vétérinaire praticien/technicien de terrain : il doit pouvoir disposer des trousses de diagnostic de terrain et les utiliser dans le respect de la législation en vigueur.
- Eleveur : l'utilisation par l'éleveur de certaines trousses ne doit être envisagée que si aucune formation n'est nécesssaire (dip stick) et si le diagnostic de la maladie recherchée ne requiert pas la mise en place de mesures sanitaires légales.

Considérations techniques

Technologies de base

Anticorps monoclonaux

Un lymphocyte B produit des molécules d'anticorps toutes douées d'une même spécificité antigénique (réactivité vis à vis d'un seul épitope). En faisant fusionner ce lymphocyte avec une cellule myélomateuse, à croissance rapide et indéfinie, on obtient une cellule de type hybride (hybridome) possédant les propriétés génétiques des deux cellules parentales : croissance rapide et production d'un seul clone de molécules d'anticorps. Les anticorps monoclonaux sont actuellement exploités dans le diagnostic et dans la caractérisation des antigènes; ils ont en outre des applications thérapeutiques potentielles.

Le Tableau II présente les principaux avantages et inconvénients de ces réactifs

Des performances notoires ont été accomplies grâce à ces molécules; il est actuellement possible de produire de très grandes quantités d'immunoglobulines avec une utilisation minimale des animaux de laboratoire, comme il est possible de fabriquer des anticorps monoclonaux à partir de lymphocytes provenant d'animaux autres que la souris. Cependant il paraît encore prématuré de se passer des anticorps polyclonaux. Les deux types d'anticorps sont comparés dans le Tableau III.

Génie génétique ou technologie de l'ADN recombinant

Trois découvertes majeures ont rendu son avènement possible :
- possibilité d'introduction d'un brin d'ADN dans *E. coli* (transformation);
- purification de petits plasmides (10 kb; ex. Col E1) par centrifugation en gradient de

Tableau II. Anticorps monoclonaux dans le diagnostic.

Avantages
1. Molécules monospécifiques, chimiquement définies. Standardisation souhaitée.
2. 100% des Ig produites possèdent la fonction anticorps active. Possibilité de marquage hautement spécifique (isotopes, enzymes, fluorescéine).
3. Facilement produits en culture cellulaire dès qu'ils sont identifiés. Chaque laboratoire peut obtenir le même réactif, en utilisant la même lignée cellulaire.
4. Manipulation aisée. On peut produire des cocktails ayant une réactivité définie, préparer des anticorps bispécifiques à partir de deux anticorps monoclonaux de spécificité différente, réaliser une focalisation en microscopie électronique, etc.
5. On peut définir les réactions antigéniques croisées.
Inconvénients
1. Trop spécifiques, d'où le risque de ne pas détecter des déterminants antigéniques très proches de l'épitope spécifique.
2. Les effets biologiques de la liaison Ag-Ac *in vitro* ne réflètent pas la situation chez l'animal. Aucune synergie possible entre Ac qui les ferait réagir avec différents sites.
3. Etant chimiquement identiques, tout traitement physique ou chimique qui affecterait une molécule affecterait toute la population d'anticorps monoclonaux.
4. Les Ac monoclonaux utilisables dans un test ne le sont pas forcément dans un autre

Tableau III. Comparaison des anticorps monoclonaux et polyclonaux.

	Anticorps polyclonaux	Anticorps monoclonaux
Spécificité	multiple; population d'anticorps dirigés contre différents épitopes	unique; toutes les molécules d'anticorps sont dirigées contre le même épitope
Affinité	variable vis-à-vis des différents épitopes	homogène
avidité du sérum (= somme des affinités)	grande	faible

densité sur chlorure de césium ;
- découverte des endonucléases de restriction.

En outre, la découverte de la transcriptase reverse a rendu possible les manipulations génétiques de l'ARN.

Définition
Production d'ADN hybride (recombinant) par insertion de gène(s) exogène(s) dans l'ADN d'un porteur ou vecteur (plasmides, bactériophages ou virus animaux à ADN tels que poxvirus, baculovirus...).

Outils
- enzymes de restriction (endonucléases) pour couper l'ADN à des endroits pré-définis, après la reconnaissance d'une séquence spécifique de bases dans la double hélice. Près de 800 endonucléases sont actuellement disponibles;
- ligases pour recoller les fragments du gène transféré dans le matériel génétique du vecteur, produisant ainsi de l'ADN hybride;
- transcriptase reverse permettant de synthétiser les brins d'ADN compléméntaires (cDNA) à partir d'un ARN (ex. viral).

Conséquences
L'élément fondamental est l'identification de gène(s) codant pour une fonction phénotypique ou un produit donné. Une fois cette étape franchie, les nucléotides peuvent être séquencés et les protéines qu'ils codent définies. Ainsi :
- les peptides peuvent être chimiquement synthétisés;
- les agents infectieux peuvent être identifiés grâce à leur séquence nucléotidique;
- à l'aide de la PCR, il devient possible d'amplifier quelques séquences d'ADN en de multiples copies et un processus d'hybridation permet alors d'identifier rapidement et spécifiquement la séquence cible qui peut être dérivée d'un chromosome ou d'un génome viral.

Techniques

Tests immunologiques : ELISA, RIA, peroxydase, immuno-empreinte...

Toutes ces techniques sont basées sur le même principe : détection de complexes Ag-Ac à l'aide d'un marqueur.

Dans le modèle ELISA, les puits des microplaques sont revêtus soit par l'antigène (ex. virus), soit par les anticorps, et l'addition de l'autre partenaire de la réaction entraîne la formation du complexe Ag-Ac. Ce complexe est détecté après réaction avec des anticorps anti-espèce, dirigés contre les premiers anticorps (ex. anticorps anti-virus). L'anticorps révélateur est généralement conjugué à une enzyme. Celle-ci, en présence de son substrat, fournira un changement de couleur.
Le principe des principales variantes de l'ELISA, ainsi que leurs qualités et limites sont présentés dans le Tableau IV.

Techniques basées sur les acides nucléiques

Ces techniques recouvrent le séquençage des nucléotides et les méthodes de détection des acides nucléiques des agents infectieux, par hybridation et/ou amplification (PCR).

Tableau IV. Principales variantes de la technique ELISA.

	Principe	Qualités et limites
ELISA indirect	Adsorption directe de l'Ag à la surface des plaques	-influence la conformation de l'Ag - interférence avec protéines contaminantes et blocage Ag
ELISA sandwich	1. Ac de capture (Pc en général) 2. Ag 3. Ac de détection (Mc ou Pc)	Ac Mc = spécificité Ac Pc = sensibilité (plus grande avidité)
ELISA en phase liquide	1. Ag + Ac détection (en solution) 2. Complexe + Ac capture	conformation Ag conservée (très grande spécificité)
ELISA compétitif	1 Ag 2. sérum à tester 3. Ac détection	-très sensible pour détection anticorps - difficilement applicable à la détection Ag (sauf en phase liquide)

Sondes (radio-actives, froides)

Les produits pathologiques, les cultures cellulaires infectées, et les sections d'organes peuvent être examinés à l'aide de sondes spécifiques de l'agent pathogène incriminé. L'échantillon est étalé sur des filtres de nitrocellulose ou incorporé dans des blocs de paraffine. Si l'acide nucléique de l'agent pathogène recherché est présent, il sera détecté par la sonde marquée qui se lie par hybridation, c'est à dire par appariement des bases. La sonde détecte le génome de l'agent pathogène ou son ARN messager transcrit à partir du génome, selon le type de sonde. Pour les sondes radio-actives, la détection des fragments hybridants se fait par les rayons X. Pour les sondes froides, on ajoute un couple enzyme-conjugué comme la peroxydase-streptavidine (pour un marqueur comme la biotine); ensuite, la réaction est révélée à l'aide d'un substrat approprié.

Amplification en chaîne par polymérase (ACP = PCR)

La technique repose sur l'amplification de séquences nucléotidiques spécifiques portées par le génome de l'agent recherché et met en œuvre l'activité d'une enzyme, l'ADN polymérase, capable de synthétiser des brins complémentaires d'ADN compris entre deux oligonucléotides ou amorces, choisis pour leur spécificité et introduits dans le milieu réactionnel de telle sorte qu'ils puissent s'hybrider spécifiquement au génome de l'agent préalablement extrait. Les amorces sont synthétisées comme oligonucléotides monocaténaires d'une vingtaine de nucléotides. L'un a une séquence dirigée dans un sens et l'autre dans le sens contraire. Ils ne sont pas marqués. Une fois initiée, la réaction progresse cycliquement et génère des copies de la séquence choisie exponentiellement. Dans de

nombreux cas, la quantité de matériel généré est suffisante pour permettre une visualisation directe, après électrophorèse en gel et coloration au bromure d'éthidium. De même, ce matériel peut être détecté par hybridation avec une sonde marquée complémentaire à la partie de la séquence qui doit être spécifiquement amplifiée. Cela augmente la sensibilité et la spécificité de la technique.

D'une manière générale, la spécificité de la PCR dépend de la nature des amorces utilisées. Quant à la sensibilité, elle est parfois jugée excessive à cause de la possibilité de contamination par des éléments exogènes présents dans la réaction et pouvant recéler la même séquence de nucléotides. En quelques années, la technique PCR a été explorée, et souvent avec bonheur dans le diagnostic de nombreuses maladies infectieuses, comme le montre le Tableau V.

Tableau V. Applications de la PCR en pathologie infectieuse animale.

Maladies virales	Maladies bactériennes
Fièvre aphteuse	Brucellose bovine
Peste porcine classique	Mycoplasmoses
Peste porcine africaine	Colibacillose
Bluetongue	Leptospirose
Coronavirus bovin	Listériose
Leucose bovine	Tuberculose
Leucose aviaire	Paratuberculose
Rotavirus bovin	Salmonellose
BVD	
CAEV	
Artérite à virus	
Rhinopneumonie	Maladie à protozoaires
Anémie infectieuse	Toxoplasmose
Leucémie féline	
Laryngotrachéite aviaire	
Bronchite aviaire	
Influenza	
Maedi-Visna	
Coryza gangréneux	
Maladie d'Aujeszky	
Rage	

On peut combiner le pouvoir des techniques basées sur la détection des acides nucléiques à celui des techniques immunologiques, mettant en évidence la réaction Ag-Ac. En effet, la PCR peut s'avérer défaillante si les acides nucléiques sont dégradés; de même, les techniques immunologiques souffrent des problèmes de réactions croisées, d'où l'intérêt de les associer.

Un progrès décisif a été accompli par le développement de vaccins préparés à partir de micro-organismes à génome délété, c'est à dire n'exprimant pas certains des déterminants antigéniques normalement présents sur les souches pathogènes sauvages. L'utilisation de réactifs de diagnostic permettant de mettre en évidence l'absence de réponse immunitaire post-vaccinale vis-à-vis de ces antigènes permet de distinguer les animaux vaccinés des animaux infectés. Cette approche laisse envisager l'éradication des maladies sous couverture vaccinale, jusque-là impossible en raison de l'équivalence du marquage sérologique des animaux vaccinés et infectés.

Applications dans les pays en développement

Diagnostic et surveillance

Les techniques faisant appel à des réactifs issus de la biotechnologie trouvent un champ d'application fertile dans le diagnostic des maladies animales, qu'il s'agisse de diagnostic immédiat ou de diagnostic de référence.

L'ELISA est une technique qui n'utilise pas d'isotopes radio-actifs, ne requiert pas les conditions de stérilité et se prête à l'automatisation, permettant la manipulation rapide de plusieurs échantillons. C'est actuellement la technique la plus utilisée dans les programmes de séro-surveillance.

La Division de la Production et de la Santé Animale de la FAO, ainsi que la Division Mixte FAO/AIEA en ont assuré une large diffusion dans les pays en développement. On peut dire à juste titre que l'application de l'ELISA au suivi sérologique de la peste bovine en Afrique constitue aujourd'hui le plus grand réseau d'utilisation d'un kit standardisé dans le monde. La FAO a adopté cette technique pour la standardisation du suivi sérologique et de la surveillance dans toutes les campagnes régionales dans le cadre du programme global d'éradication de la peste bovine (GREP). A l'heure actuelle, les organisations internationales œuvrent à promouvoir l'utilisation globale de cette technique dans les programmes régionaux de contrôle de la brucellose bovine, de la fièvre aphteuse, de la babésiose bovine et d'un certain nombre de maladies aviaires.

La PCR a révolutionné la recherche fondamentale et le diagnostic. L'attribution du dernier prix Nobel de chimie à K.B. Mullis, qui a été à l'origine du développement de cette technique, met en valeur les progrès qu'elle a permis de réaliser. On peut prédire que cette technique supplantera, dans un proche avenir, les méthodes conventionnelles de mise en évidence de l'antigène dans le diagnostic de la quasi-totalité des maladies infectieuses et parasitaires.

Caractérisation moléculaire et épidémiologique

Toutes ces technologies ont rendu possible une discrimination beaucoup plus précise entre micro-organismes ou virus autrefois difficiles à distinguer entre eux par les moyens de la sérologie conventionnelle. Elles sont, en outre, appliquées à des fins taxonomiques, notamment en virologie. En effet, les séquences des gènes codant pour la polymérase étant parmi les mieux conservées, la comparaison des polymérases virales permet de ranger une souche virale dans un groupe connu ou, éventuellement, de créer une nouvelle subdivision dans la taxonomie virale. En outre, les données de séquençage des protéines

structurales permettent de différencier entre virus appartenant à un même sérotype. Les résultats obtenus avec le virus aphteux constituent l'exemple le plus probant de ces nouvelles applications. C'est ainsi qu'il a été possible d'apparenter la souche de type O responsable du récent foyer italien de fièvre aphteuse aux souches du Moyen-Orient (sud et ouest de l'Asie Mineure), tandis que la souche O bulgare semblait plus proche des souches du nord de l'Asie Mineure (Turquie, Iran...).

Déterminer la source d'un nouveau foyer de maladie, analyser la dynamique des épidémies/épizooties, établir le risque d'introduction d'une maladie sont devenus des outils de plus en plus précis de planification et de prise de décision dans les programmes de contrôle/éradication.

La FAO est en train de réexaminer le rôle de ses laboratoires de référence, avec l'optique de désigner comme centres de référence internationaux des instituts susceptibles de réceptionner des échantillons à partir de n'importe quelle région du monde et d'entreprendre une caractérisation à l'échelle moléculaire des souches d'agents pathogènes.

A côté de la biotechnologie, d'autres disciplines comme l'aérobiologie, l'imagerie par satellite, l'informatique et l'électronique concourent à la réalisation d'études épidémiologiques de mieux en mieux ciblées et permettent d'envisager des programmes de contrôle ou d'éradication rationnels. C'est le cas pour la lutte contre la peste bovine, la fièvre aphteuse et la rage, pour ne citer que ces trois maladies majeures. L'éradication de la lucilie bouchère de la Lybie constitue un bon exemple d'approche intégrée ayant rencontré du succès. La même approche ciblée et multi-disciplinaire est en train d'être appliquée au contrôle de la mouche tsé-tsé et de la trypanosomiase, ainsi qu'à l'épidémiologie de la theiléríose.

Formation, information, informatisation

La diffusion des techniques issues de la biotechnologie passe nécessairement par le recyclage des microbiologistes et leur initiation, voire leur perfectionnement en biotechnologie. La contribution de la FAO dans ce domaine a été d'organiser des ateliers de travail à l'échelle régionale, au profit des scientifiques impliqués ou désireux d'être impliqués dans l'application des techniques issues de la biotechnologie. Un autre point crucial est la sensibilisation des décideurs.

En outre, les laboratoires de diagnostic doivent avoir un accès facile et régulier aux très nombreuses publications consacrées à la biotechnologie (bulletins, revues, ouvrages). L'information relative à la tenue de réunions scientifiques doit pouvoir arriver aux intéressés.

Les laboratoires des pays en développement doivent également bénéficier d'un support logistique informatique par la mise à leur disposition de programmes informatiques pour l'analyse des séquences des acides nucléiques et des protéines, ainsi que de toutes les informations nouvelles dont ils ont besoin.

Simplification des techniques

Dans les pays en développement, il y a généralement :
- peu de laboratoires bien équipés et disposant d'un personnel qualifié;
- de grandes distances à parcourir pour atteindre ces laboratoires, d'autant plus que les moyens de communication et de transport des prélèvements restent souvent insuffisants.

Par conséquent, tout en s'efforçant de mettre en place des structures adéquates, il serait fort utile de disposer de moyens de diagnostic simples et fiables. L'idéal serait de pouvoir utiliser des tests d'étable ou des trousses de terrain, nécessitant le minimum de technicité et échappant à des contraintes telles que la rupture de la chaîne du froid, ou encore les dates de péremption des réactifs. Un tel objectif est devenu envisageable grâce à l'apport des biotechnologies. Certaines réalisations ont déjà vu le jour, mais il deviendra possible de concevoir de telles applications à une plus grande échelle dès que certaines difficultés d'ordre technique auront été surmontées.

Transfert de technologie

L'appui des laboratoires centres d'excellence internationaux aux laboratoires des pays démunis, en matière de biotechnologie, doit se traduire par l'adaptation des techniques mises au point dans les premiers aux conditions spécifiques des seconds. Certaines maladies animales ne sont rencontrées ou n'ont un intérêt économique évident que dans les pays en développement (peste bovine, fièvre de la vallée du Rift, dermatose nodulaire et autres poxviroses majeures, péripneumonie contagieuse bovine et pleuropneumonie contagieuse caprine, septicémie hémorragique, dermatophilose, trypanosomiases, theilérioses, etc.). Les recherches ayant trait à la mise au point de techniques de diagnostic ou de vaccins nouveaux pour ces maladies devraient être conduites dans ces pays, à chaque fois que les techniques sont applicables sur place.

Conclusion

La biotechnologie fournit la base des réactifs de diagnostic immunologique conventionnel, apporte de nouvelles opportunités de développement de réactifs et de techniques de diagnostic direct ou indirect, parmi lesquelles il faut citer : la production d'antigènes par recombinaison génétique, l'obtention d'anticorps monoclonaux par fusion cellulaire et, dans un futur proche, par recombinaison génétique et enfin l'hybridation nucléique et l'amplification de gènes.

Ces réactifs et techniques concourent à la réalisation de diagnostics plus fiables, reposant sur des techniques plus spécifiques, plus sensibles et plus reproductibles.

La mission des Centres d'Excellence qui mettent au point de nouvelles techniques de diagnostic et améliorent leurs performances, est d'aider à opérer un transfert de technologie réel vers les pays en développement. Ceux-ci ont besoin d'utiliser les technologies disponibles pour résoudre, dans leur contexte, leurs problèmes spécifiques. Il est à espérer que cela contribuera à mettre un terme à la "fuite des cerveaux" des pays en développement vers les pays développés, pourvu que les conditions et l'ambiance de travail deviennent favorables.

De par ses activités, conduites soit à partir du Siège, soit de la Division mixte FAO/AIEA ou des Bureaux Régionaux, la FAO s'efforce d'aider à la réalisation de ces objectifs, avec les moyens limités dont elle dispose. Le renforcement de la collaboration avec toutes les organisations et institutions œuvrant dans le domaine, accélèrera le rythme de développement de la biotechnologie, et, partant, celui du développement économique et social.

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 19-29.

3

De nouveaux outils pour le diagnostic et l'épidémiologie de la trypanosome animale africaine

G. DUVALLET, Z. BENGALY, J.M. REIFENBERG, L. ARGIRO

CRTA/CIRDES, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

La trypanosome animale, transmise par les glossines, est un des obstacles majeurs au développement de l'élevage dans les zones subhumides d'Afrique de l'Ouest. Pourtant la demande en viande et en lait augmente rapidement, en raison d'un taux de croissance élevé de la population humaine et du changement, suite à l'urbanisation, des habitudes alimentaires [9,11].

La solution n'est pas dans l'augmentation numérique des animaux, en raison des risques de déforestation progressive et de dégradation de l'environnement, mais dans l'augmentation de la productivité du cheptel actuel. Pour cela, les effets de la trypanosome sur la santé animale et la productivité doivent être mieux compris pour être mieux combattus.

Les techniques de diagnostic sont à la base de toutes les recherches sur la trypanosome. Les techniques les plus sensibles de diagnostic parasitologique ne permettent pas de déceler des parasitémies inférieures à 100 parasites par ml [31,35]. L'identification des trypanosomes à l'état frais et/ou sur frottis de sang colorés aboutit au plus à la détermination du sous-genre. Chez la glossine, la morphologie du parasite n'est d'aucun secours; seule la localisation des parasites dans le vecteur apporte une indication grossière sur le sous-genre. Les études épidémiologiques, dans ce contexte, manquent de précision.

Les nouvelles biotechnologies introduites récemment pour les recherches sur la trypanosome, anticorps monoclonaux [29], sondes nucléiques [14, 17], amplification en chaine par polymérase [25], apportent à la fois une plus grande sensibilité et une spécificité inégalée.

Nous envisagerons ci-après ces techniques pour le diagnostic et les études épidémiologiques.

Le diagnostic

En ce qui concerne le diagnostic clinique, il n'existe pas de signe pathognomonique qui permette un diagnostic de certitude. Le diagnostic de la trypanosomose requiert nécessairement des techniques de laboratoire.

On distingue les techniques parasitologiques qui, en révélant le parasite dans les liquides biologiques de l'hôte, apportent un diagnostic de certitude, et les techniques sérologiques qui mettent en évidence, soit des anticorps, soit des antigènes circulants; il s'agit dans ce cas d'un diagnostic de présomption, qui dépend de la sensibilité et de la spécificité des techniques utilisées.

Nous n'insisterons pas sur les techniques parasitologiques [6,10,34]. La majorité d'entre elles sont simples à mettre en œuvre, mais leur sensibilité est réduite [31]. La double micro-centrifugation [35] permet de déceler des parasitémies à 100 parasites par ml. La chromatographie sur colone de DEAE-cellulose [16] est plus sensible mais difficile à mettre en œuvre sur le terrain et réservée, jusqu'à présent, au dépistage de la maladie du sommeil chez l'homme [15]. L'inoculation à l'animal de laboratoire (souris, rat, *Mastomys sp.*) est parfois très sensible, notamment pour le sous-genre *Trypanozoon,* mais le diagnostic n'est pas immédiat. De plus, le coût d'entretien d'une animalerie est élevé et de nombreuses souches de trypanosomes ne poussent pas sur rongeurs.

Concernant le diagnostic sérologique, de nombreux tests ont été mis au point et testés, dans le passé, pour la détection des anticorps. Les deux tests les plus utilisés actuellement sont l'immunofluorescence indirecte (IFI) [37] et l'ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) [36]. Ces tests sont assez faciles à réaliser et de nombreux laboratoires nationaux en Afrique sont maintenant équipés, soit de microscope à fluorescence, soit de lecteur ELISA. Cependant l'utilisation dans ces tests d'un antigène mal défini (trypanosome entier pour l'IFI, lysat brut pour ELISA) rend difficile leur standardisation. D'autre part ces tests n'apportent qu'un diagnostic de présomption; ils ne différencient pas entre une infection passée et guérie et une infection présente. Les anticorps persistent en effet plusieurs mois après un traitement efficace ou une guérison spontanée [4]. Ces tests sont finalement plus utiles pour des études épidémiologiques (prévalence) que pour un diagnostic individuel [27].

Aussi dans ce contexte, l'introduction des tests permettant de détecter les antigènes circulants a été un progrès décisif pour le diagnostic [33]. La découverte dans l'organisme d'antigènes circulants spécifiques est, en effet, synonyme d'infection présente. C'est le développement à l'*International Laboratory for Research on Animal Diseases* (ILRAD, Nairobi, Kenya) d'anticorps monoclonaux spécifiques d'espèces de trypanosomes [29], qui a donné à ces tests toute leur signification. Ainsi, le diagnostic sérologique devenait spécifique de l'espèce de parasite en cause. De plus, les mêmes réactifs sont utilisés quelle que que soit l'espèce animale étudiée. Les tests sont faciles à réaliser, de nombreux

sérums peuvent être analysés en même temps et un diagnostic individuel est possible en remplaçant les plaques à microtitration par des microtubes [27].

Résultats obtenus au CRTA

La comparaison de la détection des parasites par centrifugation en tube capillaire [26], de la détection des antigènes circulants [28] et de la détection des anticorps IgC [3], sur 1633 bovins prélevés dans les zones infestées de glossines autour de Bobo-Dioulasso (Burkina Faso) a donné les résultats exprimés dans le Tableau I.

Tableau I. Résultats obtenus au CRTA.

Techniques utilisées	Nb de tests réalisés	Nb de tests positifs	%	*Trypanosoma* (c)		
				brucei	*congolense*	*vivax*
Centrifugation en tubes capillaires	1633	144 (a)	9	1	51	96
Détection antigène circ. ELISA	1633	1075 (b)	66	645	786	533
Combinaison 2 techniques précédentes	1633	1090	67	645	798	597
Détection d'anticorps IgC ELISA	1633	1230	75	non spécifique d'espèce		

(a) dont 1 infection triple et 2 infections doubles
(b) dont 223 infections triples et 443 infections doubles
(c) nombres totaux observés par espèce, y compris les infections mixtes.

Ces résultats appellent les observations suivantes :

1) La sensibilité du test de détection des antigènes circulants est supérieure à la détection des parasites par centrifugation en tubes capillaires (66% contre 9% de cas positifs).

2) La combinaison des deux techniques n'a amélioré que très faiblement (15 cas positifs supplémentaires sur 1633 tests) le score du test de détection des antigènes circulants.

3) La détection des anticorps IgC par test ELISA indique un niveau élevé de prévalence : 75%. Ce chiffre reflète l'intensité du contact entre les animaux et les trypanosomes. Il ne permet pas de distinguer les infections dues aux différentes espèces de trypanosomes.

4) La technique parasitologique indique une prévalence plus forte des infections à *T. vivax* (67%) sur *T. congolense* (35%) et *T. brucei* (0,7%); les infections mixtes détectées représentent 2% des infections. La technique de détection des antigènes circulants montre une prévalence plus forte des infections à *T. congolense* (73%) devant *T. brucei* (60%) et *T. vivax* (50%), et 62% des infections sont des infections mixtes.

5) La divergence entre les deux techniques concernant les prévalences de *T. brucei* est compréhensible car *T. brucei* est très difficile à mettre en évidence par les techniques parasitologiques classiques. Concernant *T. vivax,* la divergence est plus difficile à expliquer. Elle pourrait provenir d'un manque de sensibilité pour cette espèce du test de détection des antigènes circulants [12].

6) Le test de détection des antigènes circulants montre l'importance, passée inaperçue jusqu'à présent, des infections mixtes dans la nature et de la forte prévalence de *T. brucei.* Ceci dénote l'importance du réservoir naturel de cette espèce dans laquelle sont regroupées les sous-espèces *gambiense* et *rhodesiense*, agents de la maladie du sommeil chez l'homme.

De ces résultats et d'autres (non publiés) obtenus au CRTA, les conclusions suivantes provisoires peuvent être tirées :

- Le test de détection des antigènes circulants sur ELISA représente une avancée spectaculaire dans le domaine du diagnostic des trypanosomes.
- La spécificité du test doit continuer à être étudiée. En particulier, de fortes prévalences à *T. brucei*, généralement observées, correspondent-elles bien à des infections chroniques ? Dans l'attente de cette évaluation, il est recommandé d'utiliser un test parasitologique sensible en parallèle au test de détection des antigènes circulants.
- Ce test mérite d'être utilisé plus largement pour les études épidémiologiques, notamment les évaluations de prévalence, et l'étude de l'impact des mesures de lutte (lutte anti-vectorielle, usage de trypanocides) sur la transmission de la maladie.
- L'ensemble des laboratoires intéressés dépendent de l'ILRAD ou de l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (AIEA, Vienne, Autriche) pour la fourniture des réactifs (anticorps monoclonaux et conjugués correspondants). Il est prévisible que la demande va rapidement dépasser l'offre et nous recommandons fortement qu'une solution soit trouvée pour un approvisionnement régulier des laboratoires régionaux et nationaux.

De l'épidémiologie des parasites à l'épidémiologie moléculaire

Les études épidémiologiques classiques ont utilisé les tests de diagnostic parasitologique et sérologique décrits ci-dessus. Leur sensibilité est limitée et l'identification des parasites assez grossière. L'introduction du test de détection des antigènes circulants a apporté une plus grande sensibilité et l'identification simultanée de l'espèce de trypanosome infectant. Ceci a permis de montrer, entre autre, l'importance des infections mixtes qui passent habituellement inaperçues. Ce test a permis aussi une évaluation plus précise de l'incidence de la maladie (nouvelles infections pendant une période donnée) et aussi de la trypanotolérance de certains taurins (antigènémie positive mais parasitémie non patente).

Parallèlement, des techniques issues de la biologie moléculaire ont été développées pour une identification plus précise des trypanosomes. Il s'agit des sondes nucléiques et de l'amplification en chaîne par polymérase (ACP = PCR en anglais). Ces outils ont été adaptés pour permettre aux parasitologistes de faire des distinctions très fines dans les populations de parasites. Ils permettent d'identifier les individus en analysant directement leur génome.

Les sondes nucléiques

Une sonde nucléique est une molécule d'ADN (généralement), longue de 15 à plusieurs milliers de nucléotides, utilisée pour détecter sa séquence complémentaire dans un mélange d'acides nucléiques provenant d'une cellule. Pour les trypanosomes, les travaux de l'ILRAD et ceux de l'Université de Bristol (UK) principalement, ont permis de développer des sondes reconnaissant les différents espèces ou sous-espèces.

Les sondes disponibles sont énumérées dans le Tableau II.

Tableau II. Les sondes disponibles.

Sous genres	Espèces	Groupes taxonomiques	Sondes	Réf
Nannomonas	*congolense*	forme de savane	pgNRE-372	[14]
	sensu lato		369 bp	[8]
		forme Kilifi	pgNIK-450	[14]
			400 bp	[8]
		forme de forêt	350 bp	[8]
	simiae		pgNS-600	[13]
			200bp	[8]
Dunotella	*vivax*	forme Afrique de l'Ouest	IgDIL-10	[14]
			180 bp	[7]
		forme Afrique de l'Est	pkDIL-900	(*)
Trypanozoon	*brucei*		pgDR1 (ingi)	[14]
	sensu lato		177 bp	[8]

* : ILRAD Actualités, janvier 1991

Un travail important a été réalisé au sein du sous-genre *Trypanozoon* pour séparer les sous-espèces *gambiense, rhodesiense, brucei* et *evansi* entre elles, en raison du rôle pathogène pour l'homme des deux premières. De nombreuses sondes ont été développées pour cela [2, 5, 20, 21, 22, 30, 32].

Pour les trypanosomes animales, c'est au sein du sous-genre *Nannomonas* que cet outil est le plus efficace pour le moment. En effet, parmi les trypanosomes indistinguables morphologiquement, les sondes nucléiques permettent de différencier au moins 5 groupes taxonomiques différents : *T. simiae*, *T. congolense* forme de savane, *T. congolense* forme Kilifi, *T. congolense* forme de forêt, et une nouvelle forme, découverte récemment en Gambie [24], non reconnue par les sondes précédentes.

Ces résultats ont une grande importance sur le plan épidémiologique. *T. simiae*, très pathogène pour les porcs, ne l'est pas pour les bovins; or, plus de 70% des infections à *Nannomonas* chez *Glossina morsitans submorsitans* en Gambie ont été rapportées à *T.*

simiae [23]. Cela influe sur l'estimation du risque mesuré par le taux d'infection des glossines. D'autre part, les résultats obtenus en Gambie montrent aussi que *T. simiae* et *T. congolense* forme de savane n'ont été observés que chez *G. m. submorsitans* alors que *T. congolense* forme de forêt n'a été observé que chez *G. palpalis gambiensis* [24]. Ces spécificités parasites-vecteurs sont primordiales pour la compréhension des cycles épidémiologiques, et donc pour mieux cibler la lutte.

Résultats obtenus au CRTA

A l'occasion de séjours à l'ILRAD et à l'Université de Bordeaux-II (France) grâce à une convention Aupelf-Uref, les souches suivantes de *T. congolense* sensu lato, isolées dans la région de Bobo-Dioulasso ont pu être caractérisées (Tableau II).

Tableau III. Souches de *T. congolense* sensu lato isolées dans la région de Bobo-Dioulasso.

Souches testées	Stabilats	Espèces hôtes	Sondes + (c)
Samandeni/82/CRTA/29	S2 (11.6.82)	zébu	pgNRE-372
Samndeni/82/CRTA/33	S4 (16 12.83)	zébu	pgNRE-372
Karankasso/83/CRTA/69	C1 (24.1.84)	zébu	pgNRE-372
Karankasso/83/CRTA/57	C1 (18.1.84)	zébu	pgNRE-372
Karankasso/83/CRTA/66	C3 (30.4.85)	zébu	pgNRE-372
Samorogouan/82/CRTA/53	ILRAD 2468 (a)	zébu	pgNRE-372
Banankélédaga/83/CRTA/67	ILRAD 2462 (a)	zébu	pgNRE-372
Samandeni/82/CRTA/31	C1 (26.12.83) = ILRAD 3875 (b)	zébu	pgNRE-372
Dinderesso/80/CRTA/3	C18 (28.8.84) = ILRAD 3874 (b)	chien	350bp

(a) : résultats obtenus par l'ILRAD [18]
(b) : résultats obtenus par l'ILRAD [R. Masake, comm pers, 1993]
(c) : pgNRE-372 = *T. congolense* forme de savane; 350 bp = *T. congolense* forme de forêt

Ces résultats, obtenus à partir de souches isolées sur souris et conservées en azote liquide, ne reflètent pas la réalité épidémiologique de la circulation des différentes espèces de trypanosomes dans la nature. Ils montrent la présence des taxons *T. congolense* forme de savane et *T. congolense* forme de forêt autour de Bobo-Dioulasso. Les recherches doivent se poursuivre avec toute la batterie de sondes pour mieux caractériser les trypanosomes dans la nature au sein des cycles épidémiologiques.

Le problème principal rencontré pour le transfert de cette technologie est celui du marquage des sondes. Traditionnellement, il se fait à l'aide de produits radioactifs (^{32}P). Les délais de livraison en Afrique, généralement non compatibles avec la durée de demi-vie de ces produits, la difficulté et les dangers de leur manipulation, l'absence de personnel entrainé à leur utilisation, l'impossibilité de conserver les sondes marquées, rendent leur emploi impossible en dehors de laboratoire comme l'ILRAD. Les recherches s'orientent

donc vers des marquages non radioactifs utilisant des réactions enzymatiques et/ou la chimiluminescence. Les kits proposés commercialement permettent de marquer les sondes et de les conserver ainsi pendant une année. Nous avons testé au CRTA le marquage chimiluminescent par kit ECLND d'Amersham. Les résultats ont montré des réactions croisées entre les différentes sondes et un résultat positif a été obtenu avec du sang humain ou de souris non parasité. Des résultats similaires ont été obtenus par les chercheurs de l'ILRAD, et, sur leurs conseils, nous allons tester le kit de chimiluminescence proposé par Boehringer-Mannheim (DIG DNA *Labeling and Detection Kit Non Radioactive et Lumi-Phos 530*) dont les résultats semblent prometteurs.

Si l'utilisation des sondes apporte une grande spécificité et permet de tester un grand nombre d'échantillons à la fois, une limitation semble être leur manque de sensibilité. En effet, en utilisant la technique "Dot-blot" de fixation des échantillons sur une membrane de nylon ou de nitrocellulose, la limite de détection semble être 100 trypanosomes par échantillon (soit environ 500 trypanosomes par ml). Cette technique reste cependant intéressante pour analyser et caractériser un grand nombre d'échantillons provenant de glossines capturées dans la nature.

L'amplification en chaîne par polymerase

En décembre 1985, un groupe de chercheurs de la société Cetus Corp. a publié une technique permettant d'amplifier les séquences ADN double brin avec un facteur d'amplification égal à $2x10^5$. Cette technique est dénommée *Polymerase Chain Reaction* (PCR), ce qui a été traduit en français par Amplification en chaîne par polymérase (ACP).

Cette technique permet d'amplifier en quelques heures un fragment d'ADN : le recopier en plusieurs millions d'exemplaires. Elle présente une sensibilité extrême qui permet de détecter une molécule d'ADN aussi petite que 100 paires de nucléotides, présente à un seul exemplaire dans un prélèvement biologique.

La technique ACP est fondée sur le fonctionnement cyclique d'une ADN polymérase. Cette polymérase copie un brin d'ADN, utilisé comme matrice, en un brin complémentaire, par élongation, à partir de l'extrémité libre d'une amorce oligonucléotidique. La technique consiste donc à effectuer des cycles successifs d'amplification, au cours desquels deux amorces dirigent l'amplification de la séquence d'ADN double brin, préalablement dénaturé, qu'ils encadrent.

La seule limitation de la méthode concerne la longueur du segment amplifiable. Cette longueur est conditionnée par la distance séparant les deux amorces et est le plus souvent comprise entre 100 et 1000 nucléotides. Au-delà, il y a une baisse considérable du rendement.

Un cycle d'amplification comprend trois étapes successives :
- la dénaturation de l'ADN double brin en ADN simple brin, par chauffage à 94-95°C ;
- l'hybridation des amorces oligonucléotidiques sur les brins d'ADN dénaturés, à une température d'environ 55°C ;
- l'extension des brins d'ADN par l'ADN polymérase à une température d'environ 72°C. Chaque amorce est allongée pour donner une séquence exactement complémentaire du brin recopié. Il en résulte un doublement de la séquence considérée.

Chaque étape dure environ 2 min. Pour éviter l'addition d'enzyme à chaque cycle, une ADN polymérase pouvant résister à 100°C a été isolée d'une archébactérie thermophile :

Thermus aquaticus, d'où son nom de Taq-polymérase. Comme cette enzyme résiste à la température requise pour la séparation des deux brins (90°C), il n'est pas nécessaire d'en rajouter à chaque cycle, ce qui diminue considérablement le prix de revient, et permet de faire toutes les opérations dans le même tube.

L'amplification en chaîne par polymérase est une révolution biologique qui fera date dans l'histoire de la biologie moléculaire. Son application la plus immédiate concerne le diagnostic, mais son intérêt en recherche fondamentale est également important pour le séquençage, le clonage, la mutagénèse dirigée et l'étude de l'expression des gènes.

Pour les trypanosomes, l'utilisation de l'ACP à des fins de diagnostic et/ou d'identification a déjà fait l'objet de plusieurs publications [20,25].

Résultats obtenus au CRTA

Après une mise au point des protocoles au CRTA en 1992, des amplifications ont été obtenus pour *T. congolense* forme de savane, *T. brucei*, et *T. vivax*. La polymérase utilisée est la VentND Polymerase de New England Biolabs. Les amorces énumérées dans le Tableau IV ont été fournies par l'ILRAD et le CIRAD-EMVT.

Tableau IV. Amorces fournies par l'ILRAD et le CIRAD-EMVT.

Amorces	Specificités	Taille fragments amplifiés
col 1 et 2	*T. congolense* forme de savane	320 bp
kol 1 et 2	*T. congolense* forme Kilifi	non testé au CRTA
vol 1 et 2	*T. vivax*	170 bp
sol 1 et 2	*T. simiae*	non testé au CRTA
bol 1 et 2	*T. brucei*	177 bp
bol 3 et 4	*T. brucei*	1520 bp

Les cycles adoptés sont : 90 secondes à 94°C, 60 secondes à 55°C et 90 secondes à 72°C, avec une répétition de 30 cycles. La révélation des produits de l'amplification se fait par électrophorèse en gel d'agarose avec incorporation de bromure d'éthidium et lecture sur table UV.

Dans ces conditions, les résultats préliminaires suivants ont été acquis :

- une bande d'amplification d'environ 320 bp a été obtenue avec les amorces col 1 et 2 pour les souches suivantes : CRTA/29, CRTA/31, CRTA/33, CRTA/69 et ILRAD/C49. Pour les 4 premières, ce résultat confirme celui obtenu avec les sondes nucléiques;
- une bande d'amplification d'environ 1520 bp a été obtenue avec les amorces bol 3 et 4 pour un clone de la souche Farakoba/80/CRTA/1, confirmant ainsi l'identification *T. brucei;*
- une bande d'amplification d'environ 170 bp a été obtenue avec les amorces vol 1 et 2 à partir d'un échantillon isolé sur bovin. Ce résultat est particulièrement intéressant car l'échantillon a été isolé sur le terrain dans une trousse KIVI (kit d'isolement *in vitro*, fourni par l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers).C'est le résultat de 3 semaines de cul-

ture après inoculation qui a été testé en ACP. Les trousses KIVI mises au point pour l'isolement de trypanosomes du sous-genre *Trypanozoon* [1] semblent donc permettre aussi l'identification de *T. vivax* dans un prélèvement.

Il est envisagé maintenant d'utiliser cette technique ACP plus largement pour déceler et identifier les trypanosomes chez les glossines.

Conclusion

Les résultats récents de la recherche, notamment en immunochimie et en biologie moléculaire, ont apporté de nouveaux outils pour le diagnostic et l'épidémiologie des trypanosomes africaines.

Les anticorps monoclonaux spécifiques des différents groupes de trypanosomes, créés à l'ILRAD, ont permis le développement d'un test de détection des antigènes circulants. Ce test sensible présente l'immense intérêt d'identifier les groupes de trypanosomes en cause, en même temps que la détection d'une infection active. Utile pour aider au diagnostic, ce test doit devenir un outil indispensable pour les enquêtes épidémiologiques (estimation des prévalences régionales) et pour l'évaluation de l'efficacité des campagnes de lutte.

La biologie moléculaire a apporté deux outils : les sondes nucléiques et l'amplification en chaine par polymérase. Depuis 1992, de nombreux essais ont été réalisés pour la mise au point des protocoles d'utilisation des sondes nucléiques et de la technique ACP au sein de l'Unité d'Epidémiologie et de Biotechnologie appliquée du CRTA. Ces techniques doivent permettre une identification spécifique et/ou subspécifique des trypanosomes au niveau de l'hôte et du vecteur, avec une grande sensibilité. Elles sont cependant chères et difficiles à mettre en œuvre dans un laboratoire non spécialisé : c'est pourquoi nous pensons qu'elles doivent être réservées pour le moment à une utilisation en recherche stratégique pour mieux comprendre l'épidémiologie des trypanosomes.

Enfin un effort important doit être fait pour aider à la formation des cadres nationaux dans les zones d'endémie et au transfert de ces biotechnologies.

Remerciements

Nous adressons nos remerciements à l'AUPELF-UREF (convention X/10.8/90.3) et au CIRAD-EMVT (ATP n°70/92) pour leur aide financière au transfert de ces technologies au CRTA. Nous remercions nos collègues de l'ILRAD (P.A.O. Majiwa, R. Masake, V. Nantulya, M. Touré) pour la fourniture des réactifs et leurs conseils techniques. Nous remercions le Dr S.M. Touré, Directeur du CRTA, pour son soutien constant ainsi que nos techniciens L. Millogo, Y. Mémé, J. Simporé pour leur aide technique au laboratoire et sur le terrain.

Références

1. Aerts D., Truc P., Penchenier L., Claes Y., Le Ray D. (1992). A kit for *in vitro* isolation of trypanosomes in the field : first trial with sleeping sickness patients in the Congo Republic. *Trans R Soc Trop Med Hyg* ; 86 : 394-395.
2. Barnes D.A., Mottram J., Selkirk M., Agabian N. (1989).Two variant surface glycoprotein genes distinguich between different substrains of *Tripanosoma brucei gambiense. Molec Biochem Parasit* ; 34 : 135-146.
3. Bocquentin R., Duvallet G. (1990). Amélioration de la reproductibilité du test ELISA adapté à la détection d'anticorps anti-*trypanosoma congolense* chez les bovins. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop* ; 43(2) : 179-186.
4. Bocquentin R., Very P., Duvallet G. (1990). Cinétique des anticorps après traitement trypnocide chez les bovins infectés expérimentalement ou naturellement. Intérêt épidémiologique. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop* ; 43(4) : 479-483.
5. Borst P., Fase-Fowler F., Gibson W.C. (1987). Kinetoplast DNA of *Trypanosoma evansi. Molec Biochem Parasit* ; 23 : 31-38.
6. Boyt W.P. (1986). Guide pratique pour le diagnostic, le traitement et la prévention de la trypanosomiase animale africaine. FAO, Rome, Italie.
7. Dickin S.K., Gibson W.C. (1989). Hybridisation with a repetitive DNA probe reveals the presence of small chromosomes in *Trypanosoma vivax. Molec Biochem parasit* ; 33 : 135-142.
8. Gibson W.C., Dukes P., Gashumba J.K. (1988). Species specific DNA probes for the identification of African trypanosomes in tsetse filies. *Parasitology* ; 97 : 63-73.
9. Hoste C. (1987). Elevage et trypanosomiase animale africaine. Thèse de doctorat d'Etat, Université Paris VI, 30 septembre 1987.
10. IEMVT-CIRAD (1991). Diagnostic et traitement des trypanosomes animales en Afrique. I. Le diagnostic. Fiche technique d'élevage tropical, fiche n°3, juin 1991, Ministère de la coopération/IEMVT-CIRAD, Paris, France.
11. Jahnke H.E., Tacher G., Keil P., Rojat D. (1988). Livestock production in tropical Africa, with special reference to the tsetse affected zone. In : Livestock Production in tsetse affected areas of Africa, Procceding of a Meeeting held 23-27 November 1987, Nairobi, Kenya, *ILCA/ILRAD Publ.*
12. Kanwe A.B., Bengaly Z., Saulnier D., Duvallet G. (1992). Evaluation du test de détection des antigènes circulants de trypanosomes à l'aide d'anticorps monoclonaux. Infections expérimentales et naturelles. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop* ; 45(3) sous presse.
13. Knowles G., Betschart B., Kukla B.A., Scott J.R., Majixa P.A.O. (1988) Genetically discrete populations of *Trypanosoma congolense* from livestock on the Kenyan coast. *Parasitology* ; 96 : 461-474.
14. Kukla B.A., Majiwa P.A.O., Young J.R., Moloo S.K., Ole-Moiyoi O. (1987). Use of species specific DNA probes for the detection and identification of trypanosome infection in tsetse flies. *Parasitology* ; 97 : 1-16.
15. Lumsden W.H.R., Kimber C.D., Dukes P., Haller L., Stanghellini A., Duvallet G. (1981). Field diagnosis of sleeping sickness in the Ivory Coast. I. Comparison of the miniature anion-exchange/centrifugation technique with other protozoological methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg .*; 75(2) : 242-250.
16. Lumsden W.H.R., Kimber C.D., Evans D.A., Doig S.J. (1979). *Trypanosoma brucei* : miniature anion-exchange/centrifugation technique for detection of low parasitaemias : adaptation for fiels use. *Tans R Soc Trop Med Hyg* ; 73 : 312-317.
17. Majiwa P.A.O., Otieno L.H. (1990). Recombinant DNA probes reveal simultaneous infection of tsetse flies with different trypanosome species. *Molec Biochem Parasit* ; 40 : 245-254.
18. Majiwa P.A.O., Webster P.A. (1987). A repetitive deoxyribonucleic acid sequence distinguishes *Trypanosoma simiae* from *T congolense. Parasitology* ; 95 : 543-598.

19. Masiga D.K., Gibson W.C. (1990). Specific probes for *Trypanosoma (trypanozoon) evansi* based on kinetoplast DNA minicircles. *Molec Biochem Parasit* ; 40 : 279-284.
20. Masiga D.K., Smyth A.J., Hayes P., Bromidge T.J., Gibson W.C. (1992). Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *Intern J Parasit.*
21. Massamba N.N., Williams R.O. (1984). Distinction of African trypanosome species using nucleic acid hybridisation. *Parasitology* ; 88 : 55-65.
22. Mathieu-Daude F. (1991). Mode de reproduction de *Trypanosoma brucei* dans ses populations naturelles : implications taxonomiques et épidémiologiques. Thèse de doctorat de spécialité, Parasitologie, Université de Montpellier II, France.
23. McNamara J., Dukes P., Snow W.F., Gibson W.C. (1989). Use of DNA probes to identify *Trypanosoma congolense* and *T. simiae* in tsetse flies from Gambia. *Acta Trop* ; 46 : 55-61.
24. McNamara J., Snow W.F. (1991). Improved identification of *Nannomonas* infections in tsetse flies from the Gambia. *Acta Trop* .; 48 : 127-136.
25. Moser D.R., Cook G.A., Ochs D.E., Bailey C.P., McKane M.R., Donelson J.E. (1989). Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Parasitology* ; 99 : 57-66;
26. Murray M., Murray P.K., McIntyre W.I.M. (1977). An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* ; 71 : 325-326.
27. Nantulya V.M. (1991). Molecular diagnosis of parasites. *Experientia* ; 47 : 142-145.
28. Nantulya V.M., Lindqvist K.J. (1989). Antigen-detection enzyme immunoassays for the diagnosis of *Trypanosoma vivax, T. congolense* and *T. brucei* infections in cattle. *Trop Med Parasit.* ; 40 : 267-272.
29. Nantulya V.M., Musoke A.J., Rurangirwa F.R., Saigar N., Muiya S.H. (1987). Monoclonal antibodies that distinguish *Trypanosoma congolense, T. vivax,* and *T. brucei. Parasite immun* ; 9 : 421-431.
30. Paindavione P., Pays E., Laurent M., Geltmeyer Y., Le Ray D., Mehlitz D., Steinert M. (1986). The use of DNA hybridisation and numerical taxonomy in determinig relationships between *Trypanosoma brucei* stocks and subspecies. *Parasitology* ; 92 : 31-50.
31. Paris I., Murray M., McOdimba F. (1982). A comparative evaluation of the parasitological techniques currently available for the diagnosis of African trypanosomiasis in cattle. *Acta Tropica* ; 39 : 307-316.
32. Pays E., Dekerke P., Van Assel S., Eldiridi A.B., Le Ray D., Van Meirvenne N., Steinert M. (1983). Comparative analysis of *Trypanosoma brucei gambiense* antigen gene family and its potential use in epidemiology of sleeping sickness. *Molec Biochem Parasit* ; 7 : 63-74.
33. Rae R., Luckins A.G. (1984). Detection of circulating trypanosomal antigens by enzyme immunoassay. *Ann Trop Med Parasit* ; 78 : 587-596.
34. Troncy P.M., Itard J., Morel P.C. (1981). Précis de parasitologie vétérinaire tropicale. Ministère de la Coopération/IEMVT, Paris, France, 717 p.
35. Very P., Bocquentin R., Duvallet G. (1990). Sensibilité de la double microcentrifugation pour la recherche des trypanosomes. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop* ;43(3) : 325-329.
36. Voller A., Bidwell D.E., Bartlett A. (1970). A serological study on human *Trypanosoma rhodesiense* infections using a microscale enzyme-linked immunosorbent assay *Trop Med Parasit* ; 26 : 247-2
37. Williams J.S., Duxbury R.E., Anderson R.I., Sadun E.H. (1963). Fluorescent antibody reactions in *Trypanosoma rhodesiense* and *T. gambiense* in experimental animal. *J Parasitol* ; 49(3) : 380-384.

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 31-47.

4

Caractérisation et typage de souches de *Clostridium perfringens* par la méthode ELISA

A. GINTER*, K. RENIER, A. COLLARD*, B. LIMBOURG**, G. DAUBE***, P. SIMON***, C. MANTECA***, P. COPPE*

* *Division Immunologie animale, Centre d'économie rurale, Marloie, Belgique.*
** *Centre de dépistage des maladies animales, Erpent, Belgique.*
*** *Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Service de bactériologie et des maladies bactériennes, Liège, Belgique.*

Clostridium perfringens est divisé en 5 toxinotypes (A, B, C, D et E) sur base de sa capacité à produire les toxines létales majeures α, β, ε et ι. Le test le plus communément utilisé pour détecter les toxines létales majeures est le test de toxinotypie sur souris. Ce test est fastidieux à mettre en oeuvre, il est éthiquement discutable et comme tout test biologique, il est sujet à de multiples variations. Au cours de ce travail, nous avons développé une méthode de typage et de caractérisation de souches de *Clostridium perfringens* basée sur le principe d'un test ELISA. Ce test permet de détecter la production des toxines α, β et ε par des souches isolées à partir d'échantillons prélevés sur des cadavres. Il permet également la détection directe des toxines dans des organes ou dans des liquides biologiques du cadavre (liquides péricardiques, péritonéaux, contenu intestinal)

Matériel et méthode

Production des toxines

Toxine alpha

Toxine commerciale
La phospholipase C ou phosphatidylcholine de *Clostridium perfringens* a été achetée auprés de la firme Sigma (P4039 125 U). Cette toxine a été purifiée par le fabricant par une méthode chromatographique.

Production en flacon
La souche ATCC 13124 de type A de *Clostridium perfringens* a été multipliée en flacon de 2 litres dans du milieu TGY (Trypticase, Glucose, Yeast extract) à 37°C durant 4 à 5 heures.

Production en fermenteur
Une préculture de la souche ATCC 13124 de *Clostridium perfringens* a été réalisée en milieu TGY durnt 4 heure à 37°C. La préculture (200 ml) a servi à l'inoculation de 2 litres de milieu TGY dns un fermenteur New Brunswick BioFlo III. Le pH a été maintenu durant la fermentation à 7 à l'aide d'une solution de NaOH 10 N. La culture a été réalisée en atmosphère d'azote à 37°C. L'agitation du milieu de culture a été maintenue à 100 RPM durant tout le temps de la fermentation. Une solution de glucose à 50% a été injectée en continu dans le liquide de fermentation à l'aide d'une pompe d'alimentation à raison de 830 µl/min.

Toxine bêta

Production en flacon
La souche ATCC 3626 de type B a été multipliée dans 2 litres de milieu TGY à 37°C durant 8 à 10 heures.

Production en fermenteur
Une préculture de la souche ATCC 3626 de *Clostridium perfringens* type B a été réalisée en milieu TGY durant 6 heures à 37°C. La préculture (200 ml) a servi à l'inoculation de 2 litres de milieu TGY dans un fermenteur New Brunswick BioFlo III. La culture en fermenteur a été réalisée de la même manière que pour la production de la toxine α (durée de la fermentation : 24 heures).

Toxine epsilon

Production en fermenteur
La souche NCTC 2062 du type D a été multipliée durant 20 heures à 37°C dans un fermenteur New Brunswick. Le milieu retenu pour cette fermentation était celui décrit par K.J. Beh et S.H. Buttery [1]. L'ajustement du pH a été réalisé manuellement durant les 10 premières heures de fermentation à l'aide d'une solution de NaOH 3N. La culture n'a pas été réalisée en atmosphère d'azote.

Purification des toxines

Toxine alpha

Filtration et chromatographie sur gel échangeur d'ions
et sur gel de type tamis moléculaire
Le surnageant de culture de *Clostrdium perfringens* type A souche ATCC 13124 a été filtré sur une membrane de 0,22 µ puis sur une membrane avec un seuil de coupure de 100 KD (appareil de filtration tangentielle Minitan de la firme Millipore). Le filtrat a été concentré sur une membrane avec un seuil de coupure de 30 KD [2, 7]. Le rétentat de cette étape de filtration a été équilibré en tampon phosphate 20 mM pH 6,8 1 mM EDTA, 1 mM PMSF (Phenylmethan-sulfonylfluorid, Merck, 7349) par passage sur un gel sephadex G25 (Pharmacia G25 Sephadex Medium, 100 g, 17-0033-01). L'échantillon a ensuite été appliqué sur un gel échangeur anionique (sepharose Q fast flow de la firme Pharmacia 17-0510-01) en utilisant le même tampon. La séparation des divers composants de l'échantillon a été réalisée en appliquant un gradient linéaire de NaCl (0 à 500 mM NaCl) dans le tampon phosphate de base. Les fractions présentant une activité lécithinasique en gel d'agarose ont été concentrées par filtration tangentielle sur une membrane avec un seuil de coupure de 10 KD. Le rétentat de cette étape de filtration a été appliqué sur un gel superdex 75 (Pharmacia Hiload 26/60 superdex 75 prepgrade 17-1070-01) dans un tampon phosphate 50 mM NaCl 100 mM pH 7,4.

Immunoaffinité
Nous avons fixé sur un gel de sepharose 4B activité au CnBr (Pharmacia 52-1153-00-AI) l'anticorps monoclonal DY2F5 spécifique de la toxine α (voir ci-aprés les conditions d'obtention de cet anticorps). Cet anticorps a été purifié à partir de liquide d'ascite par passage sur un gel de protéine G sepharose fast flow (Pharmacia 17-0618-01). Dix millilitres de milieu de culture produits sur fermenteur ont été appliqués sur le gel d'immunoaffinité à raison de 2 ml par passage. Aprés équilibration du gel dans un tampon phosphate 20 mM pH 7,2 le tampon d'élution (glycine 100 mM ph 2,8) a été appliqué sur le gel. L'éluat a été immédiatement neutralisé par l'addition d'une solution de Tris 1 M pH 8.

Toxine bêta

Précipitation et chromatographie sur gel échangeur d'ions
Le surnageant de culture de la souche ATCC 3626 de *Clostridium perfringens* type B a été précipité à l'aide d'une solution de sulfate d'ammonium (313 gr/L poids/volume [9]). Le culot a été remis en solution dans un tampon Tris 10 mM pH 7,2.Le sulfate d'ammonium a été éliminé par passage de l'échantillon sur un gel de type sephadex G25 équilibré en tampon Tris 10 mM pH 7,2. Les fractions positives au test de létalité sur souris ont été regroupées avant d'être appliquées sur un gel d'immunoaffinité spécifique de la toxine α. Ce dernier a été préparé par couplage sur un gel de sepharose 4B activité au CnBr (Pharmacia 17-0430-01) d'une solution d'immunoglobulines purifiées à partir d'un sérum polyclonal de lapin (Col 25) immunisé avec une préparation commerciale de toxine α (Sigma). Le premier pic issu de ce gel d'immunoaffinité (échantillon débarassé de la toxine α) a été appliqué sur une colonne de type DEAE (LKB TSK DEAE 5PV 2133-110

HPLC) préalablement équilibrée en tampon Tris 10 mM pH 7,2. Les divers composants de l'échantillon ont été élués à l'aide d'un gradient de NaCl (0 à 500 mM NaCl en Tris 10 mM pH 7,2). Les fractions positives au test de létalité sur souris ont été regroupées et concentrées par lyophilisation.

Précipitation et immunoaffinité
Le surnageant de culture de la souche ATCC 3626 de *Clostridium perfringens* type B a été précipité à l'aide d'une solution de sulfate d'ammonium (313 gr/L poids/volume). Le culot a été remis en solution dans un tampon PBS puis dialysé contre le même tampon de manière à éliminer le sulfate d'ammonium. L'échantillon a ensuite été appliqué sur un gel d'immunoaffinité spécifique de la toxine α (Col 25). Le premier pic issu de ce gel d'immunoaffinité (échantillon débarassé de la toxine α) a été appliqué sur un gel d'immunoaffinité spécifique de la toxine β. Ce gel a été préparé par couplage sur un gel de sepharose 4B activé au CnBr d'une solution d'immunoglobulines purifiées à partir d'un sérum polyclonal de lapin (Col 35) immunisé avec de la toxine β préparée selon la méthode décrite au chapitre précédent.

Toxine epsilon

Précipitation et chromatographie sur gel échangeur d'ions
Le surnageant de culture de la souche NCTC 2062 de *Clostridium perfringens* type D a été précipité à l'aide d'une solution de sulfate d'ammonium (350 g/L poids/volume [10]). Le culot a été remis en solution dans un tampon Tris 10 mM pH 7,2. Le sulfate d'ammonium a été éliminé par passage de l'échantillon sur un gel de type sephadex G25 équilibré en tampon Tris 10 mM pH 7,2. Les fractions positives au test de létalité sur souris ont été regroupées avant d'être appliquées sur un gel échangeur anionique (sepharose Q fast flow de la firme Pharmacia) en utilisant le même tampon. La fraction non fixée sur le gel a été équilibrée en tampon Tris 50 mM pH 9,4 puis elle a été à nouveau appliquée sur le gel sepharose Q fast flow. La séparation des divers composants de l'échantillon a été réalisée en appliquant un gradient linéaire de NaCl (0 à 500 mM NaCl) dans le tampon de base (Tris 50 mM pH 9,4). Les différentes fractions obtenues ont été analysées en SDS PAGE (Phast system Pharmacia, phast gel gradient 10-15 % 17-0540-01).

Immunoaffinité
Le surnageant de culture de la souche NCTC 2062 de *Clostridium perfringens* type D a été précipité à l'aide d'une solution de sulfate d'ammonium (313 gr/L poids/volume). Le culot a été remis en solution dans un tampon PBS puis dialysé contre le même tampon de manière à éliminer le sulfate d'ammonium. L'échantillon a ensuite été appliqué sur un gel d'immunoaffinité spécifique de la toxine ε (anticorps monoclonal CK6G4). L'élution de la toxine ε a été réalisée en suivant le même protocole que celui décrit pour la toxine α.

Immunisation des animaux

Toxine alpha

Un lapin néo-zélandais a reçu 100 µg de toxine α commerciale (sigma) par voie intradermique en présence d'adjuvant complet puis incomplet de Freund. Il a été rappelé à intervalle de 1 mois. Le réactif obtenu a été appelé Col 25.

Un cobaye a été immunisé de la même manière avec une dose de 10 µg de toxine α. Le réactif obtenu a été appelé Cob 13.

Pour l'immunisation des souris Balb/C, la toxine (10 µg) a été formolée (solution à 0,5%) à 37°C durant 3 jours puis elle a été dialysée contre du PBS. La toxine a été injectée par voie intrapéritonéale en présence d'adjuvant complet ou incomplet de Freund (J0, J30, J45). La fusion cellulaire a été réalisée au 48ème jour.

Toxine bêta

Un lapin néo-zélandais a reçu 10 à 20 µg de toxine β purifiée par précipitation et chromatographie sur échangeur d'ions, par voie intradermique en présence d'ajuvant complet puis incomplet de Freund. Il a été rappelé à intervalle de 1 mois. Le réactif obtenu a été appelé Col 35.

Un cobaye a été immunisé de la même manière avec une dose de 2 à 5 µg de toxine β. Le réactif obtenu a été appelé Cob 16.

Les rappels du lapin et du cobaye ont ensuite été effectués en utilisant la toxine purifiée par immunoaffinité.

Pour l'immunisation des souris Balb/C, la toxine (8 µg) a été formolée (solution à 0,5%) à 37°C durant 3 jours puis elle a été dialysée contre du PBS. La toxine a été injectée par voie intrapéritonéale en présence d'adjuvant complet ou incomplet de Freund (J0, J15, J65, J72). La fusion cellulaire a été réalisée au 76ème jour.

Toxine epsilon

Un lapin néo-zélandais a reçu 100 µg de toxine ε purifiée par immunoaffinité à l'aide de l'anticorps mooclonal CK6G4 par voie intradermique en présence d'adjuvant complet puis incomplet de Freund. Il a été rapelé à intervalle de 1 mois. Le réactif obtenu a été appelé Col 26.

Pour l'immunisation des souris Balb/C, la toxine (10 µg) a été formolée (solution à 0,5%) à 37°C durant 7 jours. Cette toxine avait été purifiée par précipitation et chromatographie sur gel échangeur d'ions. La toxine a été injectée par voie intrapéritonéale en présence d'adjuvant complet ou incomplet de Freund (J0, J30, J60). La fusion cellulaire a été réalisée au 63ème jour.

Production des anticorps monoclonaux

Les fusions cellulaires ont été réalisées selon la procédure classique à l'aide de myélome SP2/OAG14 [5].

Purification des sérums polyclonaux et des liquides d'ascite

Les liquide d'ascite et les sérums sanguins de lapin et de cobaye ont été purifiés sur gel de protéine G (Pharmacia) selon la procédure préconisée par le fabricant.

Couplage des anticorps à la péroxydase

Le couplage des anticorps à la péroxydase (VI 25.000 U Sigma P8375) a été effectué en suivant la procédure décrite par Boehringer (Biochemistry 1989 Boehringer Mannheim), elle-même dérivée de la méthode de P.K. Nakane et A. Kawaoi [6].

Test ELISA

ELISA indirect

Pour le criblage des fusions et l'évaluation du titre des sérums polyclonaux, les toxines α, β et ε ont été fixées directement sur les microplaques (Nunc maxisorp F16 4/67466) à raison de 10 µg par ml en PBS (une nuit à 4°C). Les microplaques ont ensuite été saturées par une solution d'hydrolysat de caséine (Merk 2242 caséine selon Hammersten) préparée selon la procédure préconisée par la firme Nunc (Caséine Nunc Bulletin 7.12.89). Les plaques ont ensuite été séchées par lyophilisation et stockées sous vide dans un emballage de plastic. Les échantillons à analyser (sérums sanguins, liquides d'ascite, solutions d'anticorps purifiés et surnageants de culture) ont été appliqués à une dilution adéquate en hydrolysat de caséine dans les micropuits. La fixation des anticorps a été mise en évidence par des antisérums spécifiques couplés à la péroxydase (chèvre anti immunoglobulines de souris, mouton anti immunoglobulines de cobaye et mouton anti immunoglobulines de lapin). La fixation des conjugués a été révélée par une solution de TMB (Tétra Méthyl Benzidine) et d'eau oxygénée (KPL TMB Microwell Peroxidase Substrate System 50-76-00).

ELISA sandwich

Toxine alpha

Les colonnes impaires des microplaques ont été sensibilisées avec l'anticorps polyclonal de cobaye Cob 13 et les colonnes paires avec un anticorps polyclonal provenant d'un cobaye non immunisé (anticorps témoin négatif). En parallèle, des microplaques ont été également sensibilisées avec l'anticorps monoclonal DY2F5 (colonnes impaires) et avec un anticorps monoclonal témoin (AK13A2) spécifique du BRSV (Bovine Respiratory Syncitial Virus). Après saturation des microplaques à l'aide d'une solution d'hydrolysat de caséine, elles ont été séchées par lyophilisation puis stockées sous vide en emballage de plastic. Les surnageants de culture de *Clostridium perfringens* ont été distribués tels quels sur les microplaques. Les échantillons provenant de contenu intestinal de veaux morts d'entérotoxémie ont été dilués au 1/2 en hydrolisat de caséine, puis centrifugés avant d'être distribués sur les microplaques. Les liquides biologiques (liquides péritonéaux et liquides péricardiques) ont également été dilués au 1/2 en hydrolisat de caséine. Aprés une heure d'incubation à température ambiante, les microplaques ont été rinçées par immersion dans une solution de PBS tween 20 0,1%. Le conjugué utilisé pour révéler la fixation de la toxine α sur la plaque était préparé par couplage à la peroxydase, d'une solution d'immunoglobulines purifiées à partir du sérum polyclonal du lapin Col 25. L'activité enzymatique a été révélée par une solution de TMB et d'eau oxygénée.

Toxine bêta
Le test ELISA a été réalisé comme décrit au chapitre précédent, l'anticorps de capture fixé sur la microplaque étant le sérum de lapin Col 35 et le conjugué étant préparé à partir du sérum polyclonal de cobaye Cob 16.

Toxine epsilon
Pour ce test, l'anticorps monoclonal CK6G4 a été utilisé comme anticorps de capture et le sérum polyclonal de lapin Col 26 comme conjugué.

Détermination de l'activité lécithinasique de la toxine alpha en gel d'agarose

Cinq millilitres d'une solution de lécithine d'œuf (Lécithine Merk Art. 5331 25g) (500 mgr/ 5 ml d'isobutanol) sont mélangés à 50°C avec 100 ml d'une solution de Tris maléate 50 mM pH 7 + $CaCl_2$ 10 mM +1,4 gr d'agar noble. La préparation est coulée en boîte de pétri. Après perforation des puits dans la gélose, les échantillons sont déposés à raison de 15 µl par puits (Calmels).

Test de toxinotypie sur souris

La technique utilisée est celle de la neutralisation de l'effet létal sur souris par des antisérums commerciaux (Wellcome RP04, RP05, RP06, RP08) produits contre les souches bactériennes complètes (corps bactériens + toxines). Les antisérums disponibles sont spécifiques de *Clostridium perfringens* type A, B, C, D et E. Les prélèvements à tester sont initialement étalés sur une gélose au sang pour anaérobies (anerobic blood agar base 152/00205M Gibco). Après une nuit à 37°C en anaérobiose (jarre Merck), les colonies isolées sont transférées dans un bouillon TGY. Après 4 à 5 heures de culture à 37°, les bouillons sont centrifugés à 6.500g durant 20 minutes. La moitié du surnageant récolté est trypsiné (Life technologies : trypsine 1 : 250 VSP grade 066-07072E; 2U = 25g) à 1 pour 1000 (V : V) durant 1 heure à 37°C. A 500 µl de surnageant trypsiné ou non sont ajoutés les antisérums spécifiques selon le protocole décrit dans le Tableau I. Le volume d'antisérum ajouté à 500 µl de surnageant de culture est de 50 µl. La neutralisation est réalisée à température ambiante durant 30 minutes.

Tableau I.

	Surnageant non trypsiné	Surnageant trypsiné
Antisérums	-	-
	+A	+A
	+A +C	+A +C
	+A +D	+A +D
	+A +C +D	+A +C +D
	+A +E	+A +E

Le mélange surnageant + antisérum est injecté par voie intrapéritonéale à des souris de 20 à 30 grammes. Les souris sont observées durant 3 jours et le taux de mortalité est enregistré.

Résultats

Production des toxines (Tableau II)

Tableau II.

Alpha commerciale	7 LD50/ unité "Sigma"
Alpha en flacon	non réalisé
Alpha en fermenteur	600 LD50/ ml
Bêta en flacon	3 - 10 MLD/ml
Bêta en fermenteur	600 LD50/ ml
Epsilon en fermenteur	45 - 1250 MLD/ ml

La dose létale 50 (LD50) est la dose la plus faible qui tue au moins la moitié d'un lot de souris.

La MLD (minimum lethal dosis) est la dose la plus faible qui tue 100% d'un lot de souris.

Immunisation des animaux

Lors de tests ELISA de type indirect (fixation des toxines purifiées sur les microplaques), la monospécificité des divers sérums polyclonaux (Col 25 et Cob 13 pour la toxine α, Col 35 et Cob 16 pour la toxine β, Col 26 pour la toxine ε) a pu être confirmée. Le pouvoir de neutralisation de l'effet létal des toxines correspondantes a également été confirmé pour ces 5 sérums polyclonaux.

Production des anticorps monoclonaux (Tableau III)

Tests ELISA

Toxinotypie des souches de Clostridium perfringens *(comparaisons entre le test ELISA et les sondes génétiques).*

171 souches de *Clostridium perfringens* ont été isolées en milieu TGY à partir de divers échantillons (108 contenus intestinaux, 32 matières fécales, 9 colons, 4 foies, 7 reins, 2 liquides péritonéaux, 1 bile, 1 rate et 7 échantillons d'origine inconnue) provenant de diverses espèces animales (21 moutons, 11 chèvres, 45 porcs, 45 bovins, 15 chats, 26 chiens, 3 cerfs et 5 échantillons d'origine inconnue). Les surnageants de ces 171 souches

ont été testés en ELISA de type sandwich pour la présence des toxines α (avec le polyclonal col 25 ou le monoclonal DY2F5), β et ε. Ces échantillons ont également été testés avec l'anticorps monoclonal CN2E12, un anticorps spécifique d'un déterminant antigénique de stucture de *Clostridium perfringens*. Cet anticorps permet de déceler un niveau anormalement élevé de *Clostridium perfringens* dans un échantillon biologique.

Les résultats obtenus avec ces divers tests ELISA ont été comparés à ceux obtenus à l'aide de sondes génétiques (sonde alpha et epsilon [4]) (Tableaux IV, V VI).

Tableau III.

Antigène	Nb fusions	Total clones	Clones positifs	Clone	Isotype
Alpha	6	57	4	DY2F5	IgG1, K
				DY5H5	IgG2a, K
				DY8C7	IgG1, K
				DY8H2	IgG1, K
Bêta	2	27	3	EI2D7	IgM, K
				EI8H9	IgM, K
				EI8E4	IgM, K
Epsilon	2	30	7	BQ5D6	IgG1, ?
				BQ11A9	IgG1, ?
				CK6G4	IgG1, K
				CK4D11	IgG1, K
				CK1B2	IgG1, K
				CK4H8	IgG1, K
				CK1A4	IgG1, K

Tableau IV. Comparaison ELISA CN2E12 *versus* alpha toxine et sonde alpha.

	Sonde α+	ELISA a (col 25)		
CN2E12		+	+/-	-
+	170	157	8	5
+/-	0	0	0	0
-	1	0	1	0
Total	171	157	9	5

Tableau V. Comparaison ELISA DY2F5 *versus* sonde α, ELISA CN2E12 et alphá toxine.

	Sonde α	ELISA CN2E12			ELISA alpha		
DY2F5	+	+	+/-	-	+	+/-	-
+	17	17	0	0	17	0	0
+/-	4	4	0	0	3	0	0
-	126	126	0	0	116	7	3
Total	147	147	0	0	136	7	4

Sur les 171 échantillons, 147 seulement ont été testés à l'aide du monoclonal DY2F5.

Tableau VI. Comparaison ELISA epsilon toxine *versus* sonde epsilon, ELISA alpha et ELISA CN2E12.

	Sonde ε		ELISA alpha	ELISA CN2E12				
ELISA ε	+	-	+	+/-	-	+	+/-	-
+	31	0	26	3	2	30	0	1
+/-	0	1	1	0	0	1	0	0
-	0	139	130	6	3	139	0	0
Total	31	140	157	9	5	170	0	1

L'absence de sonde spécifique de la toxine β a empêché l'établissement de toute comparaison avec les résultats obtenus en ELISA. Sur les 171 échantillons, 10 ont été positifs en ELISA.

Toxinotypie de souches de **Clostridium perfringens** *(comparaisons entre le test de létalité sur souris, le test ELISA et les sondes génétiques)*

24 souches isolées en culture ont été caractérisées par le test ELISA pour la production de toxines α et ε, et les résultats obtenus ont été comparés avec ceux fournis par les sondes génétiques et par le test de létalité sur souris. Le Tableau VII présente les résultats obtenus.

Tableau VII.

		Toxinotypie sur souris			
		A	B	D	NL
ELISA alpha	+	18	1	1	4
Sonde alpha	+	18	1	1	4
ELISA epsilon	+	0	1	1	0
Sonde epsilon	-	0	1	1	0

NL : souche non létale

Tests réalisés à partir d'échantillons prélevés sur un veau avec des anses intestinales ligaturées

Les échantillons prélevés au niveau de la lumière intestinale d'un veau avec des anses ligaturées ont été analysés en ELISA. Le Tableau VIII reprend la liste des souches inoculées au sein des 13 anses isolées. Les résultats obtenus en ELISA à partir du contenu intestinal figurent également sur ce tableau. Les prélèvements ont été effectués 12 heures après l'inoculation expérimentale.

Tableau VIII.

		Alpha	Bêta	Epsilon	CN2E12	DY2F5
0	milieu culture	-	-	-	+	-
1	*C. sordelli* isolé du terrain	-	-	-	-	-
2	*C. bifermentans*	-	-	-	-	-
3	*C. sordelli* toxinogène	-	-	-	+	-
4	*C. perfringens* 45017C6	+	-	-	+	-
5	*C. perfringens* 45017MF3	+	-	-	+	+
6	*C. perfringens* 45017CO2	-	-	-	+	-
7	*C. perfringens* 45017CO4	+	-	-	+	-
8	*C. perf.* 45017 C6 + MF3 + CO2 + CO4	+	-	-	+	+
9	*C. sord.* isolé du terrain + *C. perf.* 45017C6	+	-	-	+	-
10	*C. sord.* isolé du terrain + *C. perf.* 45017MF3	+	-	-	+	-
11	*C. sord.* toxinogène + *C. perf.* 45017C6	+	-	-	+	-
12	milieu de culture	-	-	-	+	-

Tests réalisés sur des échantillons biologiques

Des échantillons tels que du contenu intestinal, du liquide péricardique ou péritonéal, du foie ont été prélevés sur des cadavres d'animaux morts dans des conditions qui laissaient suspecter une participation de *Clostridium perfringens.* Ces échantillons ont été testés en ELISA pour la présence des toxines α et ε ainsi qu'avec le test ELISA de détection de *Clostridium perfringens* (CN2E12). Les échantillons ont été mis en culture et quelques colonies ont été testées par hybridation avec les sondes α et ε. Seuls les échantillons donnant une réaction positive avec la sonde α ont été retenus pour la comparaison avec les résultats des tests ELISA (Tableau IX).

Tableau IX.

	ELISA alplha			ELISA CN2E12		
	+	+/-	-	+	+/-	-
sonde α+	6	4	12	17	1	4

Les souches de *Clostridium perfringens* isolées de 22 échantillons retenus pour cette étude ont été testées par hybridation avec la sonde ε. Aucune de ces souches n'a donné de signal positif avec cette sonde (Tableau X), alors que l'ELISA a donné un signal positif avec un échantillon et un signal douteux avec deux autres échantillons.

Tableau X.

	ELISA epsilon		
	+	+/-	-
sonde ε–	1	2	19

Discussion

Production de toxines`

La production des toxines α, β et ε s'étant révélée particulièrement médiocre en flacon, les cultures ont été réalisées en fermenteur. Dans ces conditions, la production des 3 toxines était très bonne comme indiqué dans le Tableau II. La toxine α d'origine commerciale a été utilisée à plusieurs reprises au cours de ce travail.

Purification des toxines

Toxine alpla

Toxine commerciale
L'analyse en SDS PAGE avec coloration à l'argent de la préparation commerciale (100 µg/ml de protéines) a montré la présence d'une bande majoritaire d'un poids moléculaire d'environ 43 KD. D'autres bandes d'un poids moléculaire supérieur ou inférieur étaient également visibles. La préparation commerciale n'est donc pas d'une pureté suffisante.

Filtration et chromatographie
L'analyse en SDS PAGE avec coloration au bleu de coomasie d'une préparation de toxine α purifiée par filtration tangentielle et chromatographie échangeuse d'ions a montré que la bande majoritaire est dédoublée (40 KD et 41.5 KD). Ici aussi, d'autres bandes d'un poids moléculaire supérieur ou inférieur à celui de la toxine α étaient également visibles, ce qui indique bien que cette méthode de purification de la toxine n'est pas adéquate.

Immunoaffinité
L'analyse en SDS PAGE avec coloration à l'argent a montré la présence d'une seule bande d'un poids moléculaire à 42 KD. L'anticorps monoclonal DY2F5 est donc un réactif adéquat pour purifier de façon aisée la toxine α à partir de surnageant de culture de *Clostridium perfringens* type A.

Toxine bêta

Précipitation et chromatographie
Une analyse en SDS PAGE avec coloration à l'argent de la préparation de toxine β purifiée par précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie échangeuse d'ions a montré que la toxine β était présente (poids mmoléculaire 35 KD) mais qu'elle était contaminée par de nombreuses autres protéines. Cette méthode est donc inadéquate pour purifier de façon valable la toxine β.

Précipitation et immunoaffinité
La préparation précédente a été adsorbée par un sérum polyclonal spécifique de la souche A, ce qui a eu pour effet de la débarasser d'un grand nombre de contaminants. L'analyse en SDS PAGE a montré que la toxine β était beaucoup plus pure que dans la préparation précédente si l'on excepte la présence d'un contaminant important d'un poids moléculaire d'approximativement 65 KD. Dans l'attente de la disponibilité d'un anticorps monoclonal, cette technique est donc retenue pour assurer la purification de la toxine β

Toxine epsilon

Précipitation et chromatographie
Les résultats obtenus en SDS PAGE avec coloration à l'argent de la préparation de toxine ε purifiée par précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie échangeuse d'ions ont montré que d'emblée la pureté de la toxine était très bonne. La bande majoritaire correspondant à la protoxine ε avait un poids moléculaire de 33 KD. Malgré les bons résultats enregistrés avec cette méthode, une procédure de purification de la toxine par

immunoaffinité a été développée dans le but de disposer d'une méthode plus rapide et plus facile à mettre en œuvre.

Immunoaffinité
La toxine ε a été purifiée par immunoaffinité sur l'anticorps monoclonal CK6G4. L'analyse de la préparation en SDS PAGE avec coloration à l'argent a démontré que la toxine était parfaitement purifiée.

Production des anticorps monoclonaux

Toxine alpha

L'anticorps DY2F5 neutralise l'effet létal de la toxine α sur souris. Cet anticorps reconnaît également la toxine α en western blotting et il neutralise son effet lécithinasique *in vitro*. DY2F5 est le seul anticorps spécifique de la toxine α qui soit capable d'assurer son immunocapture sur microplaque. Les 3 autres reconnaissent bien la toxine lorsque cette dernière est directement fixée sur la microplaque (ELISA indirect), mais ils sont incapables de la capturer lorsqu'ils sont eux-mêmes fixés sur la microplaque (ELISA sandwich). Assez curieusement, l'anticorps DY2F5 ne reconnait pas toutes les souches productrices de la toxine α.

Toxine bêta

Les signaux obtenus avec 3 anticorps monoclonaux spécifiques de la toxine β sont très faibles, ce qui peut sans doute être mis en relation avec la classe de ces anticorps (3 IgM). Ils n'ont pas été testés en neutralisation de l'effet létal, ni en western blotting.

Toxine epsilon

L'anticorps monoclonal CK6G4 fonctionne en immunocapture (ELISA sandwich), et en ELISA de type indirect (fixation de la toxine sur la microplaque). Cet anticorps ne reconnait pas la toxine en western blotting, et il ne neutralise pas son effet létal sur souris. Cet anticorps est utilisé pour purifier la toxine ε par immunoaffinité.

Tests ELISA

Toxinotypie de souches de Clostridium perfringens *(comparaisons entre le test ELISA et les sondes génétiques)*

Les résultats obtenus en ELISA en matière de détection des toxines α et ε dans des surnageants de culture de 171 souches de *Clostridium perfringens* isolées d'échantillons biologiques ont été comparés à ceux obtenus par typage moléculaire de ces mêmes souches à l'aide de 2 sondes génétiques spécifiques des gènes des toxines α et ε.
En comparaison des résultats obtenus avec la sonde α, la sensibilité du test ELISA spécifique de la toxine α est de 91,8% si on considère les douteux comme négatifs, et de 97,1% si on les considère comme positifs. Il n'est pas possible de calculer la spécificité du test, puisque dans cet essai, seuls des échantillons positifs pour la sonde ont été retenus. Les 5

échantillons négatifs pour la toxine α sont bien des faux négatifs, puisque dans les mêmes conditions de culture, l'anticorps CN2E12 parvient bien à détecter la présence de la bactérie (Tableau IV). Pour une raison inconnue, il semble que ces 5 souches n'ont pas produit de toxine en culture ou qu'elles en ont produit à un niveau trop faible pour que la toxine soit détectable par le test ELISA. Il est à remarquer que parmi ces 5 souches, 2 sont du type D (Tableau VI), un type qui est connu pour être un faible producteur de toxine α.

Sur les 9 souches qui ont donné un résultat douteux en ELISA de détection de la toxine α, 8 ont produit un résultat positif avec l'anticorps CN2E12 et 1 un résultat négatif (Tableau IV). En aucun cas, une souche positive pour la toxine α n'a donné de résultat négatif avec l'anticorps CN2E12. Sur les 9 souches douteuses au test ELISA α, 3 étaient de type D (Tableau VI).

Si on compare les résultats fournis par l'anticorps CN2E12 avec ceux obtenus avec la sonde α, (Tableau IV), on obtient une sensibilité du test de 99,4%. Seul un échantillon a donné un résultat faussement négatif. Il s'est révélé, par après, que cet échantillon n'était pas pur (contamination par d'autres micro-organismes).

Le Tableau V démontre clairement que l'anticorps monoclonal DY2F5 ne reconnait qu'un nombre limité de souches bactériennes (17 sur les 136 souches trouvées positives avec le test ELISA de détection de la toxine α). Le séquençage des gènes provenant de souches DY2F5 positives et négatives est actuellement en cours de manière à déterminer à quel niveau de la toxine se situe d'épitope reconnu par le monoclonal. Il semble bien qu'au sein des souches DY2F5 négatives, une proline remplace la sérine en position 363 [8]).

En l'absence de sondes spécifiques du gène de la toxine β, il n'est pas possible de valider le test ELISA de détection de cette toxine. Les sérums polyclonaux utilisés pour produire ce test semblent toutefois manquer actuellement d'affinité et les signaux enregistrés restent faibles même lorsque des souches de référence sont utilisées. Le fait de disposer depuis peu de quantités importantes de toxine β pure devrait permettre de remédier à cette situation et d'améliorer la qualité générale du test.

Pour la toxine ε (Tableau VI), la sensibilité du test ELISA est de 100% et la spécificité de 99,3% si on classe l'échantillon douteux dans les positifs (sensibilité = 100%, spécificité = 100% si on classe l'échantillon douteux dans les négatifs).

Toxinotypie de souches de Clostridium perfringens *(comparaisons entre le test de létalité sur souris, le test ELISA et les sondes génétiques)*

Sur les 24 souches testées (Tableau VII), les résultats obtenus avec les tests ELISA se sont révélés être parfaitement identiques à ceux obtenus avec les sondes génétiques. Quatre échantillons n'ont pas pu être typés sur souris (souches non létales). Ces 4 souches étaient du type A tel que confirmé par ELISA et par les sondes génétiques.

Tests réalisés à partir d'échantillons prélevés sur un veau avec des anses intestinales ligaturées

On constate en analysant le Tableau VIII, que l'anticorps CN2E12 donne un signal positif avec le contenu des anses intestinales inoculées avec *Clostridium perfringens.* Les anses 0 et 12 sont également positives, ce qui indique que la simple inoculation de milieu de culture a suffi à favoriser le développement des souches de *Clostridium perfringens*

présentes dans l'intestin du veau. Ce fait a pu être confirmé par culture. Assez curieusement, le contenu de l'anse numéro 3 a également donné un résultat positif avec l'anticorps CN2E12, alors que seul du *Clostridium bifermentans* y avait été inoculé. Par culture, il a été possible de démontrer que dans cette anse également une souche endogène de *Clostridium perfringens* avait eu l'occasion de se multiplier.

Le test ELISA de détection de la toxine a pu identifier la présence de la toxine dans toutes les anses où on pouvait s'attendre à l'y trouver, à l'exception des anses 0 et 12 (milieu de culture) et de l'anse 6 (souche 45017CO2 de *Clostridium perfringens*) Cette dernière souche était très faiblement hémolytique *in vitro* ce qui peut expliquer que le test ELISA ne l'ait pas détectée.

Les ELISA α et ε sont restés négatifs, ce qui correspond bien à ce que l'on pouvait attendre.

L'anticorps DY2F5 n'a détecté la toxine α que dans deux anses. Il confirme ici ce que l'on sait de lui, c'est à dire qu'il ne reconnaît qu'un nombre limité de souches productrices de la toxine α.

En résumé, on peut dire que cet essai a parfaitement démontré l'efficacité des tests ELISA à détecter les toxines létales majeures et un taux élevé de *Clostridium perfringens* au niveau du contenu de l'intestin.

Tests réalisés sur des échantillons biologiques

Le Tableau IX montre clairement que la toxine α est très difficile à déceler dans des échantillons biologiques (10 échantillons positifs sur 22 en prenant en considération les douteux). La toxine α est en effet très sensible à l'action des enzymes protéolytiques, et elle est très vite dégradée dans les échantillons biologiques. Le monoclonal CN2E12 reconnaît pour sa part un antigène beaucoup plus résistant et les résultats présentés dans le Tableau IX montrent que ce test ELISA est beaucoup plus fiable pour détecter la présence de *Clostridium perfringens* dans les échantillons biologiques (18 positifs au test ELISA sur 22 échantillons positifs avec la sonde α). Les 4 échantillons négatifs ont tous donné un comptage inférieur à 3 millions de bactéries par millilitre, ce qui peut expliquer qu'ils n'aient pu être détectés par le test ELISA CN2E12. Pour le test ELISA de détection de la toxine ε, 19 échantillons sur 22 donnent des résultats concordants, 1 échantillon est positif au test ELISA et négatif au test d'hybridation avec la sonde, et deux autres échantillons donnent des résultats douteux en ELISA. Il se pourrait que les souches typées par hybridation avec la sonde ne soient pas représentatives de la population générale des clostridies de l'échantillon biologique. L'hybridation n'a en effet été réalisée que sur un nombre très restreint de souches.

Conclusion

Les outils développés dans le cadre de ce travail permettent d'aborder de façon plus aisée et plus efficace que par le passé l'étude des pathologies dues à *Clostridium perfringens*. Ils permettront à l'avenir de ne plus devoir passer par le test de toxinotypie sur souris toujours très laborieux à effectuer et éthiquement condamnable. Le problème de la détection des toxines létales majeures directement au sein d'échantillons pathologiques semble devoir être abordé avec prudence. La toxine α est en effet très rapidement dégradée et sa

détection directe sur le cadavre semble devoir passer par un test ELISA décentralisable à réaliser immédiatement au moment de l'autopsie.

L'ELISA faisant appel à l'anticorps monoclonal CN2E12 donne des résultats plus fiables en ce qui concerne la détection de *Clostridium perfringens* dans des échantillons biologiques. En ce qui concerne la toxine β, l'absence de sondes génétiques nous empêche provisoirement de tirer des conclusions quant à la validité de notre test. Quoi qu'il en soit, nous pensons que ce test devra encore évoluer. Les tests que nous avons développés pour la détection de la toxine ε et pour la mise en évidence d'un niveau anormalement élevé de *Clostridium perfringens* sont au point et peuvent être utilisés en routine.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier le Dr Marchal et son équipe de l'Institut Pasteur du Brabant pour l'aide apportée à la réalisation de ce travail.
Ce travail a été réalisé grâce au support financier de l'I.R.S.I.A. (Institut pour l'encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture).

Références

1. Beh K.J., Buttery S.H. (1978). Reverse phase passive haemagglutination and single radial immunodiffusion to detect epsilon antigen of *Clostridium perfringens* type D. *Aus Vet J* ; 54 : 541-544.
2. Bruce A. (1970). Diner purification and properties of *Clostridium welchii* phospholipase C. *Bioch Bioph Acta* ; 198 : 514-522.
3. Calmels D. Mise en évidence et titrage de la toxine alpha de *Clostidium perfringens* par diffusion radiale. Iffa Mérieux, Lyon, France.
4. Daube G. (1993). Typage moléculaire de *Clostridium perfringens*. Application à l'étude de l'entéroxémie bovine. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Vétérinaires, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Belgique.
5. Kohler G., Milstein C. (1975). Continuous culture of fused cells secreting antibody of predifined specificity. *Nature London* ; 256 : 495-497.
6. Nakane P.K., Kawaoi A. (1974). Peroxidase-labeled antibody, a new method of conjugation. *J Hist Cyt* ; 22 (12) : 1084-1091.
7. Odendaal M.W. (1987). Purification of the alpha toxin of *Clostridium perfringens* type A by ultrafiltration and gel chromatography. *Ond J Vet Res* ; 54 : 39-43.
8. Saint-Joanis B., Garnier T., Cole St.T. (1989). Gene cloning shows the alpha-toxin of *Clostridium perfringens* to contain both sphingomyelinase and lecithinase activities. *Mol Gen Genet* ; 219 : 453-460.
9. Sakurai J., Fujii Y. (1987). Purification and characterization of *Clostridium perfringens* beta toxin *Toxicon* ; 25 (12) : 1301-1310.
10. Worthington R.W., Mülders M.S.G., Van Rensburg J.J. (1973). *Clostridium perfringens* type D epsilon protoxin. Some chemical, immunological and biological properties of a highly purified protoxin. *Ond J Vet Res* ; 40(4).

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 49-55.

5

Le ribotypage est-il intéressant pour la recherche d'un marqueur épidémiologique dans les souches de *Bordetella bronchiseptica* ?

S. VANDEVENNE, J. MAINIL, A. KAECKENBEECK

Faculté de Médecine Vétérinaire, Bactériologie, Liège, Belgique.

Les bactéries du genre *Bordetella* sont responsables de pathologies respiratoires en médecine vétérinaire et en médecine humaine. Ce genre comprend deux espèces dont le pouvoir pathogène est limité à l'espèce humaine (*B. pertussis* et *B. parapertussis)* [6], une dont le pouvoir pathogène est limité au dindon (*B. avium*) et une dont le pouvoir pathogène s'étend à diverses espèces animales (*B. bronchiseptica*) [1]. Cette dernière espèce est un pathogène respiratoire du porc (en synergie avec *Pasteurella multocida* type D dans la rhinite atrophique) et du chien (associée à d'autres agents, dans la toux des chenils). Elle est aussi responsable de troubles respiratoires et septicémiques dans diverses autres espèces animmales (lapin, cobaye...). *B. bronchiseptica* est également connue depuis très longtemps comme pathogène respiratoire chez l'homme, mais son rôle était considéré comme très mineur jusqu'à récemment. En effet, depuis quelques années, la fréquence d'isolement de *B. bronchiseptica* à partir d'êtres humains dont l'état général est médiocre est en hausse, ainsi qu'à partir d'enfants [4].

Au vu des nombreuses espèces animales infectées par *Bordetella bronchiseptica*, il était intéresssant de comparer génotypiquement diverses souches isolées d'espèces animales différentes, afin de rechercher un marqueur épidémiologique permettant de suivre les souches en fonction de l'espèce animale d'origine et peut-être aussi des individus.

La première approche est le ribotypage [3] ou hybridation ADN-ADN avec des sondes radioactives dérivant des gènes codant pour l'ARNr 23S.

La seconde approche est une comparaison des patterns de restriction du produit d'amplification du gène de l'ARNr 16S.

Matériel et méthodes

Souches

17 souches de *Bordetella bronchiseptica* ont été étudiées : 9 souches humaines (isolées de 3 sujets à des moments différents) : R1, R2, R3, R4, B1, B2, B3, M1, M2; 3 souches de lapins (isolées de 3 sujets différents) : LR1, LR2, 52125; 2 souches canines (isolées de 2 sujets différents) : 45075, 55110; 2 souches équines (isolées de 2 sujets différents) : CV1, CV2 et 1 souche porcine : B6L. Deux souches du genre *Alcaligenes*, un genre proche de *Bordetella* ont aussi été étudiées pour comparaison : 6080T (*Alcaligenes faecalis*) et 6075T (*Alcaligenes piechaudii*).

Le ribotypage

Extraction de l'ADN total

La technique d'extraction de l'ADN total est inspirée de la méthode de Popoff [7], qui repose sur une extraction par le lysosyme, le Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), et la pronase.

Electrophorèse

L'ADN est restreint par un des enzymes de restriction suivant : *Bam* HI, *Bgl* II, *Eco* RI, *Hind* III, *Pst* I ou *Xho* I et est ensuite soumis à une électrophorèse d'une nuit à 1,3 Volts/cm dans un gel d'agarose 0,6%. Les bandes sont ensuite révélées par transillumination aux ultra-violets (365 nm) après coloration au bromure d'éthidium.

Transfert de l'ADN

Après dénaturation à l'HC1 0,2M et au NaOH 0,5M, l'ADN est transféré sur une membrane de nylon (Hybond N^+, Amersham) selon la technique du "Vacuum Blot" (Bio-Rad). Les membranes sont ensuite imprégnées de NaOH 0,4M afin de fixer les fragments d'ADN.

Hybridation ADN-ADN

Sonde

La sonde 23S (1768pb), correspondant au gène codant pour l'ARNr 23S et une partie de l'ARNr 5S, est extraite du plasmide vecteur à l'aide des enzymes adéquats : *Kpn* I et *Sma* I. L'ADN est ensuite récupéré selon la technique "Gene-Clean" (BIO 101). Le marquage est effectué par la technique du random-priming [2].

Hybridations et lavages
Les membranes sont préhybridées pendant 1 heure à 65°C dans une solution 3XSSC, 10X Denhardts, 0,1% SDS et 1% d'ADN de sperme de hareng, sous agitation modérée. Ensuite, la sonde dénaturée est ajoutée au milieu de préhybridation pour atteindre une activité de 2 X 10^6 cpm. L'hybridation se déroule une nuit à 65°C sous agitation modérée. Après hybridation, les membranes subissent deux lavages de 20 minutes à 65°C dans une solution de 3XSSC, 0,1% SDS [8].

Autoradiographie
Les filtres lavés sont emballés dans un sachet plastique scellé hermétiquement et l'autoradiographie se déroule en cassette avec écrans renforçateurs à -80°C pendant 3 à 7 jours en fonction du signal.

Pattern de restriction du produit d'amplification

Amplification en chaîne par polymérase

Les primers ont été synthétisés selon la séquence publiée par Gurther *et al.* [5]. Aux tubes contenant 50µl d'ADN sont ajoutés 50 µl d'un mélange concentré deux fois, de telle sorte que la réaction d'amplification se déroule en solution 10mM Tris HC1 ph 8,5, 50mM KC1, 1,5mM $MgC1_2$, 0,01% gélatine, 0,2mM d'NTP (Pharmacia), 0,2µM de chaque primer spécifique, 20 U/ml Amplitaq DNA Polymerase. La réaction se déroule sur un DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus). Les cycles sont les suivants : prédénaturation pendant 5 minutes à 95°C, suivie de 30 cycles comprenat 1 minute à 95°C, 1 minute à 50°C et 2,5 minutes à 70°C.

Analyse du produit d'amplification

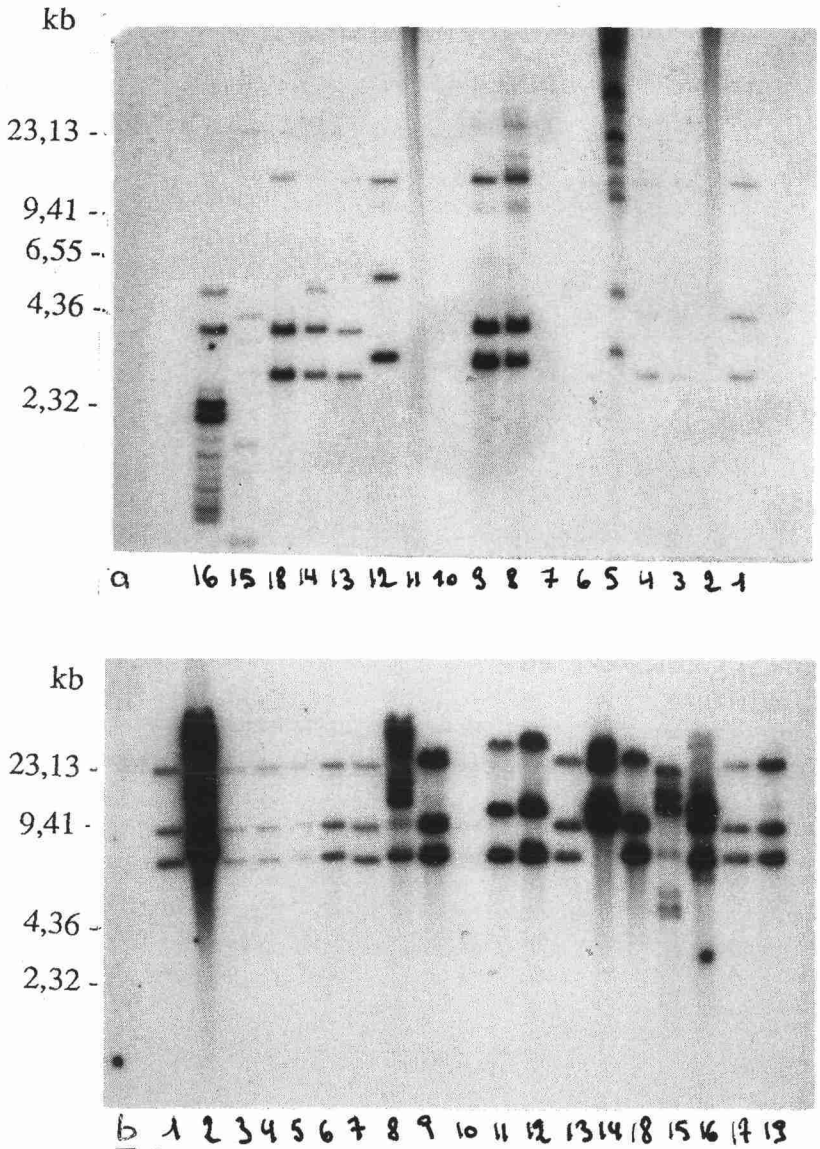
Après digestion par un des enzymes de restriction suivants, *Eco* RI, *Hinf* I, *Taq* I, *Xho* I, *Hind* I ou *Hpa* II, les échantillons sont chargés sur gel d'agarose 3% et soumis à une électrophorèse en 40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, sous un voltage constant de 3 Volts/cm durant 1 h 30. Après coloration au bromure d'éthidium, le produt d'amplification est visualisé par transillumination aux ultra-violets (365 nm).

Résultats et discussion

Le rybotipage (Figures 1 et 2)

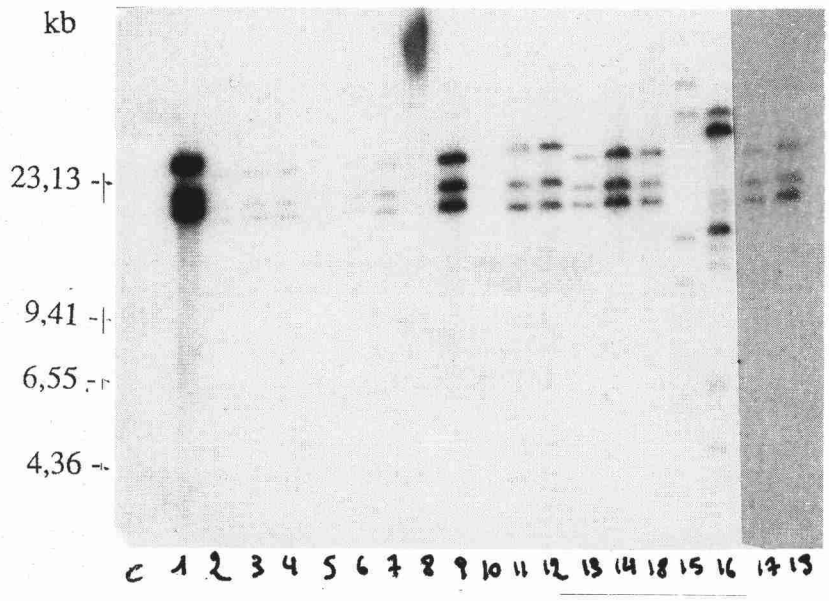
Des profils d'hybridation totalement différents ont été observés entre les souches de *Bordetella bronchiseptica* et d'*Alcaligenes*. Pour chaque enzyme de restriction utilisé, au moins une bande de même mobilité a été observée chaque fois pour toutes les souches de *B. bronchiseptica* étudiées, et nous permet ainsi de faire un diagnostic du genre et même d'espèce bactériens en comparaison avec les caractères phénotypiques.

L'hybridation après digestion par *Eco* RI montre un polymorphisme inter et intra espèce animale. Sur la Figure 1a, on remarque deux bandes communes entre les souches humaines B et M et une bande commune entre la souche humaine B et les deux souches



Figures 1 a, b et c : Ribotypes après digestion par *Eco* RI (a), *Bgl* II (b) et *Bam* HI (c).

Souches : *Alcaligenes faecalis* (15)
Alcaligenes piechaudii (16)
Bordetella bronchiseptica :humaines RI(1), R2(2), R3(3), R4(4), B1(8), B2(9), B3(10),M1(11), M2(12).
lapines LR1(5), LR2(6), 52125(7);
canines 45075(13), 55110(14);
équines CV1(19), CV2(17);
porcines B6L(18).



canines. Les deux souches canines ont un profil d'hybridation différent. Les profils de restriction après digestion par *Xho* I permettent également de différencier certaines souches d'une même espèce animale d'origine (Figure. 2). Après digestion par *Bam* HI (Figure 1c), les profils de restriction des souches humaines M sont différents de ceux des soouches humaines B et R et des profils des souches canines, lapines, équines et porcines. Les résultats obtenus après digestion par *Bgl* II mmontrent également un polymorphisme inter et intra espèce animales (Figure 1b).

Par contre, les profils de restriction sont identiques pour des souches isolées du même sujet à des moments différents.

Les résultats obtenus après restriction avec *Pst* I n'ont pu être interprétés suite à une restriction partielle (activité enzymatique réduite ?)

Les profils de restriction après digestion par *Hind* III étaient tous identiques, une seule bande a été révélée. Les fragments d'ADN restreints sont vraisemblablement de poids moléculaire trop élevés et devraient être séparés par une électrophorèse en champ pulsé.

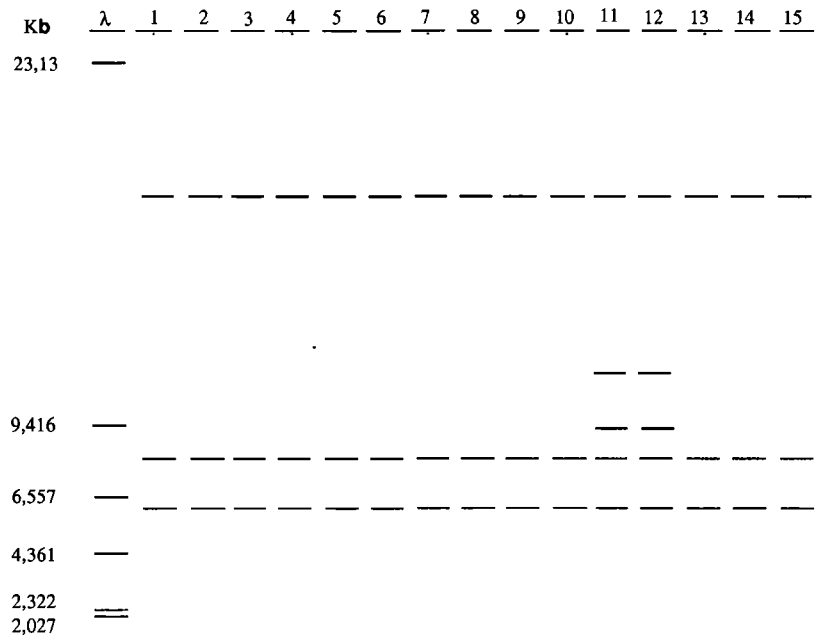


Figure 2. Ribotype après digestion par *Xho* I. Souches : *Bordetella bronchiseptica* humaines R1(1), R2(2), R3(3), R4(4), B1(8), B2(9), B3(10), M1(11), M2(12); lapines LR1(5), LR2(6), 52125(7); canines 45075(13), 55110(14), porcines B6L(18).

Hpa II

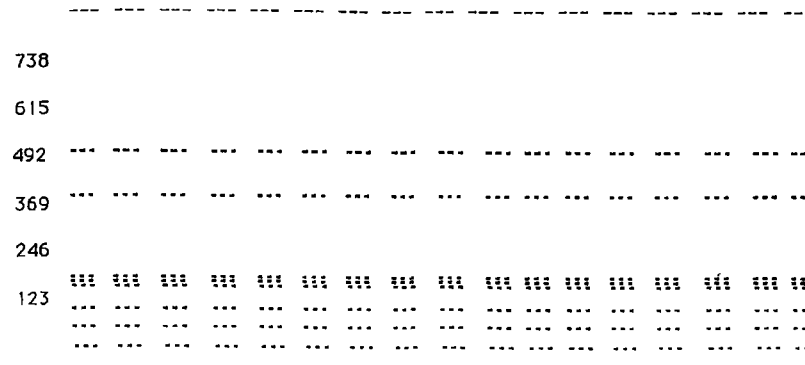


Figure 3. Résolution sur gel d'agarose 2% du produit d'amplification du gène 16S après digestion par *Hpa* II. On obtient 8 fragments de 498 pb, 159 pb, 130 pb, 118 pb, 81 ;b, et 11 pb. Les souches testées sont de gauche à droite : R1 à 4 (humain), 3 souches de lapins, B1 à 3 (humain), M1 et 2 (humain), 2 souches canines et 2 souches équines.

Pattern de restriction du produit d'amplification (Figure 3)

Aucun polymorphisme n'a été observé avec les différents enzymes utilisés. Par exemple, lors de la digestion par *Hpa* II, on retrouve les 8 fragments attendus (en fonction de la carte de restriction du gène), mais il n'y a aucun polymorphisme entre des souches de même espèce, ou entre des souches d'espèces animales différentes.

En fonction de ces résultats sur quelques souches de *Bordetella bronchiseptica*, nous pouvons donc conclure à un polymorphisme non seulement entre souches d'espèces animales différentes, mais aussi entre différentes souches d'une même espèce animale. Bien sûr, un plus grand nombre de souches devrait être étudié avant de pouvoir envisager des applications épidémiologiques. Il serait alors possible d'utiliser le ribotypage pour rechercher une source d'infection humaine ou pour tracer les souches dans une épidémie, dans et entre des exploitations porcines ou des chenils par exemple.

Par contre, les patterns de restriction du gène 16S, après amplification en chaîne par polymérase et digestion par différentes enzymes de restriction, n'apportent pas pour le moment d'information supplémentaire.

Références

1. Bisping W., Amstberg. (1988). Farbatlas zur diagnose bakterieller infektionserreger der Tiere, Hambourg, Germany, Ed. Parey : 153-156.
2. Feinberg A.P., Vogelstein B. (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to specific activity. *Anal Biochem* ; 132 : 6-13.
3. Grimont F., Grimont P.A.D. (1986). Ribosomial ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonotools. *Ann Inst Pasteur/Microbio* ; 137B : 165-175.
4. Guiso N. (1992). Comm. Personn.
5. Gurtler V., Vicki A., Mayoll W., Mayoll B. (1991). Classification of medically important clostridia using restriction endonuclease site differencesof P.C.R. amplified 16S rDNA. *J Gen Microbiol* ; 137 : 2673-26 .
6. Pitman M. (1984). In : Krieg N.R. *et al.* eds *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.. Williams and Wilkins, Baltimore, London ; 1 : 388-393.
7. Popoff M. (1991). Cours de Bactériologie, Taxonomie et Epidémiologie moléculaire. Institut Pasteur, Paris, France.
8. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning : A Laboratory Manual.* Cold Spr ing Harbor Laboratory Press, New-York, USA.

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 57-71.

6

Utilisation de la méthode d'amplification génétique (PCR) pour la détermination des types toxiques de *Clostridium perfringens* et la recherche de son entérotoxine

B. KADRA*, J.P. GUILLOU**, A. CHIKHI***

* *Service Vaccins Bactériens, Institut Pasteur d'Algérie, Alger, Algérie.*
** *Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires, Maisons Alfort, France.*
*** *Institut de Biologie, USTHB, Bab Ezzouar, Alger, Algérie.*

Résumé

Soixante et une souches de Clostridium perfringens *ont été identifiées par les techniques bactériologiques classiques, leur type toxinique a été déterminé par le test de toxinotypie sur souris. La production de l'entérotoxine par certaines souches a été mise en évidence par le test d'agglutination au latex et par le test de cytotoxicité sur cultures cellulaires VERO.*
Toutes ces souches ont été étudiées par la technique PCR (Polymerase Chain Reaction) en utilisant les cibles nucléiques suivantes :
- gène de la toxine alpha de C. perfringens,
- gène de toxine epsilon de C. perfringens,
- gène de l'entérotoxine de C. perfringens.
Nous avons procédé à des amplifications simples (amplifiant un seul gène), duplex ou tri-

plex (amplifiant plusieurs gènes dans le même tube), suivant que les bactéries exprimaient 1, 2 ou les 3 toxines.
Les produits sont révélés au terme de l'amplification par électrophorèse en gel d'agarose, par restriction enzymatique ou à l'aide de sondes oligonucléotidiques spécifiques marquées à la DIGOXYGENINE.
La technique P.C.R. s'est montrée beaucoup plus performante que les techniques d'identification et de typage utilisées habituellement (toxinotypie sur animal, tests immunologiques et de cytotoxicité sur cultures cellulaires).
Dès que le gène de la toxine bêta sera séquencé, nous pourrons envisager la mise au point d'un kit diagnostique utilisable aussi bien en santé animale qu'en hygiène alimentaire; il permettra l'identification simultanée de Clostridium perfringens *types A, B, C et D , et la recherche de l'entérotoxine.*

En Algérie, les entérotoxémies peuvent affecter et engendrer de lourdes pertes si des mesures de prévention et de prophylaxie ne sont pas appliquées de manière rigoureuse [6]. En effet, il s'agit là de toxi-infections à point de départ digestif, d'allure enzootique, communes à de nombreuses espèces animales, atteignant plus particulièrement les ovins [7,10].

Les germes responsables sont des anaérobies sporulés appartenant au genre *Clostri dium*, particulièrement *C. perfringens*, et à un degré moindre *C. sordelli* [1,2]. La détermination de la bactérie et la connaissance du type toxinique impliqué dans une entérotoxémie sont essentielles pour la mise en place d'une prophylaxie efficace.

L'identification de la toxine est effectuée par séroneutralisation sur animaux de laboratoire (souris ou cobayes) à l'aide d'antisérums spécifiques. Cette toxinotypie nécessite un approvisionnement permanent en animaux de laboratoire et l'utilisation de sérums diagnostiques monovalents de plus en plus difficiles à trouver et extrêmement coûteux.

Des techniques de substitution comme l'hémagglutination passive ou la technique ELISA ont été proposées. Elles nécessitent, là encore, des sérums diagnostiques quasiment introuvables, ce qui peut constituer un handicap pour leur développement. Il convient donc de trouver une méthode de remplacement pour la mise en évidence et le typage de *C. perfringens*.

Dans cette optique, il est intéressant d'évaluer les possibilités de la technique d'amplification génétique par P.C.R. comme outil de diagnostic.

En collaboration avec le LCRV (Laboratoire Central de Recherche Vétérinaire de Maisons-Alfort, Paris, France) et l'IPP (Institut Pasteur de Paris, France), une trousse de diagnostic pour le typage de *C. perfringens* est en cours de réalisation.

Les séquences codant pour les gènes des toxines alpha [9,12,13], epsilon [5] et entérotoxine [14] ont été publiées et nous ont permis de choisir des amorces spécifiques.

Intérêt et but du travail

Le but de ce travail est l'évaluation de la technique P.C.R. pour mettre en évidence et typer *C. perfringens* à l'aide de séquences de gènes de toxines déjà connues.

En parallèle, nous effectuerons les tests classiques d'identification et de toxinotypie. Pour les souches produisant de l'entérotoxine, nous effectuerons le test au latex et le test de cytotoxicité sur cultures cellulaires.

Matériel et méthode

Identification des souches

Pour l'identification de *C. perfringens*, nous avons utilisé les galeries classiques comme décrit par Sebald [11], ainsi que la galerie Api anaérobie.

Toxinotypie

C'est une méthode immunologique d'identification permettant la détermination du type toxinique *C. perfringens*.

Elle consiste en la neutralisation des toxines produites par des antisérums correspondants. Ce test se fait sur souris (Tableau I).

Tableau I. Principales toxines de *C. perfringens* et toxinotypie

Types	Principales toxines				Neutralisation par sérum anti-				
	α	β	ε	ι	A	B	C	D	E
A	+				+	+	+	+	+
B	+	+	+		-	+	-	-	-
C	+	+			-	+	+	-	-
D	+		+		-	+	-	+	-
E	+			+	-	-	-	-	+

(+) souris vivante

(-) souris morte

Remarque : il est bon de signaler qu'il existe également un autre schéma de toxinotypie effectué sur cobayes et impliquant des réactions de dermonécrose [12].

Recherche de l'entérotoxine de *C. perfringens*

Certaines souches de *C. perfringens* impliquées dans les intoxications alimentaires produisent de l'entérotoxine. Les deux tests les plus utilisés actuellement pour la mise en évidence de cette entérotoxine sont le test au latex [3] et le test de cytotoxicité sur cultures cellulaires [8].

Souches bactériennes

Les souches proviennent de l'IPA (Institut Pasteur, Alger, Algérie) : 36 souches, l'IPP : 17 souches et du LCRV : 8 souches.

Amorces nucléotidiques

Les amorces utilisées dans la réaction P.C.R. ont été sélectionnés sur les gènes codant pour la toxine alpha (Figure 1), epsilon (Figure 2) et entérotoxine (Figure 3). Ces amorces synthétiques sont constituées en général de 18 à 30 nucléotides et ont une composition en base guanine et cytosine variant de 45% à 55% afin d'optimiser au maximum l'hybridation sur la séquence d'ADN cible. Les choix des amorces sont effectués à l'aide des logiciels "PC gène" et "OLIGO".

```
===  -   -    ==========================================================PC/GENE===

AMPLIMER PL3. POS. 734-757 SUR ALPHATOXINE

                10         20         30         40         50         60
                 |          |          |          |          |          |
      1 AAGTTACCTT TGCTGCATAA TCCC

Total number of bases is: 24.
DNA sequence composition:    6 A;   7 C;   3 G;   8 T;

Sequence name: PL3
```

```
===  -   -    ==========================================================PC/GENE===

AMPLIMER PL7; POS. 475-498 SUR NALPHATOXIN

                10         20         30         40         50         60
                 |          |          |          |          |          |
      1 ATAGATACTC CATATCATCC TGCT

Total number of bases is: 24.
DNA sequence composition:    7 A;   7 C;   2 G;   8 T;

Sequence name: PL7

===  -   -    ==========================================================PC/GENE===
```

Figure 1 / Amorces PL_3 / PL_7 du gène codant pour l'alpha-toxine.

```
===  -   -    ==================================================PC/GENE

                10         20         30         40         50         60
                 ¦          ¦          ¦          ¦          ¦          ¦
      1 CTACTACTCA TACTGTGGGA ACTTCG

Total number of bases is: 26.
DNA sequence composition:    6 A;   7 C;   5 G;   8 T; 0 OTHER;

Sequence name: EPSILON443

===  -   -    ==================================================PC/GENE

                10         20         30         40         50         60
                 ¦          ¦          ¦          ¦          ¦          ¦
      1 GGAGTCTTTC TATTAAGGCA CCAGGA

Total number of bases is: 26.
DNA sequence composition:    7 A;   5 C;   7 G;   7 T; 0 OTHER;

Sequence name: EPSILON953

===  -   -    ==================================================PC/GENE

SONDE INTERNE GENE EPSILON DE C. PERFRINGENS POS.: 677

                10         20         30         40         50         60
                 ¦          ¦          ¦          ¦          ¦          ¦
      1 TAGTAGGACA AGTAAGTGGA AGTG

Total number of bases is: 24.
DNA sequence composition:    9 A;   1 C;   9 G;   5 T; 0 OTHER;

Sequence name: EPSILON677

===  -   -    ==================================================PC/GENE=
```

Figure 2. Amorces et sonde du gène codant pour l'epsilon-toxine.

```
===  -   -    ==========================================================PC/GENE

AMPLIMER SENS DE L'ENTEROTOXINE DE C. PERFRINGENS POS.418  26-BP

               10         20         30         40         50         60
                |         |          |          |          |          |
     1 CAAGCATCTG TAGAATATGG ATTTGG


Total number of bases is: 26.
DNA sequence composition:    8 A;   3 C;   7 G;   8 T; 0 OTHER;


Sequence name: ENTERO418

===  -   -    ==========================================================PC/GENE=

AMPLIMER ANTISENS DE L'ENTEROTOXINE DE C. PERFRINGENS POS. 808  24-BP

               10         20         30         40         50         60
                |         |          |          |          |          |
     1 GTCCAAGGGT ATGAGTTAGA AGAACG


Total number of bases is: 26.
DNA sequence composition:    9 A;   3 C;   9 G;   5 T; 0 OTHER;


Sequence name: ENTERO808

===  -   -    ==========================================================PC/GENE=

AMPLIMER SENS DE L'ENTEROTOXINE C. PERFRINGENS POS.607  26-BP

               10         20         30         40         50         60
                |         |          |          |          |          |
     1 GGAATATGGC TTAGTAAAAC ATCTGC


Total number of bases is: 26.
DNA sequence composition:    9 A;   4 C;   6 G;   7 T; 0 OTHER;


Sequence name: ENTERO607

===  -   -    ==========================================================PC/GENE=
```

Figure 3 : Amorces et sonde du gène codant pour l'entérotoxine.

Conditions de la réaction d'amplification

Simple amplification (gène alpha)

Nous avons dans un premier temps amplifié un fragment de 283 bp, correspondant au gène de l'alphatoxine qui est un marqueur d'espèce. Les réactions d'amplification ont été effectuées à l'aide du bain sec programmable : PCT-100 (M.J. Research Inc.). Dans chaque tube, on prépare la solution d'hybridation à laquelle on ajoute 5µl de la dilution Taq Polymérase (2U) (Tableau II).

Tableau II. Solution d'hybridation

Nombre de réactions	1	2	3	N=	C.T.	Q
H_2O bidist. stérile µl	14	28	42	14N=		
Tampon x 10	10	20	30	10N=		
DNTP dilués 1,25mM de chaque (II.2)	16	32	48	16N=	200µM	20 nmoles
Amplimer n° 1 (20µM)	5	10	15	5N=	1µM	100 pmoles
Amplimer n° 2 (20µM)	5	10	15	5N=	1µM	100 pmoles

Amplification Duplex et Triplex

Nous avons procédé à l'amplification simultanée de 2 gènes (alphatoxine et entérotoxine) et de 3 gènes (alphatoxine, entérotoxine et epsilon toxine). Les conditions des réactions sont similaires à la simple amplification. La seule variable est la quantité d'amorces à ajouter. Elle est de 3 µl de chaque amorce pour la duplex, et de 2 µl pour la triplex. Trente cycles thermiques (fixation des amorces à 50°C/1mn - extension à 72°C/1mn - dénaturation à 95°C/1mn) ont été effectués avant une extension terminale à 72°C/10mn.

Détection des produits d'amplification

Les produits sont révélés, au terme de l'amplification, par électrophorèse en gel d'agarose et à l'aide de sondes oligonucléotidiques spécifiques marquées à la digoxygénine.

Résultats

Identification

Nous avons constaté que les deux types de galeries (classique et Api anaérobie) permettent une identification précise de l'espèce *C. perfringens*.

Toxinotypie

La toxinotypie des souches testées de *C. perfringens* nous a donné les résultats exprimés dans le Tableau III.

Recherche sur l'entérotoxine de *C. perfringens*

Après avoir préalablement cultivé les souches de *C. perfringens* sur milieu de sporulation, nous avons procédé au test au latex et au test de cytotoxicité sur culture cellulaire. Quatre souches ont agglutiné les particules de latex, ce qui implique qu'elles sont productrices d'entérotoxine. Ces mêmes souches se sont révélées cytotoxiques sur culture cellulaire (Tableau IV).

Tableau IV.

Identification de la souche	Origine	Entérotoxine	
		Test au latex	Test de cytotoxicité sur culture cellulaire
CPNCIBE	IPP	+	+
R3	IPP	+	+
CP76	IPP	+	+
64	LCRV	+	+

Amplification génétique par P.C.R.

Simple amplification

Nous avons procédé dans un premier temps à des amplifications simples (amplifiant un seul gène) avec les couples d'amorces PL_3/PL_7 (alpha-toxine), P443/P953 (epsilon-toxine) et P418/P808 (entérotoxine). Ces couples d'amorces amplifient respectivement des régions de 283, 510 et 426 paires de bases, conformément aux prévisions de l'analyse informatique.

Amplification Duplex et Triplex

Selon que les bactéries exprimaient une, deux, ou trois toxines, nous avons effectué des amplifications duplex et triplex, c'est-à-dire que dans une même réaction, nous avons amplifié deux ou trois gènes dans le même tube.

Pour les souches R3 et 64, nous avons amplifié les gènes de l'alpha-toxine et de l'entérotoxine (Figure 4).

Une amplification triplex a été réalisée avec la souche CP76, où nous avons amplifié les gènes le d'alpha-toxine, de l'entérotoxine et de l'epsilon-toxine (Figure 5).

Spécificité des produits amplifiés

Bien que les bandes obtenues soient de poids moléculaire attendu, la spécificité de la réaction d'amplification a été confirmée par hybridation moléculaire à l'aide d'une sonde interne marquée à la digoxygénine.

Tableau III

Identification de la souche	Origine IPA/IPP/LCVR	Toxinotypie sur souris A	B	C	D	E
431I	IPA	+				
431R	IPA	+				
CPDE	IPA				+	
CPDA	IPA				+	
442	IPA	+				
CWC	IPA			+		
CP3	IPA	+				
CWD	IPA				+	
CP68/83	IPA	+				
CP33/53	IPA	+				
CP64/67	IPA				+	
CP35/53	IPA				+	
CP58/65	IPA	+				
380	IPA	nt	nt	nt	nt	nt
D137	IPA	+				
4461	IPA	+				
4891	IPA	nt	nt	nt	nt	nt
434	IPA	nt	nt	nt	nt	nt
439	IPA	nt	nt	nt	nt	nt
470	IPA	+				
8	IPA	+				
11F	IPA	+				
D286	IPA	+				
5	IPA			+		
6I	IPA				+	
CPC91	IPA			+		
CP39/91	IPA				+	
CP12	IPA	+				
CP27	IPA				+	
CP45/90	IPA	+				
CWA35	IPA	+				
36/91	IPA	+				
CP198	IPA	+				
249	IPA					+
CP49	IPA					+
CP2	IPA	+				
9	LCVR	+				
10	LCVR	+				
10F	LCVR	+				
11	LCVR	+				
12	LCVR				+	
16	LCVR	+				
19	LCVR	+				
64	LCVR	+				
128	IPP	+				
CP42	IPP	+				
CP45	IPP	+				
CP41	IPP	+				
CP40	IPP	+				
CP46	IPP	+				
CPNCIBE	IPP					+
R3	IPP	nt	nt	nt	nt	nt
CAPTCC13124	IPP	+				
CP3922	IPP	+				
CPG23	IPP	+				
CPD250	IPP				+	
CPD75	IPP				+	
CPD76	IPP				+	
CP33 89	IPP	+				
CP34.89	IPP	+				
CP35.89	IPP	+				
	Total					
Types toxiques		A	B	C	D	E	nt
Nombre		38	0	3	14	1	5

nt : non toxique

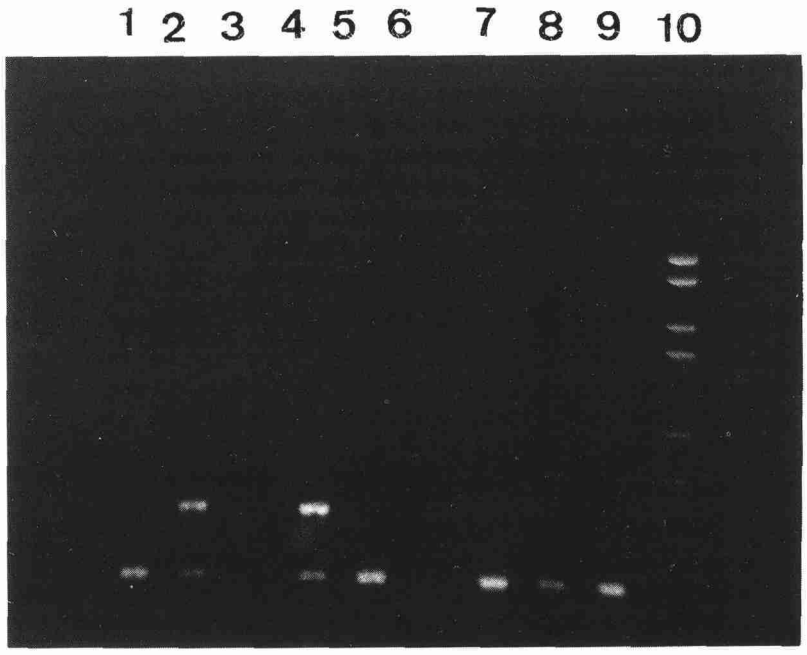


Figure 4. Amplification duplex avec les amorces PL_3/PL_7 (alpha-toxine) et P418/P808 (entérotoxine).
Souches de *C. perfringens* testées : 1 : Cp249; 2 : R_3; 4 : Cp64; 5 : Cp39/91; 7 : Cp5; 8 : Cp431; 9 : Cp6
Souches de *C. sordelli* testées : 3 : Cs27; 6 : Cs26
10 : Marqueur de taille moléculaire (ADN de phage lambda)

Southern Blot

L'hybridation moléculaire à l'aide de sondes internes permet d'identifier formellement le produit amplifié. Les résultats obtenus avec les oligonucléotides alpha, EP677, entéro 607, sondes internes de l'alpha-toxine, de l'epsilon-toxine, et de l'entérotoxine sont donnés par les Figures 6 et 7.

Les bandes observées sur le gel (Figure 6A) correspondant au fragment amplifié des gènes de l'alpha-toxine (283 bp) hybrident spécifiquement avec la sonde alpha (Figure 6B).

Sur la Figure 7, les fragments amplifiés des gènes de l'epsilon-toxine et de l'entérotoxine hybrident spécifiquement avec leur sonde respective.

Dot Blot

L'identification des produits d'amplification Dot Blot est réalisée à l'aide de souches froides marquées à la digoxygénine. L'hybridation réalisée avec les sondes EP677 et entéro 607 montre la spécificité de la réaction d'amplification (Figure 8).

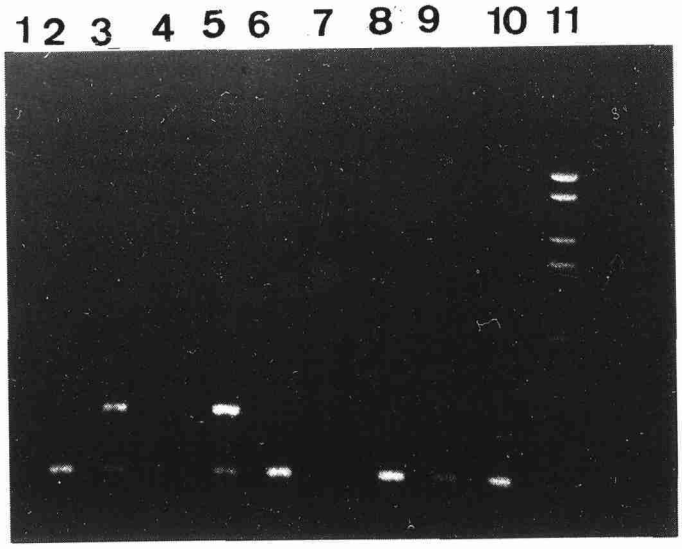
Figure 5. Amplification triplex avec les amorces PL_3/PL_7 (alpha-toxine), P418/P808 (entérotoxine) et P443/P953 (epsilon-toxine)
Souches de *C. perfringens* testées : A : R_3 ; 2 : Cp76; 3 : Cp75; 4 : G23; 5 : Cp264; 6 : Cp4; 7 : Marqueur de taille moléculaire (ADN de phage lambda).

Conclusions et perspectives

Ce travail nous a permis d'évaluer les possibilités de la technique d'amplification génique par P.C.R. pour le typage de *C. perfringens*. Nous avons procédé à des amplifications simples (amplifiant un seul gène), duplex ou triplex (amplifiant plusieurs gènes dans le même tube), suivant que les bactéries exprimaient une, deux ou trois toxines.

La spécificité des produits d'amplification est démontrée par hybridation moléculaire à l'aide de sondes internes aux fragments amplifiés, ainsi que par l'analyse des produits de restriction enzymatique.

La comparaison entre les séquences nucléotidiques des différentes espèces productrices d'une phospholipase C *(C. bifermentants, B. cereus...)* a permis le choix d'amorces spécifiques à *C. perfringens*. Des tests de P.C.R. duplex amplifiant le gène gène de



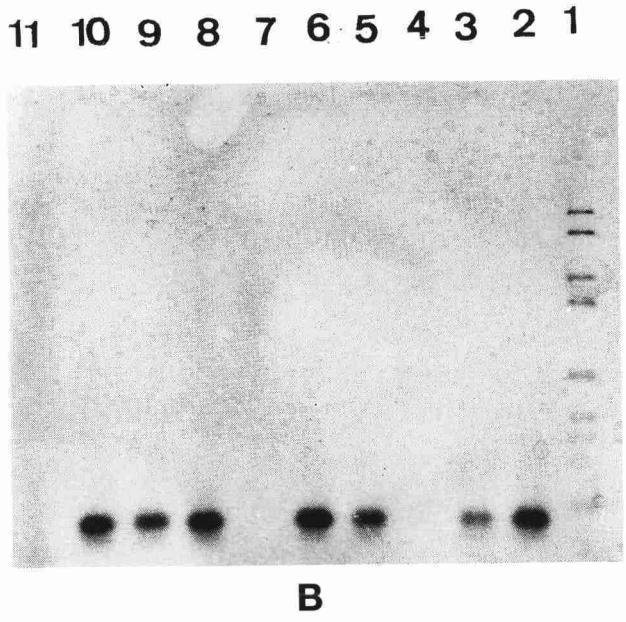
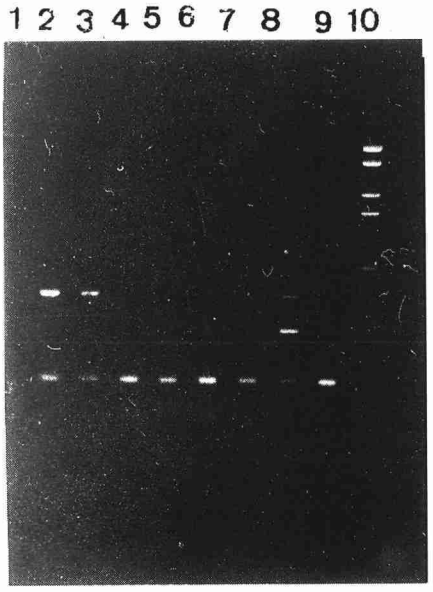
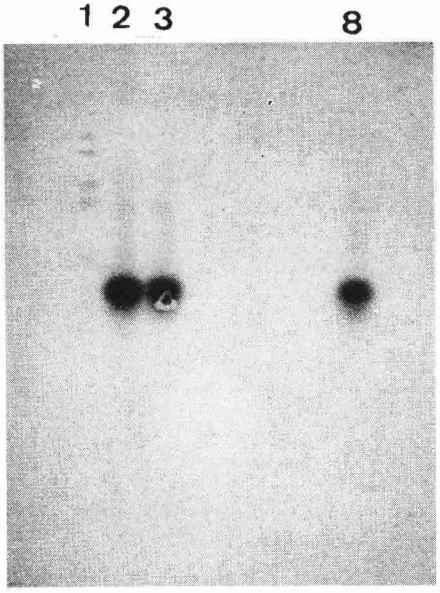


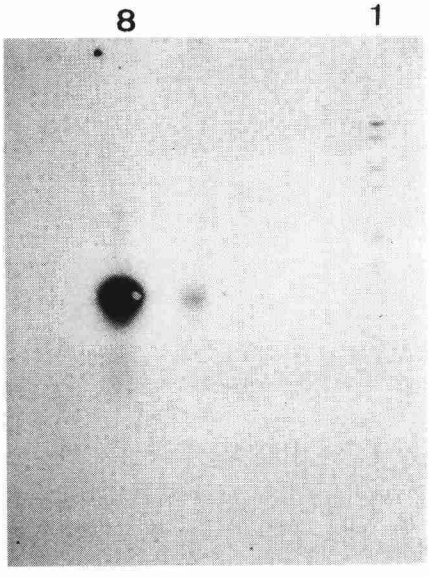
Figure 6 (A,B). Hybridation moléculaire par Southern-blot à l'aide de la sonde alpha-toxine.
A : 1 : marqueur VI marqué à la digoxygénine; 2 : Cp249; 3 : R_3; 4 : Cs27; 6 : Cp39/91; 7 : Cs26; 8 : Cp5; 9 : Cp431; 10 : Cp6; 11 : marqueur VI
B : hybridation avec la sonde alpha



A



B



C

Figure 7 (A,B,C).
Hybridation moléculaire par Southern-blot à l'aide des sondes epsilon-toxine (EP677) et entérotoxine (607).
A : 1 : marqueur VI marqué à la digoxygénine; 2 : Cp75; 3 : Cp250; 4 : G23; 5 : 33/89; 6 : Cp27; 7 : Cp34/89; 8 : Cp76; 9 : Cp35/89; 10 : marqueur VI
B : hybridation avec la sonde epsilon-toxine (EP677)
C : hybridation avec la sonde entérotoxine (607)

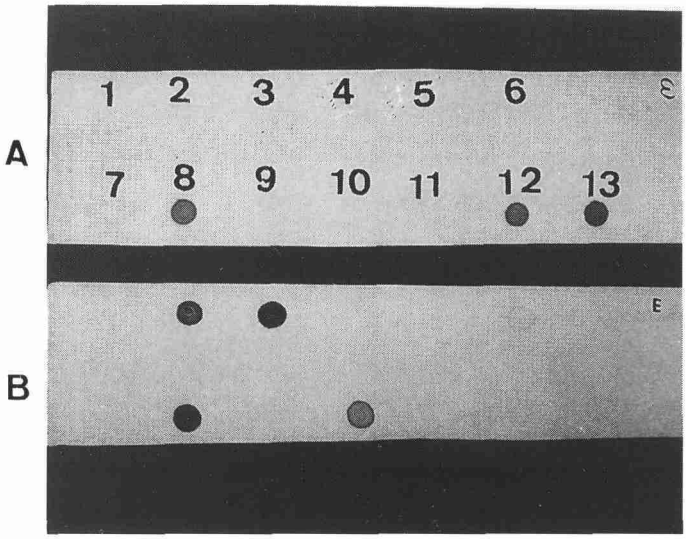


Figure 8. Hybridation moléculaire par Dot-blot. ADN amplifié de souches de *C. perfringens* par les amorces des gènes epsilon-toxine et de l'entérotoxine.
Spots : 1 : Cp249; 2 : R_3; 3 : Cp64; 4 : Cp28/91; 5 : Cp27; 6 : Cp431; 7 : Cp35/89; 8 : Cp76; 9 : Cp34/89; 10 : NCIBE; 11 : Cp33/89; 12 : Cp75; 13 : Cp250.
A : hybridation avec la sonde epsilon Ep677
B : hybridation avec la sonde entérotoxine 607.

l'alpha-toxine et de l'entérotoxine ont été réalisés et ont été comparés avec les tests de séroneutralisation sur souris, de cytotoxicité sur culture cellulaire, et avec le test au latex.

Les amplifications du gène de la toxine epsilon effectuées sur des souches de *C. perfringens* se sont avérées spécifiques. Il nous faudra tester l'amplification génique de cette toxine avec des souches de type B.

Havard, Hunter et Titball [4] ont récemment testé plusieurs souches de *C. perfringens* B et D en amplifiant les gènes de l'epsilon-toxine avec des amorces choisies sur la séquence codante de ce gène.

Leurs résultats étaient concluants. Ils ont obtenu des amplifications spécifiques avec les souches de *C. perfringens* B et D, et négatives avec d'autres types de *C. perfringens* (A,C et E) de *Bacillus subtilis* et *B. anthracis*.

Nous avons, par ailleurs, pu amplifier spécifiquement trois gènes de souches produisant l'alpha, l'epsilon et l'entérotoxine dans une réaction triplex.

La technique P.C.R. s'est montrée beaucoup plus performante que les techniques d'identification et de typage utilisées habituellement (toxinotypie sur animal, tests immunologiques et de cytotoxicité sur cultures cellulaires).

Dès que le gène de la toxine bêta sera séquencé, nous pourrons envisager la mise au point d'une trousse diagnostique utilisable aussi bien en santé animale qu'en hygiène alimentaire; il permettra l'identification simultanée de *Clostridium perfringens* types A, B, C et D, et la recherche de l'entérotoxine.

Références

1. Al-Mashat R.R., Taylor D.J. (1983). *Clostridium sordellii* in enteritis in an adult sheep. *Vet Rec* ; 112 : 1-19.
2. El Idrissi A.H., Gssair L., Benkirane A. (1991). *Clostridium sordellii* : causes possibles des entérotoxémies au Maroc. *Maghreb Vétérinaire* ; Vol 5 : N° 25 : 21-23.
3. Harmon S.M., Kautter D.A. (1986). Evaluation of a reversed passive latex agglutination test kit for *Clostridium perfringens* enterotoxine. *J Food Prot* ; 49 : 523-525.
4. Havard H.L., Hunter S.E.C., Titball R.W. (1992). Comparison of the nucleotide sequence and development of a PCR test for the epsilon-toxine gene of *Clostridium perfringens* type B and D *Fems Microbiol Lett* ; 97 : 77-81.
5. Hunter S.E., Clarke I.N., Kelly D.C., Titball R.W. (1992). Cloning and nucleotide sequencing of the *Clostridium perfringens* epsilon-toxine gene and its expression in *Escheria coli*. *Am Soc Microbiol* ; 60 : 102-110.
6. Kadra B. (1985). Isolement et typage de souches de *Clostridium perfringens* en Algérie. *Maghreg Vetérinaire* ; Vol 2 : N°8 : 27-29.
7. Katitch R.V. (1963). Les toxi-infections causées par les microbes anaérobies et l'importance de leur étude. *Bul Off Int Epiz* ; 59 : 1351-1359.
8. Mahony D.E., Gilliatt E., Dawson S., Stockdale E., Lee S.H.S. ( ). Vero cell assay for rapid detection of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Am Soc Microbiol* ; 55 : 2141-2143.
9. Okabe A., Shimizu T., Hayashi H. (1989). Cloning and sequencing of phospholipase C gene of *Clostridium perfringens*. *Biochem Biophys Res Comm* ; 150 : 33-39.
10. Popoff M. (1979). Entérotoxémie à *Clostridium perfringens* chez les ovins et glucosurie. *Bul Soc Vét Prat de France* ; 63 : 431-448.
11. Sebald M. (1990). Diagnostic bactériologique d'une infection à *Clostridium perfringens*. *Rev Prat* ; N°7 : mars.
12. Sterne M., Batty I. (1975). *Criteria for diagnosing clostridial infections in pathogenic clostridia*. Butterworth and Company; London : 79-84.
13. Titball R.W., Hunter S.E.S., Martin K.L., Morris B., Shuttleworth A.D., Rubidge T., Anderson D.W., Kelly D.C. (1989). Molecular cloning and nucleotide sequence of alpha-toxin (phospholipase C) of *Clostridium perfringens*. *Infect Immun* ; 57 : 367-376.
14. Tso J.Y., Seibel C. (1989). Cloning and expression of the phospholipase C gene from *Clostridium perfringens* and *Clostridium bifermentans*. *Infect Immun* ; 57 : 468-476.
15. Vandamme-Jongsten M., Wernars K., Notermans S. (1989). Cloning and sequencing of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene. *Antonie van Leeuweuhoek* ; 48 : 411-413.

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 73-79.

7

La détection, au moyen de sonde(s) génétique(s), de souches potentiellement attachantes et effaçantes d'*Escherichia coli* (AEEC) isolées de veaux, de porcelets et de carnivores domestiques

J.G. MAINIL*, E. JACQUEMIN*, S. BEZ*, P. POHL**, A. KAECKENBEECK*

* *Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège,Sart-Tilman, Belgique*
** *Institut National de Recherches Vétérinaires, Bruxelles, Belgique*

Résumé

*Certaines souches diarrhéogènes d'*Escherichia coli *possèdent la propriété d'effacer les microvillosités des entérocytes et d'y adhérer intimement : souches AEEC, lésions AE. Ces souches sont subdivisées en deux groupes : les souches vérotoxinogènes ou souches VTEC-AEEC, qui produisent des toxines actives sur les cellules Véro en culture (toxines SLT1 et SLT2), et les souches entéropathogènes, ou souches EPEC-AEEC, qui ne produisent pas de vérotoxines, mais bien des adhésines ("EPEC Adherence Factor" ou EAF) leur conférant la propriété d'adhérer de manière localisée sur des cellules en culture. Les souches AEEC humaines produisent une protéine de membrane externe, l'intimine, qui est impliquée dans l'attachement intime de ces bactéries aux entérocytes. Le gène qui code pour l'intimine a été cloné à partir de souches AEEC humaines et une sonde génétique*

spécifique en a été dérivée (sonde eae). Cette sonde génétique a été utilisée dans un test d'hybridation ADN-ADN sur colonies , sur des collections de 798 souches canines, 113 souches félines et 781 souches porcines afin de détecter des souches potentiellement AE pour ces espèces animales. 270 souches bovines ont aussi été choisies et étudiées, dont 66 étaient des VTEC. Ces collections de souches ont ensuite été testées avec des sondes génétiques spécifiques des vérotoxines (sondes SLT1 et SLT2), de l'attachement localisé sur cultures de cellules (sonde EAF), et d'une adhésine fimbriaire produites par des souches AEEC de lapins (sonde AF/R1). Des souches potentiellemelt AE, positives à la sonde eae, ont été détectées dans toutes les espèces animales, mais à des fréquences différentes : 7% chez le chien, 5% chez le chat et 1% chez le porcelet. La proportion de souches bovines positives à la sonde eae n'a pas de valeur statistique étant donné que ces souches avaient été choisies au sein d'une large collection. Les souches bovines positives à la sonde eae étaient majoritairement des VTEC-AEEC (85%) au contraire des souches des autres espèces animales : 3% chez le chien, 1% chez le porcelet et 0% chez le chat. Les souches non-VTEC-AEEC ne peuvent cependant être qualifiées de souches EPEC-AEEC car elles n'hybridaient pas avec la sonde EAF à trois exceptions près, pas plus qu'elles n'hybridaient avec la sonde AF/R1. Par contre, certaines souches négatives à la sonde eaae hybridaient avec la sonde EAF seule ou avec les sondes SLT1 et/ou SLT2, constituant peut-être d'autres groupes de souches potentiellement diarrhéogènes.

Les souches diarrhéogènes sont subdivisées en de nombreuses classes [18]. Les souches possédant la propriété d'effacer les microvillosités des entérocytes (souches AEEC : "attaching and effacing *E. coli*"; propriétés AE : attachement et effacement) ont été décrites dans l'espèce humaine et diverses espèces animales, dont les bovins, les chats, les chiens et les porcs [2,8,17]. Deux classes de souches AEEC sont décrites : les souches vérotoxinogènes qui produisent des toxines actives sur cellules Véro (toxines Shiga-like, SLT), mais pas d'entérotoxines (souches VTEC/AEEC), et les souches entéropathogènes qui ne produisent pas de vérotoxines, ni d'entérotoxines (souches EPEC/AEEC).

Le modèle actuel concernant la pathogénie de ces souches comprend trois étapes [4]. La première étape est la colonisation de l'intestin grâce à une adhésine. La production d'une telle adhésine ("Bundle Forming Pili" ou BFP) par les souches EPEC/AEEC humaines se traduit par des propriétés particulières d'adhérence localisée (LA) à des cellules en culture ("EPEC Adherence Factor" ou EAF). Les souches adhérant de manière locale, diffuse ou aggrégative à des cellules en culture ont aussi été dénommées souches entéroadhérentes d'*E. coli* ou EAEC [12,15]. Une deuxième étape est constituée par la production d'un signal par la bactérie, qui provoque dans les entérocytes un réarrangement du cytosquelette, avec entre autres conséquences, la disparition des microvillosités. La troisième étape est constituée par l'adhérence intime de la bactérie à la cellule intestinale, par l'intermédiaire d'une protéine de la membrane externe appelée intimine, ce qui provoque une accentuation des réarrangements du cytosquelette avec une forte accumulation de filaments d'actine au pôle apical de la cellule, à l'endroit d'attachement intime de la bactérie. Une cupule se forme sous la cellule bactérienne.

Le gène qui code pour la protéine intimine (gène *eae*) a été cloné à partir de la souche EPEC humaine de référence E2348/69 et de deux souches VTEC/AEEC humaines

(souches entérohémorragiques ou EHEC) [1, 6, 22]. Ces trois intimines montrent des différences importantes de séquence dans le dernier tiers du gène, qui peuvent être à la base de différences antigéniques et de récepteurs cellulaires.

Le diagnostic d'une infection à souches AEEC chez l'animal n'est pas facile à faire. Les signes cliniques sont vagues (diarrhée récidivante, non profuse) et les lésions macroscopiques peu typiques (entérite ou colite plus ou moins hémorragiques) ou inexistantes [13]. Les lésions microscopiques d'effacement des microvillosités pourraient être mises en évidence par examen microscopique[13], mais ces examens exigent d'effectuer les prélèvements sur un cadavre frais, ce qui est très souvent non compatible avec les conditions de la pratique. Donc, les *E. coli* isolés à partir de matières fécales ou du contenu intestinal sont à caractériser. Les souches AEEC appartiennent à quelques sérogroupes particuliers selon l'espèce animale [2,11,17] mais, comme pour les souches entérotoxinogènes, ce seul critère est insuffisant. Les propriétés spécifiques de la virulence à mettre en évidence sont ou seraient les suivants :

- une ou des adhésines responsables de l'attachement initial. Il s'agit des pili BFP responsables de l'adhésion localisée des souches EPEC humaines à des cellules en culture, mais ces adhésines sont malheureusement encore inconnues pour les souches animales, sauf peut-être chez le lapin [4,17];
- l'accumulation de filaments d'actine. Le test FAS ("Fluorescent-Actin-Staining") permet de visualiser l'accumulation d'actine sur cellules en culture grâce à la propriété de fixation du conjugué Phalloïdine-Isothiocyanate Fluorescéine (FITC) sur ces filaments [7]. Ce test ne peut cependant être utilisé que si les bactéries adhèrent aux cellules en culture, ce qui n'est pas le cas de toutes les souches d'origine animale (Pohl, résultats non publiés);
- la protéine intimine responsable de l'attachement intime. Actuellement, la seule manière de la mettre aisément en évidence est constituée par l'emploi d'une sonde génétique spécifique dérivée du gène *eae* de la souche E2348/69 [6].

Le but de nos travaux était double :

- mettre en évidence des souches potentiellement AEEC en utilisant la sonde pour l'intimine sur des collections de souches bovines, canines, félines et porcines;
- utiliser sur ces mêmes collections des sondes spécifiques pour les toxines Véro, pour l'adhérence LA sur cellules en culture et pour une adhésine de souches EPEC lapines, afin de classer les souches potentiellement AEEC d'origine animale comme VTEC ou EPEC, comme c'est le cas chez l'homme.

Matériels et méthodes

Souches bactériennes

270 souches d'origine bovine, 798 souches d'origine canine, 113 souches d'origine féline et 781 souches d'origine porcine ont été testées dans ce travail. Ces souches ont été isolées d'animaux souffrant de diarrhées ou de lésions d'entérite ou de septicémie soupçonnées être causées par *E. coli*. Une à cinq souches ont été isolées par animal et conservées sur milieu Dorset à l'œuf [3].

Sondes génétiques et hybridation ADN/ADN sur colonies

Les sondes génétiques (Tableau I) ont été dérivées de plasmides recombinants après purification par ultracentrifugation en gradient de CsC1. Les hybridations sur colonies ont été accomplies à 65°C sans formamide [9].

Tableau I. Dérivation des sondes génétiques.

Sonde			Plasmide	Endonucléases*
Nom	Taille	Spécificité	recombinant	
eae [6])	1000 pb	Intimine	pCVD432	*Sal* I + *Kpn*I
SLTI [16]	1142 pb	Vérotoxines 1	pJN37-19	*Bam*HI
SLT2 [16]	842 pb	Vérotoxines 2	pNN111-19	*Pst*I
EAF [14]	1000 pb	Adhérence localisée	pMAR22	*Bam*HI + *Sal* I
AF/R1 [21]	412 pb	Adhésine	pW9	*Kpn*I

(*) : Endonucléases de restriction à utiliser pour dériver le fragment sonde
pb : paires de base

Les souches contrôles positves étaient les souches de référence EPEC E2348/69 (sondes eae et EAF), RDEC-1 (sondes eae et AF/R1), 1625 (sondes eae et SLT1) et 211 (sonde SLT2). Les témoins négatifs étaient constitués des mêmes souches et de la souche HS [5, 10, 20].

Résultats

Les résultats sont résumés dans le Tableau II. Il faut noter qu'aucune souche n'hybridait avec la sonde AF/R1.

Discussion

Le diagnostic des souches AEEC est difficile. Jusque récemment, l'examen histopathologique des prélèvements de la muqueuse intestinale était le seul test possible et demandait confirmation par microscopie électronique [13]. Le développement du test FAS a permis de faciliter la recherche des souches AEEC [7], mais ce test se base sur l'expression *in vitro* de l'attachement initial des bactéries aux cellules en culture. Le test d'hybridation ADN-ADN sur colonies avec une sonde spécifique et sensible ne dépend pas des condotions de culture *in vitro* et peut être utilisé pour étudier des centaines de souches à la fois. Une sonde génétique (sonde eae) a récemment été dérivée du gène codant pour la protéine intimine qui intervient dans l'adhérence intime des souches AEEC aux entérocytes [6]. Cette sonde s'est avérée spécifique et sensible pour la détection des souches AEEC d'origine humaine, lapine et bovine [6,11, 20].

Tableau II. Résultats d'hybridation et pathotypes des souches d'*Escherichia coli* d'origine bovine (270 souches), canine (798 souches), féline (113 souches) et porcine (781 souches).

Origine	Pathotype	Nombre de Souches	Nombre de Animaux	Classe
Bovine	eae+SLT1+	46	28	VTEC/AEEC
	eae+SLT1+SLT2+	2	2	VTEC/AEEC
	eae+SLT2+	1	1	VTEC/AEEC
	eae+	10	4	AEEC
	SLT1+	3	1	VTEC
	SLT1+SLT2+	8	4	VTEC
	SLT2+	4	4	VTEC
	SLT2+EAF+	2	1	VTEC/EAEC*
	EAF+	2	1	EAEC*
Canine	eae+SLT2+	2	1	VTEC/AEEC
	eae+	56	29	AEEC
	EAF+	2	1	EAEC
	EAF+	15	5	EAEC*
Féline	eae+EAF+	3	1	EPEC/AEEC
	eae+	3	3	AEEC
	SLT2	1	1	VTEC
	EAF+	4	2	EAEC*
Porcine**	eae+	10	10	AEEC
	eae+SLT2+	1	1	VTEC/AEEC
	SLT2+	164	NC	VTEC***

* Ces souches hybridaient avec la sonde EAF mais faiblement.
** La sonde EAF n'a pas encore été testée sur ces souches.
*** Nombre de ces souches étaient associées à de la diarrhée postsevrage et/ou à la maladie de l'œdème [19].
NC : non calculé.

Notre travail consistait à détecter au moyen de cette sonde génétique, des souches potentiellement AEEC dans les espèces animales bovine, canine, féline et porcine, et à en déterminer les autres propriétés de virulence retrouvées chez des souches AEEC humaines.

Les résultats ont donc montré qu'il existe bien des souches potentiellement AEEC dans ces quatre espèces animales, mais leur proportion varie selon l'espèce considérée, bien

qu'il ne faille pas tirer de conclusions définitives étant donné le biais apporté par le choix des souches (surtout pour l'espèce bovine).

Les souches AEEC bovines se répartissent en deux groupes : VTEC (85%) et non-VTEC (15%), au contraire des souches AEEC canines (à deux exceptions près, 3%), félines et porcines qui sont toutes non-VTEC. Mais, seules trois de ces souches AEEC non-VTEC d'origine féline, hybrident avec la sonde EAF et peuvent donc être qualifiées d'EPEC. Nous proposons que toutes les autres souches non-VTEC positives à la sonde eae gardent le nom de souches AEEC ou, pour être plus précis, de souches potentiellement AEEC. Des études phénotypiques doivent en effet être menées pour confirmer la correspondance entre le génotype et le phénotype.

Les souches négatives à la sonde eae et positives aux sondes SLT1 et/ou SLT2 (Tableau II) sont rarissimes ou inexistantes chez le chien et le chat. Celles qui sont positives chez le porc à la sonde SLT2 sont associées à la maladie de l'œdème[18]. Celles qui sont positives chez le veau peuvent représenter une autre classe de souches diarrhéogènes ou bien une autre classe de souches AEEC possédant un gène codant pour une protéine intimine différent de celui dont la sonde génétique fut dérivée. Nous proposons de garder le nom de VTEC pour ces souches.

Il reste à présenter un groupe de souches qui hybrident plus ou moins fortement avec la sonde EAF, spécifique de la propriété d'attachement localisé (LA) de certaines souches EAEC humaines aux cellules en culture [12,15], tout en étant négatives avec les autres sondes. Chez l'homme, ces souches sont en fait des souches AEEC qui hybrident avec la sonde eae et portent le nom de souches EPEC [18]. Mais les souches positives à la sonde EAF chez le veau, le chien et le chat sont négatives à la sonde eae et peuvent, à l'instar des souches VTEC, représenter une autre classe de souches diarrhéogènes ou bien une autre classe de souches AEEC possédant un gène codant pour une protéine intimine différent de celui dont la sonde génétique fut dérivé. Nous proposons de garder le nom de EAEC pour ces différentes souches.

En résumé, à côté des souches ETEC, une deuxième classe de souches potentiellement pathogènes dans l'intestin existe donc chez les animaux domestiques : celles des souches AEEC. Le pathotype (et probablement les sérotypes) de ces souches diffèrent selon l'espèce animale envisagée. Chez les bovins, le chien et le chat, l'importance de ces souches est approximativement 5%, tandis qu'elle est beaucoup plus basse chez le porc (1%) [Mainil et Pohl : résultats non publiés, 5,8]. L'existence d'autres classes de souches, VTEC et EAEC est à reconnaître. Leur pouvoir et leur rôle pathogènes sont suggérés par la présence de nombreuses souches positives dans les matières fécales (Tableau II), mais doivent cependant être confirmés par des études sur l'animal.

Références

1. Beebakhee G., Louie M., De Azavedo J., *et al.* (1992). Cloning and nucleatide sequence of the *eae* gene homologue from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* serotype 0157 : H7. *FEMS Microbiol Lett* ; 91 : 63-68.
2. Broes A. (1993). Les *Escherichia coli* pathogènes du chien et du chat. *Ann Méd Vèt* ; 137 : 377-384.
3. Cowan S.T., Steel K.J. (1993). *Manual for identification of medical bacteria.* Barrow G.I., Feltham R.K.A. eds; 2ème édition, Cambridge University Press; UK; 194.

4. Donnenberg M.S., Kaper J.B. (1992). Enteropathogenic *Escherichia coli. Infect Immun* ; 60 : 3953-3961.
5. Fairbrother (1993).
6. Jerse A.E., Yu J., Tall B.D. *et al.* (1990). A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for production of attaching and effacing lesions on tissue culture *Proc Natl Acad Sci USA* ; 87 : 7839-7843.
7. Knutton S., Baldwin T., Williams P.H., *et al.* (1989). Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells : basis for a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli. Infect Immun* ; 57 : 1290-1298.
8. Mainil J. (1993). Les collibaciloses dans l'espèce bovine. *Ann Méd Vét* ; 137 : 343-350.
9. Mainil J.G., Bex F., Jacquemin E., *et al* (1990). Prevalence of four enterotoxin (STaP, STaH, STb, and LT) and four adhesin subunit (K99, K88, 987P and F41) genes among *Escherichia coli* isolates from cattle. *Am J Vet Res* ; 51 : 187-190.
10. Mainil J.G., Duchesnes C.J., Whipp S.C., *et al.* (1987). Shiga-like toxin production and attaching effacing activity of *Escherichia coli* asssociated with calf diarrhea. *Am J Vet Res* ; 48 : 743-748.
11. Mainil J.G., Jacquemin E., Kaeckenbeeck A., *et al.* (1993). Association between the effacing (eae) gene and the Shiga-like toxin-encoding genes in *Escherichia coli* isolates from cattle. *Am J Vet Res* ; 54 : 1064-1068.
12. Matthewson J.J., Johnson P.C., Dupont H.L., *et al.* (1985). A newly recognized cause of travelers diarrhea : enteroadherent *Escherichia coli. J Infect Dis* ; 151 : 471-475.
13. Moon H.W., Whipp S.C., Argenzio R.A., *et al* (1983). Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbits intestines. *Infect Immun* ; 41 : 1340-1351.
14. Nataro J.P., Baldini M.M., Kaper J.B., *et al.* (1985). Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. *J Infect Dis* ; 152 : 560-565.
15. Nataro K.P., Kaper J.B., Robins-Browne R., *et al*; (1987). Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-II cells. *Pediatr Infect Dis J* ; 6 : 829-831.
16. Newland J.W., Neill R.J. (1988). DNA probes for Shiga-like toxins I and II and for toxin-converting phages. *J Clin Microbiol* ; 26 : 1292-1297.
17. Peeters J. (1993). Les *Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC) du lapin. *Ann Méd Vét* ; 137 : 361-368.
18. Pohl P. (1993). les souches pathogènes d'*Escherichia coli*, histoire et classification. *Ann Méd Vét* ; 137 : 325-333.
19. Pohl P., Lintermans P., Mainil J., *et al.* (1989). Production de vérocytotoxine par les *escherichia coli* du porc. *Ann Méd Vèt* ; 133 : 29-37.
20. Pohl P., Peeters J., Jacquemin E., *et al.* (1993). Identification of eae-sequences in rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Infect Immun* ; 61 : 2203-2206.
21. Wolf M.K., Boedeker E.C. (1990); Cloning of the genes for AF/R1 pili from rabbit enteroadherent *Escherichia coli* RDEC-1 and DNA sequence of the major structural subunit. *Infect Immun* ; 58 : 1124-1128.
22. Yu j., Kaper J.B. (1992). Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* ; 6 : 411-417.

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 81-88.

8

Etudes épidémiologiques sur la theiléríose bovine à *Theileria annulata* : application à la caractérisation du type endémique et à la définition d'une stratégie de lutte*

M.E.A. DARGHOUTH*, A. BOUATTOUR**, L. BEN MILED*, M. KILANI*, C.G.D. BROWN***

* *E.N.M.V., Sidi Thabet, Tunisie*
** *Institut Pasteur de Tunis , Tunisie*
*** *C.T.V.M., Université d'Edimbourg, Ecosse, Grande-Bretagne*

En Tunisie, la theiléríose bovine à *Theileria annulata* est une des dominantes pathologiques estivales affectant l'élevage bovin et en particulier, les animaux de races améliorées. Cette protozoose revêt une grande importance économique, du fait du coût élevé du traitement (70 Dinars Tunisiens, environ 70$), et de la lutte antivectorielle, des risques de mortalité et enfin des répercussions des formes cliniques et des états d'infections sub-cliniques sur la productivité des animaux.

L'amélioration de l'efficacité des modalités actuelles de prévention (lutte contre les tiques vectrices), et l'utilisation raisonnée de nouveaux moyens de prophylaxie (vaccin vivant atténué) passent obligatoirement par une meilleure connaissance de l'épidémiologie de la theiléríose bovine en Tunisie. C'est dans ce contexte qu'a été développé au Service de Parasitologie de l'E.N.M.V. un travail d'investigations épidémiologiques

* Travail financé par la DGXII de la CEE (projet STD2/106/1049) et la Fondation Nationale pour la recherche scientifique, Tunisie (projet MD7/89).

s'intéressant aux trois zones les plus affectées par cette parasitose : les étages bioclimatiques sub-humide, semi-aride et aride supérieur.

Dans cet exposé, nous nous intéresserons exclusivement à la première phase de ce travail, menée dans la région de Sidi Thabet (zone semi-aride).

Protocole général du travail

De 1988 à 1992, 4 enquêtes ont été menées sur des élevages bovins de la région de Sidi Thabet.

Enquête n°1 (juin-octobre 1988)

Echantillon
112 veaux en première saison estivale issus de 19 étables à antécédents de theiléríose.

Suivi
Identification des animaux et réalisation de prélèvements de sérums au début (début juin) puis à la fin de la saison de theiléríose (octobre) pour la détection de l'infection par *T. annulata*.

Dépistage de l'infection
Technique d'immuno-fluorescence indirecte (I.F.I.) utilisant les antigènes schizontes de culture cellulaire et mérozoites érythrocytaires produits *in vivo*, aux dilutions seuils respectives de 1/160 et 1/40.

Enquête n°2 (été 1990)

Echantillon
50 veaux en première saison estivale et 50 bovins adultes issus de 16 élevages de races laitières à antécédents de theiléríose.

Suivi
Après identification des animaux, les élevages ont été visités en moyenne une fois par semaine entre les mois de juillet et août 1990 pour la collecte dans les parties d'éclive, puis l'identification des espèces du genre *Hyalomma*.

Enquête n°3 (avril-mai 1991, avril-mai 1992)

Echantillon
404 bovins issus de 51 étables choisies aléatoirement (groupe 1) et 3 élevages retenus pour un parasitisme important par les tiques *Hyalomma* (groupe 2).

Suivi
Identification des animaux et classement en quatre classes d'âge en fonction du nombre de saisons antérieures de theiléríose (Tableau I). Réalisation de prélèvements de sérums et de frottis de sang à 3 reprises, avant la saison de theiléríose (avril-mai 1991), après cette

saison (septembre-octobre 1991), et enfin au bout d'un an (avril-mai 1992). Durant l'été, un suivi clinique avec identification des cas de theiléríose au laboratoire a été instauré.

Tableau I. Résultat de l'enquête sérologique sur les 51 élevages choisis aléatoirement (groupe 1) et les trois étables à forte infestation par les tiques (groupe 2).

Classe d'âge	Saisons antérieures de theiléríose	groupe 1 séro-incidence d'automne (%)	groupe 1 séro-prévalence* d'automne (%)	groupe 2 séro-incidence d'automne (%	groupe 2 séro-prévalence* d'automne* (%
0 - 7 mois	0	6,6	11	46,15	56
7 - 15 mois	1	25,8	34,36	100	100
15 - 30 mois	2	35	38,75	100	100
≥ 30 mois	≥3	29,14	53,46	100	100
Total		22,5	36,72	55,56	79,37

* Séro-prévalence estimée en tenant compte des résultats de la première visite (avril-mai 1991)

Dépistage
Par I.FI avec les antigènes schizontes et mérozoites érythrocytaires et par examen des frottis de sang avec lecture de 20 champs de microscope (G x 1000) pour la recherche des mérozoites érythrocytaires de *T. annulata*.

Enquête n°4

Echantillon
Trois élevages des groupes 1 et 2 présentant un parasitisme important par les tiques *Hyalomma*.

Suivi
Identification des animaux, visite des élevages deux fois par mois durant l'été avec collecte de toutes les tiques *Hyalomma* présentes sur les animaux et identification de l'espèce au laboratoire.

Dépistage de l'infection des tiques par T. annulata
Par coloration des glandes salivaires au vert de méthyle-pyronine (V.M.P.) après dissection. Seuls les mâles de *H. detritum* et les *Hyalomma* femelles en phase précoce de gorgement ont été disséqués.

Résultats et discussion

Les résultats principaux obtenus au cours de ces investigations épidémiologiques sont rapportés pour chacune des enquêtes :

Enquête n°1

Sur les 19 étables visitées, seules 6 ont présenté des veaux à sérologie positive. Après la saison de theilériose, la séro-prévalence de l'infection au sein de l'échantillon de veaux présents à la deuxième visite (n=92) est de 22%. Dans les étables à veaux sérologiquement positifs, la séro-prévalence a varié de 36,3% à 66,7%. Enfin, trois veaux ont présenté une theilériose clinique dans une seule des 18 étables suivies, d'où une incidence clinique de 3,2% relativement au nombre de veaux présents à la seconde visite.

Enquête n°2

H. detritum a été retrouvée uniquement dans 2 des 18 étables suivies. Cette tique représente environ 9,5% de l'ensemble des tiques *Hyalomma* collectées, et constitue de ce fait une espèce mineure par rapport à *H. marginatum* et *H. excavatum*. Les veaux en première saison estivale ont présenté un parasitisme moyen par les *Hyalomma* 4 à 5 fois plus faible que les bovins adultes.

Enquête n°3

L'I.FI à l'antigène schizonte apparait plus fiable pour le dépistage de l'infection par *T. annulata*. Elle détecte jusqu'à 4 fois plus d'animaux infectés que l'antigène érythrocytaire et 5 fois plus que les frottis de sang colorés au Giemsa. Cependant, dans les trois étables du groupe 2, ces 2 types d'antigènes présentent la même fiabilité après la saison de theilériose. De plus, à l'exception de deux animaux, tous les individus sérologiquement positifs avec l'antigène érythrocytaire ont aussi réagi positivement avec l'antigène schizonte. Les résultats obtenus dans les 2 groupes d'étables par I.FI à l'antigène schizonte sont rapportés dans le Tableau I.

Dans le groupe 1, le taux de séro-conversion chez les veaux en première saison estivale est significativement plus faible que dans les classes d'âge supérieur (test Chi-2, $p<0,01$), alors que parmi ces dernières, aucune différence significative n'a été notée. De plus, la majorité des étables (47 des 51 exploitations visitées) hébergeaient des bovins infectés, même lorsque les locaux d'élevage bien entretenus paraissaient peu favorables à la tique vectrice.

Dans le groupe 2, l'exposition à l'infection par *T. annulata* est plus fréquente. En effet, près de 60% des veaux passent le cap de la première saison estivale en contractant une infection généralement sub-clinique. A partir de la deuxième saison estivale, tous les individus sont prémunis contre la theilériose. Cette situation est poussée à l'extrême dans deux étables de ce groupe où, dès leur premier été, l'ensemble des veaux se trouvent infectés.

Au total, 9 cas de theilériose ayant nécessité une consultation vétérinaire ont été confirmés au laboratoire. 8 cas ont été enregistrés parmi les élevages du groupe 1, sur des bovins des classes d'âge 2, 3 et 4 avec une incidence relative de 3,56%. Par ailleurs, l'incidence clinique maximale, soit 8,9% a été notée dans la classe des bovins en troisième saison estivale (classe 3).

Enfin, dans le groupe 2, un seul cas de theilériose subaiguë a été diagnostiqué sur une velle en première saison estivale. De plus, dans 1 des 3 élevages, 4 taurillons acquis durant l'été et non inclus dans ce travail ont tous développé une theilériose clinique.

Enquête n°4

Au total, 4830 tiques *Hyalomma* ont été collectées dont 2260 disséquées pour l'examen des glandes salivaires. *H. detritum* est l'espèce dominante avec environ 87% du total récolté, suivie de *H. marginatum* (11%), et enfin de *H. excavatum* (2,75%). Seules les tiques *H. detritum* ont présenté des images typiques d'infection par *T. annulata*. Cependant, pour les 2 autres espèces, un faible effectif de tiques a été disséqué, respectivement 33% pour *H. marginatum*, et 10% pour *H. excavatum*. 12,8% des tiques *H. detritum* ont été trouvées infectées avec en moyenne 4 acini infectés par tique.

Les résultats obtenus dans les 3 étables visitées sont rapportés dans le Tableau II. Dans le cas de l'élevage 3, ces résultats restent peu fiables du fait de l'utilisation d'acaricide par l'éleveur suite à l'apparition de cas de theilériose sur les taurillons récemment introduits dans l'élevage.

Tableau II. Résultats de l'enquête 4 sur les tiques *H. detritum*.

Etable	Nombre moyen de tiques *H. detritum* collectées / animal / eté			Pourcentage de tiques infectées	Nombre de tiques infectées / animal / été	
	<6 mois	6-18 mois	>18 mois		<6 mois*	>18 mois*
1	8	54	>150	12,8	1,02 (100%)	19,2 (100%)
2	0,5	24	35	18,9	0,09 (0%)**	6,6 (93%)
3	8		50	2		

* Séroprévalence en fin d'été

** Calculée sur 5 veaux

Cette enquête confirme que les jeunes en première saison estivale sont moins réceptifs aux tiques *Hyalomma*, et en particulier à *H. detritum* avec de 6 à 70 fois moins de tiques que chez les adultes, et montre que les jeunes en deuxième saison estivale restent relativement moins parasités que les individus plus âgés.

Les travaux réalisés sur les tiques vectrices (enquête n°3) confirment que *H. detritum* est le vecteur unique ou principal de *T. annulata* en Tunisie, étant données la superposition de l'activité de son stade adulte avec la saison de theilériose, l'absence d'infection chez les autres espèces de *Hyalomma* disséquées, et enfin la corrélation entre les probabilités d'infection (contact avec des tiques infectées) des animaux et les résultats sérologiques obtenus.

L'endémie de theilériose à *T. annulata* apparaît régie par un facteur clé : la probabilité d'infection des jeunes en première saison estivale, ce facteur étant à son tour conditionné par l'importance du parasitisme des jeunes par les tiques et le taux d'infection du vecteur par *T. annulata*. De ces deux éléments dépendent les deux situations rencontrées en zone endémique : l'endémie stable et l'endémie instable.

La situation d'endémie stable

Ce type endémique est rencontré dans les deux premiers élevages du groupe 2 (enquête 3) où l'ensemble des veaux s'infectent pendant leur première saison estivale en développant

habituellement une theiléríose sub-clinique. Cette évolution favorable de l'infection s'explique probablement par les niveaux limités d'inoculation auxquels sont exposés les veaux étant données, d'une part leur réceptivité plus faible aux tiques *Hyalomma*, et d'autre part l'intensité modérée de l'infection du vecteur par *T. annulata*. D'ailleurs, il est possible d'induire expérimentalement des formes atténuées de theiléríose en administrant aux animaux de faibles doses de broyats de tiques infectées [5]. Il est de plus probable que chez les jeunes veaux l'immunité colostrale et notamment les anticorps anti-sporozoites représentent un facteur supplémentaire modérant les conséquences de l'infection.

A partir de la seconde saison estivale, l'immunité développée au cours des saisons précédentes se trouve régulièrement renforcée. Cependant, l'augmentation graduelle de l'infestation par les tiques de la première saison estivale aux saisons suivantes limiterait les risques de surinfection en permettant au système immunitaire de s'adapter graduellement aux infections plus lourdes auxquelles s'exposent les individus adultes.

Sur un plan pratique, l'endémie stable peut être reconnue par :
- l'apparition occasionnelle de cas subaigus de theiléríose sur les jeunes en première saison estivale,
- un parasitisme élevé des adultes par les tiques *Hyalomma* en plein été (pic d'activité de *H. detritum).*

La situation d'endémie instable

Ce contexte endémique est en partie illustré par l'exemple de l'étable 3 (Tableau II) où, malgré l'importance de la population de *Hyalomma detritum* trouvée sur les adultes, les jeunes en première saison estivale restent, étant donné leur moindre réceptivité, pratiquement épargnés par les tiques vectrices, dépassant ainsi le cap de la première saison estivale sans acquérir d'immunité. Au cours des saisons suivantes, ces animaux, du fait de l'augmentation du parasitisme par les tiques, seront soumis à des risques de theiléríose clinique.

De plus, en fonction de l'importance du parasitisme par *H. detritum*, il est possible de reconnaître deux situations d'endémie instable :

Situation 1

Dans ce contexte, seuls les animaux en deuxième et troisième saison estivale sont régulièrement affectés par la maladie, les animaux plus âgés étant en totalité prémunis et les individus plus jeunes très peu exposés à la tique vectrice, d'où les faibles taux de séroconversion notés dans l'enquête n°1.

Situation 2

Cette situation, la plus fréquente dans la région concernée par ce travail, se caractérise par une population très réduite de la tique vectrice (voir les résultats de l'enquête n°2), une séro-prévalence limitée chez les animaux les plus âgés, et l'apparition occasionnelle de theiléríose, en particulier chez les individus en troisième saison estivale et plus. Chez les jeunes en première saison estivale, les risques d'infection sont pratiquement nuls.

Par ailleurs, dans ce type d'élevage, la population "péri-domestique" de *H. detritum* liée aux abris entourant l'étable, voire en dehors de l'exploitation, et éventuellement

même sur les paturages, mérite d'être mieux étudiée. En effet, des résultats préliminaires obtenus au cours de l'été 1993 indiquent l'existence de sources de tiques de *H. detritum* entre l'étable et les pâturages.

En pratique, la situation d'endémie instable peut être reconnue ou suspectée par :
- l'apparition plus ou moins régulière de cas de theiléríose sur les animaux en deuxième saison estivale et plus,
- l'existence en plein été, sur les bovins adultes, d'une population modérée (une dizaine de tiques) à faible, voire difficilement détectable de *H. detritum.*

Les résultats recueillis au cours de ces investigations épidémiologiques permettent d'adapter les actions de prophylaxie en fonction du contexte endémique :

En endémie stable

Les traitements acaricides sont à employer avec précautions, de façon à ne pas déstabiliser l'endémie de theiléríose. Il est recommandé :
- de ne pas traiter les jeunes en première saison estivale, sauf lors de sortie massive des tiques à la suite de chaleurs inhabituelles (situation observée au cours de l'été 1993),
- de ne traiter les adultes que lors de parasitisme important. Compte tenu des taux d'infection de tiques observés dans ce travail, ces traitements seront à envisager au delà d'un parasitisme moyen de 10 à 20 tiques adultes par animal,
- de proscrire la lutte d'automne contre les nymphes qui, du fait de son efficacité plus élevée, risque de destabiliser l'endémie.

Enfin, la vaccination par vaccin vivant atténué, en cours de développement à l'E.N.M.V. Sidi Thabet, serait à réserver uniquement aux jeunes en première saison estivale et aux individus nouvellement acquis.

En endémie instable

Les traitements acaricides d'été seront appliqués aux bovins à partir de la seconde saison estivale suivant un calendrier adapté aux risques encourus par l'élevage. Pour les étables en endémie instable de type 1 (voir plus haut), la lutte acaricide doit obligatoirement tendre vers l'éradication du vecteur du fait des risques de glissement de l'âge à risque vers les animaux plus âgés habituellement prémunis contre la theiléríose.

Enfin, dans l'éventualité d'utilisation d'un vaccin atténué, la campagne de vaccination devra toucher toutes les tranches d'âge des élevages à risque.

Bibliographie

1. Burridge M.J., Brown C.G.G., Kimber C.D. (1974). *Theileria annulata* : cross reactions between a cell culture antigen and antigens of East Africa species in the Indirect fluorescent antibody test. *Exp Parasitol* ; 35 : 375-380.
2. Bouattour A., Darghouth M.E.A. (1992). Study of the *Hyalomma* ticks population on cattle and their salivary glands infection by *T. annulata* in an endemic region of Tunisia. EEC Contractant Workshops on Resistance or Tolerance of Animals to Disease and Veterinary Epidemiology and Diagnostic Methods. 2-6 novembre 1992, Rethymo, Ile de Crête, Grèce.
3. Darghouth M.E.A. (1991). Tropical theileriosis in Tunisia : status of the disease and research being undertaken at the E.N.M.V. Sidi Thabet (Tunisia). In : D.K. Singh, B.C. Varshney Eds

Proceedings of the second E.E.C. Workshop on Orientation and Coordination on Tropical Theileriosis. N.D.D.B., Anand, Inde.

4. Darghouth M.E.A., Bouattour A., Ben Miled L., Kilani M. (1992). Results of a sero-epidemiological survey on tropical theileriosis on 54 farms in the region of Sidi Thabet (Tunisia). EEC Contractant Workshops on Resistance or Tolerance of Animals to Disease and Veterinary Epidemiology and Diagnostic Methods. 2-6 novembre 1992, Rethymo, Ile de Crête, Grèce.
5. Dolan T.T., Young A.S., Losos G.J., Mc Millian I., Minder C.E., Soulsby K. (1984). Dose dependant responses of cattle to *Theileria parva* stabilate. *Intern J Parasit* ; 14 : 89-95.

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 89-101.

9

Identification d'un antigène cytoplasmique de bas poids moléculaire de *Brucella* potentiellement utilisable pour le diagnostic allergique de la brucellose

PH.A.. DENOEL*, M.S. ZYGMUNT**, V.E. WEYNANTS*, A. TIBOR*,
G. DUBRAY**, J.N. LIMET*, J.J. LETESSON*

* *Laboratoire d'Immunologie et de Microbiologie, FUNDP, Namur, Belgique.*
** *Laboratoire de Pathologie Infectieuse et Immunologie, INRA, Nouzilly, France.*

Résumé

Au cours du fractionnement du CPE (mélange de protéines cytoplasmiques de Brucella *) sur séphacryl S-200 en présence de 0,1% SDS, une fraction (F56) a été obtenue. Cette fraction contient quatre ou cinq protéines dont une protéine majeure dans la zone présentant le maximum d'activité en T cell blotting. L'injection intradermique de cette fraction chez le cobaye infecté engendre une réaction très proche de celle engendrée par le brucellergène (Rhône-Mérieux) à la même dose. Les différentes bandes protéiques observées en SDS-PAGE ont été découpées et les protéines des fractions obtenues ont été éluées du gel d'acrylamide. Les protéines des fractions ont été testées pour leur capacité à engendrer une réaction cutanée chez le cobaye infecté. La fraction contenant la protéine majeure de la F56 engendre une réaction d'hypersensibilité retardée (HSR) de même intensité que le brucellergène complet à la même dose, alors que les autre fractions*

engendrent des réactions plus faibles voire nulles. Des tests préliminaires effectués chez le cobaye infecté par Yersinia enterolitica *O:9 tendent à montrer la spécificité de cette protéine.*

La brucellose bovine et des petits ruminants due respectivement à *Brucella abortus* et à *B. melitensis* affecte directement la rentabilité de l'exploitation touchée en causant des avortements chez les animaux gestants, mais aussi en provoquant la stérilité et d'autres problèmes cliniques plus ou moins graves chez beaucoup d'animaux infectés.

Actuellement, le diagnostic de la brucellose repose principalement sur les résultats des épreuves sérologiques (détection dans le sang ou le lait des anticorps spécifiques du lipopolysaccharide (LPS) de *Brucella*). L'utilité de la révélation d'une réponse immunitaire cellulaire de type hypersensibilité de type IV ou retardée (HSR) comme test complémentaire des tests classiques et de l'ELISA a clairement été démontrée [7,12]. Des animaux infectés d'un foyer peuvent présenter une sérologie négative, même en ELISA et un test allergique (IDR) positif et vice versa. Le test cutané détecte précocement l'infection et est à l'heure actuelle le plus spécifique.

Cependant, si le test cutané à l'aide du brucellergène (préparation de protéines cytoplasmiques, Rhone-Mérieux) s'avère très utile, il reste des améliorations à y apporter. En effet, citons entre autres que la souche B115 utilisée pour la préparation de l'allergène n'est pas dépourvue de chaine O (partie spécifique du LPS de *Brucella*) [4].

L'identification et la production par génie génétique des protéines de *Brucella* les plus actives pour le diagnostic allergique de la brucellose permettrait d'augmenter l'intensité de la réaction et la sensibilité du test et en faciliterait la standardisation.

De plus, la distinction entre animaux infectés et vaccinés n'est, à l'heure actuelle, toujours pas possible. En effet, le LPS très immunogène, semble être le meilleur antigène de diagnostic sérologique et avoir des propriétés vaccinales [5,6,8,11]. Sa présence semble donc nécessaire à l'efficacité d'un vaccin. Des tests préliminaires tendent à montrer que le diagnostic sérologique basé sur les protéines ne permettrait pas la détection de tous les animaux infectés car un certain nombre d'entre eux ne produisent que très peu ou pas d'anticorps contre les protéines. Par contre un test de diagnostic allergique par IDR utilisant un ou plusieurs allergènes protéiques absents de la fraction ou de la souche vaccinale pourrait permettre de faire la distinction entre des animaux infectés et des animaux vaccinés.

Signalons enfin qu'il a été montré que les protéines cytoplasmiques de *Brucella* se trouvant dans la zone de masse moléculaire 10-20 kDa présentent le maximum d'activité en T cell blotting avec des cellules de sang périphérique de bovins infectés [3,14]. Cette zone pourrait donc contenir des allergènes potentiels pour le diagnostic de la brucellose.

L'approche que nous avons choisi pour l'identification des protéines actives est l'intradermoréaction sur cobayes infectés par *Brucella abortus* 544.

Méthodologie

Souche bactérienne

Les bactéries de phénotype rugueux ont été obtenues à partir d'un isolat *B. melitensis* B115 d'une chèvre infectée de terrain [1]. Elles ont été cultivées dans un fermenteur de 20 litres selon la méthode de l'U.S. Department of Agriculture)[2]. Les cultures sont réalisées en milieu tryptic soy broth (BioMérieux, France) supplémenté avec 0,1% de yeast extract (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) pendant 48h à 37°C.

Infection expérimentale des cobayes

Les cobayes ont été infectés par injection de 1,8 10^6 *Brucella abortus* 544 par voie sous-cutanée. Une semaine avant l'infection (contrôle négatif) et un mois après l'infection (contrôle de l'infection), les animaux sont testés par injection intradermique de 5 µg de brucellergène. Un second lot de cobayes a été infecté par injection de 10^6 *Yersinia enterocolitica* 0:9 (souche du terrain) par voie intrapéritonéale. Un mois après l'infection, l'excrétion de bactéries dans les fèces a été contrôlée.

Intradermoréaction sur cobayes infectés

Les cobayes utilisés sont des animaux infectés au même moment et donc infectés depuis 2 à 6 mois en fonction de la date de l'IDR. Les cobayes ont préalablement été tondus sur les deux flancs. Au maximum, quatre injections par flanc ont été effectuées. Les injections ont été faites avec un volume de 100 µl. Les mesures d'épaisseur de pli de peau ont été réalisées à l'aide d'un Palmer. La variation d'épaisseur de pli de peau est donnée par la différence entre l'épaisseur au temps de la mesure et l'épaisseur mesurée avant l'injection.

Préparation du CPE

Le CPE [15,16] de *B. melitensis* B115 a été préparé en cassant les cellules avec des billes de verre dans un appareillage Dyno-Mills (Bachofen, Basel, Suisse) puis en les ultrafiltrant sur cartouche de seuil 0,1µm (Amicon, Grace S.a.r.l, Epernon, France). L'ultrafiltrat a été traité ensuite à la DNAse et à la RNAse (Worthington Diagnostics, Freehold, N.J.) puis soumis à une seconde ultrafiltration sur cartouche de seuil 100kDa (Amicon). Le rétentat a été centifugé à 50000xg pendant 16h et enfin, le surnageant (CPE) a été lyophilisé.

Préparation de la F56

Le CPE a été déposé sur une colonne Sephacryl S200 HR en présence de bicarbonate d'ammonium 0,1M et de 0,1% SDS. Le second pic d'élution de la colonne (absorbance à 280nm) correspond à la F56.

SDS-PAGE

Les gels d'acrylamide SDS-PAGE ont été réalisés selon la méthode décrite par Laemli [9]. Les antigènes ont été solubilisés en conditions réductrices dans le tampon d'échantillon (62,5mM Tris, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0,01% bleu de bromophenol, pH 6,8) par chauffage à 100°C de 3min. Le standard de poids moléculaire utilisé est un mélange de protéines allant de 66 à 14,2kDa (Bio-Rad). Les gels ont été colorés à l'argent [10] pour la détection des protéines.

Immunoblotting

Le transfert électrophorétique des protéines du gel sur une feuille de nitrocellulose a été réalisé selon la méthode classique décrite par Towbin *et al.* [13]. Après transfert, la feuille de nitrocellulose a été incubée 1 h en TBS-BSA 3% puis 3 h avec l'anticorps monoclonal dilué 500X en TBS-BSA 1%-Tween 20 0,05%. La nitrocellulose a été ensuite lavée trois fois en TBS-BSA 1% puis incubée 1 h avec le conjugué "Rabbit anti-Mouse Alkaline Phosphatase" (Amersham, U.K.) dilué 500X en TBS-BSA 1%-Tween 20 0,05%. Après trois lavages en TBS-BSA 1%, la réaction de coloration a été réalisé en tampon Tris 0,2M, $MgCl_2$ 4mM avec 6mg de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP-Sigma) et 10mg de sel nitro blue tetrazolium (NBT-Sigma) par 100ml de tampon. La feuille a été ensuite lavée en eau distillée puis sèchée.

Elution des protéines séparées par SDS-PAGE

Après migration, le gel a été découpé en bandelettes qui après avoir été broyées, ont été déposées chacune séparément dans 2ml de tampon PBS, azide 0,01%, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF-Sigma) 0,2mM et EDTA 5mM. Aprés 24 h d'agitation, les tubes ont été centrifugés 10 minutes à 10000rpm et le surnageant qui contient les protéines à été récupéré. Le surnageant a été ensuite dialysé contre le tampon d'élution afin d'éliminer la majeure partie du SDS.

Dosage des protéines par "scanning"

Les fractions de protéines éluées du gel SDS-PAGE ont été déposées sur un gel SDS-PAGE afin de vérifier la bonne séparation. La référence consitait en 1 et 4µg de cytochrome C ayant migré en parallèle sur ce même gel, qui a été ensuite coloré à l'argent. Les "scannings" ont été réalisés avec un scanner Visage 110 relié à une station Sun OS. L'analyse a été effectuée avec le logiciel Bio Image Electrophoresis Analyser version 4.6B et au sein de celui-ci, le logiciel WholeBand 2.4 (Millipore Corporation, Bedford, MA).

Résultats

Composition de la F56

Au cours du fractionnement du CPE (mélange de protéines cytoplasmiques de *Brucella*) sur Sephacryl S-200 en présence de 0,1% SDS, une fraction (F56) a été obtenue. Cette fraction contient quatre ou cinq protéines dont une protéine majeure dans la zone de masse moléculaire, présentant le maximum d'activité en T cell blotting (10-30kDa).

Test cutané de la fraction protéique F56 sur cobayes infectés

Le test de l'activité de la fraction F56 a été effectué par injection intradermique d'un volume de 100µl de PBS contenant 3, 1 et 0,3µg de F56 à 5 cobayes infectés. Les doses correspondantes en brucellergène ont été injectées dans le même volume. Un contrôle négatif 100µl de PBS a également été injecté à chaque cobaye. Les sites d'injection ont été permutés d'un cobaye à l'autre. Les mesures de variation d'épaisseur de pli de peau ont été effectuées 1, 5, 24 et 48h après l'injection. Les résultats de ces mesures pour la dose 3µg sont présentés à la Figure 1.

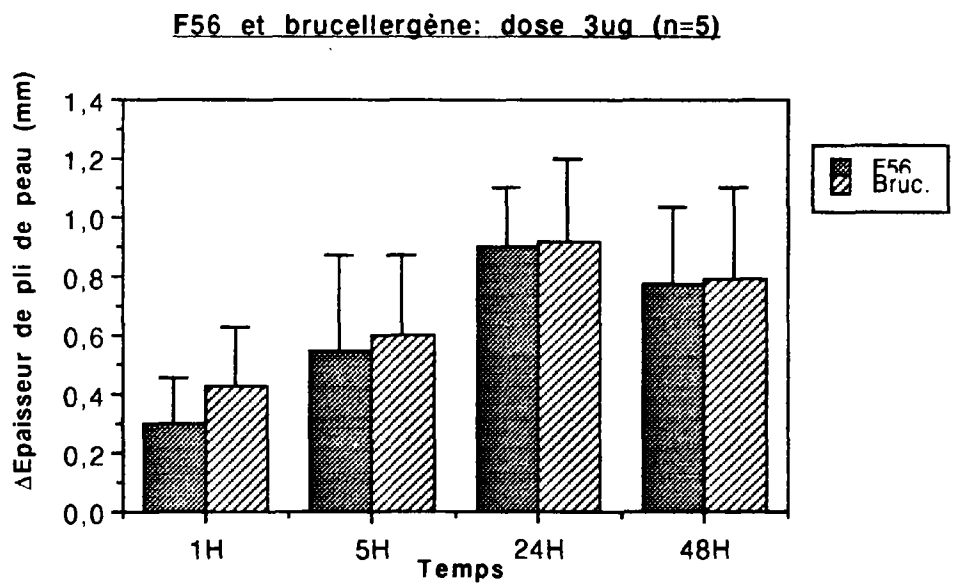


Figure 1. Mesures de la variation d'épaisseur de pli de peau en fonction du temps. Comparaison des réactions engendrées par la fraction F56 et le brucellergène.

On constate que les réactions d'HSR engendrées avec la F56 sont très proches de celles engendrées par le brucellergène injecté à la même dose (3µg). Aux plus faibles doses, principalement 0,3µg, le brucellergène semble légèrement plus actif.

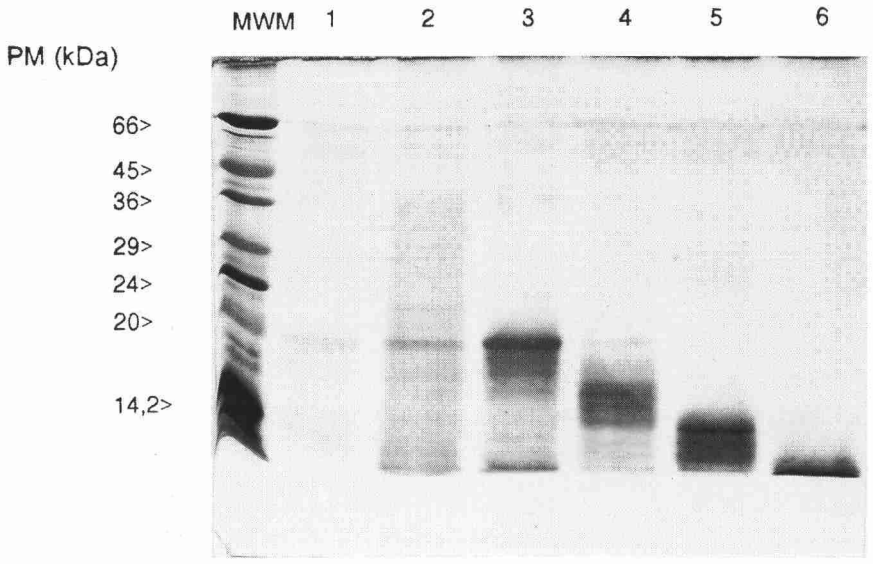


Figure 2. Les six fractions de la F56 après séparation électrophorétique sur un gel SDS-PAGE 16%.

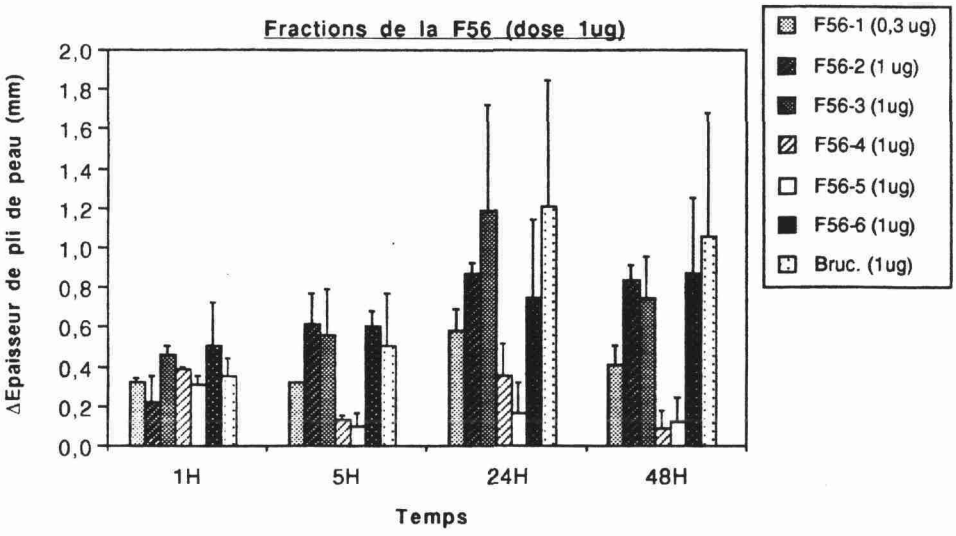


Figure 3. Mesures de la variation d'épaisseur de pli de peau en fonction du temps. Comparaison des réactions engendrées par les différentes fractions de la F56 et le brucellergène.

Fractionnement de la F56

Afin d'identifier la ou les protéines de cette fraction ayant la capacité d'engendrer cette réaction d'HSR, nous avons par SDS-PAGE, séparé en 6 fractions les protéines composant la F56.

Environ 200 µg de F56 ont été déposés sur un gel de polyacrylamide 16%. Après migration, une piste centrale du gel et la piste contenant les marqueurs de PM ont été découpées et colorées rapidement au bleu de Coomasie. Les bandes protéiques mises en évidence par cette coloration, ont été découpées du gel non coloré et chaque languette de polyacrylamide (6 fractions) a été placée dans 2 ml de PBS (+azide, EDTA et PMSF) pour trois jours, avec agitation, pour permettre la diffusion libre hors du gel des protéines de chaque fraction.

Le surnageant de la diffusion libre des protéines a été concentré au Speed Vac jusqu'à un volume de 500 µl. Cent microlitres de chacune des 6 fractions ont été déposés sur un gel SDS-PAGE 16%. La Figure 2 montre ce gel coloré à l'argent.

On remarque que la fraction 2 et principalement la fraction 3 contiennent l'antigène de 19 kDa. La fraction 6 ne contient que le front de migration du gel. Chaque fraction a été dosée par "scanning" du gel coloré à l'argent.

Etude de l'activité des différentes fractions de la F56

Les 6 fractions de la F56 ont été injectées chacune à 6 cobayes infectés par *Brucella* à la dose estimée de 1 µg (sauf pour la fraction 1 injectée à 0,3µg). En parallèle, du brucellergène à la dose correspondante ainsi que 100 µl de surnageant de la diffusion libre d'une languette de gel vierge ont été injectés. Les mesures d'épaisseur de pli de peau ont été effectuées 1, 5, 24 et 48 heures après l'injection (Figure 3).L'injection de 100 µl de tampon de "running gel", de la fraction 6 (correspondant au front de migration) ou de la fraction équivalente (front de migration) d'un gel vierge engendrent le même type de réaction. Une heure après l'injection, on observe l'apparition d'une induration importante au site d'injection suivie 5 à 24 heures plus tard d'une nécrose des tissus. Cette réaction est probablement non spécifique de l'infection et due à du SDS présent en quantité plus importante dans ces fractions et insuffisamment éliminé par dialyse.

On constate que la fraction 2 et surtout la fraction 3 engendrent des réactions proches de celles observées avec le brucellergène ou avec la F56 complète. Les fractions 1, 4 et 5 engendrent des réactions faibles proches de celles observées avec le surnageant de la diffusion libre d'une languette de gel vierge.

La fraction 2 et principalement la fraction 3 contiennent l'antigène majeur de la F56. Cet antigène semble donc être un bon candidat pour le diagnostic cutané de la brucellose.

Nous disposons en outre d'un anticorps monoclonal (297C3) reconnaissant l'antigène majeur de la F56. La Figure 4 montre le résultat d'un immunoblotting avec les différentes fractions de la F56, la F56 entière et le brucellergène. On remarque que l'anticorps monoclonal reconnait la protéine de 19 kDa de la fraction F56-3. Remarquons aussi que l'antigène de 19 kDa est peu présent dans le brucellergène.

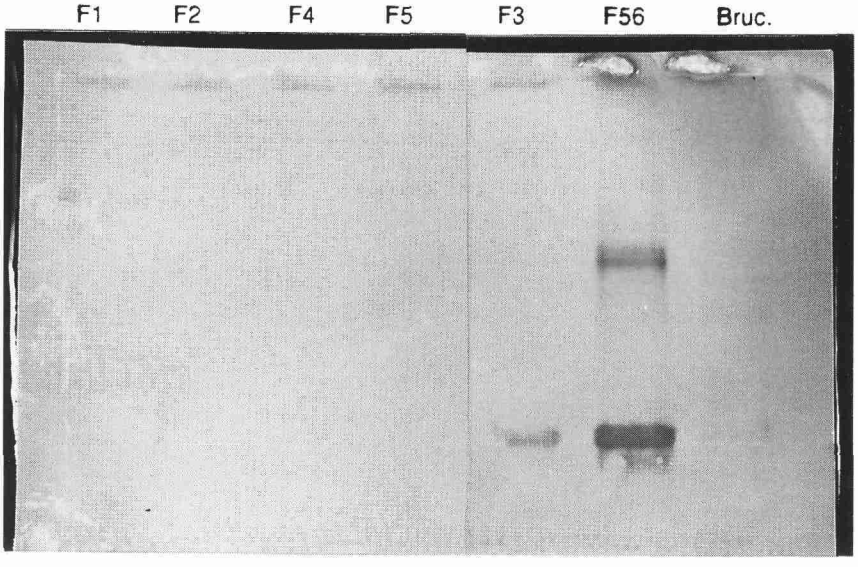


Figure 4. Immunoempreinte des fractions de la F56, de la F56 complète et du brucellergène (lot 26N151). Détection de la protéine de 19kDa par l'anticorps monoclonal 297C3.

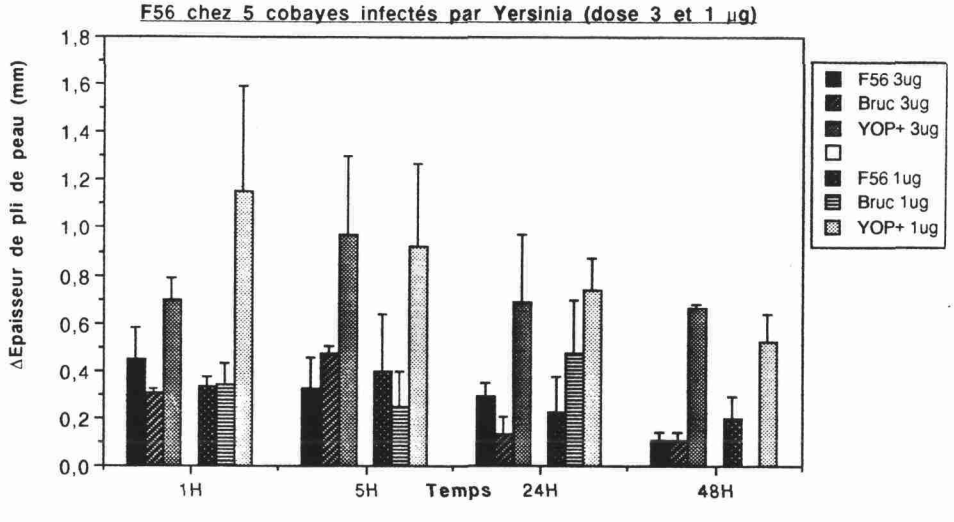


Figure 5. Mesures de la variation d'épaisseur de pli de peau en fonction du temps. Comparaison des réactions engendrées par la F56, le brucellergène et une préparation de YOP chez les cobayes infectés par *Yersinia enterolitica* O:9.

Etude de la spécificité de la protéine majeure de la F56

Afin de vérifier la spécificité de la F56 et donc de l'allergène de 19 kDa, nous avons injecté cet allergène à 5 cobayes infectés par *Yersinia enterolitica* O:9 à la dose 3 et 1 µg en parallèlle à du brucellergène et à une préparation de protéines secrétées de *Yersinia* (YOP). Les résultats de ces injections sont présentés à la Figure 5.

On remarque que la F56 engendre des réactions faibles voire nulles aux deux doses et de plus, la cinétique de ces réactions faibles ne présente pas de maximum à 24 heures caractéristique de la réaction d'hypersensibilité retardée.

L' allergène F56 ne détecte donc pas des cobayes infectés par *Yersinia enterolitica* O:9 ni des animaux non infectés par *Brucella* (résultats non présentés).

Présence de la protéine majeure de la F56 dans toutes les souches de *Brucella*

L'anticorps monoclonal 297C3 reconnait spécifiquement la protéine de 19 kDA (voir plus haut). Par la technique de Western Blotting, nous avons vérifié la présence de l'antigène de 19 kDa dans 31 souches de *Brucella* . La Figure 6 montre que l'anticorps monoclonal reconnait une protéine d'environ 19 kDa dans toutes les souches de *Brucella* .

Notons toutefois que cette protéine semble peu présente chez *Brucella suis* biovar 2, 4 et 5 ainsi que chez *Brucella neotomae* . Remarquons aussi qu'une bande supplémentaire d'environ 35-40 kDa est reconnue par le monoclonal dans les souches *Brucella abortus* 45/20, *Brucella melitensis* H38R et *Brucella melitensis* B115 qui sont toutes trois des souches de phénotype R (rugueux).

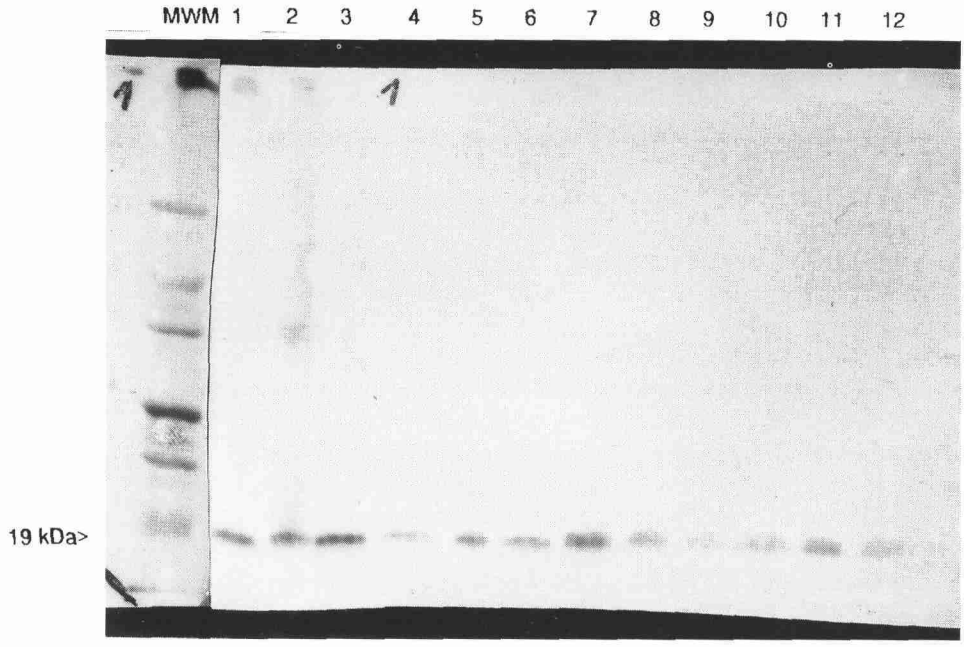
Discussion

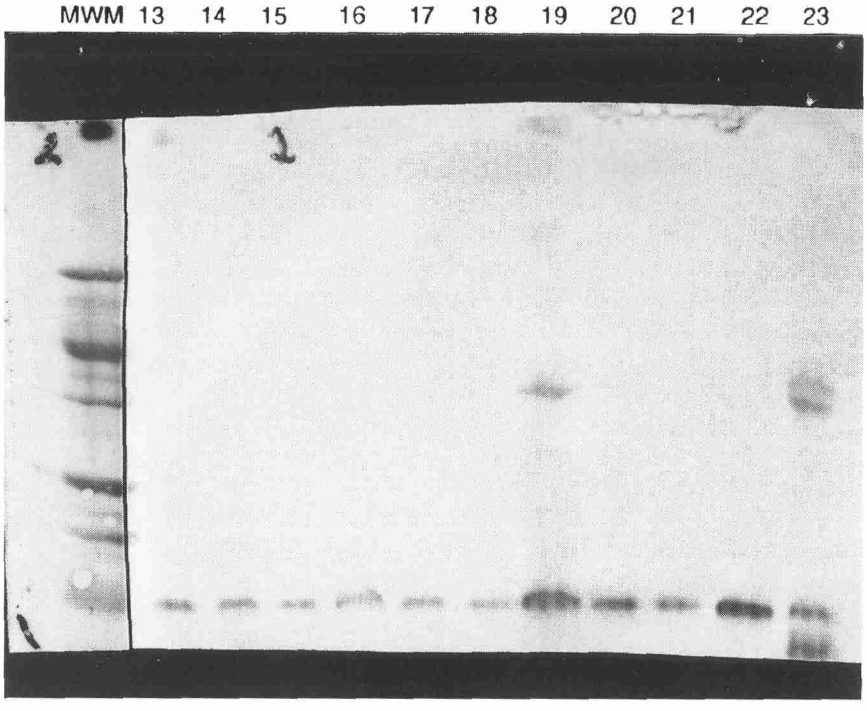
La fraction F56 obtenue par séparation sur colonne Sephacryl S200 HR en présence de 0,1% SDS engendre chez le cobaye infecté des réactions cutanées (IDR) proches de celles engendrées par le brucellergène à la même dose. Cette fraction, composée d'une protéine majeure et de quatre ou cinq protéines contaminantes, se trouve dans la zone présentant le maximum d'activité en T cell blotting avec des cellules de sang périphériques de bovins infectés [14] et 10).

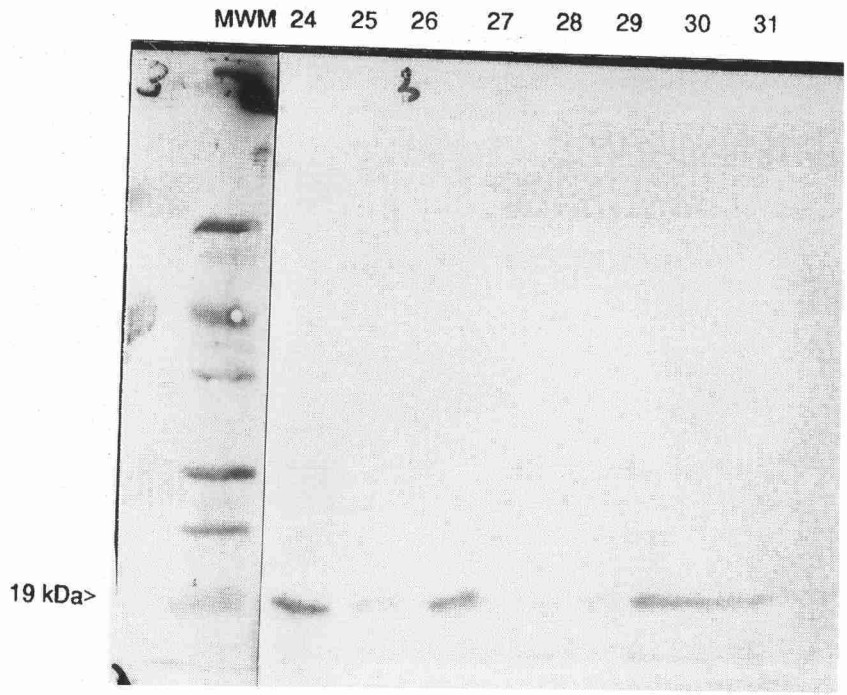
Nous avons testé l'activité de 6 fractions de cette F56 obtenues par séparation des protéines sur SDS-PAGE, découpe des bandes observées et élution des protéines de chaque fraction. De ce test d'activité, il ressort que la protéine majeure de cette fraction engendre à elle seule des réactions cutanées chez le cobaye infecté comparables à celles engendrées par le brucellergène injecté à la même dose. De plus, cet allergène n'induit aucune réaction quand il est injecté à des cobayes sains ou infectés par *Y. enterolitica* O:9 ce qui tend à montrer sa spécificité.

Nous avons donc identifié une protéine qui possède la capacité d'engendrer des réactions cutanées d'intensité comparables aux réactions engendrées par le mélange d'une vingtaine de protéines cytoplasmiques qu'est le brucellergène.

Cette protéine est exprimée de manière plus ou moins importante par toutes les espèces de *Brucella* comme le montre le résultat d'un immunoblotting réalisé avec un anticorps monoclonal spécifique de cette protéine et des extraits d'une trentaine de souches de référence et de terrain de *Brucella* représentant cinq espèces répertoriées. Une ou deux bandes supplémentaires de 39-40kDa sont révélées par l'anticorps dans les trois souches


MWM 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
19 kDa>


MWM 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23



Piste	Espèce	Biovar	Souche	Reconnaissance par l'AC
1	*abortus*	1	544	+++
2	*abortus*	rough	45/20	+++ et 2 bandes de 40 kDa
3	*abortus*	2	86/8/59	+++
4	*abortus*	3	Tulya	++
5	*abortus*	4	292	+++
6	*abortus*	5	B3196	+++
7	*abortus*	6	870	+++
8	*abortus*	6	80-236	++
9	*abortus*	6	89-43	+++
10	*abortus*	9	C68	+++
11	*abortus*	9	75-60	+++
12	*abortus*	9	76-299	+++
13	*abortus*	9	77-9	+++
14	*abortus*	9	80-133	+++
15	*abortus*	9	87-46	+++
16	*abortus*	9	90-64	+++
17	*abortus*	9	91-28	+++
18	*abortus*	9	91-135	+++
19	*melitensis*	rough	H38	+++ et 1 bande de 40 kDa
20	*melitensis*	1	16M	+++
21	*melitensis*	2	63/9	+++
22	*melitensis*	3	Ether	+++
23	*melitensis*	rough	B115	+++ et 2 bandes de 40 kDa
24	*suis*	1	1330	+++
25	*suis*	2	Thomsen	++
26	*suis*	3	686	+++
27	*suis*	4	40	+/-
28	*suis*	5	513	+/-
29	*ovis*		Bow 63-290	+++
30	*canis*		RM-6/6	+++
31	*neotomae*		5K33	+

Figure 6. Immunoempreinte avec des extraits totaux de différentes souches de *Brucella*. Détection de la protéine de 19kDa par l'anticorps monoclonal 297C3.

de phénotype rugueux que nous avons utilisées dans ce test. Ne connaissant pas la fonction de cette protéine de 19 kDa chez *Brucella* , il nous est impossible à l'heure actuelle d'expliquer cette observation. Nous pouvons cependant supposer que dans ces souches, la protéine serait présente sous forme de dimères ou serait associée à une autre protéine.

Le clonage du gène codant pour cette protéine est en cours. La production de la protéine recombinante devrait nous permettre de réaliser une évaluation de son activité chez le bovin et donc de confirmer son utilité pour le diagnostic cutané de la brucellose bovine.

Remerciements

Ce travail a pu être réalisé grâce à une bourse de spécialisation accordée par l'Institut pour l'encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture (I.R.S.I.A n° 910622).

Références

1. Alton G.G.,Corner L.A. (1981). Vaccination of heifers with a reduced dose of *Brucella abortus* strain 19 vaccine before first mating. *Aust Vet J.*; 57 : 548-550.
2. Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D., Verger J.M. (1988).Techniques for the brucellosis laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris.
3. Brooks-Worrel B. M., Splitter G.A. (1992). Antigens of *Brucella abortus* S19 immunodominant for bovine lymphocytes as identified by one- and two-dimensional cellular immunoblotting. *Infect Immun* ; 60 : 2459-2464.
4. Cloeckaert A., Zygmunt M.S., Nicolle J-C., Dubray, G. Limet J.N. (1992). O-chain expression in the rough *Brucella melitensis* strain B115 : induction of O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies and intracellular localization demonstrated by immunoelectron microscopy. *J Gen Microbiol* ; 3 : 1455-1459.
5. Dubray G., Plommet M. (1975). Structure et constituants des *Brucella* . Caractérisation des fractions et propriétés biologiques. International Symposium on Brucellosis (II) Rabat (1975), Dev Biol Stand ; 31 : 68-91 (S. Krager, Basel 1976).
6. Dubray G., Bosseray N., Plommet M. (1974). Propriétés vaccinales de fractions de *Brucella*. *C R Acad Sci Paris* ; 279D : 1805-1808.
7. Fensterbank R. (1977). Diagnostic allergique de la brucellose bovine. 2. Utilisation du test allergique dans les troupeaux infectés. *Ann Rech Vet* ; 8 : 195-201.
8. Jimenez de Bagües M.P., Marrìn C.M., Barberàn, Blasco J.M. (1993). Evaluation of vaccines and of antigen therapy in amouse model for *Brucella ovis. Vaccine* ; 11 : 61-66.
9. Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature (London)* ; 227 : 680-685.
10. Oakley B.R., Kirsch D.R., Morris, N.R. (1980). A simplified ultra sensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* ; 105 : 361-363.
11. Plommet M., Plommet A.M. (1983). Immune serum-mediated effects on brucellosis evolution in mice. *Infect Immun* ; 4 :, 97-105.
12. Saegerman C. Communication personnelle.
13. Towbin H., Stacklin T., Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some application. *Proc Natl Acad Sci USA* ; 76 : 4350.
14. Vo K. Communication personnelle.
15. Zygmunt M.S., Martin J.C., Dubray G. (1990). Analysis of the immune response : comparison

of immunoblots after isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis using cytoplasmic protein extract from *Brucella* . *FEMS Microbiol Lett* ; 70 : 263-268.

16. Zygmunt M.S., Gilbert F.B., Dubray G. (1992). Purification, characterization and seroactivity of a 20-kDa Brucella protein antigen. *J Clin Microbiol* ; 30 : 2662-2667.

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 103-112.

10

Situation actuelle de l'immunité naturelle vis-à-vis du virus de la fièvre de la vallée du Rift chez les ruminants domestiques du Sénégal

Y. THIONGANE*, M.M. LO*, H. ZELLER**, J.A. AKAKPO***

* *Laboratoire National de l'Elevage et de Recherches Vétérinaires de Dakar-Hann (LNERV), Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA), Dakar, Sénégal.*
** *Institut Pasteur de Dakar, Sénégal.*
*** *Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires (EISMV), Dakar, Sénégal.*

Résumé

Depuis que la fièvre de la vallée du Rift s'est manifestée pour la première fois, en octobre-décembre 1984, dans le Delta du fleuve Sénégal, une surveillance clinique et sérologique des ruminants domestiques (ovins, caprins et bovins) est mise en place.
Les anticorps sériques spécifiques au virus de la FVR sont recherchés par les tests de séroneutralisation et ELISA (IgGet IgM).
Nous présentons les résultats les plus récents du suivi post épizootique réalisé dans différentes zones écologiques du Sénégal (du Nord au Sud) :
D'abord, la vallée du fleuve Sénégal (zones d'irrigation en climat sahélien) où la FVR a sévi en 1987. Elle est considérée comme la zone à risque, et est la plus anciennement surveillée (depuis 1988). Le suivi a montré une période de silence post-épizootique dans les

troupeaux d'animaux sentinelles. Cette situation s'est traduite par le fait qu'aucun cas clinique n'a été décelé, mais aussi que la séroprévalence n'a cessé de baisser d'année en année dans cette vallée. Chez les petits ruminants, la séroprévalence est revenue à son niveau d'avant épizootie : 5% de positifs en 1991 (N=600, X=30) et 4% en 1992 (N=271, X=11). Chez les bovins, la baisse de prévalence est moins forte et est de 23,56% en 1991 (N=450, X=106). Ainsi, dans cette zone à risque, les petits ruminants, réputés très sensibles au virus, sont redevenus totalement réceptifs.

Ensuite, le Ferlot (climat sahélien, pluviométrie inférieure à 600 mm, zone de transhumance pour le cheptel de la vallée du fleuve Sénégal) : les petits ruminant y sont plus infectés que ceux de la vallée : 7,5% de séropositifs en 1992 (N=120, X=09). Cette zone du Ferlo, bien pourvue en mares temporaires, apparaît comme un endroit favorable de maintien du virus entre les périodes d'épizooties. Il en résulterait des risques de foyer de FVR dans la vallée du fleuve Sénégal, par réintroduction du virus à partir de ce foyer du Ferlo.

Enfin, la partie australe du pays, notamment en Casamance et à Kédougou (climat guinéen, pluviométrie supérieure à 1000 mm), où les petits ruminants, avec 1% de séropositifs en 1992, semblent les moins infectés du pays. Les bovins présentent une séroprévalence pouvant s'élever jusqu'à 12% en 1992 pour la région de Kolda.

Les différences constatées entre les zones écologiques, les modes d'élevage, les espèces animales et leurs conséquences sur l'évolution de la FVR sont discutés.

La fièvre de la vallée du Rift (FVR) est une zoonose due à un virus de la famille des *Bunyaviridae*, appartenant au groupe des *Phlébovirus*.

Depuis 1910, date de la première description, la FVR a sévi dans pratiquement toutes les zones écologiques du continent africain.

Mais, c'est en 1987 que l'Afrique de l'Ouest entre dans l'aire d'activité du virus de la FVR, avec le foyer survenu dans la vallée du fleuve Sénégal, autour de la ville de Rosso, en Mauritanie. Ce foyer fut caractérisé par une forte mortalité des jeunes animaux, et aussi, par un fort taux d'avortement chez les femelles gravides. De plus, la population humaine a été très fortement touchée.

Au Sénégal, depuis cette première épizootie, aucun cas clinique n'a été signalé, ce qui laisse à penser à une phase de silence post épizootique, comme cela est décrit classiquement. Toutefois, l'éventualité que le virus puisse circuler, à bas bruit, doit rester à l'esprit. Elle constitue une des conditions du maintien du virus dans la nature. En raison des résurgences possibles de l'activité virale, un programme de surveillance sérologique a été instauré par le suivi de l'état immunitaire du cheptel des zones enzootiques.

La présente étude fait le point des enquêtes sérologiques menées en 1991 et 1992 chez les ruminants domestiques du Sénégal.

Matériels et méthodes

Les zones d'études

Les enquêtes sérologiques ont été menées dans les trois principales zones écologiques du Sénégal. Ces zones sont, du Nord au Sud :

La zone sahélienne

C'est la zone la plus sèche du pays, car la pluviométrie ne dépasse pas 400 mm/an dans le Nord du Sénégal. La saison des pluies dure 3 mois. Elle englobe la vallée du fleuve Sénégal, les parties septentrionale et centrale de la zone sylvopastorale et du bassin arachidier.

La zone soudanienne

La saison des pluies, un peu plus longue, dure 4 à 5 mois, avec des précipitations allant de 650 mm/an (au nord sous influence sahélienne) à 900 mm/an au sud. C'est la zone des savanes plus ou moins arborées.Elle comprend les parties méridionales de la zone sylvopastorale et du Bassin arachidier et les Iles du Saloum. Les populations s'adonnent à la fois à l'agriculture et à l'élevage.

La zone guinéenne

La saison des pluies est de 5 mois, mais la pluviométrie est importante (1500 mm/an). Cette zone est caractérisée par une forêt dense semi-sèche. Elle concerne la Casamance et la partie sud du Sénégal oriental. L'élevage concerne exclusivement les races trypanotolérantes et s'y pratique selon le mode sédentaire.

Les animaux étudiés

Les prélèvements de sang concernent les ruminants domestiques, notamment les petits ruminants et les bovins. Pour chaque animal prélevé, l'espèce, l'âge et la sexe sont mentionnés. L'âge est déterminé par l'état de la denture. Au niveau de chaque site ou troupeau, un échantillon représentatif d'animaux est prélevé.

En zone sahélienne

Dans la vallée du fleuve Sénégal
Les animaux appartiennent à des éleveurs peuls qui pratiquent un élevage traditionnel extensif avec de la transhumance vers le sud (le Ferlo) en saison sèche. Les sites de prélèvement, au nombre de 9, sont répartis entre les trois parties du Bassin versant du fleuve Sénégal : la Basse vallée ou le Delta, le cours moyen et le cours supérieur. Les petits ruminants ont été suivis sérologiquement et cliniquement depuis 1988 [4]. Le nombre de petits ruminant prélevés est de 600 en 1991, et 274 en 1992. Chez les bovins, la surveillance a débuté en 1990 [3]. En 1991, 503 bovins ont été saignés pour toute la vallée du Sénégal, alors qu'en 1992, seuls 103 bovins du Delta Sénégal ont fait l'objet de prélèvements.

Dans le Ferlo ou zone sylvopastorale
C'est le domaine de l'élevage par excellence du pays, et c'est surtout la zone de transhumance pour le cheptel de la vallée du fleuve Sénégal. En 1992, 120 petits ruminants provenant de 4 troupeaux vivant ou en transhumance dans la zone d'influence du Forage de Barkédji ont été étudiés.

En zone soudanienne

Dans le bassin arachidier
En 1991, 479 bovins de race zébu Gobra, répartis entre 14 sites, ont été prélevés dans le département de Gossas (région de Fatick).

Dans les Iles du Saloum
En 1992, 11 sites ont été visités dans le département de Foundiougne (Iles du Saloum). 378 prélèvements de sang ont été obtenus chez les bovins de race taurine Ndama.

En zone guinéenne

De 1991 à 1992, des enquêtes sérologiques ont été réalisées, aussi bien chez les petits ruminants que chez les bovins.

Chez les bovins de race taurine, seules les régions de Kolda et Tambacounda ont été étudiées. En 1991, 227 prélèvements ont été obtenus de 6 sites dans le département de Vélingara (Kolda), et 503 prélèvements de 13 sites dans le département de Tambacounda.

En 1992, 318 bovins Ndama ont été saignés à partir de 10 sites dans le département de Kédougou (Tambacounda) contre 607 prélèvements de 17 sites dans le département de Sédhiou (Kolda).

Chez les petits ruminants de race naine, les trois régions de cette zone climatique ont été visitées en 1992. Les prélèvements réalisés ont été de 126 pour la région de Ziguinchor, de 170 pour la région Kolda, et 191 pour Tambacounda.

Les tests sérologiques

La séroneutralisation (SN)

Les sérums sont testés par l'épreuve d'inhibition de l'effet cytopathogène du virus de la FVR (souches SMITHBURN) sur culture de cellules Véro. Les sérums positifs sont ceux qui neutralisent 100 DCP_{50} du virus à la dilution 160.

Le test ELISA

Ce test est effectué par l'Institut Pasteur de Dakar. Il permet de détecter les anticorps de classe G et M dans les sérums déjà testés en SN. Il utilise comme antigène viral la souche humaine (MAUR 2).

Résultats et discussion

Evolution de la séroprévalence dans la vallée du fleuve Sénégal

Chez les petits ruminants

En 1991, la prévalence en anticorps neutralisants le virus de la FVR est de 5% (N=600, X=30), alors que celle de 1992 se situe à 4% (N=274, X=11). Ainsi, on constate qu'entre 1991 et 1992, la diminution progressive de la séropositivité, déjà constatée depuis 1988, s'est poursuivie dans la vallée du fleuve Sénégal (Tableau I).

Tableau I. Séroprévalence en anticorps anti FVR chez les petits ruminants de la vallée du fleuve Sénégal depuis l'épizootie de 1987.

	1988	1989	1990	1991	1992
Basse vallée ou Delta	39/28 (71,7)	159/38(23,8)	105/09(08,5)	190/198(09,4)	111/07(06,3)
Cours moyen	172/37(21,5)	115/18(15,6)	259/26(08,9)	210/10(04,7)	102/04(03,9)
Cours supérieur	92/09(09,7)	457/08(14,0)	231/04(01,7)	200/02(1,00)	61/00(0,00)
Total	303/74(24,4)	331/64(19,3)	595/39(06,5)	600/30(5,00)	274/11(04,0)

La séropositivité notée en 1992 est très liée à l'âge des animaux étudiés : 72,7% des animaux porteurs d'anticorps ont plus de quatre ans d'âge (avec huit incisives adultes). Les jeunes adultes, de 2 à 6 dents adultes, sont essentiellement séronégatifs.(Tableau II). En fait, les animaux séropositifs sont ceux qui ont été infectés lors de l'épizootie de 1987 et leurs produits qui possèdent des anticorps maternels.

Tableau II. Evolution post-épizootique de la séroprévalence en anticorps anti FVR chez les petits ruminants de la vallée du fleuve Sénégal en fonction des classes d'âge.

	1989	1991	1992
Dents de lait	115/09(07,8)	196/02(1,0)	69/02(02,8)
2 dents adultes	43/05(11,6)	66/00(0,00)	26/01(03,8)
4 dents adultes	19/02(10,5)	82/01(01,2)	38/00(0,00)
6 dents adultes	34/06(17,6)	48/01(02,0)	49/00(0,00)
8 dents adultes	120/42(35)	208/26(12,5)	92/08(08,6)
Total	331/64(19,3)	600/30(05,0)	274/11(04,0)

La prévalence en anticorps anti virus de la FVR baisse au fur et à mesure que l'on remonte le cours du fleuve. En 1992, l'évolution est la suivante : 6,3% (N=111) dans le delta, 3,9% (N=102) dans le cours moyen et 0% (N=61) dans le cours supérieur. Aucun animal n'a été trouvé porteur d'anticorps de classe M, en 1991, comme en 1992.

Chez les bovins`

En 1991, la prévalence générale est de 23,5% (N=450) pour les trois parties du bassin du fleuve Sénégal (Tableau III).

Tableau III. Séroprévalence en anticorps anti FVR chez les bovins de différentes zones écologiques du Sénégal en 1990, 1991, et 1992.

		1990	1991	1992
Zone sahélienne	Vallée du fleuve Sénégal	627/172(27,4)	450/106(23,5)	103/24(23,3)
	CRZ de Dahra	448/41(09,1)	ND	ND
Zone soudanienne	Bassin arachidier	ND	479/17(03,5)	378/48(12,6)
Zone guinéenne	Kolda	203/39(19,2)	227/14(06,1)	607/77(12,6)
	Tambacounda	ND	503/31(06,1)	318/12(03,7)

Comme chez les petits ruminants, les bovins du Delta, avec 28,1% de positifs apparaissent plus infectés que ceux des deux autres parties du fleuve : 24,5% (N=163) pour le cours moyen, et 14,1% pour le cours supérieur (Tableau IV).

Tableau IV. Séroprévalence chez les bovins de la vallée du fleuve Sénégal depuis 1990.

	1990	1991	1992
Basse vallée ou Delta	249/92(36,9)	181/51(28,1)	103/24(23,3)
Cours moyen	222/60(27,0)	163/40(24,5)	ND
Cours supérieur	156/20(12,8)	106/15(14,1)	ND

En 1992, seuls les bovins du Delta ont été étudiés. La prévalence obtenue, 23,3%, est plus faible que celle de 1991. Tous les bovins prélevés, en 1991 et en 1992, sont négatifs en anticorps anti FVR de classe M. En somme, depuis 1988, la prévalence sérique en anticorps anti virus de la FVR n'a cessé de baisser aussi bien chez les petits ruminants que chez les bovins de la vallée du Sénégal. De plus, aucun animal n'a été trouvé porteur d'anticorps de classe M depuis 1989 [3]. Ces deux faits prouvent l'absence d'activité virale dans les troupeaux suivis dans la vallée du fleuve Sénégal.

Chez les petits ruminants, la séroprévalence est passée de 24,4% (N=303, X=74) en 1988 à 4% en 1992 pour toute la vallée du Sénégal. Dans le Delta où la FVR a sévi en 1987, la baisse a été plus importante, car elle va de 71,7% en 1988 à 6,3% en 1992. Ainsi,

on note que les petits ruminants, espèces réputées les plus sensibles au virus de la FVR, sont redevenus, à l'heure actuelle, totalement réceptifs à une nouvelle infection virale parce qu'ils ont perdu toute couverture immunitaire. De plus, l'absence d'anticorps de classe M, témoins d'infection récente, semble corroborer l'absence de circulation du virus dans cette zone sahélienne. Le fait que l'on n'ait pas détecté de signe clinique de FVR montre bien l'existence d'une phase de silence post-épizootique.

Chez les petits ruminants, la baisse a été plus rapide que chez les bovins. Chez ces derniers, de 1990 à 1992, la séroprévalence est passée de 36,9% à 23,3% dans la basse vallée ou Delta du fleuve Sénégal. Cette différence est à mettre à l'actif d'un turn over plus rapide chez les petits ruminants dont la population âgée de moins d'un an représente 50% de l'effectif des troupeaux en zone sahélienne. Ainsi, chaque année apporte un fort contingent d'animaux neufs et dépourvus d'anticorps anti virus de la FVR. A l'heure actuelle, la séroprévalence chez les petits ruminants de la vallée du fleuve Sénégal est revenue à son niveau d'avant l'épizootie de 1987.

Dans le Ferlo

En 1992, la prévalence obtenue chez les petits ruminants était de 7,5% (N=120 X=09). Elle est plus élevée que celle notée dans la vallée du fleuve à la même époque. Un animal appartenant à un troupeau transhumant a été trouvé porteur d'anticorps anti FVR de classe M. Cette partie sahélienne apparaît comme une impportante zone d'enzootie en raison de son taux d'infection actuel plus élevé que celui de la vallée du fleuve Sénégal. De plus, la présence d'un animal séropositif en IgM en fait une zone de circulation du virus, à bas bruit, au niveau de certains sites comme les forages ou les mares temporaires. Cette circulation de virus dans cette zone de transhumance peut être lourde de conséquences : il est possible de penser que des animaux de la vallée en transhumance s'infectent lors de leur séjour dans le Ferlo et qu'ils réintroduisent le virus dans la vallée au retour de la transhumance. Dans la situation actuelle, le virus diffusera facilement parce que les animaux sont sans couverture immunitaire.

Dans le Bassin arachidier et les Iles du Saloum

Les résultats sérologiques obtenus montrent une nette différence chez les bovins des deux départements de la région de Fatick : Gossas (Bassin arachidier) et Foundiougne (Iles du Saloum). La prévalence était de 3,5% (N=479, X=17) pour le département de Gossas en 1991 et de 12,6% (N=378, X=48) pour le département de Foundiougne en 1992. L'analyse des résultats en fonction des classes d'âge révèle que la séropositivité dans les Iles du Saloum ne concerne que les aniamux de trois ans d'âge et plus. Au contraire, dans le bassin arachidier, toutes les catégories d'âge sont infectées par le virus de la FVR (Tableau V). Toutefois, cette infection indique l'existence d'une activité virale dans le Bassin arachidier et ne concerne que certains sites localisés dans la partie nord sous influence sahélienne. Il est important de noter que cette zone reçoit des animaux transhumants du Ferlo. Le Bassin arachidier apparaît comme une extension du foyer de circulation du Ferlo par l'intermédiaire des animaux transhumants. Au contraire, dans les Iles du Saloum, le caractère insulaire fait que les animaux sont relativement épargnés d'une contamination à partir du foyer continental, de faible activité. Ils ne sont atteints que par un foyer épizootique, comme celui de 1987, car l'ampleur de la circulation du virus est telle que beaucoup d'es-

pèces de moustiques peuvent devenir des vecteurs potentiels du virus. Mais, lorsque la circulation est faible, comme c'est le cas actuellement, les animaux des Iles du Saloum ne sont pas concernés.

Tableau V. Evolution post-épizootique de la séroprévalence en anticorps anti FVR chez les bovins dans la vallée du fleuve Sénégal en fonction des classes d'âge.

	1990	1991	1992
Jeunes	199/19(09,5)	154/12(07,7)	35/04(11,4)
Adultes	428/153(35,7)	296/94(31,9)	68/20(29,4)
Total	627/172(27,4)	450/106(23,5)	103/24(23,3)

Dans la zone guinéenne

Les bovins

En 1991, les animaux prélevés dans les deux régions de Tambacounda (N=503) et de Kolda (N=227) ont présenté des taux d'infection identiques de 6,1%.

Dans la région de Tambacounda, 11 des 13 sites visités sont apparus infectés par le virus. Toutes les catégories d'âge sont concernées. Le site de Dialacoto est remarquable par sa forte prévalence : 17,5% (N=40, X=7)

Dans la région de Kolda, 4 des 6 sites du département de Vélingara sont apparus infectés. Parmi ceux-ci, le site de Kandia présente le taux le plus élevé : 20,5% (N=38, X=8). La séropositivité est répartie entre les quatre classes d'âge.

En 1992, la région de Kolda (département de Sédhiou) a montré un taux d'infection de 12,6% (N=607, X=77) contre 3,7% (N=318, X=12) pour celle de Tambacounda (département de Kédougou). L'analyse détaillée montre que :

- le pourcentage de troupeaux infectés de Tambacounda, 70%, est plus faible que celui de Kolda (Sedhiou) : 88,2%,
- la séropositivité concerne toutes les classes d'âge dans le Tambacounda, alors que dans la région de Kolda, les jeunes adultes, de 2 à 3 ans d'âge sont dépourvus d'anticorps de la FVR,
- un seul site, celui de Missira dans le Tambacounda, présente un intérêt parce que la prévalence en anticorps anti FVR de 12,5% est relativement élevée, et que cette séroprévalence touche toutes les catégories d'âge.

Ainsi, en 1991, des indices de circulation du virus sont révélés dans les régions de Tambacounda et de Kolda, dans les sites respectifs de Dialacoto et de Kandia. En 1992, seul le site de Missira, dans la région de Tambacounda, héberge une activité virale.

Les petits ruminants

En 1992, les séroprévalences obtenues au niveau des trois régions de Ziguinchor, de Kolda et de Tambacounda sont toutes très faibles. Elles sont respectivement de 1,5%

(N=126,X=2), 1,1% (N=170, X=2) et 1% (N=191, X=2). Elles ne concernent que des animaux et leurs produits. Ainsi, une absence d'activité virale est constatée chez les petits ruminants dans toute la zone guinéenne en 1992. Cette zone apparaît alors enzootique parce que l'infection virale y est présente chez toutes les espèces animales domestiques bien qu'aucun épisode clinique de FVR n'ait été mis en évidence. La très faible infection décelée chez les petits ruminants de la zone guinéenne reste une énigme

Chez les bovins, il a été mis en évidence une circulation du virus de la FVR dans des sites localisés dans deux régions (Tambacounda et Kolda) sur les trois que compte cette zone. La circulation du virus apparait plus active dans la partie orientale de la zone guinéenne. Il est important de souligner que les troupeaux de bovins dans lesquels le virus circule, sont tous localisés dans les départements de Vélingara, de Tambacounda, de Kédougou, et sont dans la zone d'emprise du Parc National de Niokolo Koba (PNNK). Une transmission du virus de la FVR au cheptel domestique est possible à partir du réservoir faunique du PNNK. L'existence d'un réservoir du virus de la FVR dans la faune sauvage peut expliquer la persistence de la circulation du virus dans ces troupeaux qui se contaminent par des contacts répétés, au niveau des points d'eau et des pâturages, avec la faune sauvage infectée.

Il est également connu que les troupeaux de ruminants domestiques de la vallée du fleuve Sénégal et du Ferlo transhument de plus en plus souvent dans le département de Tambacounda, surtout en période de sécheresse. Il est loisible de penser que ces troupeaux transhumants se contaminent au contact des animaux autochtones domestiques ou sauvages. Au retour de leur transhumance, ils peuvent introduire le virus dans la vallée du Sénégal. Les conditions écologiques de la vallée (eau douce toute l'année dans les marigots et les périmètres irrigués pour la culture du riz) favorisent la pullulation des moustiques (vecteurs du virus) et l'apparition de l'épizootie par piqûres de moustiques. La diffusion de la maladie est facile parce que les animaux de la vallée sont sans couverture immunitaire.

Conclusions

La FVR reste une menace au Sénégal.

Dans la vallée du fleuve Sénégal, où elle a sévi en 1987, tous les aniamux sensibles, surtout les petits ruminants, sont redevenus réceptifs à une nouvelle infection. Celle-ci pourrait être provoquée par une réintroduction accidentelle du virus par les troupeaux transhumants qui seraient infectés dans les zones de circulation de virus localisées dans le Ferlo, le Bassin arachidier, et les régions australes de Tambacounda et de Kolda. Cette situation rend nécessaire la poursuite de la surveillance de la vallée du fleuve Sénégal (zone à risque) et des études épidémiologiques dans les zones d'enzooties. Ces études doivent permettre d'élucider, entre autres, le rôle des vecteurs et du réservoir faunique dans le maintien du virus au niveau de certains sites.

Bibliographie

1. Akakpo A.J., Some M.J.R., Bornarel P., Jouan A., Gonzalez J.P. (1989). Epidémiologie de la Fièvre de la Vallée du Rift en Afrique de l'Ouest : enquête sérologique chez les ruminants domestiques au Burkina Faso. *Bull Soc Path Exot* ; 82 : 321-331.
2. Davies F.G., Linthicum K.J., James A.D. (1985). Rainfall and epizootic Rift Valley Fever. *Bull WHO* ; 63(5) : 941-943.
3. Thiongane Y., Zeller H., Faty H.G., Akakpo J.A. (1990). Post-epizootic prevalence of Rift Valley Fever antobody in small ruminants from the Senegal River Bassin (1988-1990). 39th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, New Orleans Marriott, New Orleans, Louisiana, November 4-8, 1990.
4. Thiongane Y., Gonzalez J.P., Fati A., Akakpo J.A. (1991). Changes in Rift Valley Fever neutralizing antibody prevalence among the small domestic ruminants following the 1987 outbreak in the Senegal river Basin. *Res Virol* ; 142 : 67-70.

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 113-124.

11

Différenciation de la réponse sérologique induite par *Brucella* et *Yersinia enterocolitica* O:9 en utilisant les *Yersinia Outer Proteins* (YOPs)

V. WEYNANTS*, C. SAEGERMAN**, P.A. DENOEL*, A. TIBOR*, J.N. LIMET*, J.-J. LETESSON*

* *Laboratoire d'Immunologie-Microbiologie, FUNDP, Namur, Belgique.*
** *Ministère de l'Agriculture. Administration de l'Elevage et du Service Vétérinaire, Bruxelles, Belgique.*

Résumé

Une infection expérimentale chez le bovin par Yersinia enterocolitica *O:9 et* Brucella abortus *nous a permis d'identifier une fraction antigénique de* Yersinia *capable de discriminer des infections par* Yersinia *ou* Brucella. *Cette fraction est composée des* Yersinia Outer Proteins *(YOPs) qui sont des protéines exprimées exclusivement par les souches de* Yersinia *virulentes. 443 sérums provenant de bovins ne présentant pas de titres en anticorps anti-LPS de* Brucella *et 174 sérums présentant des réactions sérologiques faussement positives lors du dépistage de la brucellose ont été analysés par un ELISA basé sur la détection d'anticorps dirigés contre les YOPs. Un suivi a également été réalisé sur 7 génisses issues d'une ferme où des* Yersinia enterocolitica *O:9 ont été isolées. Cet ELISA-YOPs s'est avéré un outil supplémentaire non négligeable pour résoudre le pro-*

blème des sérologies faussement positives de plus en plus souvent observées lors des campagnes de dépistage de la brucellose.

En Belgique et en France, les 3 dernières campagnes de prophylaxie de la brucellose ont révélé un nombre anormal de cheptels positifs. Pour ces cheptels, l'absence de toute manifestation clinique et de tout facteur épidémiologique (pas de vaccination depuis plus de 5 ans, zone indemne, ...) font que ces sérologies sont sans rapport avec la brucellose. Ces réactions sérologiques ont donc été appelées Réactions Sérologiques Faussement Positives (RSFP). Pour les régions concernées, 3,8% des cheptels sont atteints soit 0,11% des bovins de plus d'un an [8]. Des *Yersinia enterocolitica* O:9 (YeO 9) ont été isolés de matières fécales provenant de certains des bovins présentant ces sérologies (C. Saegerman, communication personnelle). Les réactions sérologiques croisées entre ces bactéries sont bien connnues [1,10,11,12]. Pour ces deux pays, comme pour de nombreux autres, les programmes d'éradication de la brucellose sont basés sur la détection d'anticorps dirigés contre le lipopolysaccaharide (LPS) de *Brucella*. Or le déterminant à l'origine de la réaction croisée entre YeO:9 et *Brucella abortus* a justement été localisé dans les unités 4,6-didéoxy-4-formamido-a-D-mannopyranosyl liées par des liens α1,2 de la chaîne O du LPS [2,3,4,5,7] Ces RSFP alourdissent considérablement le contrôle de la brucellose et sont responsables de problèmes économiques aigus. C'est pourquoi diverses tentatives de développement de systèmes discriminant la brucellose d'une yersiniose, ont été ébauchées; aucune d'entre elles n'a cependant répondu aux attentes [10,11,12,19,23,24].

La virulence des Yersinia est associée à la présence d'un plasmide spécifique de *Yersinia* de 70 kilo bases (pYV pour plasmide de Virulence de Yersinia). Ce plasmide présente plusieurs propriétés dépendantes de la température dont un besoin de $Ca^{2}+$ pour pousser à 37°C. Le plasmide pYV code aussi pour des protéines spécifiques qui sont sécrétées. Ces protéines, ayant été initialement observées dans la paroi externe, ont été dénommée "YOPs" (pour *Yersinia Outer Proteins*) [17,21].

Des études récentes chez l'Humain ont montré que les sérums de patients souffrant de yersiniose contiennent des anticorps anti-LPS mais aussi des anticorps anti-YOPs [9,18]. Dans cet article, nous confirmons que des bovins infectés par YeO:9 produisent des anticorps qui interfèrent dans les tests sérologiques de dépistage de la brucellose, mais également des anticorps dirigés contre les YOPs. Sur base de ces dernières, un ELISA capable de discriminer une infection par *Brucella* d'une infection par *Yersinia* a été développé.

Matériel et méthodes

Antigènes

Productions de YOPs

La souche de YeO:3 contenant le plasmide pYV (souche WE261/87 pYV^{+}) provient du Département de Microbiologie de l'Hôpital Universitaire St LUC (Woluwe, Belgique), de même que la souche curée du plasmide (souche W261/87 pYV^{-}) [20]). Les bactéries sont

habituellement cultivées sur du trypic-soy-agar (TSA, Difco) à 28°C. L'isolement des YOPs est réalisé selon une méthode mise au point par G. Cornelis (communication personnelle). Brièvement : une culture d'une nuit (trypic-soy-broth, Difco) à 28°C est ajustée à une densité optique de 1 à 600nm et diluée 3.10^5 fois dans du PBS (tampon phosphate salin, pH 7,4). 900 ml de la dilution sont étalés sur une feuille de cellophane qui recouvre une boîte de culture de 245mm*245mm (Nunc) dans laquelle du TSA-MOX (TSA contenant 0,02M de $MgCl_2$ et 0,02M de $Na_2C_2O_4$) a été coulé. La boîte est incubée 20h à 28°C puis 8h à 37°C. Les bactéries et les YOPs sont ensuite récupérées hors du cellophane avec du PBS-azide (PBS-NaN3 0,01%), agitées sur vortex pendant 2 minutes. Les bactéries sont ensuite séparées par centrifugation. Les YOPs excrétées sont concentrées sur une membrane Amicon (10YM10, 43 mm, Diafol).

Extraction du LPS

Le LPS a été obtenu selon la méthode décrite par L. De Waele [6].

Tests classiques

Le test d'agglutination (EDTA), le test de Fixation du Complément (FC) et le test Rose Bengal (RB) ont été réalisés comme décrit précédemment [14]. Les seuils légaux pour l'EDTA et le FC sont respectivement de 30 UI/ml et 20 UI/ml. Un résultat est considéré comme positif si un titre est positif pour au moins un test. Tous les tests ont été réalisés au Centre de Dépistage des Maladies du Bétail (Erpent, Belgique).

Sérums bovins

Infections expérimentales de génisses

Les animaux ont été gardés à l'Institut National de Recherche Vétérinaire, Machelen, Belgique. Quatre génisses non gestantes ont été infectées par voie orale avec 10^{12} YeO:9 et 4 génisses gestantes depuis 5 mois ont été infectées par voie conjonctivale par 16,6 10^6 *Brucella abortus* 544. Les échantillons de sang ont été collectés chaque semaine.

Evaluation de la spécificité

Pour évaluer la spécificité, 443 sérums ont été prélevés sur des animaux de 18 fermes indemnes de brucellose et de RSFP.

Sérums correspondant à des RSFP

174 sérums de génisses présentant des RSFP ont été analysés. De plus, 21 sérums provenant de 7 génisses d'une ferme où des RSFP et des YeO:9 ont été isolées à partir des matières fécales, ont également été analysés. Tous ces sérums nous ont été fournis par le Centre de Dépistage des Maladies du Bétail.

Production du conjugué

L'anticorps monoclonal choisi pour produire le conjugué est le 1C8 [13]. Il s'agit d'un anticorps spécifique de l'IgG1 bovin. Cet anticorps a été produit par ascite en souris hybrides BALB/c/NMRI et purifié par affinité sur une colonne protéine A Sepharose commerciale (Pharmacia, Uppsala, Suède) selon le protocole du producteur et couplé à la peroxidase comme décrit par L. De Waele [6]

Réactifs

- Tampon Salin Glycine (GBS) : 0.17 M NaCl, 0.1 m Glycine et 6 mM NaN_3, pH 9.2.
- GBS-EDTA-TW : tampon GBS contenant 50 mM EDTA et 0.1% Tween 20, pH 9.2
- Hydrolysat de caséine : 25 g de caséine de lait (Fluka, Buchs, Suisse) sont dissous dans 800 ml de NaOH 0.3 N et incubés sous agitation une nuit à 37°C. La solution est ensuite neutralisée (pH 7) par de l'HCl et le volume ajusté à 1 litre. La solution est ensuite filtrée.
- PBS-caséine : tampon salin-phosphate (PBS), pH 7.4, contenant 4% (v/v) d'hydrolysat de caséine.
- Tampon citrate-phosphate : 0.051 M Na_2HPO_4, 0.024 M acide citrique, pH 5.
- NaCl-Tw : 0.15 M NaCl contenant 0.01% Tween 20.

ELISA

Les plaques de microtitration (69620, Nunc) sont sensibilisées au cours d'une incubation d'une nuit à 37°C soit par une mixture (1/1) de LPS de *Brucella melitensis* Rev1 et de *Brucella abortus* W99 à une concentration finale de 1µg/ml soit par une préparation de YOPs à une concentration finale de 4µg/ml dans du tampon GBS dilué 50 fois dans de l'eau distillée. Cent ml d'antigènes dilués sont déposés par puits. Après six lavages en NaCl-Tw, les plaques sont saturées 3 h à 37°C avec du PBS-caséine (150µl/puits).

Pour l'ELISA-LPS-*Brucella* , les sérums sont dilués 50 fois dans du GBS-EDTA-Tw et 50µl sont déposés par puits. Pour l'ELISA-YOPs, les sérums dilués 250 fois sont pré-incubés avec des extraits ultrasoniqués de YeO:3 (souche WE261/87 pYV^-) avant d'être déposés dans les plaques (50µl/puits). Après une incubation d'une heure à température ambiante, la fixation des anticorps est révélée par l'utilisation de 50µl d'un conjugué 1C8-peroxydase dilué dans du GBS-EDTA-Tw contenant 4% (v/v) d'hydrolysat de caséine. Le conjugué est incubé une heure à température ambiante. Entre chaque incubation, l'excès de réactifs est éliminé par 6 lavages en NaCl-Tw avec un laveur automatique (Microplate washer M96, Titertek). L'o-phénylenediamine (0,4%, wt/v) et 2mM H_2O_2 dans du tampon citrate-phosphate sont utilisés pour révéler l'activité de la peroxydase (100µl/puits). La réaction est stoppée après 20 min. par addition d'H_2SO_4 (2N) (25 µl/puits). La différence de longueur d'ondes à 490nm-630nm est lue par un lecteur (Bio Kinetics Reader EL-340, Biotek Instruments, Vermont, USA). Les résultats sont exprimés en unités par comparaison à un sérum standard. Celui-ci est dilué successivement afin d'établir une courbe de calibration qui permette l'interpolation des densités optiques en unités.

Pour l'ELISA-LPS-*Brucella* , le sérum de référence présente un titre de 1200 unités internationales (UI) en FC. La courbe est réalisée par 9 dilutions successives (1/1000 à 1/256000). Le seuil de positivité a été fixé à 2,5 UI [6]. Pour l'ELISA-YOPs, le sérum de référence correspond à un mélange de sérums provenant des animaux infectés expéri-

mentalement par YeO:9. La conversion en unité arbitraire (UA) est réalisée grâce à une courbe d'interpolation obtenue par 10 dilutions successives du mélange de référence (1/20 à 1/10240). Ces dilutions sont également pré-incubées avec des extraits ultrasoniqués de la souche WE261/87 pYV$^-$. L'interpolation est réalisée par le logiciel Delta Soft II.3 (Biometallics, Princton, USA) selon l'équation logistique à 4 paramètres.

Résultats

Infections expérimentales

Dans une première expérience, les sérums provenant des infections expérimentales ont été analysés par les tests classiques et l'ELISA (Tableau I). Un mélange de sérums prélevés chez les 8 génisses avant les infections a été utilisé comme contrôle négatif. Pour les génisses infectés par YeO:9, les valeurs correspondent aux titres maximuns observés avec l'ELISA-LPS-*Brucella* . Pour les génisses gestantes infectées par *Brucella* , les titres correspondent à ceux la dernière saignée réalisée avant l'avortement. Toute les génisses infectées par YeO:9 ont excrété, dans les matières fécales, pendant deux ou trois semaines le germe d'épreuve. Aucune *Brucella* n'a été isolée des matières fécales des génisses gestantes infectées. L'analyse de ces résultats confirme bien qu'une infection par YeO : 9 induit chez le bovin des anticorps qui interfèrent dans les tests de dépistage de la brucellose (tests classiques et ELISA-LPS-*Brucella*).

Tableau I. Tests sérologiques sur les animaux infectés expérimentalement.

Germe	Bovin	Tests classiques			ELISA Matières		
	n°	EDTA	RB	FC	LPS-YeO9**	LPS-B*	fécales
-***	0	0	-	0	0,121	0	
	1	30	+	0	0,203	1,1	21
YeO·9	2	30	+	20	0,776	8.9	15
	3	200	2+	25	0,649	5,4	15
	4	30	+	0	0,473	4,3	15
	5	50	4+	220	2,192	34	-
s	6	50	4+	50	2,296	31	-
	7	50	4+	220	2,004	41	-
	8	50	4+	200	1,752	20	-

* Titres sérologiques exprimés en UI.
** Titres sérologiques exprimés en DO.
*** Les résultats correspondent à la moyenne obtenue pour les 8 saignées réalisées avant les infections expérimentales.
N.D. non déterminé.

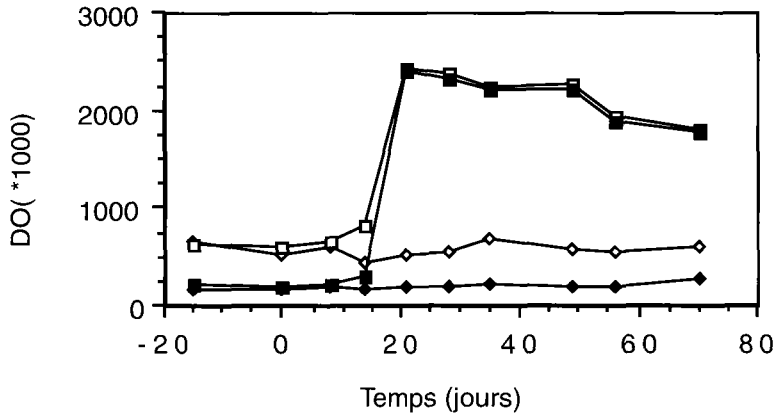


Figure 1. Effet de la pré-incubation sur la détection des anticorps anti-YOPs après infection par YeO:9 (carré) ou par Brucella abortus 544 (losange) au jour 0. Les sérums ont été épuisés (carré fermé) ou non (carré ouvert) par des extraits ultrasoniqués de YeO:3 (souche WE 261/87 pYV-).

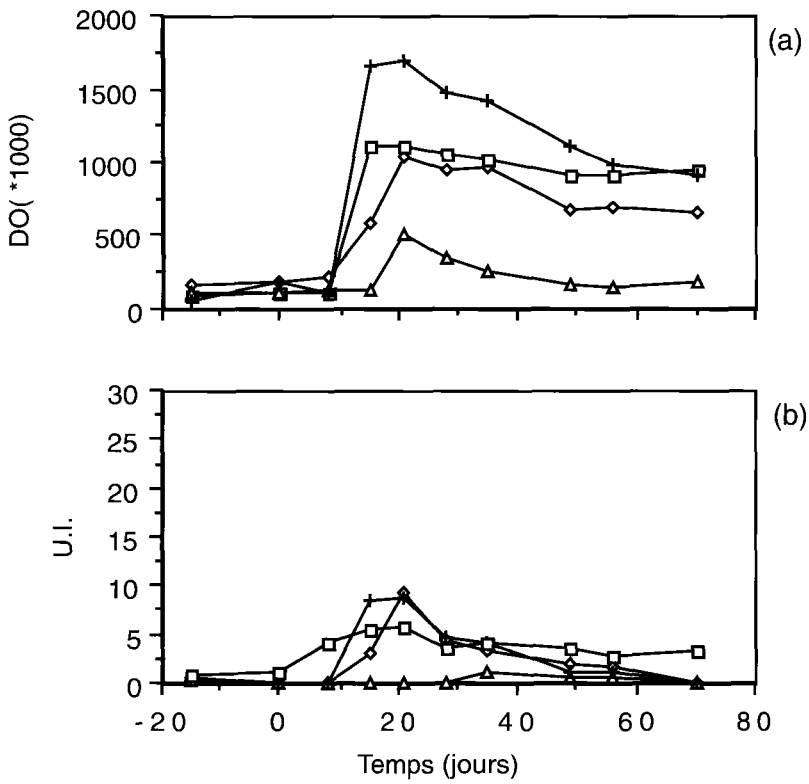


Figure 2. Suivis sérologiques des anticorps anti-YOPs (a) et anti-LPS (b) chez les quatre génisses infectées expérimentalement au jour 0 par YeO:9.

Par la suite, ces sérums ont été utilisés pour suivre la réponse anticorps dirigée contre différentes fractions de *Yersinia* (protéines cytoplasmiques, protéines des parois, YOPs) (données non montrées). De ces suivis sérologiques, il est apparu que seule la fraction contenant les YOPs était susceptible de discriminer une infection par YeO:9 d'une infection par *Brucella* . Cependant, les densités optiques obtenues pour les sérums avant infection par YeO:9 et pour sérums provenant des génisses infectées par *Brucella* , étaient relativement élevées (entre 0,8 et 1,2). Nous avons donc amélioré l'ELISA-YOPs en modifiant différents paramètres. La fraction YOPs étant contaminée par du LPS et des protéines de la paroi (données non montrées), nous avons également analysé l'effet d'une pré-incubation des sérums avec des extraits ultrasoniqués de YeO : 3 dépourvue du plasmide de virulence (souche WE261/87 pYV$^-$). La Figure 1 illustre l'effet de cette pré-incubation sur la cinétique d'apparition des anticorps anti-YOPs chez deux bovins représentatifs des deux groupes. L'épuisement des sérums ne modifie pas le profil sérologique pour l'animal infecté par YeO:9; il diminue par contre de manière significative les signaux chez l'animal infecté par *Brucella* . Les conditions finales de l'ELISA-YOPs sont reprises dans "matériel et méthodes".

Les suivis chronologiques des titres d'anticorps anti-YOPs et anti-LPS-*Brucella* sont représentés pour chaque génisse aux Figures 2 et 3. Les animaux infectés expérimentalement par YeO:9 montrent une réponse humorale contre les YOPs plus homogène que celle dirigée contre le LPS. Dans le cadre de ce type d'infection, nous n'avons pas observé d'anticorps anti-LPS sans mettre en évidence des anticorps anti-YOPs, les deux ELISA se révélant aussi précoces l'un que l'autre. Par contre, la réponse contre les YOPs semble perdurer bien plus longtemps que celle dirigée contre le LPS. Une des quatre génisses n'a pas présenté de réponse humorale malgré une excrétion de YeO:9 pendant 3 semaines Quant aux animaux infectés expérimentalement par *Brucella*, ils ne présentent pas des titres en anticorps anti-YOPs significatifs. Nous avons également eu l'opportunité de tester cet ELISA-YOPs sur des sérums d'animaux infectés expérimentalement par *Salmonella* , *Pasteurella* et *Pseudomonas* . Pour tous ces animaux, aucun titre significatif en anticorps anti-YOPs n'a été détecté (données non montrées).

Caractéristiques de l'ELISA YOPs et première évaluation sur des sérums du terrain

En utilisant les conditions de lavage décrites dans "matériel et méthodes", les coefficients de variations pour une plaque ou entre plaques sont inférieurs à 10.

Pour éprouver l'ELISA-YOPs, nous avons analysé 443 sérums provenant de 18 fermes où, ni brucellose, ni RSFP n'ont été signalées et où aucune *Yersinia* virulente n'a été isolée. Ces sérums ont été comparés aux dilutions successives du mélange de référence. 90% des échantillons ont des valeurs en unité inférieures à 20 unités arbitraires (UA) et 95 % des sérum testés ont moins de 30 UA. La Figure 4 montre le profil de distribution pour 174 sérums choisis de manière aléatoire en fonction des UA. Les sérums présentant des titres supérieurs à 30 UA ont été analysés en immuno-empreinte afin de vérifier s'ils contenaient des anticorps anti-YOPs. Des anticorps anti-YOPs n'ont pu être mis en évidence que pour les sérums ayant des titres supérieurs à 50 UA (données non montrées).

L'ELISA a également été appliqué à 174 sérums dont le test de fixation du complément et/ou le test d'agglutination sont positifs. Ces sérums provenaient de plusieurs fermes où les données épidémiologiques nous ont permis d'exclure la brucellose comme facteur res-

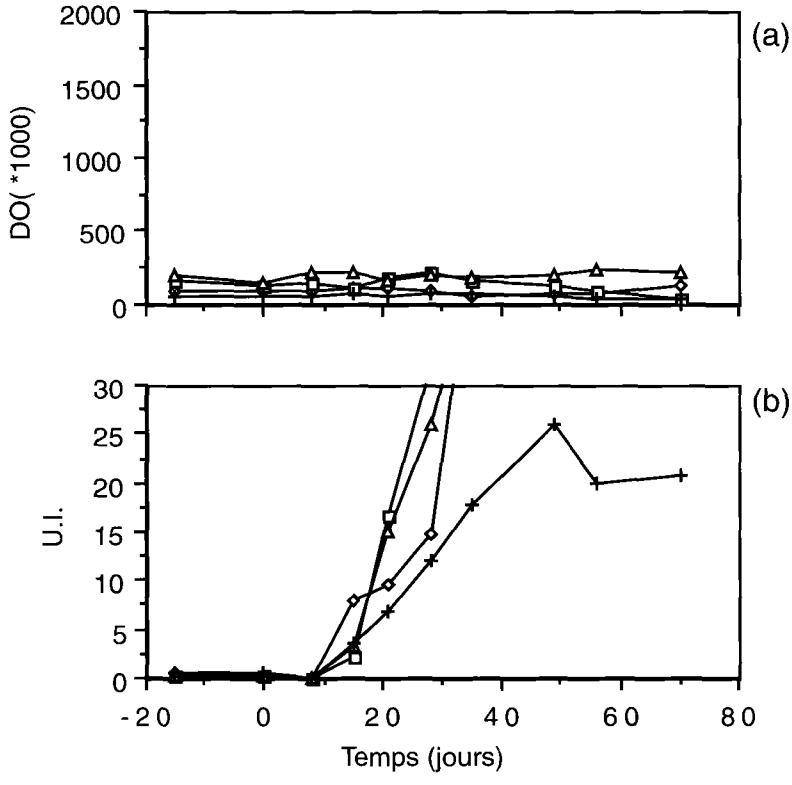


Figure 3. Suivis sérologiques des anticorps anti-YOPs (a) et anti-LPS (b) chez les quatre génisses infectées expérimentalement au jour 0 par *Brucella abortus* 544.

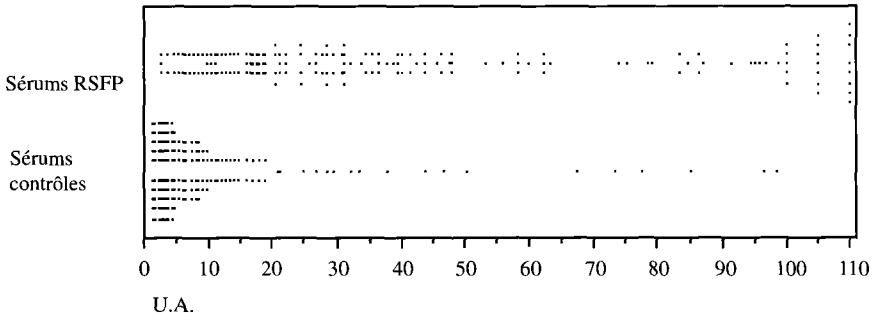


Figure 4. Distributions, en fonction des titres en anticorps anti-YOPs exprimés en UA, des sérums RSFP et de 174 sérums indemnes choisis au hasard parmi les 443 testés.

ponsable de ces réactions sérologiques. Nous les avons donc considérés comme sérum présentant une RSFP. 64 et 49% des sérums ont des valeurs unitaires respectivement supérieures à 20 et 30 UA. La Figure 4 montre le profil de distribution pour les 174 sérums en fonction des UA.

Sept génisses issues d'une ferme ont aussi été suivies sur une période de 3 mois. Des YeO:9 ont été isolées à partir des matières fécales de 2 d'entre-elles. Le Tableau 2 reprend les résultats sérologiques (tests classiques, ELISA-LPS et ELISA-YOPs) et bactériologiques obtenus au cours de cette étude. Le suivi révèle que 6 animaux présentent à un moment donné un titre en anticorps anti-YOPs supérieur à 30 UA; parmi eux, 5 sont positifs en ELISA-LPS. Cependant, contrairement à ce qui a été observé au cours de l'infection expérimentale, la génisse n°13 présente à un moment du suivi des titres en anticorps anti-LPS supérieurs au seuil, sans pour autant avoir un taux en anticorps anti-YOPs significatif. Ce n'est qu'à la saignée suivante que l'animal devint positif en ELISA-YOPs. La 7ème génisse (n°14) est restée négative tout au long du suivi.

Tableau II. Suivis sérologique et bactériologique chez des génisses d'une ferme "infectée par Ye0:9".

Génisse n°	Date J/M	ELISA YOPs(UA)	Matières fécales	ELISA LPS(UI)	Tests classiques EDTA	RB	FC
	9/7	55,8	+	25	25	+	60
9	14/8	18,3	-	9,4	12,5	+	20
	5/11	7,3	-	5,3	0	+	0
	9/7	22,6	+	0,0	12,5	-	0
10	14/8	46,0	-	5,5	12,5	+	0
	5/11	18,4	-	3,0	12,5	-	0
	9/7	0,0	-	0,0	0	-	0
11	14/8	60,0	-	10,7	12,5	+	15
	5/11	20,4	-	4,8	12,5	+	0
	9/7	5,3	-	0	0	-	0
12	14/8	40,3	-	10	0	-	0
	5/11	8,0	-	2,3	0	-	0
	9/7	7,4	-	7,0	12,5	+	15
13	14/8	55,3	-	3,0	12,5	-	0
	5/11	6,6	-	2,0	12,5	-	0
	9/7	32,4	-	0	0	-	0
14	14/8	29,5	-	0	0	-	0
	5/11	21,5	-	0	0	-	0
	9/7	4,3	-	0	0	-	0
15	14/8	7,7	-	0	12,5	-	0
	5/11	6,8	-	0	0	-	0

Discussion

Les différentes fractions de *Yersinia* ont été produites à partir d'une souche de *Yersinia enterocolitica* O:3. Ce choix se base sur le fait que les protéines des *Yersinia enterocolitica* O:3 et O:9 sont antigéniquement proches les unes des autres [16]. De plus, comme le LPS de YeO:3 n'induit pas de réactions croisées lors des tests de détection de la brucellose, cet antigène ne pouvait mettre en évidence les anticorps dirigés contre le LPS de YeO:9 ou de *Brucella* [25]. Les signaux que nous observions ne pouvaient donc pas être attribués à des anticorps dirigés contre le LPS de YeO:9 ou de *Brucella* .

C. Schoerner [18], en étudiant la présence d'anticorps anti-YOPs chez des humains pour lesquels une yersiniose aiguë ou récente a été diagnostiquée, a montré que l'ELISA était aussi approprié que l'immuno-empreinte. Mais, il est cependant bien connu que cette technique est moins sensible et plus fastidieuse que l'ELISA. Nous avons également choisi l'ELISA parce que cette technique permet d'analyser rapidement un grand nombre de sérums. Le manque de sensibilité de l'immuno-empreinte a d'ailleur été observé lorsque nous avons analysé une série de sérums présentant des titres en anticorps anti-YOPs égaux ou supérieurs à 30 UA.

Les sérums contrôles ont été prélevés dans des fermes où ni brucellose ni RSFP n'ont été mises en évidence. Le profil de distribution de ces sérums en fonction de leur titre en UA montre une cassure à 20 UA . 90 à 95 % des sérums ont des titres respectivement inférieurs à 20 et 30 UA. Les sérums ayant des titres supérieurs à 30 UA ont été analysés en immuno-empreintes afin de vérifier si ils contenaient ou non des anticorps anti-YOPs. De tels anticorps n'ont pu être mis en évidence que pour des sérums ayant des titres élevés. Le manque de sensibilité de l'immuno-empreinte ne permet cependant pas d'exclure que les sérums ne possèdent pas d'anticorps dirigés contre les YOPs. 5 à 10% des sérums indemnes de brucellose et de RSFP proviennent donc très vraisemblablement de génisses atteintes de yersiniose. Ces infections sont-elles dues à des YeO:9 ou à d'autres *Yersinia* virulentes? Nous ne pouvons le dire actuellement car les seules *Yersinia* qui ont été isolées dans les fermes concernées sont des *Yersinia* non virulentes. Cependant, l'infection expérimentale a montré que des génisses infectées par YeO:9 ont des taux en anticorps anti-YOPs qui perdurent bien plus longtemps que les anticorps dirigés contre le LPS. Chez l'Humain, 39% des individus sains auraient des titres en anticorps anti-YOP significatifs [9]. Par contre, entre 49 et 64% des génisses présentant des RSFP ont des titres en anticorps anti-YOPs respectivement supérieurs à 30 et 20 UA. Les distributions des sérums des deux populations sont significativement différentes ($\alpha < 0{,}001$).

Le fait que le plasmide de virulence pYV est présent dans toutes les souches de *Yersinia* pathogènes (*Y.enterocolitica* O:9 mais aussi O:3, O:8 et *Y. pseudotuberculosis*) doit nous éviter de tirer des conclusions trop hâtives lors de l'interprétation des sérologies anti-YOPs. Cependant, les résultats obtenus avec les différentes populations de sérums et le suivi de la ferme "infectée par YeO:9" indiquent que la détection des anticorps anti-YOPs semble une méthode de diagnostic de la yersiniose prometteuse et un outil supplémentaire pour traiter le problème des RSFP dans le dépistage de la brucellose. Il ne sérumsit pas impossible d'envisager, comme l'a réalisé I. Maki [15] pour détecter et discriminer des infections par YeO:3 et 0:8, coupler l'ELISA-YOPs à un ELISA détectant des anticorps dirigés contre le LPS de YeO:3 et contre ceux des principaux sérotypes des *Yersinia pseudotuberculosis* .

Pour être spécifique, l'ELISA-YOPs actuel nécessite un épuisement des sérums afin que seuls les anticorps anti-YOPs soient détectés. Le recours à des YOPs recombinantes devrait éliminer cette préincubation des sérums et donc, d'une part, rendre l'ELISA-YOPs plus facilement applicable en routine et d'autre part réduire le seuil de positivité. Chez le lapin ce sérumsit les YOPs de 25, 37 et 57 kDa les plus immunogènes, la YOP 35 étant la première à être mise en évidence [9]. Pour l'Humain, les YOPs les plus immunogènes sérumsient de 26, 34, 45 et 53 kDa [21] et d'après les travaux de Schoerner [18] sérumsient celles de 25, 36 et 47kDa. Une première étude en immuno-empreinte a permis d'identifier les YOPs les plus immunogènes chez le bovin. Ces protéines sérumsient les mêmes que celles décrites lors d'infection chez le lapin ou l'Humain puisque les YOPs de 25 et de 48 ou 54 kDa sérumsient régulièrement à l'origine d'une réponse humorale, mais le plus immunogène sérumsit la YOP de 37kDa. Des travaux, en collaboration avec G. Cornelis (ICP/UCL) sont en cours afin d'évaluer l'apport de ces YOPs recombinantes à la détection des RSFP.

Remerciements

Cette recherche a été subventionnée par la Région Wallonne et par l'Institut pour l'encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture (IRSIA).
Nous remercions vivement Messieurs Y. Botton, B. Limbourg et P. Thiange du Centre de Dépistage des Maladies du Bétail (Erpent, Belgique), les Professeurs G. Cornelis et G. Wauters de l'Unité de Microbiologie, Hôpital St Luc (Woluwe, Belgique) et le Dr. J. Godefroid (INRV, Bruxelles, Belgique) pour leur collaboration à ce travail.

Références

1. Ahvonen O.E., Jansson, Aho.K. (1969). Marked cross-agglutination between *Brucellae* and a subtype of *Yersinia enterocolitica* . *Acta Pathol Microbiol Scand* ; 75 : 291-295.
2. Bundle D.R., Gidney M.A.J., Perry M.B., Duncan J.R., Cherwonogrodzky J.W. (1984). Serological confirmation of *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9 O-antigens by monoclonal antibodies. *Infect Immun* ; 46 : 389-393.
3. Bundle D.R., Cherwonogrodzky J.W., Caroff M.,.Perry.M.B. (1987). The lipoloysaccharide of *Brucella abortus* and *B. melitensis* . *Ann Inst Pasteur/Microbiologie* ; 138 : 92-98.
4. Bundle D.R., Cherwonogrozky J.W., Gidney M.A.J., Meikle P.J.,Perry M.P., Peters.T. (1989). Definition of *Brucella* A and M epitopes by monoclonal typing reagents and oligosaccharides. *Infect Immun* ; 57 : 2829-2836.
5. Caroff M., Bundle D.R., Perry.M.B. (1984). Structure of the O-chain of the phenol-phase soluble cellular lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* O:9. *Eur J Biochem* ; 139 : 195-200.
6. De Waele L., Saegerman C., Gilson D., Thiange P., Vo T. K., Limet J., Letesson. J-J. (1993). Field evaluation of three ELISA using monoclonal antibodies or protein G as peroxydase conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. Submitted in *Vet Microbiol.*
7. Diaz R., Toyos J., Salvo M.D., Fernandez-Lago L., Alonso B., Moriyon I., Dorronsorov I. (1984). Studies on the polysaccharide B and native hapten of *Brucella* and *Yersinia enterocolitica* serotype O:9. *Dev Biol Stand* ; 56 : 213-220.
8. Garin-Bastuji B. (1993). Le dépistage de la brucellose des ruminants et ses difficultés. Le cas des sérologies atypiques en brucellose bovine. *Point Vét* ; 25 (152) : 115-124.
9. Heesenmann J., Eggers C., Schröder C. (1987). Serological diagnosis of yersinosis by immu-

noblot technique using virulence-associated antigen of enteropathogenic yersiniae. *Contrib Microbiol Immun* ; 9 : 285-289.

10. Hurvell B., Ahvonen P., Thal E. (1971). Serological cross-reactions between different *Brucella* species and *Yersinia enterocolitica* . Agglutination and complement fixation. *Acta Vet Scand* ; 12 : 86-94.
11. Hurvell B. (1972). Serological cross-reactions between *Brucella* species and *Yersinia enterocolitica* . Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. *Acta Vet Scand* ; 13 : 472-483.
12. Hurvell B., Lindberg A.A., Carlsson H.E. (1979). Differentiation of antibodies against *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* by enzyme-linked immunosorbent assay. *Contrib Microbiol Immunol* ; 5 : 73-79
13. Letesson *et al* (1985).
14. Limet J., Kerkhofs P., Wijfels R., Dekeyser.P. (1988). Le diagnostic sérologique de la brucellose bovine par ELISA. *Ann Méd Vét* ; 132 : 565.
15. Maki I.O., Heesemann J., Lahesmaa R., Toivanen A., Granfors A. (1991). Combined use of released proteins and lipopolysaccharide in enzyme-linked immunosorbent assay for serologic screening of *Yersinia* infections. *J Infect Dis* ; 163 (2) : 409-412.
16. Martinez M.B., Hoshino-Shimizu S., Falcao D.P. (1991). *Yersinia enterocolitica* : antigenic components with diagnostic pentential. *Contrib Microbiol Immun* ; 12 : 123-126.
17. Michiels T., Wattiau P., Brasseur R., Ruysschaert J.M., Cornelis G. (1990). Secretion of Yop proteins by *Yersiniae* . Infect Immun ; 58 (9) : 2840-2849.
18. Schoerner C., Wartenberg K., Röllinghoff M. (1990). Differentiation of serological responses to *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 and *Brucella* species by immunoblot or enzyme-linked immunosorbent assay using whole bacteria and *Yersinia* outer membrane proteins. 28 (7) : 1570-1574.
19. Schurig G.G., Pringle A.T., Breese S.S. (1981). Localization of *Brucella* antigens that elicit a humoral immune response in *Brucella abortus* infected cattle. *Infect Immun* ; 34 : 1000-1007.
20. Sory M-P., Tollenaere J., Laszlo C., Biot T., Cornelis G.R., Wauters G. (1990). Detection of pYV+ *Yersinia enterocolitica* isolates by P1 slide agglutination. *J Clin Microbiol* ; 28 (11) : 2403-2408.
21. Stahlberg *et al* (1987).
22. Straley S., Skrzypek E., Plano G.V., Bliska J.B. (1993). Yops of *Yersinia* spp. pathogenic of Humans. *Infect Immun* ; 61 (8) : 3105-3110.
23. Vizcaino N., Chordi A., Fernandez-Lago L. (1991). Characterization of smooth *Brucella* lipopolysaccharides and polysaccharides by monoclonal antibodies. *Res Microbiol* ; 142 (9) : 971-978.
24. Vizcaino N., Fernandez-Lago L. (1992). A rapid and sensitive method for the identification of *Brucella* species with a monoclonal antibody. *Res Microbiol* ; 143 (5) : 513-518.
25. Weninger J., Wartznberg K., Rôllinghoff M. (1988). Immunological characterization of Yersinia enterocolitica O:9 and O:3 LPS antigens by monoclonal antibodies. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg.* A ; 269 : 298-313.

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 125-137.

12

Epidémiologie des affections abortives des ruminants au Togo : enquête sérologique sur la brucellose, la chlamydiose, la fièvre Q et la fièvre de la Vallée du Rift

A.J. AKAKPO*, K.L.TEOU*, T. KPONMASSI*, H.G. ZELLER**
(Avec la collaboration technique de M. DIENG et de M. SENE)

* *Ecole Inter Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires, Dakar, Sénégal.*
** *Institut Pasteur, Dakar, Sénégal.*

Résumé

En 1990-1991, des prélèvements de sérums ont eu lieu sur des bovins et des petits ruminants dans toutes les régions du Togo pour apprécier la prévalence des principales affections microbiennes abortives du bétail. L'analyse des sérums en fixation du complément (483 sérums bovins testés en brucellose, chlamydiose et fièvre Q) ou en ELISA (722 sérums de bovins et d'ovins testés vis à vis de l'antigène du virus de la fièvre de la Vallée du Rift FVR), révèle une prévalence de 16,6 ± 3,3% en brucellose, 2,3 ± 1,3% en chlamydiose, 3,5 ± 1,6% en fièvre Q et 6,1 ± 1,7% en FVR (9,4 ± 2,8% chez les bovins et 2,7 ± 1,7‰ chez les ovins). Ces prévalences varient d'une région à l'autre. Pour la fièvre de la Vallée du Rift, des zones de circulation active ou récente du virus (mise en évidence d'IgM) ont été identifiées.
L'évidence sérologique de ces différentes affections est discutée sur les plans économique et hygiénique.

Le contrôle des grandes épizooties (peste bovine, péripneumonie...) qui autrefois décimaient le cheptel bovin en Afrique, n'a pas pour autant réglé les problèmes de pathologie. En effet, la disparition des mortalités dues aux épizooties a permis l'émergence des maladies d'élevage, lesquelles provoquent des pertes à travers l'avortement, la mortinatalité, la stérilité. Ces maladies abortives tendent à limiter l'élevage à sa source. C'est pourquoi il nous a paru nécessaire de faire le point sur quelques affections infectieuses abortives du bétail au Togo, à travers une enquête séro-épidémiologique, pour déterminer la prévalence de quatre de ces affections : la brucellose, la chlamydiose, la fièvre Q et la fièvre de la Vallée du Rift.

Matériel et méthodes

Entre les mois d'août 1990 et février 1991, des prélèvements de sang ont été effectués sur des bovins et des petits ruminants au Togo.Le sang a été ponctionné à la veine jugulaire à l'aide de tubes Vénoject sous vide et stériles, sur des animaux choisis au hasard dans les élevages de type traditionnel (pour les bovins) ou encadré (pour les petits ruminans), dans les cinq régions administratives du pays. Sur chaque animal, les informations concernant l'espèce, la race, l'âge et le sexe sont relevées. Les sérums sont récoltés le même jour et conservés au congélateur jusqu'à leur utilisation.

Au Laboratoire de Pathologie Infectieuse de l'Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaire de Dakar, des réactions sérologiques ont été utilisées pour rechercher les anticorps témoins de la brucellose, la chlamydiose, la fièvre Q, tandis que les recherches sur la fièvre de la Vallée du Rift ont été effectuées au Laboratoire des arboviroses de l'Institut Pasteur de Dakar.

En brucellose, l'épreuve à l'antigène tamponné coloré au Rose Bengale (RB) a été couplée à la Fixation du Complément (FC) selon la technique de Kolmer à froid .En RB, toute agglutination visible à l'œil nu est considérée comme positive. En FC, le seuil de positivité retenu est une hémolyse à 50% à la dilution de 1/4. Les réactifs (antigènes) proviennent des Laboratoires Bio Mérieux, le complément et le sérum hémolytique anti-globules rouges de mouton proviennent de Diagnostic Pasteur.

En chlamydiose et fièvre Q, la réaction classique de fixation du complément à froid (micro-méthode en plaque) a été mise en œuvre avec des antigènes *Chlamydia* et *Coxiella* des laboratoires Rhône Mérieux.

En fièvre de la Vallée du Rift, c'est l'ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) qui a été utilisé pour détecter les IgG et les IgM, comme décrit dans les travaux antérieurs [24,28]. La plupart des réactifs sont produits sur place. Il s'agit de l'immuno-ascite Rift Valley Fever (RVF) de souris, l'immuno-ascite de la chaîne μ des immunoglobulines, l'antigène spécifique de foie normal, l'antiglobuline G commercial spécifique marqué à la peroxydase de même que l'antiglobuline G de souris marqué à la peroxydase.

L'analyse statistique des résultats a eu recours aux tests classiques couramment utilisés.

Résultats

Au total, 483 sérums de bovins ont été analysés pour la brucellose, la chlamydiose et la fièvre Q. Pour la fièvre de la Vallée du Rift, 359 sérums de bovins et 327 sérums d'ovins ont été testés (Tableau I)

Tableau I. Origine et nombre de prélèvements par région.

	FVR			Brucellose Fièvre Q Chlamydiose
Région	Bovins	Ovins	Total	Bovins
Maritime	49	72	121	50
Plateaux	94	55	149	100
Centrale	30	78	108	45
Kara	92	69	161	119
Savanes	13	53	183	169
Total	395	327	722	483

Résultats d'ensemble et par espèces

La prévalence en brucellose est significativement élevée (16,6%) par rapport aux autres affections explorées (Tableau II). De même, les bovins semblent plus réceptifs à la FVR que les ovins.

Tableau II. Prévalence sérologique globale par espèce.

Affection	FVR			Brucellose	Chlamydiose	Fièvre Q
Espèce	Bovins	Ovins	Total	Bovins	Bovins	Bovins
Nombre de sérums examiné	395	327	722	483	483	483
Positif en %	9,4 ± 3,8	2,& ± 1,7	6,1 ± 1,7	16,6 ± 3,3	2,3 ± 1,3	3,5 ± 1,0
AC %				6,2 ± 2,1	5,8 ± 2,1	5,6 ± 2,0

AC : Sérums anticompléméntaires

Prévalence sérologique selon les régions et la race

Les bovins des régions maritimes et des plateaux semblent plus infectés que les autres en brucellose (26% et 23%) et en chlamydiose (6% et 4%).
En fièvre Q, c'est la région de la Kara (5,9%) qui est la plus infectée (Tableaux III, IV et V)

Tableau III. Prévalence sérologique en brucellose bovine.

Région	Nombre	Positif %	Négatif %	AC %
Savanes	169	12,4 ± 4,9	79,9 ± 6,0	7,7 ± 4,0
Kara	119	14,3 ± 6,3	77,3 ± 7,5	8,4 ± 4,9
Centrale	45	13,3 ± 9,9	84,5 ± 10,6	2,2 ± 4,3
Plateaux	100	23,0 ± 8,2	73,0 ± 8,7	4,0 ± 3,8
Maritime	50	26,0 ± 12,2	70,0 ± 12,7	4,0 ± 5,4
Total	483	16,6 ± 3,3	77,2 ± 3,7	6,2 ± 2,1

Tableau IV. Prévalence sérologique en chlamydiose bovine.

Région	Nombre	Positif %	Négatif %	Ac %
Savanes	169	1,2 ± 1,6	91,1 ± 4,3	7,7 ± 4,0
Kara	119	0,8 ± 1,6	93, 3± 4,5	5,9 ± 4,2
Centrale	45	2,2 ± 4,3	95,5 ± 6,0	2,2 ± 4,3
Plateaux	100	4,0 ± 3,8	91,0 ± 5,6	5,0 ± 4,2
Maritime	50	6,0 ± 6,6	90,0 ± 8,3	4,0 ± 5,4
Total	483	2,3 ± 1,3	91,9±2,4	5,8 ± 2,1

AC : Sérums anticomplémentaires

En fièvre de la Vallée du Rift, les bovins des régions maritimes, des plateaux et des savanes ont une prévalence en IgG supérieure à 12%, tandis que les régions de Kara et Centrale ont une prévalence faible (3,3%) (Tableau VI). Chez les ovins, la région centrale se singularise avec un taux de 6,4%.

Tableau V. Prévalence sérologique en fièvre Q bovine.

Région	Nombre	Positif %	Négatif %	AC %
Savanes	169	2,4 ± 2,3	90,5 ± 4,4	7,1 ± 3,9
Kara	119	5,9 ± 4,2	89,1 ±	5,0 ± 3,9
Centrale	45	0	100 ±0,0	0
Plateaux	100	4,0 ± 3,8	89,0 ± 6,1	7,0 ± 5,0
Maritime	50	4.0 ± 5,4	92,0 ± 7,5	4,0 ± 5,4
Total	483	3,5 ± 1,6	90,9 ± 2,6	5,6 ± 2,0

AC · Sérums anticomplémentaires

Tableau VI. Prévalence selon l'espèce et la région en FVR.

Espèces	Bovins			Ovins			Total		
Région	Examinés	FVR +	% ± i	Examinés	FVR+	% ± i	Examinés	FVR	% ± i
Maritime	49	8	10,3 ± 10,3	72	0	0	121	8	6,6 ± 4,4
Plateaux	94	15	16,0 ± 7,4	55	1	1,8 ± 3,5	149	16	10,7 ± 4,9
Centrale	30	1	3,3 ± 6,2	78	5	6,4 ± 5,4	108	6	5,5 ± 4,2
Kara	92	3	3,3 ± 3,6	69	0	0	161	3	1,8 ± 2,0
Savanes	130	10	12,3 ± 5,6	53	1	1,9 ± 3,6	183	11	6,0 ± 3,4
Total	395	37	9,4 ± 2,8	327	7	2,7 ± 1,7	722	44	6,1 ± 1,7

Le comportement des animaux vis à vis des infections bactériennes (brucellose, chlamydiose, fièvre Q) est indépendant de la race (Taurin, Zébu, Métis).

Prévalence sérologique selon l'âge

Les animaux ont été classés en tranches d'âge par rapport à la période de production. On se rend compte que c'est pendant cette période que les animaux sont les plus infectés en fièvre de la Vallée du Rift (2,4% chez les ovins et 15,4% chez les bovins) et en brucellose (16,8% et 25,4%) (Tableaux VII, VIII et IX).Par contre, en chlamydiose et en fièvre Q, ce sont les jeunes animaux de 0 à 3 ans qui offrent des prévalences relativement élevées (3,5% et 4,9%).

Tableau VII. Prévalence selon l'âge chez les ovins en FVR.

Age (an)	examinés	Sérums FVR+	% ± i
<1	24	0	0
1 à 3	287	7	2,4 ± 1,7
>3	16	0	0

Tableau VIII. Prévalence selon l'âge chez les bovins en FVR.

Age (an)	examinés	Sérums FVR+	% ± i
≤3	176	6	3,4 ± 2,6
3 à 7	181	28	15,4 ± 5,2
>7	38	3	7,9 ± 8,5

Tableau IX. Prévalence sérologique selon l'âge en brucellose, chlamydiose et fièvre Q bovines.

Classe d'âge (an)	Nombre de sérums	Brucellose positifs %	Chlamydiose positifs %	Fièvre Q positifs %
0-3	202	13,9 ± 4,8	3,5 ± 2,5	4,9 ± 3,0
4-7	214	16,8 ± 5,0	1,4 ± 1,8	2,3 ± 2,0
8-11	59	25,4 ± 11,1	1,7 ± 3,3	3,4 ± 4,6
12 et +	8	12,5 ± 22,9	0	0
Total	483	16,6 ± 3,3	2,3 ± 1,3	3,5 ± 1,§

Prévalence sérologique selon le sexe

Si en FVR et en brucellose bovine les mâles et les femelles ont un comportement identique, les béliers sont par contre plus sensibles que les brebis. En chlamydiose et en fièvre Q les mâles sont plus sensibles que les femelles (Tableaux X et XI).

Tableau X. Prévalence sérologique selon le sexe en FVR.

	Bovins		Ovins		Total	
Sérums	M	F	M	F	M	F
Examinés	75	320	30	297	105	617
FVR+	7	30	2	5	9	35
% ± ı	9,3 ± 6,5	9, 4± 3,1	6,6 ± 8,8	1,7 ± 1,4	8,6 ± 5,3	5,7 ± 1,8

Tableau XI. Prévalence sérologique selon le sexe en brucellose, chlamydiose et fièvre Q bovines.

Sexe	Nombre de sérums	Brucellose positifs %	Chlamydiose positifs %	Fièvre Q positifs %
M	100	17,0 ± 7,3	5,0 ± 4,2	6,0 ± 4,6
F	383	16,4 ± 3,7	1,6 ± 1,3	2,9 ± 1,7

Prévalence sérologique en IgM en FVR

En FVR, les sérums positifs en IgG sont repris pour une recherche en IgM. La réponse est négative chez les ovins, mais des sérums de bovins de la Kara et des plateaux sont porteurs d'IgM (Tableau XII).

Tableau XII. Prévalence sérologique en IgM et variation selon les régions chez les bovins (FVR).

Régions	Sérums examinés	IgC	IgM
Maritime	49	8	0
Plateaux	94	15	4
Centrale	30	1	0
Kara	92	3	2
Savanes	130	10	0
Total	395	37	6
% ± i	100 ± 0	9, 4± 2,8	1,5 ± 1,1

Discussion

L'enquête a porté sur un échantillon de bovins et d'ovins sans information précise sur les antécédents pathologiques, et singulièrement, sur les avortements chez les femelles prélevées. L'accès à de telles informations est plutôt difficile en système d'élevage traditionnel non encadré. Les caprins n'ont pas fait l'objet de prélèvements.

Les sérums de bovins ont d'abord été analysés en brucellose, chlamydiose et fièvre Q puis vis à vis de la fièvre de la Vallée du Rift, ce qui explique la diminution du nombre de sérums bovins analysés, car certains ont été épuisés au cours des analyses.

L'étude des différentes affections abortives, pour être complète, devrait associer le diagnostic microbiologique direct et clinique au diagnostic sérologique. Ceci n'a pas été possible, vu le temps dont nous disposions, pour le travail de terrain, mais aussi pour l'identification des germes au laboratoire.

Au laboratoire, nous avons choisi l'agglutination rapide sur lame (Rose Bengale) et la fixation du complément à froid (microméthode en plaque) pour le diagnostic de la brucellose, comme recommandé antérieurement [4,6]. Le Rose Bengale (RB), technique simple, rapide et économique, est facile à mettre en œuvre et sert au diagnostic de troupeau.

La fixation du complément (FC), recommandée par l'OMS, a été utilisée pour compléter le RB, mais aussi en chlamydiose et en fièvre Q. Nous aurions pu utiliser la technique ELISA en brucellose et fièvre Q si nous avions pu disposer de réactifs appropriés.

Avant d'être engagés dans la réaction de FC, les sérums ont subi un chauffage à 60°C pendant une heure, en vue de réduire le nombre de sérums anticomplémentaires éventuels. Pourtant, certains sérums ont gardé le pouvoir anticomplémentaire, réduisant ainsi les informations attendues.

Dans le diagnostic de la chlamydiose, la FC est une réaction de groupe (antigène thermostable commun à toutes les chlamydies), donc peut reconnaître des erreurs par excès.

Par contre, en fièvre Q, la spécificité antigénique est plus grande, car la FC met en évidence des anticorps anti *Coxiella burneti* , à l'exclusion de tout autre germe de la famille des Rickettsiaceae ou des Chlamydiaceae.

Des travaux antérieurs ont déjà révélé la présence de la brucellose au Togo (sérologie [4] et isolement de germe [5]). D'une façon générale, la prévalence moyenne relevée (16,6 ± 3,3%) est inférieure à celle obtenue il y a une dizaine d'années (41% [4]). Faut-il en déduire que la brucellose animale est en voie de régression au Togo ? Il serait hasardeux de conclure à un recul significatif de la maladie, en fonction de la taille réduite de la population bovine étudiée et de l'absence de mesures rigoureuses de prophylaxie à grande échelle. La prophylaxie médicale n'est mise en œuvre que dans le cas particulier d'un élevage en ranching (ferme d'Avétonou) dans la région des Plateaux où, pour faire face à une prévalence sérologique de 52% et à un taux de vélage de 33%, les responsables du centre ont préféré immuniser les animaux avec un vaccin à germe vivant à base de la souche B19 (Absorsec Nd). Le résultat est appréciable. En brucellose, l'interférence des facteurs d'élevage et climatiques avec la race et le sexe fait qu'il est impossible d'apprécier l'influence propre de ces derniers. Les animaux en phase et en fin de production sont plus infectés que les jeunes avant la puberté. Cette observation vient confirmer celle déjà faite par ailleurs [6]. La concordance entre la prévalence fournie par le RB et celui de la FC est bonne et d'environ 89% (Tableau XIII). Elle est supérieure à celle antérieurement signalée (70,1% [6]). Bien que la fixation du complément détecte plus de sérums positifs

(13,2%) que le Rose Bengale (11%), la différence entre les deux méthodes n'est pas statistiquement significative. Dans ces conditions, on peut se satisfaire d'une seule réaction sérologique, en l'occurence le RB (à cause de sa mise en œuvre simple, commode, et des résultats rapides), mais il faut le répéter régulièrement.

Tableau XIII. Brucellose bovine : résultats analytiques des deux réactions.

Réponse sérologique	RB	FC	Nombre de sérums	%
-	-	-	373	82,3 ± 3,9
	+	-	20	4,4 ± 9,0
+	+	+	30	6,6 ± 8,9
	-	+	30	6,6 ± 8,9
	Total		453	

En chlamydiose, la prévalence relativement faible (2,3 ± 1,3%) signe tout de même une évidence sérologique, donc une circulation du germe, beaucoup plus accentuée, dans la région maritime et dans celle des plateaux en zone guinéenne. Ce résultat est largement inférieur à ceux signalés en Afrique Centrale (31,5% [2,14]).

En fièvre Q également, la prévalence est faible (3,5±1,6%). Ce résultat n'est pas influencé par les facteurs région et climat puisque la région de la Kara en zone soudanienne, et celles des Plateaux et Maritime (en zone guinéenne) ont les prévalences les plus élevées. Les conditions d'élevage ne semblent pas non plus déterminantes, puisque les troupeaux encadrés (Centre d'Avétonou) dans la région des Plateaux, où l'hygiène de l'élevage est sensée être meilleure qu'en élevage traditionnel, n'induit pas une diminution significative du taux d'infection (Tableau V). Si la prévalence moyenne relevée est supérieure à celles signalées au Cameroun (2,9% [14]) et au Soudan (1,6% [16]), elle est inférieure aux taux relevés au Tchad (13% [23]), en Tanzanie (13,3% [19]), au Kenya (7,4% [11]) mais aussi au Nigéria (10,6% [1]).

En fièvre de la Vallée du Rift, la technique ELISA a été préférée à l'Immunofluorescence Indirecte et à la Séroneutralisation en culture cellulaire car elle est simple, rapide, fiable, d'une grande sensibilité et d'une spécificité élevée. Par la mise en évidence des IgM et des IgG, elle permet de détecter les infections récentes ou anciennes. L'inconvénient de la méthode réside dans le coût relativement élevé des réactifs et dans le fait qu'elle ne peut être mise en œuvre que par un personnel qualifié.

La prévalence globale de 6,1% (9,4% chez les bovins et 2,14% chez les petits ruminants) témoigne d'une évidence sérologique en attendant l'isolement du germe.

Par comparaison avec les travaux réalisés en Afrique de l'Ouest, la prévalence trouvée chez les ovins est inférieure à celle signalée au Burkina (14,8% [7]), au Sénégal, région du Fleuve (19,33% [17]), en Côte d'Ivoire (9,71% [8]), au Cameroun (12,28% [10]), mais supérieure à celle du Bénin (1,7% [18]). Chez les bovins, la prévalence observée est identique à celle du Cameroun (9,35% [10]), mais inférieure aux taux observés au Bénin (20,75% [18]) et dans la vallée du Fleuve au Sénégal (27,43% [17]).

La prévalence globale varie selon les zones éco-climatiques. C'est ainsi que la zone guinéenne (régions maritime et des plateaux) semble plus touchée (6,6% et 10,7%) que la zone soudanienne où la région de la Kara se singularise par un faible taux (1,8%), mais avec des IgM (tout comme dans la région des plateaux) témoins d'une infection récente. Néanmoins, la prévalence de 6% observée dans la région des savanes, en pleine zone soudano-sahélienne, peut être liée au fort mouvement du bétail venant du Burkina voisin, où le germe a été isolé [29].

Dans toutes les régions, les bovins semblent plus affectés que les ovins. Ceci serait lié, non seulement à la période du prélèvement (fin de saison des pluies, moment de pleine activité des vecteurs pour les bovins, et saison sèche, moment d'activité réduite des vecteurs pour les ovins), mais aussi au faible taux de renouvellement de la population ovine. Comme dans la brucellose, chez les deux espèces, les animaux en production sont les plus infectés.

Importance de la brucellose, de la chlamydiose, de la fièvre Q et de la fièvre de la Vallée du Rift

L'importance économique de ces maladies abortives est certaine. En effet, les avortements, les mortinatalités et stérilités représentent un manque à gagner non négligeable au niveau d'une exploitation [9], car ils tarissent l'élevage à sa source. Si on y ajoute le fait que certaines affections, comme la fièvre de la Vallée du Rift tuent les animaux, on se fait une idée plus exacte de l'importance des pertes, surtout en élevage contrôlé. Dans la ferme d'Avétonou, dans la région des plateaux, 52% d'infection brucellosique a fait chuter le taux de vélage à 3,3%, ce qui est une catastrophe.

L'étude analytique des résultats (Tableau XIV) montre qu'aucun animal n'héberge de façon concomitante les quatre germes, et très peu sont infectés par deux germes à la fois. En considérant globalement les quatre affections, on constate une nette prépondérance de l'affection brucellique dans toutes les régions. Les autres affections constituent un bruit de fond. En effet, la chlamydiose et la fièvre Q semblent avoir une incidence limitée et interviendraient sans doute assez peu dans les avortements au Togo, tout comme la FVR qui est plutôt une affection épisodique liée à une pluviométrie abondante et à une prolifération de vecteurs. Les ovins sont d'ailleurs les plus sensibles. Ainsi, devant le cas d'avortement sur bovin, il y a lieu d'éliminer l'hypothèse de brucellose avant de porter une présomption sur la chlamydiose, la fièvre Q ou la fièvre de la Vallée du Rift, sans oublier les autres causes infectieuses parasitaires ou nutritionnelles.

Les pertes économiques engendrées par la brucellose sont importantes et ont été déjà reconnues par d'autres auteurs au Maghreb [20], en Côte d'Ivoire [12,26], au Tchad et au Nord Cameroun [13], en Casamance au Sénégal [21].

Les pertes économiques dues à la fièvre Q sont tout aussi importantes à considérer comme le montrent les travaux de Maurice et Gidel [23] et Mir-Daboust [25]. Les travaux de Mage, Nicolas et Lafay [22] indiquent que la chlamydiose serait à l'origine de 20% des 3000 avortements étudiés chez la vache. De même en Afrique du Sud, les avortements d'origine chlamydienne chez le bétail ne seraient pas négligeables [15,30].

L'importance économique reconnue à ces affections se double aussi d'une importance hygiènique. Si la brucellose et la fièvre Q sont des zoonoses très répandues dans le monde entier, ils reconnaissent comme principal réservoir l'animal. L'homme a souvent été le

révélateur de brucellose, de fièvre Q et de fièvre de la Vallée du Rift évoluant à bas bruit chez l'animal. Cependant l'expression de la fièvre de la Vallée du Rift chez l'homme est une des plus spectaculaires tant la contagiosité est importante et sévère. Cela a été le cas au cours des dernières épizooties en Egypte en 1977-78 où il y a eu 600 décès sur des milliers d'atteintes et plus de 300 morts en 1987 en Mauritanie.

Tableau XIV. Brucellose, chlamydiose, et fièvre Q bovines : résultats analytiques.

Brucellose	Chlamydiose	Fièvre Q	Nombre de sérums	%
+	+	+	0	0
-	-	-	310	80,2 ±4 ,3
-	-	+	10	2,5 ± 9,7
-	+	-	6	1,5 ± 9,7
-	+	+	1	0,3 ± 10,7
+	-	-	34	13,6 ± 9,1
+	+	-	3	0,8 ± 10,1
+	-	+	5	1,3 ± 9,9

Conclusion

Parmi les affections infectieuses abortives du bétail au Togo, la brucellose est celle qui est la plus importante chez les bovins. La chlamydiose et la fièvre Q sont incontestablement secondaires par rapport à la brucellose. La prévalence de la fièvre de la Vallée du Rift est négligeable, mais l'évidence sérologique prouve que le virus circule à bas bruit dans le pays et ceci mérite d'être confirmé par son isolement. Il ne serait donc pas étonnant de voir apparaitre une épizootie lorsque les conditions écologiques seront réunies, d'autant plus qu'il y a des zones de circulation active du virus. L'importance de ces différentes affections est à la fois économique et médicale, même si elle est méconnue. C'est pourquoi il serait utile de mener une lutte concertée contre ces différentes affections abortives du bétail au Togo.

Références

1. Abdo P.B., Schnurenberger P.R. (1977). Q fever antibodies in food animals of Nigeria : a serological survey of cattle, sheep and goats. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop* ; 30 : 359-362.
2. Adamou A. (1982). Contribution à l'étude de la fièvre Q et de la chlamydiose bovine : enqu^tet sérologique dans la province du Nord Cameroun. Thèse Médecine Vétérinaire, Dakar ; n° 7.
3. Akakpo A.J., d'Almeida A., Napala A., Sonhaye A. (1981). A propos d'un foyer de brucellose bovine dans les environs de Lomé : incidences hygiéniques. *Rev Sci Méd Biol Togo* ; 2 : 37-41.
4. Akakpo A.J., Chantal J., Bornarel P. (1981). La brucellose bovine au Togo : première enquête

sérologique. *Rev Méd Vét* ; 132(4) : 269-278.
5. Akakpo A.J., Bornarel P., Sarradin P. (1986). *Brucella abortus* d'origine bovine en Afrique Tropicale. Particularités des souches isolées dans quatre pays : Niger, Rwanda, Sénégal, Togo. *Dakar Méd* ; 31(1-2-3-4) : 25.
6. Akakpo A.J., Bornarel P. (1987). Epidémiologie des brucelloses animales en Afrique tropicale : enquête clinique, sérologique et bactériologique. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* ; 6(4) : 981-1027.
7. Akakpo A.J., Some M.J.R., Bornarel P., Jouan A., Gonzalez J.P. (1989). Epidémiologie de la fièvre de la Vallée du Rift en Afrique de l'Ouest. Enquête sérologique chez les ruminants domestiques au Burkina Faso. *Bull Soc Path Exot* ; 82 : 321-331.
8. Atse N'De A. (1992) Epidémiologie des affections abortives majeures chez les ovins en Côte d'Ivoire : Etude sérologique de la brucellose, la chlamydiose, la fièvre Q et la fièvre de la Vallée du Rift dans les troupeaux suspects. Thèse Médecine Vétérinaire, Dakar n°50.
9. Attonaty J.M., Gastiner P.L., Jalles E., Rhbier M; (1973). Conséquences économiques des troubles de la fécondité. Compte rendu journées d'information I.T.E.B. UNC, E.I.A. Paris p.35.
10. Bapetel I. (1990). La fièvre de la Vallée du Rift : enquête sérologique chez les ruminants dans la partie septentrionale du cameroun. Thèse Médecine Vétérinaire, Dakar n°31.
11. Broww R.D. (1956). La mise en évidence, par tests sérologiques, de la fièvre Q chez les aniamux domestiques au Kenya. *Bull Epiz Dis Afr* ; 4 : 115-119.
12. Camus E. (1980). Incidence clinique de la brucellose bovine dans le nord de la Côte d'Ivoire. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop* ; 33(3) : 262-269.
13. Domenech J., Coulomb J., Lucet P. (1982). La brucellose bovine en Afrique Centrale. IV. Evaluation de son incidence économique et calcul du coût/bénéfice des opérations d'assainissement. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop* ; 35(2) : 113-124.
14. Domenech J., Trap D., Gaumont R. (1985). Etude de la pathologie de la reproduction chez les bovins en Afrique Centrale : enquête sur la chlamydiose et la fièvre Q. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop* ; 38(2) : 138-143.
15. Ehret W.L., Schutte A.P., Pienaar J.G., Henton M.H. (1975). Chlamydiosis in a beef herd. *J S Afr Vet Ass* ; 46(2) : 171-179.
16. El Nasri M. (1962). A serological survey for the detection of Q fever antibodies in the sera of animals in the Sudan. *Bull Epiz Dis Afr* ; 10 : 55-57.
17. Fati N.D. (1990). La fièvre de la Vallée du Rift dans la région de St Louis (Sénégal). Etude sérologique chez les ruminants domestiques et proposition d'un plan de lutte. Thèse Médecine Vétérinaire Dakar n°33.
18. Gbaguidi Alia M. (1992). Epidémiologie de la fièvre de la Vallée du Rift au Bénin : enquête sérologique chez les ruminants domestiques. Thèse Médecine Vétérinaire, Dakar n°42.
19. Humel P.H. (1976). Incidence in Tanzania of C.F. antibody to *Coxiella burneti* in sera from man, cattle, sheep, goats and game. *Vet Rec* ; 98 : 515-505.
20. Karabaghli H. (1972). Contribution à l'étude des avortements du cheptel bovin en Algérie. Thèse Médecine Vétérinaire, Lyon n°38.
21. Konte M. (1981). Des incidences d'une zoonose majeure infectieuse en zone d'enzootie : la brucellose bovine en Moyenne casamance. Thèse Médecine Vétérinaire, Dakar n°2.
22. Mage C., Nicolas K.A., Lafay E. (1976). Quelle est l'incidence des *Chlamydiaceae* sur les avortements de la vache ? *Rev Méd Vét* ; 127(11) : 1515-1522.
23. Maurice Y., Gidel R. (1968). Incidence de la fièvre Q en Afrique Centrale. *Bull Soc Path Exot* ; 61(5) : 721-736.
24. Meegan J.M., Leguenno B., Ksiazek J.G., Jouan A., Knauert F., Digoutte J.P., Peters C.J. (1989). Rapid diagnostic of Rift Valley Fever : a comparison of method of the direct detection of viral antigen in Human sera. *Res Virol* ; 140 : 59-65.
25. Mir-Daboust C.J. (1981). Contribution à l'étude de la fièvre Q bovine. Thèse Médecine Vétérinaire, Toulouse n°80.

26. Pagot J. (1985). *L'élevage en pays tropicaux* . G.P. Maisonneuve et Larose/ACCT, Paris, 526p.
27. Perreau P. (1978). Epidémiologie et importance économique des brucelloses en Afrique tropicale. In : Deuxième Conférence Internationale des Institutions de Médecine Vétérinaire Tropicale Berlin Ouest, Octobre 1976, 5 exposés et discussion, Echborn : GTZ, 503 p.
28. Peters C.J., Eunis W.H., Turell M.J., Niklasson B. (1989). Rapid detection of Rift Valley Fever antigen in the serum of infected lamb. *Res Virol :* 140 : 43-46.
29. Saluzzo J.F., Chartier C., Bada R., Martinez D., Digoutte J.P. (1987). La fièvre de la Vallée du Rift en Afrique de l'Ouest. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop* ; 40(3) : 215-223.
30. Schutte A.P., Pienaar J.G. (1977). Chlamydiosis in sheep and cattle in South Africa. *J S Afr Vet Ass* ; 48(4) : 261-265.

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 139-145.

13

Le diagnostic génomique de la BLAD (*Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency*) et ses applications

L. GROBET, C. CHARLIER, R. HANSET

Génétique Factorielle et Moléculaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, ULG, Liège, Belgique.

Résumé

*La BLAD (*Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency*) est une maladie autosomale récessive qui affecte les descendants d'un taureau Holstein (Osbornedale Ivanhoe, grand-père paternel de Carlin M. Ivanhoe Bell). Une mutation dans le gène codant pour une glycoprotéine de membrane (CD18), à l'état homozygote, rend impossible le passage des leucocytes au départ des vaisseaux sanguins vers les tissus infectés. Les animaux atteints (homozygotes) souffrent donc d'infections multiples et meurent précocément. Le test de détection de cette mutation a été appliqué à des taureaux Holstein au statut BLAD connu. Par ailleurs, sur seize taureaux Holstein au statut inconnu, dont 5 de la lignée Bell, trois se sont révélés hétérozygotes. Une génisse Holstein de la même lignée s'est aussi révélée hétérozygote. Par contre, chez 49 taureaux Blanc-Bleu et 14 taureaux Pie-Rouge, on n'a trouvé aucun porteur de la mutation.*

La BLAD (Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency) est une maladie autosomale récessive qui affecte les descendants d'une lignée de taureaux Holstein, la lignée Bell. Stöber *et al.* [18] ont donné une description détaillée des symptômes et lésions qui affectent les veaux atteints. En résumé, ils souffrent d'infections multiples et récidivantes (dermatite, gingivite, glossite, entérite et bronchopneumonies chroniques; adénites satellites, splénomégalie; leucocytose et stase leucocytaire...) qui ne répondent pas ou peu aux antibiotiques. Cette maladie a été décrite sous le nom de granulocytopathie par Hagemoser *et al* en 1983 [8], et Takahashi *et al* en 1987 [19].

Suite à des études immunologiques, Kehrli *et al.* [9] ont détecté une déficience sévère en sous-unité CD 18 des neutrophiles chez une génisse atteinte et une diminution substantielle chez son père, sa mère et 8 de ses 15 demi-frères et soeurs paternels étudiés. Cela confirmait l'étroite similitude existant entre la BLAD des bovins, la LAD (Leucocyte Adhesion Deficiency [1,2,3,12,17,20]) chez l'homme et la granulocytopathie canine chez le Setter Irlandais [5,15].

Ces trois maladies ont en commun une série d'anomalies dépendant de la perte de certains fonctions leucocytaires, en particulier leurs possibilités d'adhérence à la paroi d'autres cellules. Les individus atteints ont une déficience en plusieurs membres d'une famille de glycoprotéines (les β2-intégrines) structurellement et fonctionnellement apparentées [16]. C'est la sous unité β (CD18) commune à ces glycoprotéines dont la fonction est compromise.

Plusieurs mutations dans le gène codant pour cette sous-unité ont été identifiées comme étant la cause de tous les cas humains décrits [4,12,13,14]. A l'inverse, une seule mutation du gène CD18 a été observée chez les bovins, mais elle a été retrouvée chez tous les animaux atteints ou porteurs analysés [9,10,11]. Tous les cas décrits à ce jour ont dans leur pedigree un ancêtre commun, Osbornedale Ivanhoe, grand père paternel de Carlin M. Ivanhoe Bell.

Après avoir séquencé le cDNA du CD18 de bovin normal et de bovin atteint de BLAD, Kehrli *et al.* [9,10,11] ont découvert deux mutations ponctuelles. L'une d'entre elles était silencieuse, mais l'autre (383 Adénosine--->Guanosine) entraînait la substitution 128 Aspartat--->Glycine (Figure 1) au sein d'une région hautement conservée de la portion extracellulaire de la glycoprotéine CD18. Un test diagnostic basé sur l'Amplification en Chaîne par Polymérase (ACP) de la région variable suivi de la digestion par un enzyme de restriction a été développé. La correspondance non démentie à ce jour entre la présence de la transition (appelée D128G) et l'allèle responsable de la maladie a amené Kehrli *et al.* [11] à la conclusion que la BLAD est bien causée par la mutation D128G.

Après avoir validé la méthode sur l'ADN de taureaux dont le statut BLAD était connu, des bovins de diffrentes races, et en particulier Blanc-Bleu Belge, ont été testés.

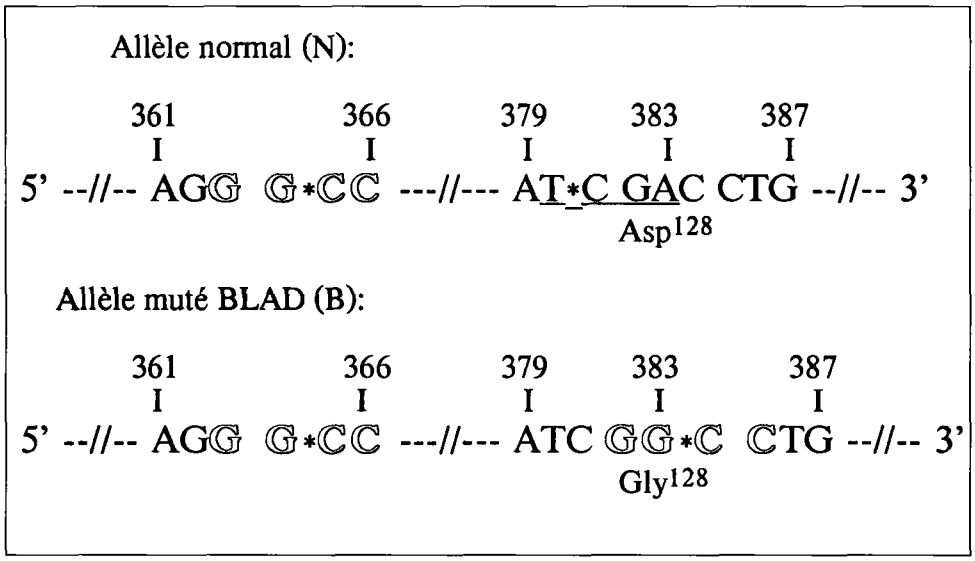


Figure 1. Séquences des sites de reconnaissance des enzymes de restriction *Hae* III (en relief) et *Taq* I (souligné) pour les allèles normal (N) et muté (B) au locus CD18 bovin. Le site de clivage est indiqué par une astérisque. Certains numéros attribués aux nucléotides dans la séquence du cDNA sont indiqués au dessus en regard des nucléotides correspondants. Le site *Hae* III constitué par les nucléotides 363 à 366 est présent dans les deux allèles. L'allèle muté se différencie du sauvage par une transition 383--->G, responsable de la mutation 128 Asp--->Gly. Cette Transition fait aussi disparaître le site *Taq* I 380-383 au profit d'un npuveau site *Hae* III (382-385).

Matériel et méthodes

Animaux

Afin de valider la méthode de typage génomique, 10 taureaux Holstein de la lignée Bell au statut BLAD connu (5 hétérozygotes et 5 homozygotes normaux) ont été typés. De plus, 16 taureaus Holstein d'I.A., dont 5 de la lignée Bell, une génisse Holstein de la lignée Bell, 14 taureaux d'I.A. de race Pie-Rouge et 49 taureaux de race Blanc-Bleu Belge ont été typés.

Détermination du génotype au locus CD18

L'ADN du sperme de la plupart des taureaux typés a été extrait et dosé comme décrit précédemment [7], et remis en suspension dans de l'eau en solution finale 5ng/µl. 50 ng de cet ADN sont soumis à l'ACP. Pour un des taureaux typés, le contenu de 2 paillettes d'insémination a été lavé 3 fois dans 1 ml de PBS. Le culot a ensuite été remis en suspension dans 100 µl de $T_{10}E_1.8$, NaCl 100mM, NaOH 0,1 M, et chauffé pendant 5 minutes à 95°C. Le surnageant est dilué 20 fois dans une réaction ACP. 100µl de sang complet de génisse a été soumis au procédé d'extraction rapide décrit précédemment [6], et le surnageant est dilué 10 fois dans la réaction ACP.

Un fragment de 58 paires de bases du gène codant pour la sous unité CD18 et contenant le site variable impliqué dans la BLAD [9,10,11] est amplifié au départ des dilutions d'ADN mentionnées ci-dessus dans un volume de 20 µl, en solution 10 mM Tris HC1 pH 8,5; 50 mM KC1; 1,5 mM $MgC1_2$; 0,01% gélatine; 0,2 µM de chaque amorce; 20 U/ml Amplitaq® DNA Polymerase (Perkin Elmer Cetus). La réaction se déroule sur un Thermal Cycler TC 9600 (Perkin Elmer Cetus) selon les cycles : 3 minutes de dénaturation à 94°C suivies de 40 cycles thermiques composés de 15 secondes de dénaturation à 94°C, 20 secondes d'hybridation-polymérisation à 69°C.

10 µl du produit d'amplification sont digérés par addition de 4 U de *Taq* I et 10 µl de *Hae* III pendant 1,5 heures à 65°C et 37°C respectivement. Les produits de digestion sont analysés en gel d'agarose 7% (Bio Rad) après migration à 8V/cm pendant 30 minutes, coloration au bromure d'éthidium et transillumination aux UV à 365 nm.

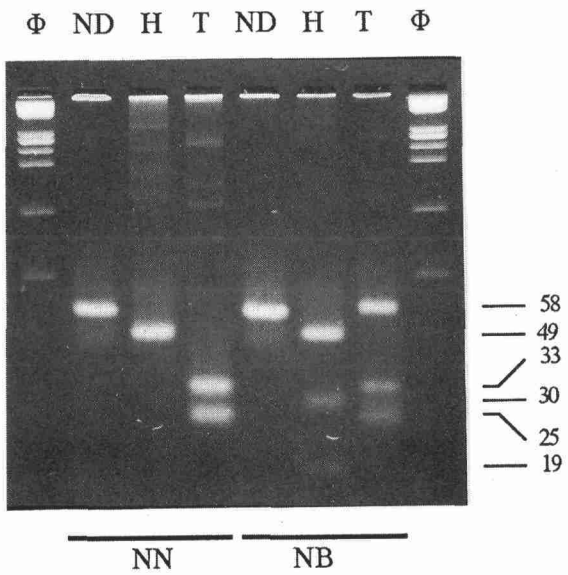


Figure 2. Electrophorèse du produit d'ACP d'un fragment contenant le site varaiable responsable de la BLAD [10,11]. Le phage fX174RF/Hae III a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire (F). La taille des fragments est donnée à droite en paires de bases. Au dessus, ND indique que l'amplifiat est non digéré, H et T qu'il a été soumis à la digestion par Hae III ou Taq I respectivement En dessous, les génotypes NN et NB indiquent que l'ADN de départ provient d'animaux homozygote pour l'allèle normal (NN) ou hétérozygote pour l'allèle responsable de la BLAD (NB). Au vu des génotypes et de la figure 50, la taille des fragments est bien celle attendue. Un fragment non digéré a une taille de 58 paires de bases. La digestion par Taq I clive l'allèle sauvage (N) en deux fragments de 33 et 25 pb, alors que l'allèle muté (B) n'est pas clivé. Les deux allèles subissent un clivage par Hae III à 9 paires de bases de l'extrémité du fragment. Ce clivage sert de contrôle interne pour la bonne digestion du fragment. Le fragment résultant de 49 paires de bases reste intègre pour l'allèle sauvage (N), ou est clivé en deux fragments de 30 et 19 paires de bases pour l'allèle muté (B).

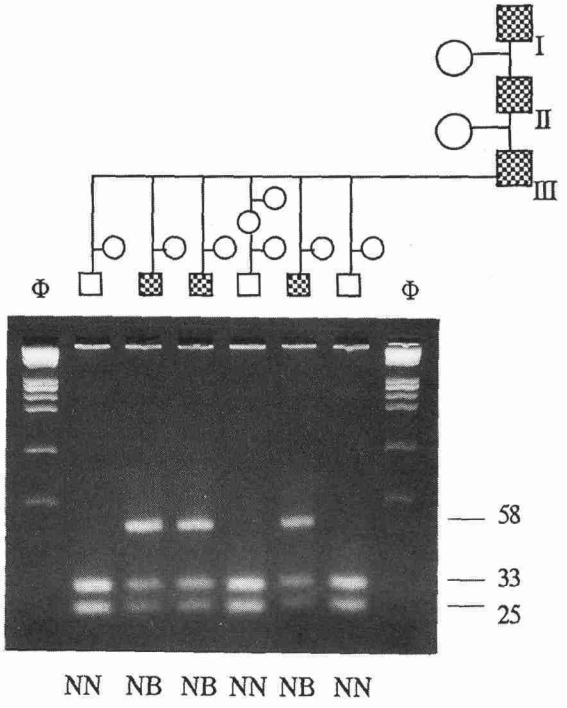


Figure 3. Electrophorèse du produit d'ACP digéré par *Taq* I d'un fragment contenant le site variable responsable de la BLAD [10,11] chez des descendants de la lignée Bell. Le phage ϕX174RF/*Hae* III a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire (Φ). La taille des fragments est donnée à droite en paires de bases. En dessous, les génotypes NN et NB indiquent que les animaux sont diagnostiqués homozygote pour l'allèle normal (NN), ou hétérozygote pour l'allèle responsable de la BLAD (NB). Le pedigree est schématisé au dessus, en regard des pistes de migration des 6 taureaux soumis au diagnostic. Les carrés pointillés représentent les taureaux porteurs de la tare. Les carrés blancs désignent les indemnes. I = Osbornedale Ivanhoe; II = Penstate Ivanhoe Star; III = Carlin M. Ivanhoe Bell.

Résultats et discussion

La correspondance parfaite entre les résultats du typage des taureaux de génotype connu et leur génotype réel au locus CD18 valide la méthode utilisée ici (Figures. 2 et 3). Sur les six autres descendants de la lignée Bell, quatre se sont révélés porteurs de la mutation D128G. Par contre, aucun des 74 autres taureaux n'était porteur. La mutation D128G est déjà bien installée en race Holstein, où 14,1% des taureaux (N=2024) et 5,8% des génisses (N=1553) typés se sont révélés porteurs (hétérozygotes) de la mutation aux USA. Au niveau de la population Holstein, mais bien plus encore au niveau de l'exploitation particulière, la naissance de veaux atteints (homozygotes) risque de constituer une lourde perte en cas d'utilisation non contrôlée d'animaux porteurs. En effet, cette cause de mortalité précoce du jeune veau s'ajouterait à toutes les autres.

La possibilité de détecter les porteurs (hétéroygotes) de la mutation permet cependant de planifier les accouplements, en évitant le croisement de deux porteurs, mais surtout de maîtriser la dissémination du gène en agissant au niveau des taureaux d'I.A. (ne plus accepter de nouveaux hétérozygotes dans les centres d'I.A.). De plus, on est sans doute en présence du premier test génomique susceptible d'aider le clinicien dans son diagnostic en cas d'infections récidivantes chez le jeune bovin.

Avec le concours des nouvelles techniques de la biologie moléculaire, et des structures de recherche qui se développent à l'échelon international (cartographie génétique chez le porc et le bovin- PigMap et BovMap), un nombre croissant de gènes à effets quantitatifs ou pathologiques seront caractérisés, et des tests dignostics seront développés. Ils existent déjà pour l'hyperthermie maligne chez le porc, et chez les bovins pour le typage des α–, β–, et κ-caséines, de lactoglobulines, et pour les gènes responsables de maladies telles la maladie de Pompe, la citrullinémie et la DUMPS. D'autres gènes, tels ceux responsables de la myéloencéphalopathie dégénérative (weaver) et l'absence de cornes (poll), sont liés à des marqueurs connus, première étape vers leur caractérisation.

Nul doute, au vu de cette évolution, qu'une ère nouvelle s'ouvre en matière de génétique préventive et de sélection animale.

Références

1. Anderson D.C., Schmalstieg F.C., Arnaout M.A., Kohl S., Tosi M.F., Dana N., Buffone G.J., Hughes B.J., Brinkley B.R., Dickey W.D., Abramson J.S., Springer T., Boxer L.A., Hollers J.M., Smith C.W. (1984). Abnormalities of polymorphonuclear leucocyte fonction associated with a heritable deficiency of high molecular weight surface glycoproteins (GP138) : common relationship to diminished cell adherence. *J Clin Invest* : 74 : 536-551.
2. Anderson D.C., Schmalstieg F.C., Finegold M.J., Hughes B.J., Rothlein R., Miller L.J., Kohl S., Tosi M.F., Jacobs R.L., Waldrop T.C., Goldman A.S., Shearer W.T., Springer T.A. (1985). The severe and moderate phenotypes of heritable Mac-1, LFA-1 deficiency : their quantitative definition and relation to leucocyte dysfunction and clinical features. *J Infect Dis ;* 152 : 668-689.
3. Anderson D.C., Springer T.A. (1987). Leucocyte adhesion deficiency : an inherited defect in the Mac-1, LFA-1 and p150,95 glycoproteins. *Ann Rev Med* ; 38 : 175-194.
4. Dana N., Clayton L.K., Tennen D.G., Pierce M.W., Lachmann P.J., Law S.A., Arnaout M.A. (1987). Leucocytes from four patients with complete or partial Leu-CAM deficiency contain the common beta-subunit precursor and beta-subunit messenger RNA. *J Clin Invest* ; 79 : 1010-1015.
5. Giger U., Boxer L.A., Simpson P.J., Lucchesi B.R. (1987). Deficiency of leucocyte surface glycoproteins Mol, LFA-1 and Leu M5 in a dog with recurrent bacterial infections : an animal model. *Blood* ; 69 : 1622-1630.
6. Grobet L., Arranz J.J. (1992). A purification procedure of DNA from Whole blood before genotyping for the porcine ryanodine receptor. *Anim Genet* ; 23 : 67s.
7. Grobet L., Charlier C., Hanset R. (1991). Empreintes génétiques et leucochimérisme chez les jumeaux bovins. *Ann Méd Vét* ; 135 : 353-360.
8. Hagemoser W.A., Roth J.A., Löfstedt J., Fagerland J.A. (1983). Granulocytopathy in a Holstein heifer. *J Am Vet Med Assoc* ; 183 : 1093-1094.
9. Kehrli M.E., Schmalstieg F.C., Anderson D.C., Van der Maaten M.J., Hughes B.J., Ackermann M.R., Wilhelmsen C.L., Brown G.B., Stevens M.G., Whetstone C.A. (1990). Molecular definition of the bovine granulocytopathy syndrome : identification of deficiency of the Mac-1

(CD11b/CD18) glycopotein *Am J Vet Res* ; 51 : 1826-1836.

10. Kehrli M.E., Shuster D.E., Ackermann M.R. (1992). Leucocyte Adhesion Deficiency among Holstein cattle. *Cornell Vet* ; 82 : 103-109.
11. Kehrli M.E., Shuster D.E., Dietz A.B., Ackermann M.R., Gilbert R., Pohlenz J. (1992). Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency (BLAD) among Holstein cattle : molecular biology, immunology and clinical phenotypes. In : Proc XIII Int Conf Anim Genet (ISAG), August 1992, p44.
12. Kishimoto T.K., Hollander N., Roberts T.M., Anderson D.C., Springer T.A. (1987). Heterogenous mutations in the b subunit common in the LFA-1, Mac-1 and p 150,95 glycoproteins cause leucocyte adhesion deficiency. *Cell ;* 50 : 193-202.
13. Kishimoto T.K., O'Connor K., Springer T.A. (1989). Leucocyte adhesion deficiency : aberrant splicing of a conserved integrin sequence causes a moderate deficiency phenotype. *J Biol Chem* ; 264 : 3588-3595.
14. Marlin S.D., Morton C.C., Anderson D.C., Springer T.A. (1986). LFA-1 immunodeficiency disease : definition of the genetict defect and chromosomal mapping of alpha and beta subunits by complementation in hybrid cells. *J Exp Med* ; 164 : 855-867.
15. Renshaw H.W., Davies W.C. (1979). Canine granulocytopathy syndrome : an inherited disorder of leucocyte function. *Am J Pathol ;* 95 : 731.
16. Sanchez-Madrid F., Nagy J., Robbins E., Simon P., Springer T.A. (1983). A human leucocyte differenciation antigen family with distinct a-subunits and a common b-subunit : the lymphocyte function-associated antigen (LFA-1), the C3b complement receptor (OKM1/Mac-1), and the 150,95 molecule. *J Exp Med* ; 158 : 1785-1803.
17. Springer T.A., Thompson W.S., Miller L.J., Schmalstieg F.C., Anderson D.C. (1984). Inherited deficiency of the Mac-1, LFA-1, p150,95 glycoprotein family and its molecular basis. *J Exp Med* ; 160 : 1901-1918.
18. Stöber M., Kuczka A., Pohlenz J. (1991). Bovine Leukozyten-Adhäsions-Defizienz (BLAD = Hagemoser-Takahasi-Syndrom) : Klinische, pathologisch-anatomische und -histologische Befunde. *Dtsch Tierärzlt Wschr ;* 98 : 443-448.
19. Takahashi K., Miyagawa K., Abe S., *et al.* (1987). Bovine granulocytopathy syndrome of Holstein-friesian calves and heifers. *Jpn J Vet Sci* ; 49 : 733-736.
20. Todd R.F., Freyer D.R. (1988). The CD11/CD18 leucocyte glycoprotein deficiency. *Hemat Oncol Clin North Am ; 2 : 13-28.*

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 147-158.

14

Développement d'un test cellulaire *in vitro* permettant le diagnostic spécifique de la brucellose sur base de la production d'Interféron gamma

V. WEYNANTS, J. DUFEY*, C. SAEGERMAN*, P. DENOEL, A. TIBOR, J. LIMET, J.J. LETESSON

Laboratoire d'Immunologie-Microbiologie, Namur, Belgique.
* *Service de l'Inspection Vétérinaire.*

Résumé

Les épreuves sérologiques de dépistage de la brucellose sont basées sur la détection des anticorps anti-lipopolysaccharides (LPS). Du fait de la proximité antigénique entre le LPS de Brucella *et le LPS d'autres bactéries à Gram négatif (* Yersinia enterocolitica *0:9 par exemple) ces tests manquent de spécificité. La mesure de l'immunité à médiation cellulaire s'est révélée être un complément non négligeable dans la lutte contre la brucellose en raison de sa grande spécificité et de sa précocité. Les principaux inconvénients de ce type de test sont liés à la réalisation* in vivo *de l'intradermo-réaction (IDR); Dans cet article nous décrivons un test cellulaire* in vitro *simple et rapide permettant le diagnostic spécifique de la Brucellose. Ce test est basé sur le dosage par ELISA de l'Interféron gamma (IFNγ) produit dans une culture de sang complet hépariné suite à un stimulus antigéno-spécifique.*

Le potentiel de ce test par rapport à l'IDR et aux épreuves sérologiques à été évalué d'une manière préliminaire, tant sur des prélèvements de terrain, que lors d'une infection expérimentale.

Les procédés actuels de dépistage sérologique de la brucellose sont basés sur la détection des anticorps anti-lipopolysaccharides (LPS) et ils ont fait preuve de leur efficacité pour une surveillance sanitaire au niveau du troupeau.

Néanmoins, la multiplicité même des techniques utilisées illustre bien les difficultés inhérentes à cette approche sérologique [1]. Ainsi, aucun test à lui seul ne permet de détecter à la fois les animaux infectés récents et les porteurs latents ou chroniques [8]. Ce fait est à mettre en relation avec l'extrême variabilité de la réponse humorale anti-brucellique en fonction de l'animal, de la souche et de la dose infectante; cette hétérogénéité affecte autant l'intensité et la durée de la réponse humorale que sa qualité (isotypie, affinité et spécificité des anticorps produits) [13].

Cependant l'aspect actuellement le plus problématique de ce type de dépistage provient des réactions sérologiques faussement positives (RSFP) [2]. Ces RSFP sont liées à la parenté antigénique bien décrite entre le LPS de *Brucella* et celui d'autres bactéries à Gram négatif (*Yersinia enterocolitica* O:9, *Escherichia coli* O:157, *Salmonella urbana*....) [4].

Un palliatif à ce manque de spécificité est de baser le diagnostic non plus sur le seul LPS mais également sur les protéines de *Brucella* [11]. Cependant, avec les outils actuels, la réponse humorale anti-protéine de *Brucella* est trop hétérogène et trop tardive pour être utilisable en diagnostic sérologique. Il n'en va pas de même de la réponse cellulaire. En tant que parasite intracellulaire facultatif, *Brucella* induit en effet une immunité à médiation cellulaire qui peut être mise à profit pour le diagnostic allergique de la brucellose [7].

Parmi les préparations protéiques utilisées en IDR pour induire une hypersensibilité retardée, la Brucelline INRA (commercialisée sous le nom Brucellergène par Rhône Mérieux) est la plus répandue. Plusieurs études ont en effet démontré que l'IDR au moyen de Brucellergène est une épreuve diagnostique extrêmement spécifique de la brucellose et qui est complémentaire des tests sérologiques [8, Saegerman comm. personn].

L'IDR présente cependant différentes limitations : certaines relatives à l'allergène utilisé (elles feront l'objet d'une communication par P. Denoel *et al.* et ne seront pas analysées ici) et d'autres liées à la nature *in vivo* de ce test : le résultat n'est obtenu qu'après deux ou trois jours; les animaux sont manipulés à deux occasions, sa réalisation et son interprétation ne sont pas toujours aisées et la répétition du test peut modifier le statut immun de l'animal.

Une mesure *in vitro* de l'immunité à médiation cellulaire pourrait pallier ces inconvénients. Ainsi, l'identification et/ou le dosage des cytokines de type TH1 semble être en excellente correlation avec la mesure *in vivo* de l'hypersensibilité retardée [9]). Cette approche a été récemment suivie avec succès par une équipe australienne pour le diagnostic de la Tuberculose bovine [12,14].

La disponibilité d'un test immunoenzymatique commercial de dosage de l'IFNγ bovin nous a permis d'investiguer l'utilité de cette approche dans le cadre du diagnostic de la brucellose.

Cet article décrit le développement d'un test adapté à la brucellose, ainsi que sa première évaluation par rapport à l'IDR et aux épreuves sérologiques, tant sur des prélèvements de terrain, que lors d'une infection expérimentale.

Matériel et méthodes

Animaux de terrain

L'origine des prélèvement est double : 47 proviennent d'animaux issus de deux foyers brucelliques et 24 correspondent à des animaux (issus de 12 exploitations) ayant développé une réponse sérologique faussement positive (RSFP) (tests légaux positifs en dehors de donnée épidémiologique pouvant faire penser à la brucellose).

Infection expérimentale

Dix génisses Pie Noire (âge moyen : 24 mois) indemnes de brucellose ont été infectées par voie conjonctivale au moyen de $6x10^7$ *Brucella abortus* 544. (la souche nous a été procurée par J.M. Verger, INRA et a été cultivée par J. Godfroid INRV). Les animaux ont été maintenu en étable protégée (Machelen, INRV) durant toute la durée de l'expérience.

Un suivi sérologique a été réalisé de semaine en semaine et trois épreuves cutanées (IDR au moyen de Brucellergène, lot 96G091) ont été réalisés 35, 55 et 77 jours après l'infection.

Aux jours 0, 10, 25, 35, 55 et 77, les animaux ont été suivis par le test de dosage de l'IFNg.

Tests sérologiques

Les tests classiques d'agglutination (EDTA), le test de déviation du complément (DC) et le test au Rose Bengale (RB) ont été décrits précédemment [10]. Le seuil légal de positivité des tests EDTA et DC est respectivement de >25 UI/ml et 20 UI/ml.Ces tests ont été réalisés, soit au Centre de Dépistage des Maladies Animales d'Erpent (Dr. Y. Botton) pour les prélèvements de terrain soit, à l'Institut National de Recherche Vétérinaire (Dr. J. Godfroid) pour les prélèvements issus des animaux infectés expérimentalement.
Le test ELISA a été réalisé au laboratoire suivant les modalités publiées [5]; le seuil de positivité de ce test a été fixé à 2,5 UI/ml.

Tests cellulaires

La mesure de la réponse immune à médiation cellulaire a été effectuée *in vivo* par IDR et *in vitro* par stimulation de sang total et mesure de la production d'IFNγ

Stimuli antigéniques

Brucelline INRA

Cet antigène a été préparé par G. Dubray (Station de pathologie Infectieuse, INRA,Tours) [7]. Pour les IDR réalisées sur le terrain, cet allergène a été utilisé à une dose ajustée sur celle du brucellergène. Les doses utilisées lors des tests *in vitro* seront précisées dans la partie résultat.

Brucellergène

Constituant la forme commerciale de la Brucelline, cet allergène (lot 96G091) a été utilisé pour les IDR pendant l'infection expérimentale à la dose de 140 µg par injection

Test *in vivo* : IDR

L'IDR est réalisée par injection d'un volume de 100 µl de brucellergène ou d'une dose équivalente de brucelline au niveau du cou, sur un pli de peau préalablement rasée. L'épaisseur du pli de peau est mesurée au site d'injection juste avant et approximativement 72 hrs après l'injection au moyen d'un cutimètre à ressort.

Un épaississement de 0,1 mm est considéré comme une réaction positive.

Test *in vitro* par culture de sang total

Du sang est récolté par ponction veineuse dans des tubes héparinés et acheminé dans les 12 heures au laboratoire. Les stimulations sont réalisées en double sur des aliquots de 1ml disposés dans une boite de culture à 24 puits (Gibco BRL) et additionnés de 100 µl de stimulus antigénique : soit du PBS (témoin négatif), soit de la brucelline (à diverses concentrations). Les allergènes sont dépouvus d'agents conservateurs et prédilués en PBS jusqu'à la concentration de travail.

La culture de sang total est incubée pendant 18 à 24 hrs à 37°C en atmosphère humide et en présence de 5% de CO2 avant la récolte du plasma au dessus du culot de globules rouges. Les échantillons de plasma sont ensuite stockés à -20°C jusqu'au moment du test de dosage de l'IFNγ.

Dosage de l'IFN γ

Les échantillons de plasma sont dosés pour leur contenu en IFNγ en utilisant un test immuno enzymatique commercial (IDDEX) et en suivant les indications du fabriquant. Les résultats d'une plaque sont considérés comme valides si la densité optique (DO) moyenne des contrôles négatifs internes est inférieure à 0,25 et si la DO moyenne des contrôles positifs internes est supérieure à 0,50. Les résultats sont exprimés en indice de stimulation (IS) suivant la formule suivante : DO moyenne en présence d'antigène divisée par la DO moyenne en présence de PBS. Un animal est considéré comme positif s'il présente un indice de stimulation supérieur ou égal à 2,5.

Résultats

Mise au point du test IFNγ

Pour les tests préliminaires un animal infecté par *Brucella* a été sélectionné en fonction de sa positivité à l'ELISA et au test de transformation lymphoblastique (TTL) avec la brucelline comme antigène. Du sang hépariné de cet animal a été stimulé par des doses croissantes de brucelline (1 à 100 mg/ml) pendant 24, 48 et 72 heures avant la récolte du plasma. Les résultats sont présentés dans le Tableau I.

Tableau I. Titration de la Brucelline pour l'induction d'IFNγ.

	Production d'IFNγ (IS)				
Durée d'incubation		Concentration en brucelline (µg/ml)			
(hr)	1	5	20	50	100
24	4	4,3	4,8	5,2	4,4
48	3,8	4,9	4,9	4,8	4,9
72	3	3,9	4	4,4	4,3

Au moment du test l'animal avait un titre ELISA de 8UI/ml et un indice de stimulation en TTL de 4,9.

La production d'IFNγ est détectable dès après 24 heures de stimulation et un allongement du temps de culture n'améliore pas sensiblement le taux d'IFNg dans le plasma. La concentration de brucelline qui donne après 24 hrs une production optimale d'IFNγ est comprise entre 20 et 50 µg/ml. Pour tous les tests ultérieurs une concentration de 40 µg/ml sera utilisée.

Chez 10 animaux contrôlés provenant d'une région indemne de brucellose depuis au moins 5 ans, cette dose de brucelline n'induit qu'une activité IFNγ limitée (IS = 1,43 +/- 0,46). Sur cette base, un IS sera considéré comme positif s'il est supérieur ou égal à 2,5 (soit approximativement la moyenne de l'IS des animaux contrôlés plus deux écarts types).

Evaluation du test IFNγ dans le cadre d'une infection expérimentale

La voie d'inoculation conjonctivale et la dose infectante (6 10^7 *Brucella abortus* 544) ont été choisies délibérement sur base des travaux de Limet [10] pour reproduire une évolution sérologique lente et de faible intensité à la limite de détection des tests légaux. Durant l'infection, les animaux ont été suivis par les tests sérologiques (DC, EDTA, RB, ELISA) et les tests cellulaires (IDR, IFNγ) suivant le canevas décrit dans "matériel et méthodes".

Pour chaque test l'évolution du nombre d'animaux positifs depuis le jour de l'infection (J0) jusqu'à l'abattage (J77) est représentée sur la Figure 1.

D'après les critères légaux belges, la sérologie est relativement transitoire puisque les tests DC/EDTA ne détectent que trois animaux au jour 25, puis un seul à partir du jour 55

jusqu'au jour de l'abattage. Le test au Rose Bengal est un peu plus précoce (2 positifs au jour 20) et plus efficace : il révèle 9 des animaux au jour 35; la réponse sérologique qu'il met en évidence reste néanmoins transitoire puisqu'il ne détecte plus qu'un animal lors des deux dernière saignées.

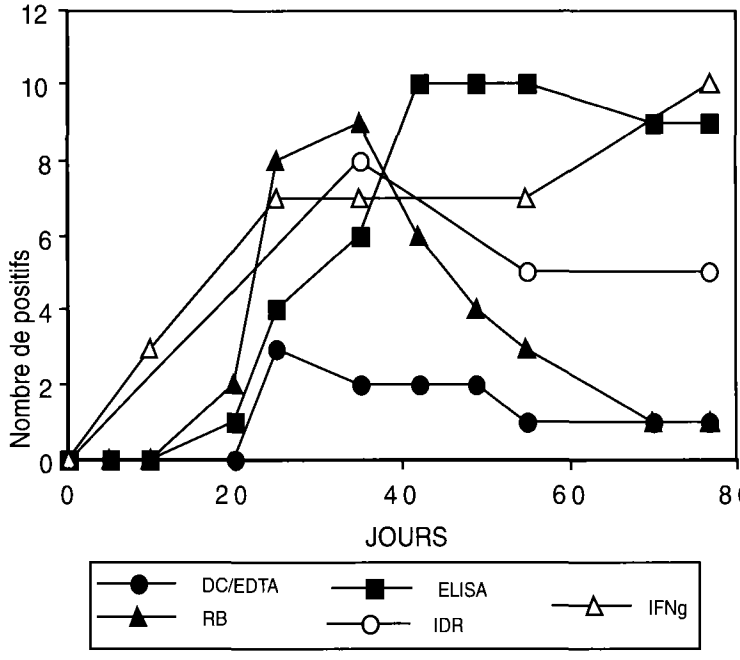


Figure 1. Evolution du nombre d'animaux positifs pour les différents tests durant l'infection expérimentale.

En ELISA, la sérologie est nettement moins passagère, puisque les 10 animaux sont détectés dès le jour 42 et que 9 d'entre eux restent positifs jusqu'à la fin de l'expérience. Bien qu'observée sur un nombre limité d'animaux, ce type d'évolution sérologique est en accord avec les données publiées dans la littérature [10].

En ce qui concerne la réponse aux tests cellulaires, le test IFNγ apparait comme relativement précoce; en effet, 3 animaux sont détectés dès le jour 10 soit plus d'une semaine avant la première détection sérologique. Un animal détecté lors d'un test reste positif pour tous les tests ultérieurs et tous les animaux deviennent positifs au fil de l'expérience. A l'exception d'une génisse (au jour 35) tous les animaux positifs en IDR sont également positif en IFNγ. L'IDR apparaît cependant moins sensible puisqu'il ne détecte plus que 5 génisses lors des deux derniers tests. L'IDR n'ayant pas été réalisée avant le jour 35, il n' est pas possible de comparer les tests cellulaires entre eux sur le plan de la précocité.

Bien qu'aucun test, à lui seul, ne soit capable de détecter tous les animaux durant toute l'évolution de l'infection expérimentale (Tableau II), l'utilisation conjointe des tests cellulaires (IFNγ ou IDR) et de la sérologie permet de détecter 90 % des animaux dès 25 jours après l'infection et 100 % à partir du jour 35.

Tableau II. Evolution de la complémentarité des tests cellulaires et sérologiques durant l'infection expérimentale.

	Pourcentage d'animaux détectés				
Jours	Sérologie*	IDR	IFNγ	IDR+sérologie	IFNγ+sérologie
10	0	NT	30	NT	30
25	80	NT	70	NT	90
35	90	80	70	100	100
55	100	50	70	100	100
77	90	50	100	90	100

* Toutes techniques confondues (DC/EDTA/RB/ELISA).

Evaluation du test IFNγ dans deux foyers brucelliques

47 animaux issus de deux foyers brucelliques ont été testés à la fois par des tests sérologiques (DC, EDTA, ELISA) et des tests cellulaires (IDR, IFNγ). Les données chiffrées sont présentées en résumé dans le Tableau III, et in extenso dans le Tableau IV.

Tableau III. Sensibilité comparative des divers tests et de leurs combinaisons.

	Pourcentage d'animaux détectés parmi	
	les animaux testée (N=47)	les animaux positifs pour au moins un test (N=36)
CD/EDTA	47	61
ELISA	49	64
Sérologie totale	57	75
IDR	28	36
IFNγ	64	83
IFNγ + sérologie	77	100

Un isolement bactériologique de *Brucella abortus* (biovar 3) a été réalisé sur un animal de chaque exploitation (VRC 30 : dans le lait et PY45 au niveau de la matrice).

En considérant les animaux présentant une réaction positive dans au moins un test, 77 % des animaux sont identifiés à des positifs (N=36).

Tableau IV Données des tests sérologiques et cellulaires dans 2 foyers récents de brucellose.

N° animal	Sérologie (UI/ml) DC	EDTA	IDR ELISA	IFN gamma Δ mm	(IS)
VRC 1	0	0	0,5	-	1,2
VRC 2	**>100**	**50**	**85,0**	**4,4**	**>20**
VRC 3	**>50**	**50**	**107,0**	**-**	**7,7**
VRC 4	15	0	**23,0**	**4,5**	**20,0**
VRC 5	0	0	0,5	-	**8,1**
VRC 6	0	0	0,5	-	1,0
VRC 7	0	0	0,2	-	1,2
VRC 8	0	0	0,4	-	2,4
VRC 9	15	0	**19,0**	**5,5**	**>20**
VRC 10	**400**	**400**	**103,0**	**3**	**3,1**
VRC 11	**>50**	12	0,4	-	1,5
VRC 12	0	0	2,4	-	**2,7**
VRC 13	0	0	**38,0**	-	**>20**
VRC 14	**400**	**400**	**94,0**	**5,7**	**>20**
VRC 15	**>100**	**100**	**32,0**	**0,13**	**>20**
VRC 16	**>50**	12	0,7	-	**17,9**
VRC 17	0	12	**2,8**	-	**5,2**
VRC 18	**400**	**400**	**93,0**	**1**	**>20**
VRC 19	0	12	0,4	-	1,2
VRC 20	0	**50**	0,2	-	1,5
VRC 21	15	12	0,3	-	1,4
VRC 22	0	0	0,6	-	2,4
VRC 23	0	12	0,3	-	**11,8**
VRC 24	0	12	0,9	-	1,3
VRC 25	**>50**	25	**53,0**	-	**>20**
VRC 26	0	0	0,2	-	**10,7**
VRC 27	**400**	**100**	**2,5**	-	1,5
VRC 28	0	0	0,4	-	**2,8**
VRC 29	0	12	1,3	-	**4,5**
VRC* 30	**400**	**400**	**140,0**	-	**>20**
VRC 31	**100**	25	**7,4**	-	**8,3**
VRC 32	0	0	0,3	-	**2,9**
VRC 33	0	12	**8,8**	-	1,1
VRC 34	0	25	0,3	-	**2,6**
VRC 35	0	12	0,8	-	1,1
VRC 36	0	0	0.6	-	1,9
VRC 37	**400**	**400**	**80,0**	**6,5**	**>20**
VRC 38	**100**	25	0,3	-	2,1
VRC 39	0	0	0,3	-	1,6
PY 40	**200**	**50**	**50,0**	**3,8**	**2,8**
PY 41	**400**	**400**	**55,8**	-	1,4
PY 42	**60**	25	**22,9**	-	**5,0**
PY 43	0	12,5	0,0	-	**14,3**
PY 44	**60**	25	**11,2**	**2,4**	**4,3**
PY* 45	**>400**	**400**	**110,0**	**3**	**>20**
PY 46	**>400**	**400**	**53,8**	**2,5**	**7,4**
PY 47	**60**	25	**11,7**	**1**	**4,0**

Les données en gras indiquent les tests positifs suivant les critères définis dans "matériel et méthodes"
* : indique l'isolement positif de *Brucella abortus*.

Parmi ceux-ci, 61 % (N=22) sont détectés par les tests légaux et 63 % (N=23) par l'ELISA. Les épreuves sérologiques combinées en révèlent 75 % (N=27). L'IDR, bien que détectant 36 % des animaux positifs, n'apporte pas de bonus puisque tous les animaux positifs en IDR sont également positifs en sérologie.

Le test IFNγ semble nettement plus sensible que l'IDR; en effet, il identifie à lui seul 83 % (N=30) des animaux positifs parmi lesquels tous ceux qui sont positifs en IDR. En outre, ce test est clairement complémentaire des données sérologiques puisque 41% (N=15) des animaux positifs ne sont détectés que par l'une ou l'autre des approches ; 9 ne sont révélés que par le test IFNγ et 6 par la seule sérologie.

Evaluation du test IFNγ pour la discrimination des RSFP

24 animaux considérés, en l'absence de données épidémiologiques pouvant faire penser à de la brucellose, comme des faux positifs ont été sélectionnés dans 12 exploitations. L'apport du test IFNγ pour la discrimination des RSFP a été évalué sur du sang hépariné de ces animaux.

Les données sérologiques sont comparées aux résultats du test IFNγ dans le Tableau V.

Des *Yersinia enterocolitica* O:9 ont été isolées des matières fécales de 5 de ces animaux et des *Yersinia pseudotuberculosis* ont été isolées chez trois autres. Parmi les 24 animaux testés, un seul a présenté un test IFNγ positif. Dans le cas de cet échantillonage limité, la spécificité du test IFNγ est donc estimée à 96 %.

Discussion

L'apport de l'immunité à médiation cellulaire au diagnostic de la brucellose à fait l'objet de nombreux travaux qui, tous, signalent l'intérêt de cette approche du point de vue de sa précocité de détection , de sa spécificité et de sa complémentarité par rapport à la sérologie [3,6].

Dans la majorité des cas ce diagnostic cellulaire est basé sur une épreuve cutanée *in vivo* qui nécessite deux à trois jours et deux manipulations des animaux pour avoir les résultats. L'IDR est en outre parfois difficile à interpréter et risque dans certaines circonstances de modifier le statut immunitaire des animaux testés.

Les techniques *in vitro* de mesure de l'immunité à médiation cellulaire sont dépourvues de ces inconvénients; néanmoins, certaines, comme le test de transformation lymphoblastique (TTL), nécessitent une préparation des cellules mononuclées sanguines et prennent plusieurs jours avant d'obtenir les résultats.

Le dosage d'IFNγ produit en réponse à une stimulation antigéno-spécifique ne souffre d'aucune de ces limitations. Cette technique est non seulement plus rapide et plus simple que que l'IDR et le TTL mais également plus sensible [12,15].

Utilisé sur une grande échelle pour le dépistage de la tuberculose bovine en Australie, ce test a démontré une spécificité supérieure à 96 % et une sensibilité nettement augmentée par rapport au test intradermique [14].

Dans cet article, un dosage immunoenzymatique d'IFNγ produit en réponse à une stimulation *in vitro* par de la brucelline a été utilisé comme test cellulaire diagnostique de la brucellose. Ce test a été évalué sur un petit nombre d'animaux infectés expérimentalement et lors d'un essai limité sur le terrain.

Tableau V. Comparaison du test IFNg avec les données de la sérologie dans le cas des RSFP.

N° animal	Sérologie (Ul/ml)				IFNγ (IS)	Bactériologie
	EDTA	RB	DC	ELISA		
LO 1	25	**2+**	15	**30**	0,9	**Y entero O9**
LO 2	25	-	10	**4**	1,4	**Y pseudo**
LO 3	**50**	**2+**	**100**	**30**	1,0	
LO 4	12	-	0	**16**	1,3	
LO 5	25	-	NT	**16**	0,9	
VE 6	**50**	-	15	**3**	0,8	
DE 7	**50**	**2+**	**50**	**43**	0,8	**Y pseudo**
DI 8	25	+	**25**	**40**	1,2	
JO 9	12,5	NT	**30**	**>30**	2,3	**Y pseudo**
FE 10	**50**	**3+**	15	NT	1,5	
MA 11	**50**	**3+**	**<100**	**55**	1,0	
MA 12	**100**	**4+**	**>100**	**>60**	1,5	
ME 13	25	**1+**	15	**8**	1,5	
ME 14	25	**2+**	0	**8**	2,4	
ME 15	25	**4+**	0	**8**	1,4	
ME 16	25	**2+**	0	**8**	1,4	
BE 17	25	**1+**	15	**4**	1,6	**Y entero 09**
MT 18	25	**3+**	0	**8**	1,2	
MT 19	25	**1+**	10	**16**	1,6	**Ecoli β hémo**
MT 20	25	**2+**	10	**16**	2,4	
SC 21	25	**2+**	**60**	**>30**	**22,3**	**Ecoli β hémo**
ZE 22	**50**	NT	**50**	**57**	1,3	**Y entero 09**
ZE 23	**50**	NT	**25**	**25**	1,0	**Y entero 09**
ZE 24	25	NT	20	**20**	1,0	**Y entero 09**

Les deux premières lettres correspondent au code de l'exploitation.
NT : non testé
Les données en gras indiquent les tests positifs suivant les critères définis dans "matériel et méthodes"

L'utilisation d'animaux dont le statut infecté est connu, comme dans une infection expérimentale, donne plus de poids aux réactions observées et permet d'évaluer facilement la sensibilité d'un test diagnostic ainsi que sa précocité. Dans ces conditions, le test IFNγ s'est révélé être plus précoce que les tests sérologiques et plus sensible que l'IDR. Comme les autres tests, il s'avère incapable, à lui seul, d'identifier tous les animaux infectés à n'importe quel moment de l'expérience. Néanmoins l'utilisation conjointe de ce test et de la sérologie permet d'identifier 90 % des infectés dès 25 jours après l'infection et 100 % à partir du jour 35.

Aucune modification du seuil de positivité n'aurait permis d'améliorer l'efficience de ce test dans la détection des animaux positifs. L'évaluation en milieu infecté naturellement indique que dans ces conditions, c'est le test IFNγ qui détecte le plus grand nombre d'animaux, mais que le maximum de détection n'est atteint qu'en conjonction avec les tests sérologiques. Sur le terrain aussi, le test IFnγ apparaît nettement plus sensible que l'IDR. Au vu de la précocité de détection démontrée lors de l'infection expérimentale, ce test permettrait de limiter la propagation de l'infection lorsqu'il est possible de mettre à l'écart ou d'éliminer les animaux suspects.

Enfin son apport pour la discrimination des réactions sérologiques faussement positive est considérable puisque 96 % des animaux suspects de RSFP sont restés négatif au test IFNγ . A ce niveau, il semble bien que le choix du seuil de positivité ait été adéquat; en effet son abaissement à une valeur de IS = 2 aurait diminué la spécificité de 12 % et son rélèvement à une valeur de IS = 3 ou 4 n'apporterait pas de gain de spécificité.

Il n'en reste pas moins que ces essais sont préliminaires et que seule une étude à plus grande échelle sur un nombre important d'animaux certifiés négatifs permettra de calculer avec précision la spécificité réelle de ce test et d'en fixer le seuil de positivité. De même son évaluation sur le terrain devrait être poursuivie notamment en réalisant un suivi de 2 ou 3 mois sur les animaux de foyers brucelliques récents.

Il est vraisemblable que ce test ne soit pas plus capable que les autres tests existant de discriminer entre une vaccination et une infection. Néanmoins, sa spécificité , sa précocité et la forte proportion d'animaux infectés détectés laissent envisager qu'il pourrait être à la base de la génération d'un système diagnostic compatible avec une nouvelle approche vaccinale.

Des études sont actuellement en cours afin d'identifier une ou plusieurs protéines qui soient des allergènes majeurs de *Brucella*. Ces protéines produites par génie génétique seraient à la base d'un test diagnostique cellulaire et la délétion du/des gène(s) correspondant(s) dans une souche vaccinale autoriserait la discrimination entre vaccination et infection [11].

Le test IFnγ apparaît donc comme un test additionnel particulièrement performant en réponse au problème des réactions sérologiques atypiques et qui contribuera à aider les autorités vétérinaires dans leur campagne d'éradication de la brucellose.

Remerciements

Cette recherche a été subventionnée par l'Institut pour l'encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture (IRSIA) et par un volet du Projet de Développement des Zones Rurales (PDZR) (Ministère de l'Agriculture- CEE).
Nous remercions vivement MM. Y. Botton, P. Thiange, B. Limbourg du Centre de Dépistage des Maladies Animales d'Erpent (Namur) et le Dr J. Godfroid (INRV, Bruxelles) pour leur collaboration à ce travail.

Références

1. Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D. *et al.* (1988). *Techniques for the brucellosis laboratory*. Paris : INRA . 199pp.
2. Benet J.J., Massard C., Garin B. (1991). Réaction sérologiques atypiques dans le dépistage de la brucellose bovine. *Epid Sant Anim* ; 19 : 97 .
3. Berkovich Z., Ter Laak E.A. (1990). An evaluation of the DTH test for diagnosing brucellosis in individual cattle : a field study. *Vet Microbiol ;* 22 : 241.
4. Corbel M.J. (1990). Recent advance in the study of Brucella antigens and their serological cross reactivity. *Vet Bull ;* 55 : 927
5. Dewaele L., Saegerman C., Gilson D., Thiange P., Vo T.K., Limet J., Letesson J.J. Field evaluation of threee serum ELISA using monoclonal antibodies or protein G as peroxydase conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. Submitted in *Vet. Microbiol.*
6. Fensterbank R. (1977). Le diagnostic allergique de la brucellose : utilisation du test allergique dans les troupeaux infectés. *Ann Rech Vet* ; 8 : 195
7. Fernsterbank R. (1982). Le diagnostic allergique de la brucellose. *Bull Acad Vét de France* ; 55 : 47 .
8. Garin B. (1993). Le dépistage de la brucellose des ruminants et ses difficultés. *Le point Vét* ; 25 : 115 .
9. Kapsenberg M.L., Wierenga A.L., Bos J.D., Jansen H.M. (1991). Functional subsets of allergen reactive CD4+ T cells. *Immunol Today* ; 12 : 392
10. Limet J., Kerkhofs P., Wijfels R., Dekeyser P. (1988). Le diagnostic sérologique de la brucellose bovine par ELISA. *Ann Med Vet* ; 132 : 565
11. Limet J.,Vo T.K., Saegerman C., Dewaele L., Tibor A., Cloeckaert A., De Wergifosse P., Zigmunt M., Letesson J.J.,Dubray G. (1991). Identification et clonage des antigènes de diagnostic de la Brucellose : perspectives d'application. In : Prevention of Brucellosis in Mediteranean countries. Proceedings of the international Seminar held in Valetta, Malte (October 1991) pp 252-264.
12. Rothel J.S., Jones S.J., Corner L.A., Cox J.C., Wood P.R. (1990). A sandwich immunoassay for bovine interferon gamma and itsuse for the detection of tuberculosis in cattle. *Aust Vet J* ; 67 : 134 .
13. Sutherland S.S., Searson J. (1990). The immune response to *Brucella abortus* : the humoral response. In : Nielsen and Ducan eds. *Animal Brucellosis*. Boca Raton, USA, CRC Press, 65
14. Wood P.R., Corner L.A., Rothel J.S., *et al.* (1991). Field comparison of the gamma interferon assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Aust Vet J* ; 68 : 286 .
15. Wood P.R., Corner L.A., Plackett P. (1990). Development of a simple rapid *in vitro* cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon. *Res Vet Sci* ; 49 : 46 .

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 159-175.

15

Apports de la génétique moléculaire dans la caractérisation de l'espèce *Clostridium perfringens*

G. DAUBE, P. SIMON, B. LIMBOURG*, K. RENIER*, A. KAECKENBEECK

Université de Liège, Faculté de Médecine Vétérinaire, Service de Bactériologie et de Pathologie des Maladies Bactériennes, Liège, Belgique.
** Fédération de lutte contre les Maladies Animales, Erpent, Belgique.*

Résumé

Depuis le début de ce siècle, plusieurs méthodes de typage de l'espèce Clostridium perfringens *ont été décrites; la détermination du toxinotype par séroneutralisation des propriétés létales sur souris est la seule véritablement répandue. La génétique moléculaire permet actuellement d'aller beaucoup plus loin dans la caractérisation de cette espèce bactérienne. D'une part, les gènes codant pour la plupart des toxines produites par cette bactérie (toxines alpha, epsilon, iota, thêta et mu, entérotoxine, sialidase) ont été recherchés par une technique d'hybridation ADN-ADN sur colonies. Onze cent vingt-trois souches sauvages ont été étudiées par cette méthode. Les 768 souches isolées de bovins morts d'entérotoxémie en Belgique possèdent toujours les gènes de la toxine alpha et de la sialidase, le plus souvent ceux des toxines thêta et mu, très rarement celui de l'entérotoxine et jamais celui des toxines epsilon et iota. D'autre part, un marqueur épidémiologique de* C. perfringens *a été défini par l'étude des polymorphismes de fragments de restriction par* HindIII *de l'ADN chromosomique après hybridation successive avec une sonde spécifique du gène de l'ARN ribosomial 16S et quatre sondes spécifiques des gènes*

situés sur le chromosome des toxines alpha, thêta et mu et de la sialidase. Cette méthode a permis de confirmer, par l'étude de 166 souches de C. perfringens, *l'absence d'homogénéité génomique des différents toxinotypes, ce qui fait suspecter le caractère mobile des principaux gènes de virulence dans cette espèce bactérienne. Les souches isolées de bovins morts d'entérotoxémie se sont révélées génomiquement polymorphes, tant chez un même individu que chez plusieurs individus différents, démontrant l'origine polyclonale de cette affection.*

Clostridium perfringens (C. perfringens) est une espèce bactérienne cosmopolite largement répandue dans de multiples niches écologiques. On la retrouve principalement dans le tube digestif de l'homme et de la plupart des espèces animales où elle peut être considérée comme saprophyte de l'intestin [3,17]. Certaines souches, pourtant, peuvent proliférer et produire différentes toxines responsables des maladies attribuées à ce germe. [4]. Le diagnostic des affections d'origine digestive repose sur l'isolement, en grand nombre, de *C. perfringens* et la détermination du toxinotype d'une ou de quelques souches [17] (Tableau I). Le typage est principalement effectué par séroneutralisation des toxines létales majeures complétée, éventuellement, par la détermination du sérotype [7]. Ces méthodes ne permettent pas une étude très approfondies de la population de *C. perfringens* présente dans l'intestin et sont, de plus, lourdes à mettre en oeuvre.

Tableau I. Toxinotypes majeurs de *Clostridium perfringens.*

	Toxines			
Toxinotypes	Alpha	Bêta	Epsilon	Iota
A	++	-	-	-
B	+	++	+	-
C	+	++	-	-
D	+	-	++	-
E	+	-	-	++

++: principale toxine produite
+: toxine secondaire produite en général en moindre quantité
-: toxine non produite

Afin de pouvoir réaliser de vastes enquêtes épidémiologiques concernant les clostridioses, deux méthodes visant à la caractérisation génétique de cette espèce bactérienne ont été développées :
- d'une part, la recherche des gènes codant pour différentes toxines (alpha, epsilon, iota, thêta et mu, entérotoxine) et pour la sialidase, par hybridation ADN-ADN sur colonies en utilisant des sondes polynucléotidiques spécifiques marquées radioactivement ;
- d'autre part, la mise au point d'une méthode de typage basée sur l'étude du polymorphisme des fragments de restriction de l'ADN chromosomique.

Matériel et méthodes

Souches de *Clostridium perfringens*

Les 1123 souches sauvages de *C. perfringens* utilisées lors de cette étude sont principalement d'origine animale : la plupart d'entre elles (768) ont été isolées, en Belgique, entre 1987 et 1991 de bovins morts d'entérotoxémie. Les autres souches sont d'origine très variée; les souches ovines et caprines proviennent essentiellement de cas d'entérotoxémie, les autres souches d'origine animale ont été souvent isolées de cas pathologiques caractérisés par des lésions ou des troubles intestinaux. Le Tableau II reprend la ventilation des souches en fonction de l'espèce animale à l'origine de leur isolement. Ces souches furent identifiées comme *C. perfringens* sur base de l'aspect des colonies et de l'hémolyse, de l'aspect à la coloration de Gram et de l'hybridation avec une sonde génétique spécifique de la toxine létale majeure alpha. Une étude préliminaire (Daube, résultats non publiés) a montré que toutes les souches de *C. perfringens* hybrident avec cette sonde.

Tableau II. Origine des souches sauvages étudiées

	Origine des souches							
Nombre total de souches	Bovine	Petit ruminant	Porcine	Volailles	Carnivores	Divers	Aliments*	ND**
1123	768	132	61	34	25	26	41	36
	68%	12%	5%	3%	2%	2%	4%	3%

* destinés à l'alimentation humaine
** non déterminée

Les 1123 souches ont été étudiées par hybridation ADN-ADN sur colonies; 166 souches représentatives de tous les toxinotypes ont été caractérisées par étude du polymorphisme de fragments de restriction de l'ADN chromosomique.

La sensibilité et la spécificité des méthodes ont été estimées grâce à une collection de souches de référence ou de souches de contrôle :
- des souches de référence internationale de *C. perfringens* ;
- des souches de contrôle, dont le phénotype a été confirmé par d'autres équipes de recherche et qui nous permettent de valider nos tests.

L'ensemble de ces souches ont été reprises dans le Tableau III avec mention du caractère principal pour lequel chaque souche est utilisée comme contrôle ainsi que du laboratoire qui l'a transmise. Des souches d'autres espèces de clostridies ont été inclues comme témoins de spécificité.

Tableau III. Propriétés et origines des souches de référence et de contrôle

Appellation	Caractère	Origine
NCIB10716	*Clost. bifermentans*	L. Devriese (Gand)
NCIB10676	*Clost. cadaveris*	L. Devriese (Gand)
CCM6066	*Clost. clostridioforme*	L. Devriese (Gand)
CCM5943	*Clost. histolyticum*	L Devriese (Gand)
CCM5743	*Clost septicum*	L. Devriese (Gand)
NCIB10717	*Clost sordellii*	L. Devriese (Gand)
G12	*Clost. sordellii*	R. Schauer (RFA)
CCM6065	*Clost. symbiosum*	L. Devriese (Gand)
ATCC12922	entérotoxine	ATCC (USA)
F3686	entérotoxine	M Van Damme (P-B)
NCTC8239	entérotoxine	M. Van Damme (P-B)
NCTC8798(8-6)	entérotoxine	M.R. Popoff (France)
A99	sialidase	R. Schauer (RFA)
DSM756	sialidase	R. Schauer (RFA)
ATCC13124	type A	ATCC (USA)
ATCC3624A	type A	J. Rood (Australie)
CW504	type A	J. Rood (Australie)
JIR323	type A	J. Rood (Australie)
NCTC6785	type A	S.T. Cole (France)
CN3888	type A	Wellcome (G-B)
G23	type B	P. Pohl (Belgique)
CN3922	type B	Wellcome (G-B)
CP232	type C	M.R. Popoff (France)
CWC236	type C	M.R. Popoff (France)
NCTC2062	type D	M.R. Popoff (France)
CN3978	type D	Wellcome (G-B)
NCIB10748	type E	M.R. Popoff (France)

Sondes génétiques

Les sondes génétiques ont été dérivées à partir des gènes codant pour les toxines alpha [15], epsilon [5], iota [13], thêta [20], mu [2], l'entérotoxine [21] et la sialidase [14] (Tableau IV). La sonde pour le gène codant pour l'ARN ribosomial 16S a été dérivée du plasmide recombinant pBA2 [8], contenant le gène de l'ARN ribosomial 16S de *Bacillus subtilis*; la sonde correspond aux 1100 bases de l'extrémité 3' de ce gène. Les fragments sondes ont été marqués radioactivement (Random Hexanucleotide Primer Kit, Boehringer Mannheim).

Tableau IV. Dérivation des sondes génétiques.

Gène du caractère recherché	Abréviation du gène	Appellation du plasmide recombinant	Endonucléases de restriction utilisées	Taille de la sonde (pb)
Toxine alpha	*plc*	pTOX5	*Bam* HI + *Hind* III	950
Toxine epsilon	*etx*	pGDS7	*Hind* III	505
Toxine iota	NP	NP	PCR*	298
Toxine thêta	*pfoA*	pRT1B	*Acc* I	736
Toxine mu	*nagH*	pNAG-S3	*Hind* III	1300
Entérotoxine	*cpe*	pLWL10	*Kpn* I + *Hind* III	504
Sialidase	*nanH*	pK14RFA	*Kpn* I + *Hind* III	1400

NP : non publié
* : fragment-sonde obtenu par PCR

Méthodes d'hybridation

Les hybridations sur colonies ont été effectuées sur papier filtre Whatman 541 et les résultats ont été lus après autoradiographie [10]. Les adaptations de la technique originale sont les suivantes :
- le milieu Ana Blood Agar Base (Gibco) sans sang a été utilisé pour l'ensemencement de la matrice des souches de *C. perfringens* (50 souches à caractériser et 7 souches-témoins).
- l'ensemencement direct à partir de bouillons de culture de nuit s'est révélé inconstant et a dû être réalisé à partir d'une culture de nuit sur milieu solide (milieu Ana Blood Agar Base plus 8 % de sang de bovin) de chacune des souches (Figure. 1).

Les hybridations sur profils de restriction de l'ADN total ont été réalisées de la manière suivante :
- la méthode d'extraction rapide de l'ADN total de *C. perfringens* a été adaptée de celle décrite par Van Damme-Jongsten *et al.* [21]. Un millilitre et demi d'une culture de nuit en BHI-thioglycollate de *C. perfringens* sont centrifugés dans un tube Eppendorf à 12.000 g pendant 10 minutes; le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 1,2 ml d'une solution TES (Tris-HCl 50 mM (pH 8)/ EDTA 5 mM/ NaCl 50 mM) et centrifugé 10 minutes à 4°C. Le culot est resuspendu dans 320 µl de TES contenant 25 % de sucrose et du lysozyme (concentration finale de 2 mg/ml) et incubé 20 minutes à 37°C. Soixante microlitres d'EDTA 0,25 M (pH 8), puis 300 µl de TES contenant 1 % de SDS et 1 µl de diéthylpyrocarbonate sont ajoutés successivement. Après incubation 10 minutes à 60°C, l'ADN est extrait 2 fois avec 700 µl de phénol-chloroforme-isoamylacool (25:24:1) et une fois avec 700 µl de chloroforme-isoamylacool (24:1). Après addition de 2,5 volumes d'éthanol absolu et incubation 10 minutes à -20°C, le culot de centrifugation est rincé avec 300 µl d'éthanol à 70 %. Après une nouvelle centrifugation, le culot est resuspendu dans 36 µl d'eau distillée.

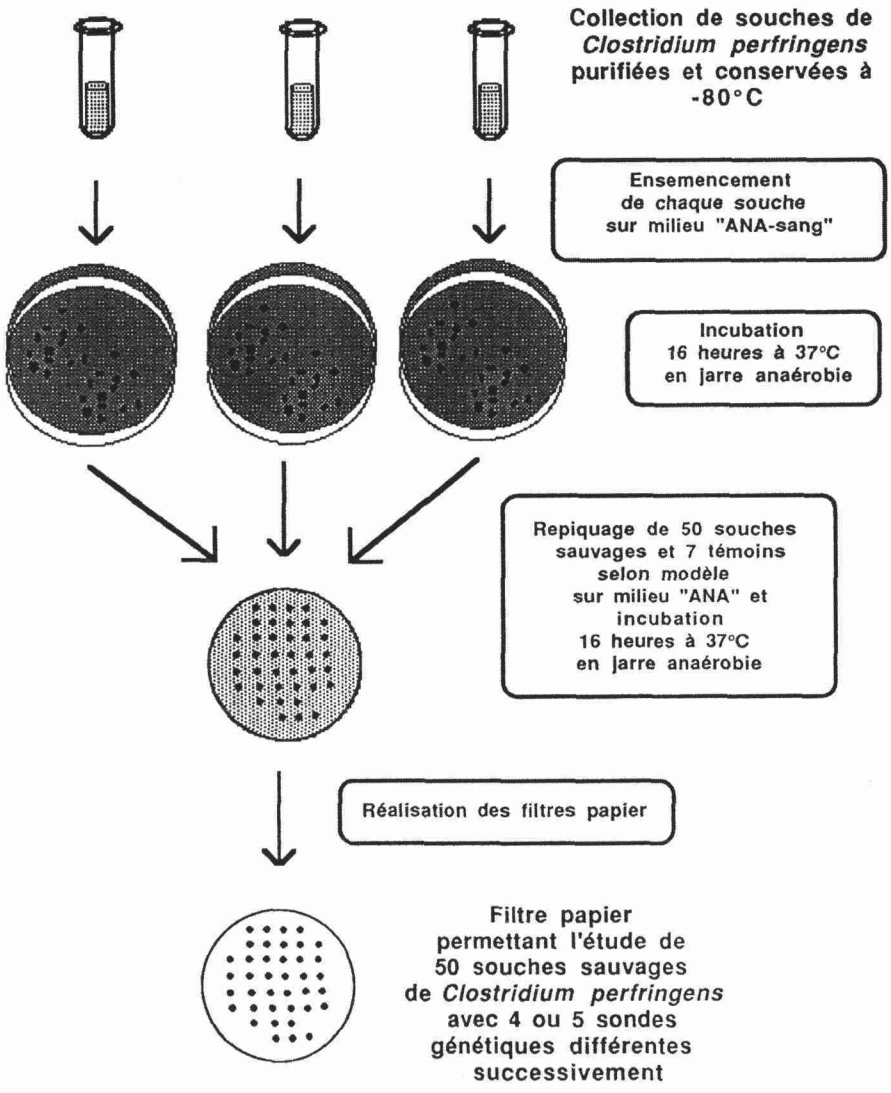


Figure 1. Méthode de réalisation des filtres en vue de l'hybridation sur colonies.

- un tiers de l'ADN extrait est soumis à la digestion par endonucléases de restriction *Hind* III afin de réaliser, après électrophorèse en gel d'agarose 0,8 %, un profil de restriction de l'ADN total, appelé aussi empreinte génétique de la souche étudiée. Les fragments d'ADN sont ensuite transférés sur une membrane de Nylon chargé par la technique de "Vacuum-Blot" et hybridés avec la sonde marquée radioactivement. Les diverses étapes expérimentales sont reprises dans la Figure 2.

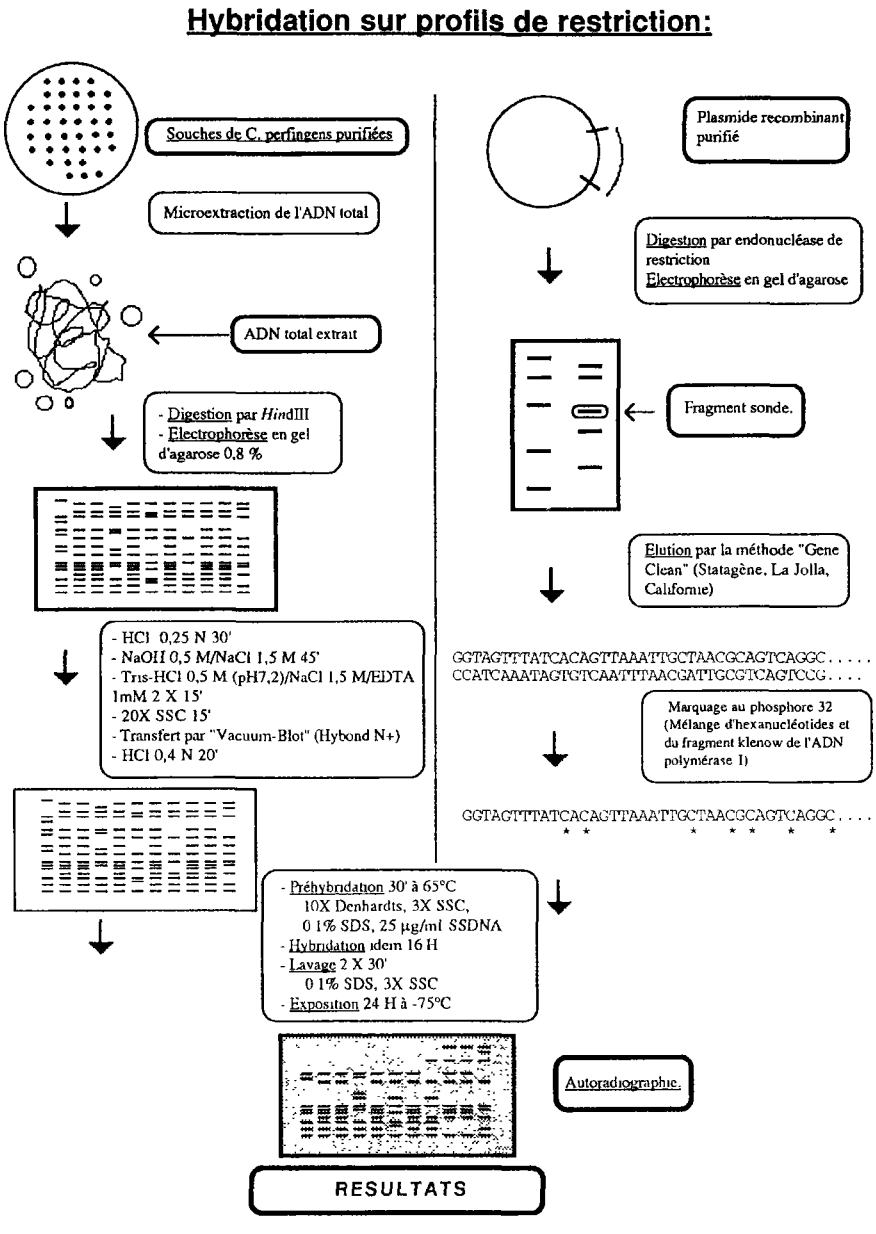


Figure 2. Protocole d'hybridation sur profils de restriction. Etapes expérimentales.

Méthodes d'analyse des profils d'hybridation

Les différents profils ont été comparés visuellement grâce aux marqueurs de taille (λ restreint par *Hind* III et pBR322 restreint par *Hinf* I) et au profil d'hybridation de référence de la souche NCTC2062. Une matrice a été réalisée reprenant le nombre total de bandes distinguées pour chaque souche ainsi que le nombre de bandes de mobilité semblable pour chaque paire de souches possible. Une matrice traduisant le pourcentage d'homologie entre les souches a été réalisée au départ de la première par la transformation suivante :

$$D = 2 \times n_{12} / (n_1+n_2)$$

où : D est le coefficient de Dice [6] traduisant l'homologie entre les souches 1 et 2,
n_{12} est le nombre de bandes communes entre les souches 1 et 2,
n_1 est le nombre total de bandes repérées dans la souche 1,
n_2 est le nombre total de bandes repérées dans la souche 2.

Cette matrice à été analysée par ordinateur selon l'algorithme de Li [9] utilisant la méthode *Unweighted Pair Group Average Linkage* (UPG) afin de générer un dendrogramme de similarité. Les profils analysés sont constitués du profil d'hybridation avec la sonde pour le gène de l'ARN ribosomial 16S additionné des quatre profils obtenus après hybridation du filtre avec les sondes pour les gènes de la sialidase et des toxines alpha, mu et thêta, quatre gènes situés sur le chromosome de *C. perfringens* [1].

Résultats

Prévalence des gènes codant pour sept toxines ou enzymes

Les résultats obtenus par hybridation ADN-ADN sur colonies sont présentés dans les Tableaux V et VI. L'absence de sonde génétique spécifique du gène de la toxine bêta nous empêche de déterminer le pathotype complet, mais des études phénotypiques complémentaires tentant la mise en évidence de ce facteur montrent que le toxinotype A non entérotoxinogène est pratiquement le seul isolé de bovins morts d'entérotoxémie en Belgique.

Typage par étude du polymorphisme de fragments de restriction de l'ADN chromosomique

La sonde spécifique du gène codant pour l'ARN ribosomial 16S a permis de détecter 10 bandes dans l'ADN restreint de la majorité des souches étudiées. Quarante-deux profils différents, appelés ribotypes, ont été distingués dans l'échantillon de 166 souches (résultats non montrés). La Figure 3 montre les profils obtenus pour quatorze souches isolées de deux bovins morts d'entérotoxémie.

L'utilisation successive des quatre autres sondes a permis de porter à 95 les classes différentes (résultats non montrés). Si on néglige les souches présentant un même profil, mais isolées d'un même animal, et pouvant donc constituer un clone, on obtient 95 catégories pour 116 souches, soit une variabilité corrigée de 82 %. Les souches isolées de bovins morts d'entérotoxémie sont différentes l'une de l'autre dans 94 % des cas, montrant ainsi qu'il ne s'agit pas d'un clone bactérien qui émerge lors de cette maladie. Un même individu peut, en outre héberger jusqu'à 9 électrophorétypes différents (résultats

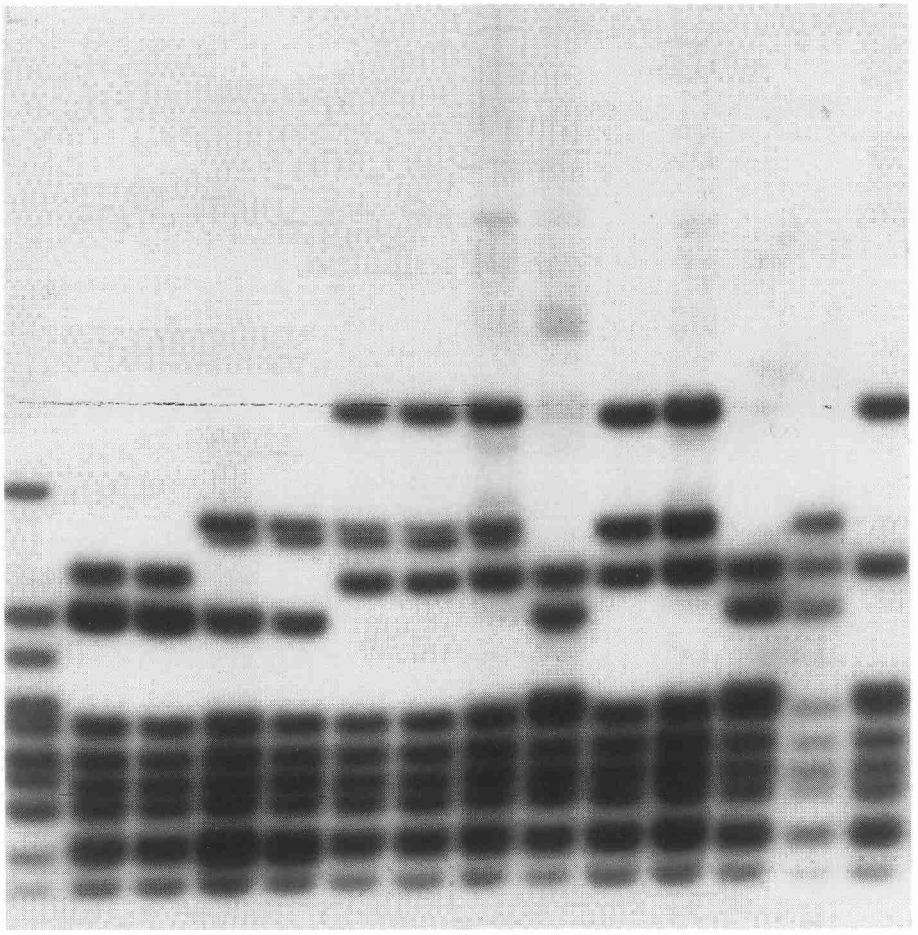


Figure 3. Profils d'hybridation de l'ADBN total extrait de 14 souches de *Clostridium perfringens* et restreint par *Hin*III avec la sonde pour le gène codant pour l'ARN ribosomial 16S.

non montrés). Les souches des différents toxinotypes sont réparties sur toute la hauteur d'un dendrogramme exprimant l'homologie relative entre les souches (Figure 4).

Malgré le polymorphisme important constaté entre les différentes souches, certaines bandes du ribotype sont fortement conservées et peuvent servir de marqueur ou de carte d'identité d'espèce (Figure 3). L'étude par cette méthode d'espèces bactériennes phylogénétiquement proches devrait être menée afin de voir si le ribotype, utilisé seul, peut être, à la fois, une méthode de différenciation de l'espèce et un marqueur épidémiologique au sein même de l'espèce *C. perfringens*.

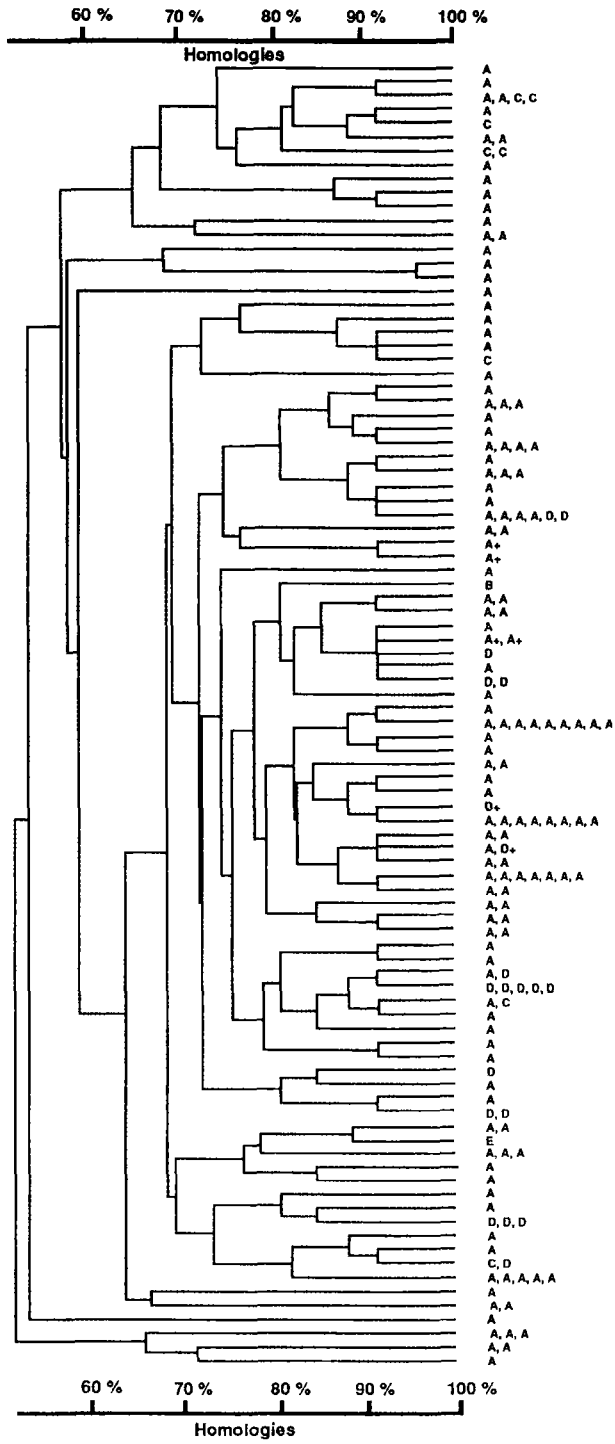


Figure 4. Dendogramme représentant la classification des 166 souches de *Clostridium perfringens* étudiées en fonction des homologies de leurs profils d'hybridation avec les sondes spécifiques du gène de l'ARN ribosomial 16S et pour les gènes codant pour les toxines alpha, thêta et mu, ainsi que pour la sialidase. Les lettres indiquent les toxinotypes des souches localisées dans chacun des 95 électrophorétypes, le signe "+" indique que, en outre, la souche possède le gène de l'entérotoxine.

Discussion

Prévalence des gènes codant pour sept toxines ou enzymes

Les résultats d'hybridation avec chacune des sondes ont tous été exempts de bruit de fond; les souches qui possèdent le gène recherché ont été détectées par un spot noir sur l'autoradiographie, celles ne le possédant pas n'ont montré aucun signal ou de faibles traces lors d'une longue exposition (Figure. 5). La lecture et l'interprétation des résultats sont donc très simples et parfaitement objectives.

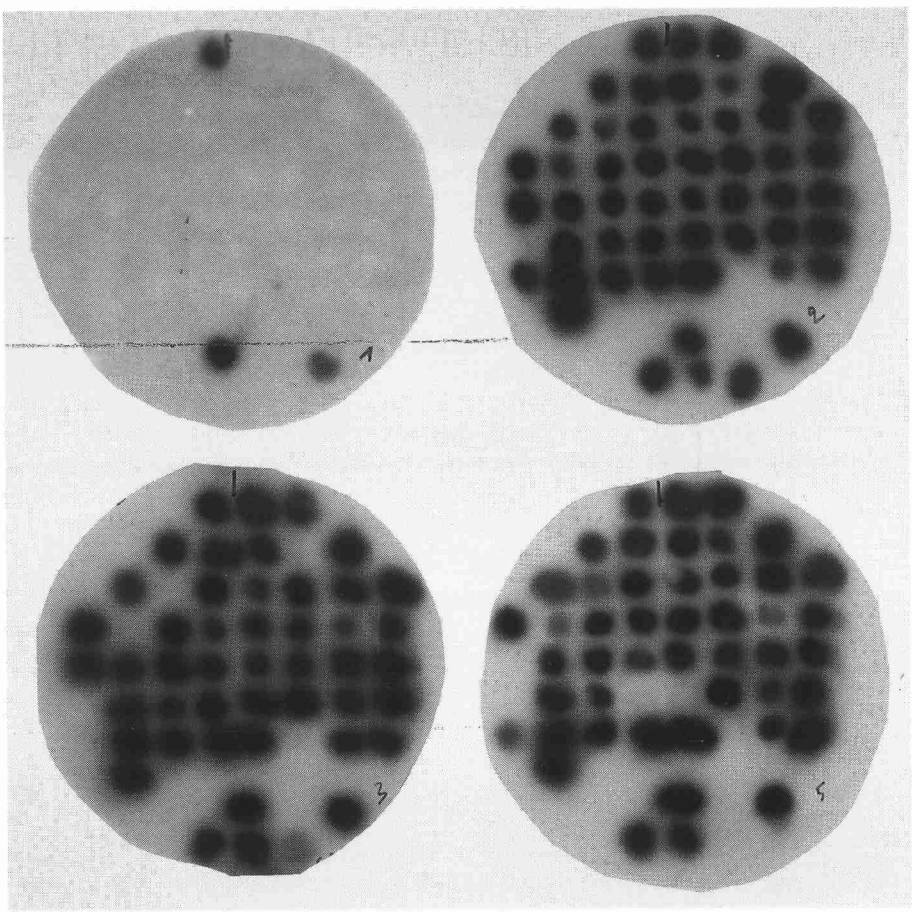


Figure 5. Hybridation ADN-ADN sur colonies avec les sondes génétiques pour les gènes codant pour la toxine epsilon (1), la toxine alpha (2), la toxine thêta (3), et la toxine mu (5).

Excepté trois études recherchant le gène de l'entérotoxine chez des souches de *C. perfringens* isolées de foyers d'intoxication alimentaire chez l'homme (6 % des souches positives), de porcs souffrant de diarrhée de sevrage (aucune souche positive) ou de matières

fécales de divers animaux domestiques sains [19,22,23], aucun travail n'a jusqu'ici utilisé l'outil génétique pour l'étude épidémiologique de pathologies liées à *C. perfringens* [4].

Les résultats rapportés ci-dessous détaillent l'absence ou la présence des gènes de plusieurs facteurs de virulence chez des souches isolées de cas de maladies animales. 41 souches isolées de substances alimentaires ont été ajoutées pour comparaison. La présence de chacun des gènes pris séparément sera étudiée ainsi que l'association de ces gènes dans chacune des souches. Parmi les 1123 souches isolées (appellées "souches sauvages"), une sous population de 768 souches d'origine bovine isolées de cas suspects d'entérotoxémie bovine a été caractérisée pour tenter de cerner les facteurs de virulence importants pour la pathogénie et le type de pathotype impliqué.

Le gène de la toxine alpha est présent dans toutes les souches étudiées. La stabilité de ce facteur de virulence est à mettre en relation avec la position de son gène à proximité de l'origine probable de réplication du chromosome [1]. Toutes les souches de référence hybrident également cette sonde (Tableau V).

Le gène de la toxine epsilon a été détecté dans 27 souches soit 2,4 % du total mais dans aucune des souches d'origine bovine (Tableau VI); ceci exclut l'implication de cette toxine dans l'entérotoxémie bovine en Belgique.

Aucune souche sauvage n'hybride avec la sonde spécifique du gène codant pour la toxine iota et la souche de référence NCIB10748 de type E est la seule à donner un résultat positif. Ces données confirment la rareté de ce toxinotype.

Toutes les souches de référence connues comme entérotoxinogènes ont été détectées par la sonde; celle-ci n'a détecté aucune autre souche de référence réputée non entérotoxinogène, excepté la souche NCIB10748 de type E. Cette souche n'a pu être démontrée comme entérotoxinogène par des tests phénotypiques [13]. Le gène de l'entérotoxine est présent dans 11 souches soit un peu moins d'1% et seule une souche provient d'un bovin suspect d'entérotoxémie. Ces constatations font bien penser que ce facteur de virulence n'est pas impliqué dans le problème de l'entérotoxémie bovine bien que Niilo, en 1978 [11], le rende responsable de diarrhées chez le veau au Canada.

Le gène de la toxine thêta a été détecté dans un peu plus de 90 % des souches étudiées et dans une proportion légèrement moindre parmi les souches d'origine bovine. Quant aux souches de référence, elles sont toutes positives, excepté deux souches de type A (souches G23 et CW504) et trois des quatre souches entérotoxinogènes (ATCC12922, NCTC8239 et NCTC8798). Cette propriété des souches entérotoxinogènes a déjà été rapportée [12].

La sonde pour le gène codant pour la toxine mu a détecté 95 % des souches étudiées dont 679 souches bovines sur 728 (soit 93,27 %).

Le gène de la sialidase intracellulaire de *C. perfringens* est présent dans toutes les souches sauvages étudiées; seule la souche JIR323, souche receveuse pour électroporation [16], n'hybride pas avec la sonde spécifique du gène de ce facteur. Ce facteur semble donc essentiel à la bactérie pour son métabolisme propre, plus qu'elle n'agit comme facteur de virulence proprement dit; cela pourrait être une raison qui explique sa stabilité dans les souches sauvages, la souche JIR323 étant une souche de laboratoire qui n'est sujette à aucune compétition.

L'ensemble de ces résultats permet, pour chaque souche la détermination d'un pathotype, pendant génétique du toxinotype, qui permet d'associer la souche à un tableau

Tableau V. Pathotype des souches de référence.

Souche	Toxine alpha	Toxine epsilon	Toxine iota	Toxine thêta	Toxine mu	Entéro-toxine	Sialidase	Toxinotype
G12	-a	-	-	-	-	-	-	-
CCM5743	-	-	-	-	-	-	-	-
CCM5943	-	-	-	-	-	-	-	-
NCIB10676	-	-	-	-	-	-	-	-
NCIB10717	-	-	-	-	-	-	-	-
CCM6065	-	-	-	-	-	-	-	-
CCM6066	-	-	-	-	-	-	-	-
NCIB10716	-	-	-	-	-	-	-	-
JIR323	+b	-	-	+	+	-	-	A
CW504	+	-	-	-	+	-	+	A
G23	+	-	-	-	+	-	+	Ac
A99	+	-	-	+	+	-	+	A
ATCC13124	+	-	-	+	+	-	+	A
ATCC3624A	+	-	-	+	+	-	+	A
CN3888	+	-	-	+	+	-	+	A
DSM756	+	-	-	+	+	-	+	A
NCTC6785	+	-	-	+	+	-	+	A
CP232	+	-	-	+	+	-	+	C
CWC236	+	-	-	+	+	-	+	C
CN3922	+	+	-	+	+	-	+	B
CN3978	+	+	-	+	+	-	+	D
NCTC2062	+	+	-	+	+	-	+	D
ATCC12922	+	-	-	-	-	+	+	A Ent+ d
NCTC8239	+	-	-	-	-	+	+	A Ent+
NCTC8798	+	-	-	-	+	+	+	A Ent+
F3686	+	-	-	+	+	+	+	A Ent+
NCIB10748	+	-	+	+	+	+	+	E

a : Hybridation négative
b : Hybridation positive
c : Souche obtenue comme type B mais confirmée comme type A
d : Souche de type A productrice d'entérotoxine.

Tableau VI. Nombre et proportion des souches sauvages positives avec chacune des sondes en fonction de l'origine des souches.

	Bovines		petit ruminant		Porcines		Volailles		Carnivores		Divers		Aliment		Non déterminé	
Alpha	768	100%	132	100%	61	100%	34	100%	25	100%	26	100%	41	100%	36	100%
Epsilon	0	0%	21	16%	0	0%	1	3%	0	0%	1	4%	0	0%	4	11%
Iota	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
Thêta	688	90%	131	99%	51	84%	31	91%	22	88%	24	92%	37	90%	34	94%
Mu	719	94%	130	98%	61	100%	34	100%	20	80%	26	100%	41	100%	36	100%
Entérotox.	1	0%	5	4%	1	2%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	4	11%
Sialidase	768	100%	132	100%	61	100%	34	100%	25	100%	26	100%	41	100%	36	100%

pathologique particulier. Le clonage du gène de la toxine bêta permettra de remplacer complètement les techniques classiques de typage sur animaux de laboratoire.

Typage par étude du polymorphisme de fragments de restriction de l'ADN chromosomique

Les hybridations sur profils de restriction par *Hind* III réalisées ici permettent de "tracer" des clones de *C. perfringens*. La sonde spécifique du gène codant pour l'ARN ribosomial 16S a l'avantage de détecter dix opérons dispersés sur un tiers du chromosome autour de l'origine de réplication [1], et donc d'étudier la position relative de minimum 20 sites *Hind* III. Les autres sondes n'étudient que les quelques sites *Hind* III dans et autour de la séquence, présente en un seul exemplaire, repérée par chaque sonde.

Le dendrogramme de similarité montre clairement que la classification établie ici n'est pas du tout superposable avec celle reposant sur le toxinotype. En effet, les souches productrices de toxine bêta, epsilon ou d'entérotoxine sont dispersées dans tout l'arbre. Le degré d'homologie entre certaines souches d'un même toxinotype n'est que de 57,7 %. Pour la toxine epsilon, les divergences vont jusqu'à 30,9 %. De même des souches des divers toxinotypes se retrouvent génomiquement très proches dans notre classification. Seules les souches isolées de porcs au Danemark, qu'elles soient de toxinotype C ou A, sont très semblables par étude des profils d'hybridation (résultats non montrés). Cette constatation avait déjà été faite par Hogh, en 1969, grâce au typage sérologique. Il reste à déterminer si cette proximité est liée à l'isolement géographique, à l'hôte (le porc) ou à la pathologie (l'entérite nécrotique du porc).

Il semble donc que la méthode utilisée confirme le caractère mobile des gènes gouvernant la synthèse de trois toxines importantes dans les pathologies liées à *C. perfringens.* Elle permet de rapprocher aisément des isolats de cette bactérie mais ne préjuge nullement des propriétés toxinogènes de ces souches. Elle complète ainsi parfaitement la classification en pathotypes établie ci-dessus. Elle permet le suivi d'une souche particulière en fonction de marqueurs situés sur le chromosome. Des études devraient être menées afin de connaître la stabilité de ces marqueurs au cours du temps. Cependant la relative homogénéité des résultats obtenus à partir d'isolats d'origines très variées laisse présager une faible variabilité de cette méthode comparée à l'étude des propriétés de virulence ou de résistance aux antibiotiques, facteurs qui sont, la plupart du temps, codés par des gènes situés sur des supports mobiles (plasmides, transposons,...).

Si ces résultats demandent à être confirmés sur un échantillon plus large, il apparaît cependant que cet ensemble de techniques, relativement faciles à mettre en œuvre dans n'importe quel laboratoire, se révèle être un outil épidémiologique très performant, là où les techniques de sérotypage ou de bactériocinotypage se sont montrées lourdes, chères et difficiles à mettre en oeuvre. Les foyers d'intoxication alimentaire de l'homme liés à l'entérotoxine seront notamment avantageusement investigués par cette méthode en confrontant les propriétés des souches isolées des aliments et celles des malades. Outre cet aspect épidémiologique au sens propre du terme, toutes les pathologies liées à *C. perfringens,* ou même l'écologie de ce germe dans ses différents habitats, peuvent être étudiées de cette manière.

Conclusion

Les deux méthodes mises en oeuvre ont permis de remplacer avantageusement les méthodes classiques de typage développées au milieu de ce siècle :
- d'une part, la méthode d'hybridation ADN-ADN sur colonies permet de déterminer, rapidement et à un faible coût, les propriétés de virulence de multiples isolats de *C. perfringens*; cette méthode se révèle d'autant plus intéressante que les réactifs de typage classique ne sont plus disponibles; la seule limitation est le manque d'alternative au marquage radioactif des sondes.
- d'autre part, la détermination de l'électrophorétype a montré de multiples avantages sur les techniques classiques de sérotypage, bactériocinotypage ou lysotypage, à savoir que 100 % des souches sont typables par cette méthode, qu'aucun réactif spécifique n'est nécessaire et que le polymorphisme constaté est beaucoup plus grand que par les autres méthodes.

Remerciements

Ce travail a été réalisé grâce au soutien financier de l'IRSIA (Institut pour l'encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture) et de la Région Wallonne (Ministère de l'Agriculture). Les auteurs tiennent à remercier les Drs J. Alonso, L. Devriese, S.T. Cole, M.R. Popoff, J. Rood, R. Schauer, T.A. Trautner, R. Tweten et M. Vandamme-Jongsten pour l'envoi des plasmides recombinants ou des séquences des toxines.

Références

1. Canard B., Cole S.T. (1989). Genome organization of the anaerobic pathogen *Clostridium perfringens. Proc Natl Acad Sc.USA* ; 86 : 6676-6680.
2. Canard B. Molecular genetic analysis of the nagH gene encoding the hyaluronidase (mu toxin) of *Clostridium perfringens.* Thèse, Université Paris VII, Biochimie-Microbiologie.
3. Correa A.E.E. (1986). Studies of *Clostridium perfringens* type A enteritis in the pig. Thèse, Glasgow, UK, 1-324.
4. Daube G. (1992). *Clostridium perfringens* et pathologies digestives. *Ann Méd Vét* ; 136 : 5-30.
5. Daube G., Simon P., Kaeckenbeeck A. (1993). IS1151, an IS-like element of *Clostridium perfringens. Nucleic Acids Res* ; 21 : 352.
6. Dice L.R. (1945). Majors of the amount of ecologic association between species. *Ecology* ; 26 : 297.
7. Henderson D.W. (1940). The somatic antigens of the *Clostridium welchii* group of organisms. *J Hyg* ; 40 : 501-512.
8. Iglesia S A., Ceglowski P., Trautner T.A. (1983). Plasmid transformation in *Bacillus subtilis.* Effects of the insertion of *Bacillus subtilis* rRNA genes into plasmids. *Mol Gen Genet* ; 192 : 149-155.
9. Li W.H. (1981). Simple method for constructing phylogenetic trees from distance matrices. *Proc Natl Acad Sci USA* ; 78 : 1085-1089.
10. Mainil J.G., Bex F., Jacquemin E., Pohl P., Couturier M., Kaeckenbeeck A. (1990). Prevalence of four enterotoxin (STaP, STaH, STb, and LT) and four adhesin subunit (K99, K88, 987P,

and F41) genes among *Escherichia coli* isolated from cattle. *Am J Vet Res* ; 51 : 187-190.
11. Niilo L. (1978). Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolated from intestinal contents of cattle, sheep and chickens. *Can J Comp Med* ; 42 : 357-363.
12. Niilo L. (1980). *Clostridium perfringens* in animal disease : a review of current knowledge. *Can Vet J* ; 21 : 141-148.
13. Popoff M.R. (1993). Communication personnelle.
14. Roggentin P., Rothe B., Lottspeich F., Schauer R. (1988). Cloning and sequencing of a *Clostridium perfringens* sialidase gene. *FEBS Letters* ; 238 : 31-34.
15. Scott P.T., Rood J.I. (1989). Electroporation-mediated transformation of lysostaphin-treated *Clostridium perfringens*. *Gene* ; 82 : 327-333.
16. Smith H.W., Crabb W.E. (1961). The faecal bacterial flora of animals and man : Its development in the young. *J Pathol Bacteriol* ; 82 : 53-66.
17. Sterne M., Batty I. (1975). In : *Pathogenic clostridia.* Butterworths, London and Boston : 22-26.
18. Tschirdewahn B., Notermans S., Wernars K., Untermann F. (1991). The presence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains in faeces of various animals. *Int J Food Microbiol* ; 14 : 175-178.
19. Tweten R.K. (1988). Nucleotide sequence of the gene for perfringolysin O, theta-toxin, from *Clostridium perfringens*: significant homology with the genes for streptolysin O and pneumolysin. *Infect Immun* ; 56 : 3235-3240.
20. Van Damme-Jongsten M., Wernars K., Notermans S. (1989). Cloning and sequencing of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene. *Antonie van Leeuwenhoek* ; 56 : 181-190.
21. Van Damme-Jongsten M., Rodhouse J., Gilbert R.J., Notermans S. (1990). Synthetic DNA probes for detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains isolated from food borne disease outbreaks. *J Clin Microbiol* ; 28 : 131-133.
22. Van Damme-Jongsten M., Haagsma J., Notermans S. (1990). Testing of *Clostridium perfringens* Type A strains isolated from piglets with diarrhea for the presence of the enterotoxin gene. *Vet Rec* ; 126 : 191-192.

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 177-182.

16

Mise au point et validation d'un ELISA sandwich pour la détection d'antigène viral dans les leucocytes des bovins infectés de manière persistante par le virus de la diarrhée virale bovine

B. MIGNON*, J. DUBUISSON**, S. WAXWEILER**, E. THIRY**, P.P. PASTORET**

* *Service de parasitologie et de pathologie parasitaire, Faculté de Médecine Vétéri naire, Sart-Tilman, Liège, Belgique.*
** *Service de Virologie-Immunologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Sart-Tilman, Liège, Belgique.*

Résumé

Un enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) sandwich a été développé pour la détection des antigènes viraux dans le sang des animaux infectés de manière persistante par le virus de la diarrhée virale bovine (BVD). Des anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine de 48-kDa et contre la protéine de 120/80-kDa ont été utilisés pour la capture et pour la détection. Le test a été évalué sur 761 échantillons sanguins prélevés en ferme chez des bovins ayant un statut déterminé (virémique ou non virémique). Avec un seuil de positivité adéquatement choisi, la sensibilité, la spécificité et les valeurs prédictives d'un résultat positif et négatif étaient égales à 100%. Ces valeurs étaient supérieures à celles obtenues avec la méthode classique d'isolement viral. La corrélation entre l'ELI-

SA et l'isolement viral était supérieure à 90%. L'ELISA développé ici constitue donc une alternative intéressante pour détecter des antigènes du virus BVD chez les animaux infectés persistants par ce virus.

Le virus de la diarrhée virale bovine ou BVDV est le pestivirus responsable de la diarrhée virale bovine (BVD) et de la maladie des muqueuses chez les bovins [3].

L'infection de vaches gestantes par une souche non cytopathogène de virus BVD peut, dans certaines circonstances, entraîner la naissance d'animaux infectés de manière persistante [4]. Ces animaux, le plus souvent en bonne santé apparente, présentent une virémie permanente et excrètent continuellement le biotype non cytopathogène du virus. De ce fait, ils contaminent le reste du troupeau de façon silencieuse. Ils peuvent aussi succomber de maladie des muqueuses.

Bien que la prévalence des animaux infectés de manière persistante soit habituellement inférieure à 1%, les pertes économiques imputables au virus BVD [1] et particulèrement celles liées à l'infection persistante, rendent essentielle la détection des porteurs asymptomatiques.

Les méthodes classiques de détection basées sur l'isolement viral étant longues, coûteuses et peu sensibles, un enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) sandwich a été développé, appliqué sur le terrain et évalué épidémiologiquement comme moyen de diagnostic rapide des animaux infectés persistants par le virus BVD.

Matériel et méthodes

Echantillons sanguins

1006 échantillons de sang hépariné ont été collectés entre les mois de janvier et juillet 1991 chez des bovins de fermes privées et chez tous les taurillons âgés de 6 mois du Centre de Sélection Bovine de Ciney. Certains prélèvements ayant été recueillis à différents moments chez les mêmes animaux pour confirmer une virémie persistante, 989 animaux ont en fait été testés par isolement viral. 761 échantillons sur 1006 ont été testés par ELISA.

Anticorps monoclonaux

Les anticorps (Ac) monoclonaux ont été choisis en fonction de leur affinité relative, de l'absence de compétition réciproque et de leur spectre de reconnaissance envers différentes souches de BVDV [2,9]. Des anticorps dirigés contre la glycoprotéine de 48-kDa et contre la protéine de 120/80-kDa ont été utilisés, tant pour la capture que pour la détection.

ELISA et isolement viral

L'ELISA a été réalisé selon la méthode décrite par Mignon *et al.* [9]. Brièvement, les microplaques ont été enduites pendant une nuit à 4°C avec un mélange de 3 Ac monoclo-

naux purifiés (200ng/puits de chaque Ac)). Les plaques ont été lavées 5 fois avec du PBS-Tween, de même qu'entre chacune des étapes ultérieures. L'antigène a été ajouté pendant 1h à 37°C. Cet antigène a été préparé à partir du buffy coat débarassé des hématies par lyse au NH_4Cl et traité au Nonidet-P40. Un mélange de 2 Ac biotinylés a ensuite été ajouté (100ng/puits de chaque Ac) pendant 1h à 20°C. L'incubation suivante a été conduite à 37°C pendant 1h avec de la streptavidine-biotine liée à la peroxydase (Amersham) à la dilution 1/400. Le substrat (ABTS, Boeringher-Mannheim) a été incubé pendant 8h à température ambiante et la lecture a été réalisée à 414nm avec un Titertek multiscan. L'isolement viral a été réalisé selon la méthode décrite par Waxweiler *et al.* [10].

Evaluation de l'ELISA

Les prélèvements ont été classés en "virémiques" (V+) et "non-virémiques" (V-) d'après les résultats obtenus au laboratoire et ceux obtenus de manière indépendante par un autre laboratoire en isolement viral (IV). L'isolement viral réalisé au laboratoire a été considéré comme le test standard et a été comparé à l'ELISA.

Un échantillon constitué de 151 prélèvements V- tirés au hasard parmi l'ensemble des V- et de tous les prélèvements V+ (26) a été testé en ELISA en utilisant 2 immunoplaques. Des tables de contingence ont été construites pour différentes valeurs de seuil de positivité (cut-off) et ont permis de calculer les valeurs intrinsèques de l'ELISA : sensibilité (Se) et spécificité (Sp). Les valeurs prédictives d'un résultat positif (VP+) et négatif (VP-) en ELISA ont ensuite été calculées pour différentes estimations de la prévalence (p) par le théorème de Bayes [7]. Les Se, Sp et VP de l'isolement viral ont également été déterminées. La corrélation entre L'ELISA et l'isolement viral a été déterminée par calcul du coefficient Kappa (K) [8].

Résultats

Parmi les 1006 échantillons, 41 étaient virémiques et correspondaient à 24 animaux différents. La prévalence de l'infection persistante était égale à 2,4%.

Le Tableau I montre les tables de contingence construites avec les résultats obtenus en ELISA pour différentes valeurs de cut-off (absorbance A414). Les sensibilité et spécificité calculées à partir des tables de contingence étaient égales à 100%, lorsque le cut-off était choisi entre 0,4 et 0,45 (Tableau I, Figure1).

La probabilité (VP+) qu'un résultat positif en ELISA soit réellement V+ était égale à 100% pour une valeur de cut-off supérieure à 0,4. Pour des valeurs égales ou inférieures à 0,4, VP+ dépendait de la prévalence (Figure 2). La valeur prédictive d'un résultat négatif (VP-=(1-p)Sp/{(1-p)Sp+p(1-Se)}) était toujours supérieure à 99% pour des valeurs de cut-off situées entre 0,2 et 0,55 et une prévalence inférieure à 5%.

Le Tableau II montre que les Se et VP+ de l'isolement viral sont plus faibles que celles de l'ELISA (Figures 1 et 2). La corrélation entre les deux tests était cependant excellente (K>0,9) pour un cut-off égal ou supérieur à 0,35.

Tableau I. Classification des résultats obtenus en ELISA*.

	V+	V-		
ELISA+	26^{VP}	12^{FP}	38	Cut-Off = 0,3
ELISA-	0^{FN}	139^{VN}	139	Se = 100%
	26	151	177	Sp = 92,1%
ELISA+	26^{VP}	0^{FP}	26	Cut-off = 0,4
ELISA-	0^{FN}	151^{VN}	151	Se = 100%
	26	151	177	Sp = 100%
ELISA+	25^{VP}	0^{FP}	25	Cut-off = 0,5
ELISA-	1^{FN}	151^{VN}	152	Se = 96,2%
	26	151	177	Sp = 100%

VP : vrais positifs VN : vrais négatifs
FN : faux négatifs FP : faux positifs
* : un échantillon avec une absorbance supérieure au cut-off choisi est considéré comme positif

Tableau II. Classification des résultats obtenus en isolement viral au laboratoire.

	V+	V-	
IV+	32^{VP}	3^{FP}	35
IV-	8^{FN}	963^{VN}	971
	40	966	1006

Se = 80%
Sp = 99,7%
VP- >99% ($5\% \leq p \leq 0,1\%$)
VP+ variant de 93,1% ($p = 5\%$) à 20,5% ($p = 0,1\%$)

Discussion

L'analyse épidémiologique de l'ELISA montre que ce dernier peut être appliqué sur le terrain comme une méthode de référence pour la détection d'antigène BVDV chez les bovins infectés de manière persistante.

Des Ac monoclonaux dirigés contre deux protéines différentes du virus BVD, dont la protéine non structurale de 80 kDa relativement bien conservée parmi les différentes souches de virus BVD [5,6], ont été utilisés dans le but de diminuer le pourcentage de faux

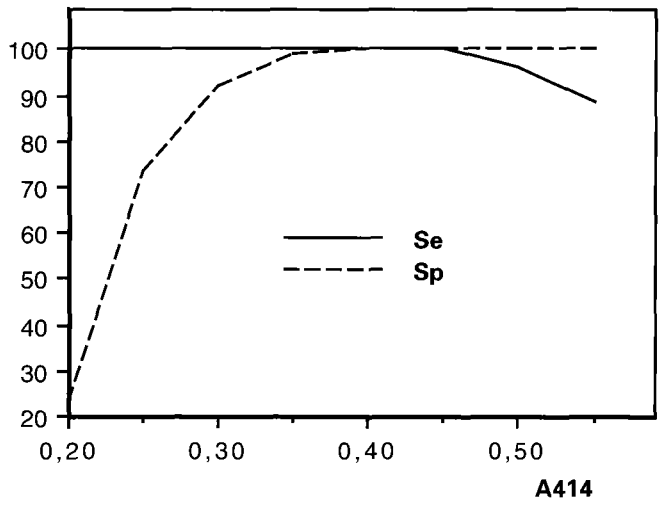


Figure 1. Sensibilité (Se=VP/(VP+FN)) et spécificité (Sp=VN/(VN+FP)) de l'ELISA pour différentes valeurs de cut-off (A414). Le test est considéré comme positif si A414 est supérieure au cut-off choisi.

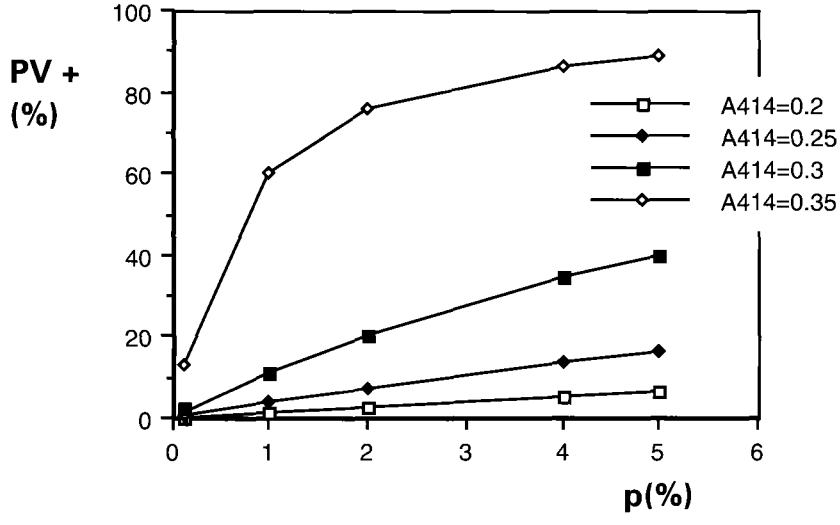


Figure 2. Valeur prédictive d'un résultat positif (PV+=pSe/{pSe+(1-p)(1-Sp)}) de l'ELISA pour différentes valeurs de cut-off et de prévalence (p).

négatifs. Ce but a été atteint puisque, pour un cut-off égal ou inférieur à 0,45, la sensibilité de l'ELISA était égale à 100%, la spécificité demeurant égale ou supérieure à 90% pour un cut-off supérieur à 0,3. Ces valeurs de Se et Sp, supérieures à celles de l'isolement viral, indiquent que l'ELISA apparait approprié pour détecter les animaux infectés persistants par le virus BVD. Cette conclusion est renforcée par les hautes valeurs prédictives d'un résultat positif et négatif obtenues en ELISA pour un cut-off égal à 0,4 ou 0,45, même à faible prévalence.

Les Se, Sp et VP de l'ELISA étant supérieures à celles de l'isolement viral et les 2 tests étant bien corrélés, l'ELISA pourrait remplacer l'isolement viral, qui reste actuellement la seule méthode officiellement admise pour la détection des animaux infectés persistants par le virus BVD. Par ailleurs, l'ELISA est beaucoup moins lourd à mettre en oeuvre que l'isolement viral; il est globalement moins coûteux et plus rapide. Il constitue donc un outil intéressant pouvant avoir sa place dans des programmes sanitaires visant à l'éradication de l'infection par le virus BVD.

Références

1. Bennet R.M., Done J.T. (1986). Control of the bovine pestivirus syndrome in cattle : a case for social cost-benefit analysis ? *Proc Soc Vet Epid Prevent Med*, Thrusfield, Edimbourg.
2. Boulanger D.,Waxweiler S., Karelle L., Loncar M., Mignon B., Dubuisson J., Thiry E., Pastoret P.P. (1991). Characterization of monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus: evidence of a neutralizing activity against gp48 in the presence of goat anti-mouse immunoglobulin serum. *J Gen Virol* ; 72 : 1195-1198.
3. Brownlie J. (1990). Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine virus diarrhoea virus. *Vet Microbiol* ; 23 : 371-382.
4. Brownlie J., Clarke M.C., Howard C.J., Pocock D.H. (1987). Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection of cattle. *Ann Rech Vet* ; 128 : 157-166.
5. Collet M.S., Moennig V., Horzinek M.C. (1989). Recent advances in Pestivirus research. *J Gen Virol* ; 70 : 253-266.
6. Donis R.O., Dubovi E.J. (1987). Differences in virus-induced polypeptides in cells infected by cytopathic and non-cytopathic biotypes of bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus. *Virology* ; 158 : 168-173.
7. Jenicek M., Cleroux R. (1983). Epidémiologie. Principes. Techniques. Applications. Edisem Inc., Ste Hyacinte, Québec.
8. Martin S.W., Meek A.H., Willeberg P. (1987). *Veterinary Epidemiol.ogy Principles and methods*. Iowa state University press.
9. Mignon B., Dubuisson J., Baranowski E., Koromyslov I., Ernst E., Boulanger D., Waxweiler S., Pastoret P.P. (1991). A monoclonal ELISA for bovine diarrhoea pestivirus antigen detection in persistently infected cattle. *J Virol Methods* ; 35 : 177-188.
10. Waxweiler S., Karelle-Bui-Thi L., Sneyers M., Lambert A.F., Delchambre M., Dubuisson J., Thiry E., Antoine H., Dive M., Detal G., Pastoret P.P. (1989). Circulation de souches non-cytopathogènes du virus BVD-MD dans des lots de taurillons. *Ann Méd Vét* ; 133 : 681-690.

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 183-188.

17

Etude par ELISA de compétition de l'immunité contre le virus de la peste bovine chez les bovins du Sénégal

J. SARR, M. DIOP

ISRA, Dakar, Sénégal.

La longue période de sécheresse que traverse le Sahel a durement éprouvé le cheptel bovin du Sénégal, entraînant des pertes directes considérables par mortalité (10% à 30% environ selon les régions), mais aussi des pertes indirectes non chiffrables au niveau des productions et de la productivité. A cette menace s'ajoute aujourd'hui la peste bovine qui est réapparue après une longue période d'accalmie, dans de nombreux pays africains. Au Sénégal, l'effort de vaccination a permis la disparition de la maladie depuis 1968, mais la situation qui prévaut dans les pays limitrophes montre que la menace reste permanente.

La situation immunitaire du cheptel national effectuée en 1991 [3,4], montre que des efforts doivent être réalisés dans de nombreuses zones, en particulier au niveau des régions frontalières avec la Mauritanie et le Mali. L'absence de campagne annuelle de vaccination dans la plupart des régions en 1991-1992 a du également affecter les taux de séro-conversion. L'objectif de cette enquête est :

- d'évaluer la baisse des taux d'immunité, en particulier chez les catégories d'animaux les plus jeunes,
- d'orienter, compte tenu des résultats, la stratégie des campagnes dans une perspective d'éradication de la peste bovine,
- de renforcer la base de données pour améliorer le système d'information en santé animale avec les pays voisins.

Matériel et méthodes

Les prélèvements

Dix départements, sur les trente que compte le Sénégal, ont été tirés au hasard et visités à raison d'un troupeau, également choisi au hasard, par communauté rurale.
Au niveau de chaque troupeau tiré de l'urne, sont prélevés 40 animaux selon les classes d'âge :
- 10 animaux âgés de $0 < x < 1$ an,
- 10 animaux âgés de $1 < x < 2$ ans,
- 10 animaux âgés de $2 < x < 3$ ans,
- 10 animaux âgés de $x > 3$ ans.

Au total, 4200 prélèvements ont été effectués pour une estimation correcte de la prévalence en anticorps contre la peste bovine dans l'intervalle de confiance de 95%.

Le test

Le test utilisé pour la recherche des anticorps contre le virus de la peste bovine est l'ELISA de compétition [1,2] (plaques ELISA Nunc maxisorp, monoclonal anti-proteine H du virus peste bovine).

Le conjugué est constitué par un sérum de lapin anti-immunoglobulines de souris (Dako P 260) conjugué à la péroxydase.

Le substrat et le chromogène sont l'eau oxygénée et l'orthophénilène diamine (OPD).
Le pourcentage d'inhibition (PI) est calculé de la façon suivante :
PI = 100- (< DO de l'échantillon/ DO contrôle AcM > x 100).

Les valeurs d'inhibition supérieures à 50% sont considérées comme Peste bovine positives.

Résultats

Tous les résultats sont regroupés dans le Tableau I et les Figures 1 et 2.

Région de Diourbel

Au total, 270 prélèvements ont été réalisés dans les 11 communautés rurales du département. La couverture immunitaire moyenne est de 73% seulement, alors qu'il n'y a pas eu d'interruption dans les campagnes annuelles de vacination depuis 1968. Les catégories les plus réceptives restent les classes d'animaux de 1 à 2 ans avec respectivement 60% et 34% de séro-positifs.

Région de Fatick

269 prélèvements ont été réalisés sur la terre ferme et 371 au niveau des Iles du Saloum. La couverture immunitaire est relativement bonne chez les animaux âgés de 2 ans, avec 82,8%, excellente chez les plus de 3 ans, avec 90%. L'absence de campagne de vaccination en 1991-1992 a entraîné une baisse du taux d'immunité chez les jeunes : 15,4% chez les moins de 1 an, et 18,7% chez ceux âgés de 1 à 2 ans.

Région de Kaolack

75% des 308 prélèvements réalisés se sont révélés positifs. Tous les animaux âgés de plus de 2 ans disposent d'une bonne couverture immunitaire avec 87,5% chez les 2 à 3 ans et 92% chez ceux âgés de plus de 3 ans. Les taux d'immunité restent toujours faibles che les jeunes : 17,4% chez les moins de 1 an, contre 40,6% pour la classe des 1 à 2 ans.

Région de Louga

Au total, 547 prélèvements ont été effectués. Le taux moyen de séro-conversion positive est de 63%. Aucune classe d'âge n'atteint le taux d'immunité de 85%, généralement considéré comme étant la limite à partir de laquelle le virus de la peste bovine ne peut plus circuler à l'intérieur d'un troupeau.

Région de Tambacounda

Les résultats globaux montrent un taux moyen de séro-conversion positive faible : 60% environ. Aucune catégorie d'animaux, même ceux âgés de plus de 3 ans, ne dispose d'une couverture immunitaire suffisante. Les taux les plus faibles se rencontrent, comme partout ailleurs, chez les animaux les plus jeunes.

Région de Kolda

Sur les 607 prélèvements analysés, seuls les animaux âgés de plus de 3 ans disposent d'un taux supérieur à 85%. Il n'y a pas de communauté rurale disposant d'une couverture immunitaire qui puisse empêcher toute circulation de virus bovipestique.

Tableau I . Situation immunitaire de la peste bovine au Sénégal (% de séro-positifs)

Région	0<x<1 an	1<x<2 ans	2<x<3ans	x>3ans	Taux moyen
Diourbel	60	34	77	85	73
Fatick	15,4	18,7	82,8	90	67
Kaolack	17,4	40,6	87,5	92	75
Louga	53	37	67	86	63
Tambacounda	27	34	55	81	60
Kolda	31	22	66	90	67
Saint Louis	29	16	58	84	64
Ziguinchor	33	28,8	68,5	87	91,7
Taux moyen en fonction de l'âge	33,8	28,8	68,5	72,8	60,32

Région de Saint-Louis

64% seulement des animaux visités possèdent des anticorps contre le virus de la Peste bovine. Seule la catégorie des plus de 3 ans dispose d'un taux d'immunité voisin de 85%. Chez les jeunes âgés de 0 à 3 ans, qui représentent près de 60% de la population totale de la région, les taux restent généralement faibles.

Région de Ziguinchor

161 prélèvements ont été effectués dans cette région La situation immunitaire moyenne est de 72,6% d'animaux séropositifs. Les taux d'immunité dépassent tous 85% chez toutes les catégories d'animaux âgés de plus de 2 ans.

Discussion

Il est admis aujourd'hui qu'il faut une couverture immunitaire moyenne de 85% ou plus pour assurer à un troupeau ou à un cheptel bovin, quel qu'il soit, une protection efficace contre d'éventuelles contaminations ou de circulation de virus bovipestique sauvage.

Au niveau de la région de Diourbel, aucun troupeau visité ne dispose de ce taux de couverture immunitaire.

A Fatick, 28% seulement des troupeaux ont un taux supérieur ou égal à 85%, contre 34% dans la région de Kaolack et 19% à Louga.

Aucun troupeau visité ne possède ce taux dans les régions de Tambacounda, de Kolda et de saint-Louis.

La région de Ziguinchor semble donc avoir la meilleure couverture immunitaire avec près de 40% des troupeaux.

Enfin, il n'y a aucune région qui dispose d'une couverture immunitaire suffisante pouvant la mettre à l'abri d'une circulation éventuelle de virus en cas de contamination. Néanmoins, chez les animaux âgés de plus de 3 ans, ce taux est généralement atteint dans toutes les régions sauf à Tambacounda et Saint-Louis.

Chez les catégories d'animaux âgés de 2 à 3 ans, une couverture immunitaire suffisante existe à Fatick et Ziguinchor. Partout ailleurs, elle reste à améliorer.

Au niveau des moins de 2 ans, cette couverture est généralement insuffisante dans tout le pays.

Compte tenu de l'importance de cette catégorie d'animaux par rapport au cheptel bovin national (30% à 40% environ), la peste bovine pourrait revêtir, en cas de contamination, des allures épizootiques, en particulier dans les zones où, par manque d'intérêt, les éleveurs présentent de moins en moins l'ensemble des animaux aux campagnes annuelles de vaccination, pourtant obligatoires.

Cependant, des efforts ciblés sur les catégories les plus jeunes, devraient permettre, au Sénégal, et à moindre coût, d'améliorer considérablement les acquis de nombreuses campagnes annuelles de vaccination, depuis la dernière Campagne Panafricaine pour l'éradication de la peste bovine en Afrique, appelée PC15 de 1962 à 1969, pour l'Afrique de l'Ouest et du Centre.

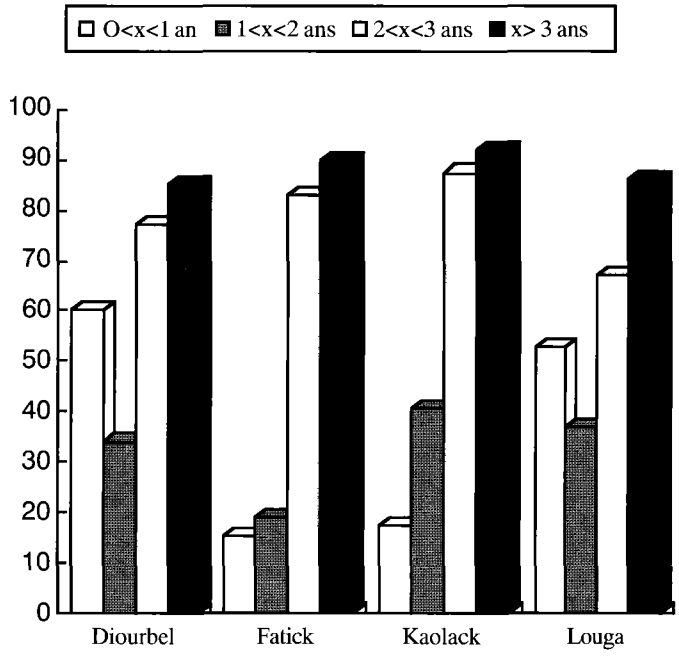


Figure 1. Situation immunitaire de la peste bovine dans les régions I.

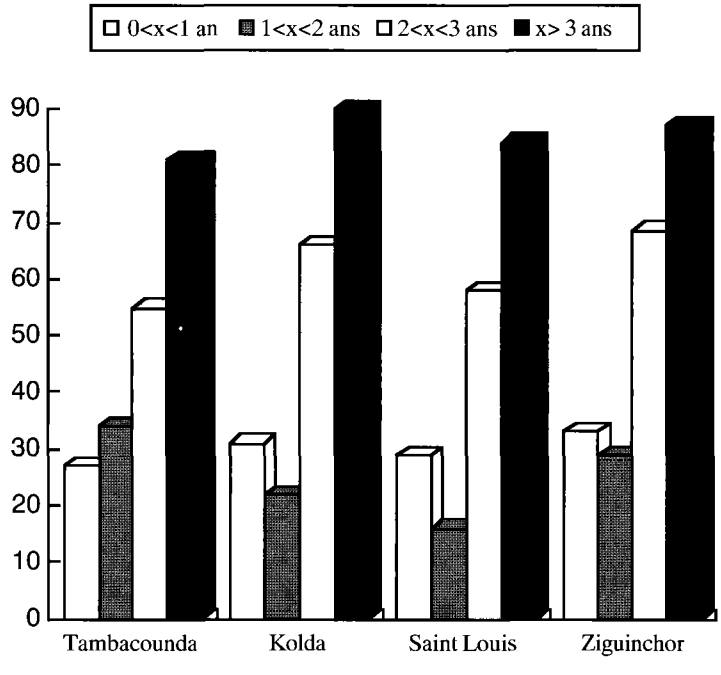


Figure 2. Situation immunitaire de la peste bovine dans les régions II.

Références

1. Anderson J. *et al.* (1991). In : The sero-monitoring of rinderpest troughout Africa phase I. AIEA TECDOC 623 Vienna 55.
2. Rinderpest Competitive ELISA, Bench protocil. Version RPV 1,0. AIEA TECDOC Sept 1991
3. Sarr J., Diop M. (1991). Situation immunitaire de la peste bovine au Sénégal. Direction des Recherches sur les Productions et la Santé Animales (ISRA), Dakar, Sénégal, 250 p; Dec. 1991.
4. Sarr J., Diop M. (1992). La peste bovine au Sénégal : Etat immunitaire du cheptel bovin national. In : The sero-monitoring of Rinderpest troughout Africa Phase II. AIEA/ FAO/ SIDA/ OUA/ IBAR/ PARC coord meet. Entebbe, Uganda 15-21 Sept. 1992.

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 189-197.

18

Utilisation de l'amplification en chaîne par polymérase pour la détection du virus de la peste équine à partir d'échantillons cliniques

S. ZIENTARA, C. SAILLEAU, S. MOULAY

CNEVA-Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires, Maisons-Alfort, France.

Résumé

La peste équine est une maladie virale qui affecte les équidés et plus particulièrement les chevaux dont elle provoque très fréquemment la mort. Le virus (AHSV ou African horse sickness virus) est transmis par l'intermédiaire d'insectes piqueurs, notamment les culicoïdes qui sont des vecteurs biologiques. Le virus appartient à la famille des Réoviridae *et au genre* Orbivirus. *Neuf sérotypes viraux ont, à ce jour, été décrits. Cet article décrit l'utilisation de la méthode combinée de transcription inverse et d'amplification en chaîne par polymérase pour la détection des ARN génomiques du virus de la peste équine, à partir d'échantillons cliniques. Les ARN totaux ont été extraits à partir de 100 mg de 19 rates de chevaux infectés par le virus AHSV sérotype 4 (le virus a été isolé de chacune des rates) par la méthode d'extraction à l'isothiocyanate de guanidium. Des rates de 10 chevaux non infectés ont été soumises au même traitement. L'ARN a ensuite été dénaturé par l'hydroxyde de méthyl mercure. Dans un même tube et en une seule manipulation, l'ADN complémentaire du segment génomique 7 est synthétisé par la transcriptase inverse du virus de la myéloblastose aviaire et amplifié par la Taq polymérase. Les fragments géno-*

miques amplifiés sont visualisés sur gel d'agarose (1179 pb) et leur spécificité vérifiée par l'analyse de leurs profils de restriction obtenus avec 8 enzymes. Aucun fragment n'a été amplifié à partir de rates de chevaux non infectées.

La peste équine est une maladie virale qui affecte les équidés et plus particulièrement les chevaux dont elle provoque très fréquemment la mort. Le virus (AHSV ou African horse sickness virus) est transmis par l'intermédiaire d'insectes piqueurs notamment les culicoïdes [5] qui sont des vecteurs biologiques. Le virus appartient à la famille des *Réoviridae* et au genre *Orbivirus* [16]. Neuf sérotypes viraux ont, à ce jour, été décrits [8]. En juillet 1987, l'Espagne fut déclarée infectée de peste équine (virus du sérotype 4). La maladie frappa aussi le Portugal en 1989, puis le Maroc la même année.

Le génome du virus équipestique est constitué de dix molécules d'ARN double-brin [1,10]. La capside externe de ce virus nu est composée de deux protéines majeures (VP2 et VP5) qui portent les sites de fixation au récepteur cellulaire et les épitopes de neutralisation.

La capside interne est composée de deux protéines majeures (VP3 et VP7) [2,4] et de trois protéines mineures (VP1, VP4 et VP6). Des protéines non-structurales (NS1, 2, 3 et 4) [6,9] sont aussi présentes dans les cellules infectées.

Les méthodes classiques de diagnostic direct de cette infection sont l'inoculation intracérébrale aux souriceaux nouveau-nés et l'infection aux cultures cellulaires (BHK1 ou cellules Vero). Le diagnostic sérologique repose sur la recherche des anticorps fixant le complément qui est la méthode officielle.

Mais aucune de ces méthodes n'est suffisamment sensible et précoce pour détecter de faibles quantités de virus.

Nous décrivons l'utilisation de la méthode combinée de transcription inverse et d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR pour "Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction") pour la détection des ARN génomiques viraux à partir d'échantillons cliniques.

Matériel et méthodes

Echantillons cliniques

Deux groupes de 10 et 19 échantillons de rates de chevaux suspects d'être morts de peste équine nous ont été fournis par le Dr El-Harrack (Laboratoire Biopharma, Maroc) et par le Dr Hooghuis du laboratoire de référence communautaire d'Algete (Madrid). Un échantillon d'une rate prélevée sur un cadavre d'un cheval marocain d'une région non-infectée par la peste nous a aussi été adressé. Dix rates non infectées prélevées sur des cadavres de chevaux français ont été utilisées aussi comme témoins négatifs (Tableau I).

Tableau I. Caractéristiques (année et origine géographique) des échantillons spléniques analysés par RT-PCR.

Echantillon N°	Origine	Année	Isolement viral	Résultats par PCR
1	Kenitra (Maroc)	1989	-	+
2	Ouarzazate (Maroc)	1989	+	+
3	Khouribga (Maroc)	1989	+	+
4	Taounate (Maroc)	1989	+	+
5	Boulaouane (Maroc)	1989	+	+
6	Missour (Maroc)	1989	-	+
7	Fes (Maroc)	1989	+	+
8	Agadir (Maroc)	1989	+	+
9	Tahla (Maroc)	1989	+	+
10	Oujda (Maroc)	1989	- (témoin négatif)	-
11	Espagne	1990	+	+
12	Espagne	1990	+	+
13	Espagne	1990	+	+
14	Espagne	1990	+	+
15	Espagne	1990	+	+
16	Espagne	1990	+	+
17	Espagne	1990	+	+
18	Espagne	1990	+	+
19	Espagne	1990	+	+
20 à 29	France	de 1990 à 1993	- (témoins négatifs)	-

Recherches virales

Les recherches virales ont été réalisées par inoculation par voie intracérébrale à des souriceaux nouveau-nés et par inoculation à des cultures de cellules Vero (réf. ATCC* CCl 81) cultivées en boîtes de 175 cm^2 avec du milieu RPMI 1640 supplémenté par du sérum de veau fœtal (8%), de la streptomycine (100 l/µl) et de la pénicilline (100 UI/ml) [7]. Le sérotype est déterminé par la méthode de séroneutralisation [11].

Extraction des acides nucléiques

Les ARN totaux sont extraits de 100 mg de prélèvements de rates (infectées ou non infectées) par la méthode de Chominczynski et Sacchi [3] à l'isothiocyanate de guanidium.

Cent mg de tissu splénique sont broyés et homogénéisés en présence d'une solution D (d'isothiocyanate de guanidium 4M, 25 mM citrate de sodium, pH 7, sarcosyl 0,5%, β-

* American Type Culture Collection

mercap-toéthanol 0,5M). Après extraction au phénol-chloroforme isoamylalcool (24:1), la solution obtenue est centrifugée à 13 000 tours/minute à 4°C.

Vingt unités de RNAsin (40 U/µl ; Boehringer-Mannheim, Meylan, France) sont ajoutés à la phase aqueuse récupérée et qui contient les ARN. Les ARN sont précipités par l'isopropanol à -20°C pendant une nuit. Le culot obtenu après centrifugation (13 000 tours/minute, pendant 10 minutes) est repris dans 150 µl de la solution D et précipité par l'isopropanol 2 heures à -20°C. Après centrifugation, le culot est resuspendu dans 1 ml d'éthanol à 75%, précipité, séché sous vide et repris dans 10 µl d'eau traitée par le diéthylpyrocarbonate (DEPC).

Le même protocole est employé pour préparer les acides nucléiques extraits de cultures cellulaires infectées et non-infectées utilisées comme témoins positifs et négatifs.

Amplimères

Les amplimères ont été sélectionnés à partir de la séquence publiée [13] du segment 7 du virus AHSV-4 (souche isolée en Espagne en 1987). Les oligonucléotides choisis permettent l'amplification entière du gène 7 [18].
La taille du segment génomique est de 1179 pb et le poids moléculaire de $7{,}7.10^5$ Da [13].
Les séquences des deux oligonucléotides sont respectivement :
5'GTTAAAATTCGGTTAGGATG3' et 5'GTAAGTGTATTCGGTATTGA3'.

RT-PCR

Les ARN db, repris sous un volume de 2,5 l, sont dénaturés par l'addition d'un volume égal d'hydroxyde de méthyl mercure 0,02 M et laissés 10 minutes à température ambiante [17].

Après réduction de l'hydroxyde de méthyl mercure par addition de 1 µl de β-mercaptoéthanol 0,7 M, 2 µl de RNAsin sont ajoutés (5 minutes à température ambiante).

Tous les réactifs nécessaires à la transcription inverse et à l'amplification en chaîne par polymérase sont ajoutés simultanément dans le même tube Eppendorf (0,5 ml) et les deux réactions sont effectuées pendant le même cycle de programmation dans le thermocycleur [15].

Quatre µl du mix sont ajoutés à 100 µl de Tris, pH 8,8, 50 mM KCl, 200 µM de chaque dNTP, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,1 mg/ml de gélatine, 10 pmol de chaque paire d'amplimères. Dix unités de la transcriptase inverse du virus de la myéloblastose aviaire (AMV-RT, Appligène, Illkirch, France) et 7 unités de la Taq polymérase (Boerhinger-Mannheim) sont ajoutées dans chaque tube. Le rapport RT-Taq est inférieur à 3:2 comme le recommandent Sellner *et al* [14]. Après addition de 100 µl d'huile minérale, les tubes sont incubés dans un thermocycleur PTC 100/60 (Prolabo). Le protocole des cycles thermiques est le suivant : 1 heure à 37°C, 5 minutes à 95°C, 40 cycles à 55°C pendant 1 minute, 70°C pendant 2 minutes et 95°C pendant 1 minute puis une étape d'extension terminale à 70°C pendant 8 minutes.

Analyse des produits de la PCR

Dix µl du produit d'amplification de chaque réaction est déposé sur un gel d'agarose à 2% (1% Nu-sieve/1% Sea-kem) (Nalgène, Tebu), dans un tampon Tris-borate EDTA 1 X. La

migration s'effectue pendant 2 heures à 100 V. Après trempage dans du bromure d'éthidium, le gel est observé au transilluminateur. La migration des fragments viraux amplifiés est comparée à celle d'ADN marqueurs de poids moléculaires (marqueur de Boehringer-Mannheim, cat. n° 10662590).

Analyse par polymorphisme des profils de restriction

Des aliquotes de 10 µl des produits d'amplification obtenus à partir des ARN génomiques de chaque sérotype sont hydrolysés par des enzymes de restriction (10 U par réaction) : *Asn* I, *Bam* HI, *Hinf* I, *Pvu* II, *Sac* I, *Sph* I, *Cfo* I (Boehringer-Mannheim) et *Hph* I (Ozyme) sous un volume total de 20 l à 37°C pendant 2 heures.

Les fragments de digestion sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% [18].

Résultats

Recherches virales

Le virus de la peste équine a été isolé à partir de tous les échantillons suspects (rates espagnoles et marocaines) à l'exception des rates marocaines n°1 (Kenitra) et 6 (Missour). Les tests de neutralisation ont confirmé que les virus (souches espagnoles et marocaines) appartenaient au sérotype 4

RT-PCR

Un seul segment de 1179 pb est observé sur gel d'agarose après amplification à partir d'acides nucléiques extraits de cultures cellulaires infectées (Figure 1, puits 2), de cerveaux de souriceaux infectés (Figure 1, puits 3 à 5) et d'échantillons spléniques (Figure. 2A-2B, puits 10).

Figure 1. Produits d'amplification après électrophorèse sur gel d'agarose. Puits 1 : cellules Vero non infectées ; puits 2 : cellules infectées par AHSV-4 ; puits 3 à 5 : cerveaux de souriceaux nouveau-nés infectés par AHSV-4 ; puits 6 et 7 : cerveaux de souriceaux non infectés. Le marqueur de poids moléculaire (M) est le plasmide de pBR 328 digéré par *Bgl* I et *Hinf* I.

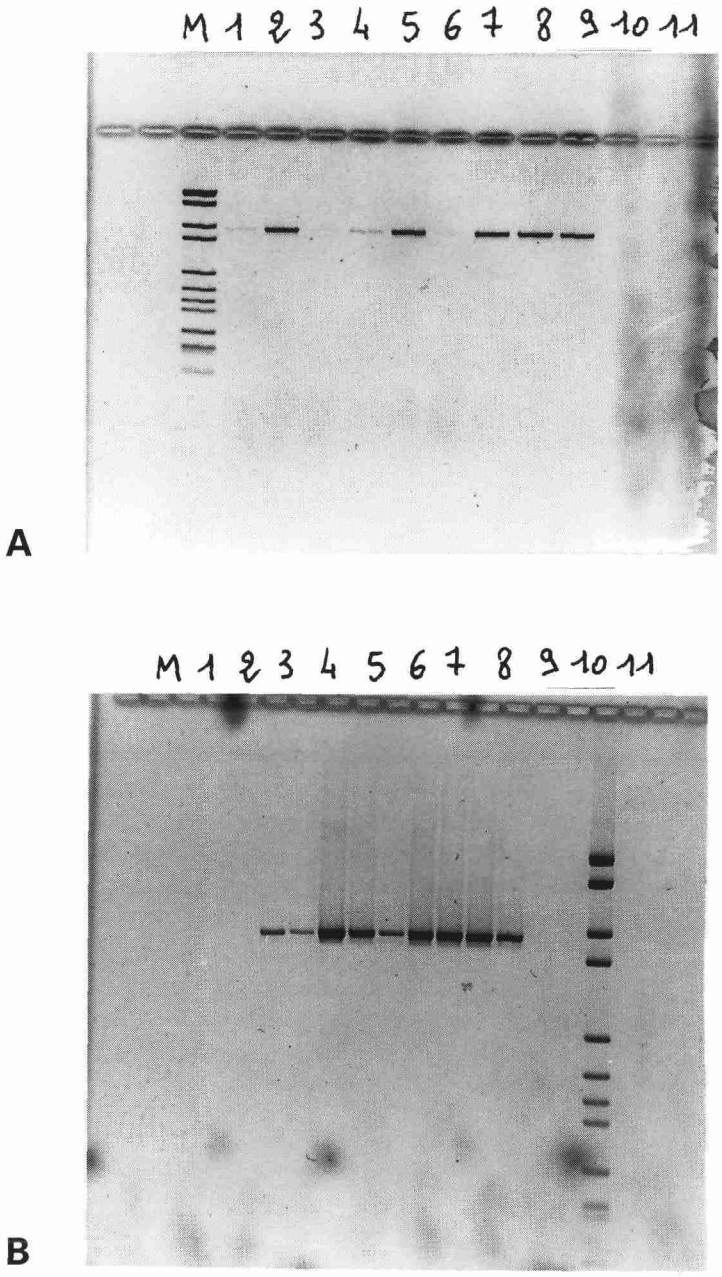


Figure 2. Produits d'amplification obtenus après RT-PCR à partir de rates infectées prélevées sur des chevaux marocains (A) et espagnols (B). A : puits 1 à 9 : rates de chevaux infectés ; puits 10 : rate de cheval marocain non infecté. B : puits 1 à 9 : rates de chevaux infectés ; puits 10 : rate non infectée ; puits 11 : témoin négatif (absence d'ADNc). Le marqueur de poids moléculaire (M) est le plasmide digéré par le *Bgl* I et *Hinf* I.

La Figure 3 représente l'électrophorèse des fragments obtenus après digestion de l'ADN complémentaire (ADNc) du gène 7 du virus AHSV-4 de la souche marocaine par huit enzymes de restriction pour vérification de la spécificité du produit d'amplification. Le profil de restriction obtenu est identique à celui de l'ADNc du gène 7 de la souche espagnole du virus AHSV-4 (données personnelles ; [18]).

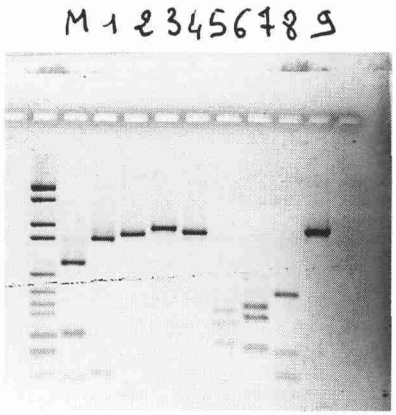


Figure 3. Vérification de la spécificité du produits d'amplification après RT-PCR du segment génomique 7 de la souche marocaine du virus AHSV-4 par polymorphisme de restriction. Puits 1 : *Sac* I ; puits 2 : *Hinf* I, : puits 3 : *Bam* H I ; puits 4 : *Pvu* II ; puits 5 : *Sph* I ; puits 6 : *Asn* I ; puits 7 : *Hph* I ; puits 8 : *Cfo* I et puits 9 : ADNc amplifié non digéré. M : marqueur de poids moléculaire.

Comparaison RT-PCR et recherches virales

Le Tableau I résume les résultats respectifs de l'amplification génique RT-PCR et des recherches virales à partir des échantillons biologiques. Dix-huit échantillons spléniques (n°1 à 9 et n°11 à 19) se sont avérés être positifs par RT-PCR. De seize d'entre eux, le virus a pu être isolé par inoculation aux cultures cellulaires et des échantillons n°1 et 6, aucun virus n'a pu être isolé.

Discussion

La mise au point d'une technique RT-PCR effectuée en une seule étape pour la détection du virus de la peste équine est décrite. La transcription inverse ("reverse transcription") suivie d'une amplification en chaîne par polymérase ("polymerase chain reaction" ou PCR) des ARN db génomiques du virus équipestique par l'emploi d'amplimères spécifiques, associées à une analyse du polymorphisme de restriction, constitue une méthode sensible et relativement rapide pour la détection et l'identification du virus AHSV à partir d'échantillons cliniques.

La technique RT-PCR détecte moins de 600 DCP_{50} (doses cytopathogènes 50%) (à partir de cultures cellulaires infectées) alors que l'ELISA sandwich n'en détecte que $2,5x10^3$ DCP_{50} [7]. Mais les DCP_{50} ne sont qu'une mesure du pouvoir infectieux et leur corrélation avec le nombre de particules virales, et donc de génomes viraux, n'est pas nécessairement proportionnel. Bien que la RT-PCR se soit révélée positive, aucun virus n'a pu être isolé à partir des deux échantillons 1 et 6. Ces résultats divergents peuvent s'expliquer par une très faible quantité de particules virales dans l'échantillon clinique ou par une inactivation du virus équipestique à cause d'un délai trop long entre la mort de l'animal et le prélèvement biopsique, ainsi que par les mauvaises conditions de conservation de l'échantillon. Par contre, les ARN génomiques ont pu être amplifiés.

Le diagnostic de laboratoire dans le cas d'une suspicion d'épizootie de peste équine ne doit pas être uniquement basé sur des analyses sérologiques (car un grand nombre d'animaux infectés peuvent mourir avant que les anticorps ne soient décelables) [12], mais sur la détection du virus dans les échantillons cliniques (rates, sang, coeur...) prélevés sur cadavres. La technique d'amplification en chaîne par polymérase est une méthode de détection spécifique, sensible et rapide (les résultats sont obtenus en moins de 48 heures alors que plusieurs jours sont parfois nécessaires pour l'isolement viral). Mais de par l'emploi de quelques réactifs parfois dangereux qu'elle nécessite, et de par les contraintes de locaux et les précautions que cette technique impose afin d'éviter les contaminations, la PCR reste encore réservée à des laboratoires spécialisés.

Remerciements

Nous tenons à remercier le Dr Hooghuis du laboratoire de référence communautaire (Madrid) et le Dr El-Harrack (laboratoire Biopharma à Rabat) pour les échantillons qu'ils nous ont adressés. Ce travail a été financé par la Communauté Economique Européenne (projet 8001-CT 91-0211).

Références

1. Bremer C.W. (1976). A gel electrophoretic study of the protein and nucleic acid components of African horsesickness virus. *Onderstepoort J Vet Res* ; 43 : 193-200.
2. Bremer C.W., Huismans H., Van Dijk A.A. (1990). Characterization and cloning of the African horsesickness virus genome. *J Gen Virol* ; 71 : 793-799.
3. Chomczynski P., Sacchi N. (1987). A single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* ; 162 : 156-159.
4. Chuma T., Le Blois H., Sanchez-Vizcaino J.M., Diaz-Laviada M., Roy P. (1992). Expression of the major core antigen VP7 of the African horsesickness virus by a recombinant baculovirus and its use as a group-specific diagnostic reagent. *J Gen Virol;* 73 : 925-931.
5. Du Toit R.M. (1944). The transmission of bluetongue and horse sickeness by Culicoïdes. *Onderstepoort J Vet Res* ; 50 : 536-541.
6. Grubman M.J., Lewis S.A. (1992). Identification and characterization of the structural and non-structural proteins of African horsesickness virus and determination of the genome coding assignments. *Virology* ; 186 : 444-451.
7. Laviada M.D., Babib M., Dominguez J., Sanchez-Vixcaino J.M. (1992). Detection of African horsesickness in infected spleens by a sandwich ELISA using two monoclonal antibodies spe-

cific for the VP7. *J Virol Methods* ; 38 : 229-242.

8. Mc Intosh B.M. (1958). Immunological types of horsesickness virus and their significance in immunization. *Onderstepoort J Vet Res I* ; 27 : 465-538.
9. Mizukoshi N., Sakamoto K., Iwata A., Tsuchiya T., Ueda S., Watanabe T., Kamada M., Fukusho A. (1992). The complete sequence of African horsesickness virus serotype 4 (vaccine strain) RNA segment 5 and its predicted polypeptide compared with NS 1 of bluetongue virus. *J Gen Virol* ; 73 : 2425-2428.
10. Oellermann R.A., Els H.J., Erasmus B.J. (1970). Characterization of African horsesickness virus. *Arch Gesamte Virusforsch* ; 29 : 163-174.
11. Reed L.J., Muench H. (1938). Simple method of estimating 50 percent end points. *Am J Hyg ;* 27 : 493.
12. Rodriguez M., Hooghuis H., Castano M. (1993). Current status of the diagnosis and control of African horsesickness. *Vet Res* ; 24 : 189-197.
13. Roy P., Hirasawa T., Fernandez M., Blinov V.M., Sanchez-Vixcaino R. (1991). The complete sequence of the group-specific antigen, VP 7, of African horsesickness disease virus serotype 4 reveals a close relationship to bluetongue virus. *J Gen Virol* ; 72 : 1237-1241.
14. Sellner L.N., Coellen R.J., Mackenzie J.S. (1992). Reverse-transcriptase inhibits Taq polymerase activity. *Nucl Acids Res* ; 20 : 1487-1490.
15. Sellner L.N., Coellen R.J., Mackenzie J.S. (1992). A one-tube, one manipulation RT-PCR reaction for detection of Ross River Virus. *J Virol Methods* ; 40 : 255-264.
16. Verwoerd D.W., Huismans H., Erasmus B.J. (1979). Orbiviruses. In : Fraenkel-Conrat H., Wagner R.R. eds. *Comprehensive Virology*, Plenum Press , New York, 14 : 285-345.
17. Wade-Evans A.M., Mertens P.P.C., Bostock C.J. (1990). Development of the polymerase chain reaction for the detection of bluetongue virus in tissue samples. *J Virol Methods* ; 30 : 15-24.
18. Zientara S., Sailleau C., Moulay S., Crucière C. (1993). Diagnosis and molecular epidemiology of the African horsesickness virus by the polymerase chain reaction and restriction patterns. *Vet. Res* ; in press.

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 199-204.

19

Les vaccins produits par ingéniérie génétique

P.P. PASTORET, B. BROCHIER, D. BOULANGER, M. DENIS, E. THIRY

Département de Virologie-Immunologie, Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège, Sart Tilman, Liège, Belgique.

Si l'obtention d'animaux génétiquement résistants à certaines maladies est un rêve que caressent actuellement les généticiens, l'approche traditionnelle de la protection envers les maladies infectieuses, tout particulièrement celles d'origine virale, demeure la vaccination [6].

Cependant, la difficulté de disposer de certains principes actifs dans des conditions économiquement acceptables et le risque potentiel de contamination humaine ou de l'environnement sont des facteurs limitant le développement des vaccins classiques. Dans de rares cas même, l'impossibilité de multiplier le virus ou le parasite condamne toute approche vaccinale conventionnelle. La recombinaison génétique, en permettant l'intégration de gènes étrangers dans un génome hôte et leur expression, a ouvert de nouvelles voies de production des vaccins; cette technique impose de connaître le ou les antigènes actifs portés par le virus, la bactérie ou le parasite et d'isoler le ou les gènes qui les codent (ou leur ADN complémentaire dans le cas des virus à ARN). Ces gènes sont alors insérés

dans différents systèmes vecteurs-hôtes : l'expression par un système procaryote ou eucaryote permet l'obtention d'antigènes qui, purifiés, fournissent les principes actifs de vaccins sous-unitaires. L'expression par des systèmes viraux (poxvirus, virus herpès, ...) donne naissance à des virus recombinants qui sont utilisés comme vaccins vivants ou, dans de plus rares cas (intégration de l'antigène néoformé au niveau de l'enveloppe ou de la capside virale), comme vaccins inactivés. Des bactéries peuvent également être utilisées comme vecteur (BCG,...).

Un nombre croissant d'immunogènes est actuellement identifié et les gènes qui les codent peuvent être insérés dans des systèmes vecteurs d'expression. Les vaccins obtenus par les techniques de l'ingénierie génétique offrent en outre l'avantage de pourvoir les souches de marqueurs, permettant ultérieurement de distinguer les animaux vaccinés des animaux infectés. D'excellents exemples nous sont fournis dans le domaine de la santé animale par la lutte contre la maladie d'Aujeszky, à l'aide de virus délétés et par la vaccination antirabique du renard par voie orale, à l'aide du virus recombinant vaccine-rage.

Les déterminants antigéniques susceptibles d'induire une réponse immune protectrice peuvent parfois être synthétisés : ce sont de courts peptides qui doivent être couplés à des protéines porteuses et injectés avec des adjuvants appropriés. La technique des peptides branchés permet actuellement d'obtenir une immunisation à l'égard de peptides sans devoir recourir à une molécule porteuse. Si d'importants progrès doivent encore être réalisés dans la connaissance des déterminants antigéniques, les premiers résultats obtenus confirment cependant la fiabilité d'une vaccination fondée sur la synthèse chimique des déterminants antigéniques utilisés. Une contrainte majeure reste cependant le polymorphisme des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité, indispensables à une réponse immune cellulaire. C'est pourquoi, les virus vecteurs offrent encore de nombreux avantages pour la délivrance d'antigènes hétérologues appropriés.

La récente description d'un virus de la vaccine délété en de nombreux gènes (NYVAC) [11] offre à cet égard de nouvelles perspectives, tant en médecine humaine que vétérinaire. Une autre solution réside dans l'emploi de poxvirus aviaires pour la vaccination chez l'homme. Un virus recombinant du canaripox, comportant le gène codant pour la glycoprotéine de la rage et présentant un cycle de multiplication abortif chez l'homme, en est actuellement au stade des premiers essais cliniques en France avec des résultats extrêmement prometteurs.

La réalisation d'ouverture comme NYVAC n'aurait pas été possible sans la connaissance préalable de la séquence complète en nucléotides du virus de la vaccine [7]. L'analyse de cette séquence et la comparaison des séquences de lecture ouverte avec les séquences codant pour d'autres protéines et déposées dans les banques de données, a montré que le virus de la vaccine et d'autres poxvirus codaient pour des protéines intervenant dans la régulation de la réponse immune, ouvrant ainsi un nouveau chapitre de la virologie générale [10]. L'application de cette technique a également permis de démontrer que l'herpèsvirus EBV code pour une protéine analogue à l'interleukine 10 et que certaines souches cytopathogènes du virus BVD possédaient des séquences codant pour une protéine analogue à l'ubiquitine.

D'autres améliorations pourraient se situer dans la gamme des vaccins disponibles.

En effet, certaines maladies attendent toujours leur vaccin, parmi celles-ci, nombre de maladies parasitaires et, bien sûr, le SIDA.

La lutte contre les maladies parasitaires se fonde encore essentiellement sur la chimiothérapie. L'immunité anti-parasitaire est un sujet de recherches particulièrement ardu et

les connaissances fondamentales qui permettraient le choix de stratégies adéquates pour l'élaboration de vaccins font souvent défaut. Les recherches en immunité anti-parasitaire méritent cependant un soutien accru car l'utilisation de vaccins efficaces permettrait de réduire considérablement l'emploi d'anti-parasitaires. Cette réduction est hautement souhaitable, dans la mesure où certains d'entre eux ont des effets néfastes sur l'environnement. Des progrès spectaculaires sont déjà obtenus dans la lutte contre les tiques en Australie, à l'aide de vaccins à base d'antigènes cryptiques.

Enfin, une dernière innovation est attendue : la mise au point de vaccins anti-parasitaires pour bloquer le cycle de parasitoses responsables d'anthropozoonoses comme les taenioses. De premiers résultats encourageants ont été obtenu en matière de cysticercose ovine. L'utilisation de vaccins capables d'interrompre le cycle de transmission de *Taenia saginata* avant la formation de cysticerques, non seulement révolutionnerait les habitudes et les concepts en hygiène des denrées alimentaires, mais introduirait également une nouvelle dimension dans le rôle de la médecine vétérinaire en élevage bovin.

Enfin, la récente description d'une immunisation à l'aide d'ADN nu ouvre de toutes nouvelles perspectives en vaccinologie [4,5].

Exemple de développement : le recombinant vaccine-rage

Construction

Les souches atténuées du virus rabique utilisées pour la vaccination antirabique du renard par voie orale présentent certains inconvénients; en effet la souche SAD/B19, actuellement largement employée sur le terrain, est pathogène pour les micromammifères. Une amélioration a été l'obtention de mutants avirulents (mutants qui échappent à la neutralisation par des anticorps monoclonaux) par modification de l'arginine située en position 333 de la glycoprotéine. Ces mutants présentent l'inconvénient d'une potentialité de réversion. En outre les souches atténuées résistent mal lorsqu'elles sont soumises aux conditions adverses du milieu extérieur.

En vue d'améliorer à la fois la sécurité, l'efficacité et la stabilité du vaccin utilisé sur le terrain, un virus recombinant vaccine-rage a été construit [8].

La construction du virus recombinant vaccine-rage exprimant la glycoprotéine immunisante du virus de la rage (souche VVTGgRAB-26D3 187XP) n'a pas suivi une voie classique et certains problèmes particuliers ont dû être résolus. Tout d'abord, c'est à cette occasion que la technique d'isolement des virus recombinants de la vaccine a été améliorée en introduisant un double système de sélection; l'addition d'une mutation de thermosensibilité dans le virus de la vaccine a permis de sélectionner en une fois des virus qui, pour la plupart, sont les recombinants recherchés. De plus, la séquence en acides aminés déduite de l'ADNc ne correspondait pas parfaitement aux autres séquences publiées, car le huitième codon de l'ADNc codait pour une leucine et non pour une proline. Or la présence d'une leucine pouvait conduire à une structure aberrante et un codon proline a été introduit dans l'ADNc par mutagenèse localisée. Il est ultérieurement apparu que seule la glycoprotéine comportant une proline en position 8 est capable de conférer une protection contre la rage. Des cellules animales infectées par le virus recombinant produisent une grande quantité de glycoprotéine rabique dont la structure est probablement identique à

celle de la protéine native, comme cela a notamment été démontré à l'aide d'anticorps monoclonaux.

Dans le recombinant utilisé, l'ADNc correspondant à la glycoprotéine de la souche ERA du virus rabique a été inséré dans le gène codant pour la thymidine kinase (TK) du virus de la vaccine (souche Copenhague). Le VVTGgRAB est actuellement produit en lignée continue VERO.

Efficacité du virus recombinant

Lorsque 10^7TCID$_{50}$ du VVTGgRAB sont directement administrés dans la bouche, 100% des renards (*Vulpes vulpes*) adultes sont protégés à l'égard d'une inoculation d'épreuve sévère [1]. Une dose de 10^8 est nécessaire lorsque le vaccin est contenu dans un appât. Administrée par voie orale à des renardeaux, une dose de 10^7TCID$_{50}$ du VVTGgRAB induit une réponse humorale satisfaisante et permet de protéger 92% des animaux à l'égard d'une épreuve virulente. La durée de l'immunité conférée par le recombinant est au minimum de 18 mois chez l'animal adulte, ce qui correspond à la durée de vie réelle du renard.

Innocuité du virus recombinant

Avant d'utiliser le virus recombinant vaccine-rage dans la nature, il était important de s'assurer de sa parfaite innocuité pour l'espèce cible et les espèces non-cibles, ainsi que de l'absence d'excrétion et de transmission du virus. Aucun signe clinique et aucune lésion n'ont été mis en évidence chez les renards chez lesquels le virus recombinant a été administré par voie orale.

L'absence de pathogénicité a été confirmée quelle que soit la dose inoculée (de 10^2 à 10^{10}TCID$_{50}$) ou la voie d'administration (orale, intramusculaire, intraduodénale, sous-cutanée, intradermique (scarification), conjonctivale ou intranasale). L'absence de pathogénicité du VVTGgRAB administré par voie orale a été démontrée chez la souris de laboratoire, le lapin, le furet (*Putorius furo*), les bovins, le chat, le chien, le porc et le mouton. De plus, l'innocuité du recombinant a été démontrée chez de nombreuses espèces animales sauvages qui pourraient entrer en compétition avec le renard dans la consommation des appâts en Europe [2]. Les espèces suivantes ont été utilisées : le sanglier (*Sus scrofa*), le blaireau d'Eurasie (*Meles meles*), le mulot sylvestre (*Apodemus sylvaticus*), le mulot à collier (*Apodemus flavicollis*), le campagnol des champs (*Microtus arvalis*), le campagnol agreste (*Microtus agrestis*), le rat taupier (*Arvicola terrestris*), le campagnol roussâtre (*Clethrionomys glareolus*), la buse variable (*Buteo buteo*), le faucon crécerelle (*Falco tinnunculus*), la corneille noire (*Corvus corone*), la pie bavarde (*Pica pica*) et le geai (*Garrulus glandarius*). Les autopsies pratiquées n'ont permis de déceler de lésions de type Pox au niveau de la muqueuse buccale ou de la peau, chez aucun des animaux examinés. Pendant une durée d'observation d'un minimum de 28 jours, aucun signe clinique ou aucune lésion n'ont été observés chez aucun des 107 animaux vaccinés. L'absence de mortalité, tout particulièrement chez les micromammifères est un avantage notable du recombinant par rapport aux souches atténuées du virus de la rage.

Pour mesurer l'excrétion et pour juger d'une éventuelle transmission horizontale du recombinant, des animaux sentinelles non vaccinés ont été maintenus en contact étroit avec les vaccinés. Aucune transmission n'a été observée chez le renard, le chien, le chat,

les bovins, le furet, le blaireau et le sanglier. L'utilisation de plusieurs techniques n'a pas permis de démontrer la présence de virus dans la salive, les glandes salivaires, le sang et les organes internes de renards peu après l'inoculation. La technique très sensible d'amplification génique [12] a permis de mettre la multiplication du virus en évidence uniquement au niveau des amygdales, de la muqueuse buccale et du voile du palais, tout comme pour la souche parentale du virus de la vaccine. Le virus recombinant ne présente pas de glycoprotéine du virus rabique au niveau de son enveloppe et sa réceptivité tissulaire n'est donc pas modifiée.

Il était également important d'éliminer tout risque épizootiologique potentiel comme l'émergence de porteurs asymptomatiques de virus sauvage par vaccination d'animaux en cours d'incubation. Une étude expérimentale a montré que ce risque pouvait être exclu, puisque la vaccination d'animaux en cours d'incubation produit un phénomène de mort précoce ou retardée

Dissémination volontaire du virus recombinant vaccine-rage

Du fait de son efficacité, de sa parfaite innocuité et de sa stabilité, le virus recombinant vaccine-rage s'est imposé comme une excellente alernative aux souches atténuées de virus rabique actuellement utilisées sur le terrain. C'est pourquoi, un premier essai de vaccination antirabique a été pratiqué à l'aide de cette souche virale, dans le courant du mois d'octobre 1987 [9]. L'expérience préliminaire a été menée sur 600 hectares d'un terrain militaire qui en compte 2700. Cet essai a permis de confirmer l'innocuité du procédé, mais n'a pas permis de juger de son efficacité du fait de la faible étendue traitée. De nouveaux essais ont donc été entrepris en Belgique en octobre 1988 sur un terrain beaucoup plus étendu (436km2) et en novembre 1989, avril et octobre 1990, en collaboration avec les équipes françaises, sur un territoire de plus de 2700 km2 afin de se mettre dans les conditions requises pour juger de son efficacité.

Les résultats obtenus permettrent d'espérer l'éradication de l'infection [3]. Le vaccin recombinant est actuellement utilisé sur l'ensemble du territoire contaminé au grand-duché de Luxembourg et en Belgique et sur la plus grande partie de celui-ci en France. Plus aucun cas de rage n'a été détecté en Belgique depuis mars 1993.

Références

1. Blancou J., Kieny M.P., Lathe R., Lecocq J.P., Pastoret P.P., Soulebot J.P., Desmettre P. (1986). Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia virus. *Nature* ; 322 : 373-375.
2. Brochier B., Blancou J., Thomas I., Languet B., Artois M., Kieny M.P., Lecocq J.P., Costy F., Desmettre P., Chappuis G., Pastoret P.P. (1989). Use of recombinant vaccinia-rabies glycoprotein virus for oral vaccination of wildlife against rabies : innocuity to several non-target bait consuming species. *J Wild Dis* ; 25 : 540-547.
3. Brochier B., Kieny M.P., Costy F., Coppens P., Bauduin B., Lecocq J.P., Languet B., Chappuis G., Desmettre P., Afiademanyo K., Libois R., Pastoret P.P. (1991). Large-scale eradication of rabies using recombinant vaccinia-rabies vaccine. *Nature* ; 354 : 520-522.
4. Cohen J. (1993). Naked DNA points way to vaccines. *Science* ; 259 : 1691-1692.
5. Cox G.J.M., Zamb T.J., Babiuk L.A. (1993). Bovine herpesvirus 1 : immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. *J Virol* ; 67 : 5664-5667.

6. Desmettre P., Chappuis G. (1990). Vaccins et vaccination. In : Pastoret P.P., Govaerts A., Bazin H,eds. *Immunologie animale.* Flammarion, Médecine-Sciences, Paris, France.
7. Goebel S.J., Johnson G.P., Perkus M.E., Davis S.W., Winslow J.P., Paoletti E. (1990). The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology* ; 179 : 247-266.
8. Pastoret P.P., Brochier B., Blancou J., Artois M., Aubert M., Kieny M.P., Lecocq J.P., Languet B., Chappuis G., Desmettre P. (1992). Development and deliberate release of a vaccinia-rabies recombinant virus for the oral vaccination of foxes against rabies. In : M. M. Binns, G. L. Smith, eds. *Recombinant Poxviruses.* CRC Press, Baton Roca, USA, 163-206.
9. Pastoret P.P., Brochier B., Languet B., Thomas I., Paquot A., Bauduin B., Costy F., Antoine H., Kieny M.P., Lecocq J.P., Debruyn J., Desmettre P. (1988). First field trial of fox vaccination against rabies with a vaccinia-rabies recombinant virus. *Vet. Rec* ; 123 : 481-483.
10. Ray C.A., Black R.A., Kronheim S.R., Greenstreet T.A., Sleath P.R., Salvesen G.S., Pickup D.J. (1992). Viral inhibition of inflammation : cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1b converting enzyme. *Cell* ; 69 : 597-604.
11. Tartaglia J., Perkus M.E., Taylor J., Norton E.K., Audonnet J.C., Cox W.I., Davis S.W., Vanderhoeven J., Meignier B., Rivière M., Languet B., Paoletti E. (1992). NYVAC : a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology* ; 188 : 217-232.
12. Thomas I., Brochier B., Languet B., Blancou J., Peharpré D., Kieny M.P., Desmettre P., Chappuis G., Pastoret P.P. (1990). Primary multiplication site of the vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus administered to foxes by the oral route. *J Gen Virol* ; 71 : 37-42.

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 205-208.

20

LEUCOGEN : un exemple de vaccin sous-unité

P. BAYCHELIER

Laboratoires Virbac, Carros, France.

Le virus FeLV

Le virus de la leucémie féline (FeLV, *feline leukaemia* virus) est un rétrovirus (sous-famille des *Oncornavirinae*, c'est-à-dire virus oncogènes à ARN). C'est un virus enveloppé. Deux de ses protéines ont une importance particulière : la glycoprotéine d'enveloppe gp70 (de 70 kilodaltons) et la protéine p27, protéine de la nucléocapside (de 27 kilodaltons).

La gp70 est responsable des phénomènes de reconnaissance membranaire entre le virus et la surface des cellules qu'il infecte : il s'agit d'une reconnaissance spécifique entre récepteurs cellulaires et certaines parties de la gp70. La protéine p27 est une protéine qui est produite en excès lors de la multiplication active du virus dans l'organisme : on la retrouve à l'état libre dans le sang, où elle est classiquement détéctée par les tests ELISA du commerce (on parle d'antigénémie).

Le FeLV infecte les cellules de la lignée blanche en particulier. Après adsorption du virion sur la membrane, l'ARN et la transcriptase inverse sont en quelque sorte injectés dans le cytoplasme de la cellule : l'ARN y est transcrit de façon réverse en ADN qui se duplique pour s'intégrer dans son génome. A ce stade, le virus se nomme provirus, et toutes les cellules filles de la cellule infectée seront elles-mêmes infectées. Après un laps

de temps plus ou moins longs (latence), le provirus va s'exprimer et la cellule va produire, par bourgeonnement, de nouveaux virions capables d'infecter d'autres cellules. C'est aussi à ce stade que la p27, produite en excès, se retrouve dens le sang.

Le FeLV existe sous forme de 3 sous-groupes différents : A, B et C. Ce ne sont pas des sérotypes, et le seul moyen de les différencier est de faire un test d'interférence virale *in vitro.*

Seul le sous-groupe A est infectieux. Il est remarquablement stable sur le plan antigénique. En particulier, la séquence de la gp70 est toujours la même d'un isolat à l'autre.

Les différents sous-groupes de type B apparaissent à la suite de recombinaison du provirus A avec des séquences endogènes de FeLV. Ces séquences endogènes sont normalement présentes dens le génome de tous les chats et correspondent à des virus apparentés au FeLV qui sont devenus détectifs, c'est-à-dire incapables de se multiplier, au cours de l'évolution. Les FeLV de type B diffèrent du type A par la séquence en acides aminés de leur gp70. Il y a de très nombreuses possibilités de recombinaison entre le provirus du type A et les séquences endogènes de FeLV, donnant pratiquement un sous-groupe B différent par chat infecté, lorsqu'il y a reconbinaison. On isole le sous-groupe A dans 100% des cas d'infection et les sous-groupes A et B dans 50% des cas.

C'est également par recombinaison, mais avec des oncogènes du génome félin, cette fois-ci, que le provirus A peut déclencher l'apparition de tumeurs (leucémie).

Enfin, pour être précis, il faut aussi citer les sous-groupes C. Eux aussi diffèrent du sous-groupe A par la séquence d'acides aminés de la gp70. Ils apparaissent, non par recombinaison avec le génome félin, mais par mutation. On ne les isole que dans 1% des cas d'infection, toujours en association avec le type A.

Il faut donc retenir que seul le FeLVA est infectieux.

Sur le plan de la pathogénie, on doit retenir qu'après une phase d'invasion accompagnée d'une multiplication locale à la porte d'entrée (amygdales), puis d'une virémie par portage intracellulaire, les organes lymphoïdes plus profonds,ainsi que la moelle osseuse sont atteints, ce qui entraîne une très forte virémie (d'origine médullaire) : le virus est alors libre dans le sang et peut coloniser tout l'organisme; on le retrouve dans toutes les sécrétions et excrétions du chat.

De façon naturelle, 40% des chats se débarrasent du virus de façon précoce, au stade de virémie intracellulaire (et ne manifestent donc qu'une virémie transitoire). 30% des chats deviennent porteurs latents (provirus intégré dans le génome, pas de virémie, pas d'antigénémie). 30% développent une virémie persistante, laquelle évolue ensuite vers les pathologies (tumeurs, immunodéficience) et 80% des chats virémiques persistants meurent dans les 3 ans suivant l'infection.

Le vaccin LEUCOGEN

Conception

Il paraissait donc logique de s'intéresser au sous-groupe de type A pour le développement d'un vaccin. La grande difficulté a été d'isoler la séquence nucléotidique codant pour la gp70 du sous- groupe A. En effet, il fallait travailler sur le provirus, c'est-à-dire sur le virus à l'état intégré, car le virus est trop fragile. Or, les cellules félines sont pourvues de très nombreuses séquences endogènes qui ont grandement compliqué la tâche. La séquen-

ce isolée, il a été plus simple de l'intégrer à un plasmide. Le plasmide introduit dans *E. coli* a permis d'obtenir une bactérie recombinante capable de synthétiser le squelette protéique de la gp70 (*E. coli* ne glycosyle pas les protéines). On la nomme p45 (45 kilodaltons).

Cette protéine, extraite d'*E. coli* et purifiée, est mélangée à un sytème de deux adjuvants de l'immunité : l'hydroxyde d'aluminium et une fraction purifiée du Quil A.

Le mélange a donné toutes satisfactions sur le plan de l'efficacité et de la sécurité.

Efficacité

Six essais de laboratoire avec épreuve virulente ont tous donnés des résultats au moins statistiquement significatifs (*) et en général très hautement significatifs (***) (Figure 1)

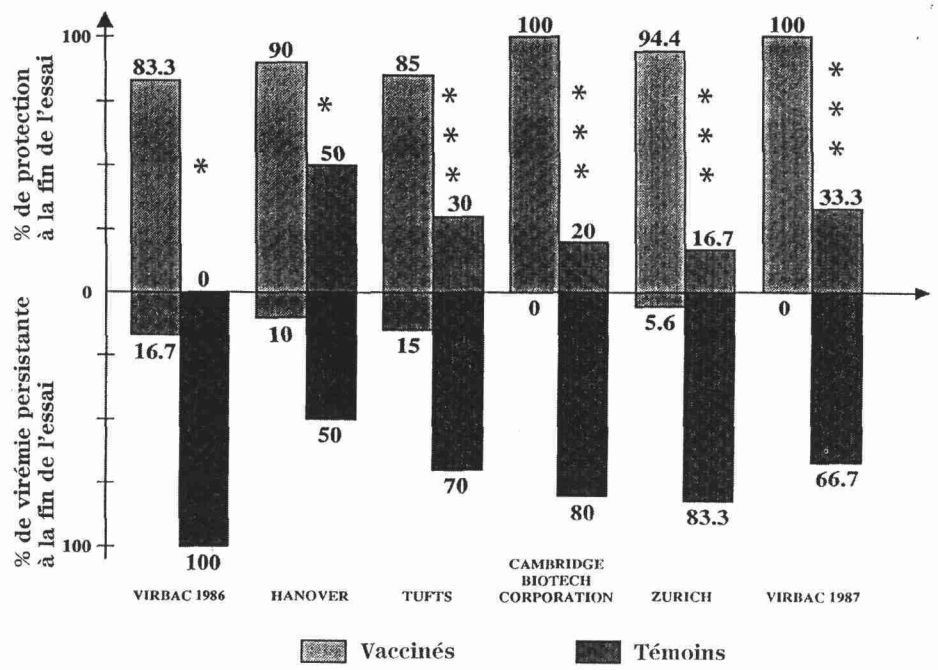


Figure 1. Six essais de laboratoire avec épreuve virulente sur chats EOPS.

Le diagramme résume ces essais réalisés sur chats EOPS. L'épreuve virulente a été très sévère puisque en moyenne 75% des témoins ont été infectés de façon persistante par le virus d'épreuve (contre 30% dans les conditions naturelles).

Sur le terrain, sur plus de 100 chats vivant dans des conditions diverses (80% d'entre eux en refuge), on a obtenu une séroconversion dans 95% des cas (apparition d'anticorps chez les animaux sans anticorps) et tous les chats p27 négatifs sont restés p27 négatifs tout au long de l'étude qui a duré plus d'un an.

Innocuité

L'innocuité du vaccin est due à sa parfaite pureté chimique : protéine p45, hydroxyde d'aluminium et Quil A purifié.

Cette innocuité a été vérifiée aussi bien au laboratoire que sur le terrain.

Au laboratoire, les essais ont porté sur 89 chats ayant reçu 2 ou 3 doses successives par voie sous-cutanée ou intramusculaire. Durant la période d'observation (2 à 15 semaines), les paramètres suivants ont été étudiés : poids vif, symptômes locaux et généraux, température rectale et réultats hématologiques. Il n'y a pas eu de différence avec les groupes témoins d'animaux non vaccinés du même âge.

Sur le terrain, plus de 1000 chats de propriétaires ont été étudiés. Ils ont reçu 2 injections successives à 2-3 semaines d'intervalle, soit par voie sous-cutanée, soit par voie intramusculaire. Sur l'ensemble des injections, 3,8% ont été suivies d'un court épisode fébrile et/ou d'anorexie et 1,4% de l'apparition d'un nodule au point d'injection. Les autres réactions furent représentées par des épisodes de diarrhée ou de vomissement ou de douleur (1,4% des injections). Un seul cas d'anaphylaxie a été noté.

Le contrôle de la qualité de chaque lot de production est également assuré sur animaux avant de pouvoir être commercialisé : les tests sont réalisés sur souris, cobayes et chats. Ces derniers reçoivent une double dose de vaccin et ne doivent montrer aucune réaction locale ou générale pendant les 2 semaines qui suivent l'injection.

Enfin, le recul que nous avons nous permet de confirmer l'excellente sécurité du vaccin, puisqu'à ce jour, plus de 3 millions de doses de LEUCOGEN ont été vendues dans le monde.

Conclusion

LEUCOGEN permet donc de protéger contre l'infection par FeLV de façon sûre et efficace :

- primovaccination : 2 injections réalisées à 2-3 semaines d'intervalle, en sous-cutanée, sur des chats âgés de 9 semaines ou plus,
- rappel annuel.

Il est conseillé de vérifier l'absence d'infection par le FeLV avant de vacciner les animaux.

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 209-220.

21

Séroprotection virale bovine chez le veau : application, cas

I. TURKI*, Y. ELAZHARY**, R. ELAZHARY**

* *Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire, Sidi Thabet, Tunisie.*
** *Faculté de Médecine Vétérinaire, Saint Hyacinthe, Canada.*

Le complexe "diarrhée virale bovine (DVB)-maladie des muqueuses (MM)" est une maladie infectieuse, affectant essentiellement les bovins, due à un virus appartenant désormais à la famille des *Flaviviridae* [7,26]. Elle se traduit par des manifestastions cliniques très diverses touchant plusieurs appareils, essentiellement les organes de la reproduction et le tube digestif.

Elle fut décrite pour la première fois en Amérique du Nord [25]. Plus tard, l'agent causal fut rapporté un peu partout dans le monde [12,27]. Une enquête sérologique, réalisée dans divers pays, a montré que 60 à 80% des veaux testés étaient positifs [16]. Au Québec, une étude des sérums soumis à des fins de diagnostic étaient positifs et le même résultat a été obtenu en France suite à une étude sérologique effectuée par Dannacher et Moussa [11]. La séroprévalence est donc très élevée, ce qui pose un problème majeur, aussi bien dans le dépistage de la maladie, que dans les mesures de lutte. Par ailleurs,les systèmes de protection pratiqués actuellement, basés sur l'administration du colostrum et sur la vaccinaton, ne semblent pas efficaces [22].

Les animaux les plus sensibles aux infections par le VDVB sont les veaux. Ceux dépourvus d'anticorps maternels se trouvent démunis de toute défense face à une éventuelle infection par le VDVB, et l'immunisation active des veaux n'est efficace qu'après un délai de 15 à 20 jours, période dans laquelle l'animal est susceptible à l'infection.

Le but de notre travail est d'améliorer les mesures immunoprophylactiques par l'administration de sérum hyperimmun contre le VDVB chez le veau. Un second objectif vise à déterminer les polipeptides immunogènes du VDVB en relation avec les résultats sérologiques.

Matériel et méthodes

Animaux de l'expérience et protocole expérimental

Les animaux de l'expérience sont 5 vaches et 21 veaux, tous de race Holstein. Ils sont divisés en 3 lots :
- le premier est composé de 5 vaches auxquelles est injectée une suspension antigénique du VDVB pour l'obtention d'un sérum hyperimmun (SH).
- le deuxième lot est constitué de 13 veaux parmi lesquels 11 ont servi de témoins. L'analyse sérologique des prélèvements effectués sur ces animaux nous permet de définir les caractéristiques de la séroprotection (demi-vie des anticorps, choix de la dose, de la voie et de la fréquence d'injection).
- l'ensemble du 3ème lot, composé de 8 veaux, a subi une épreuve virulente avec un mélange de 2 souches virales : Singer et NADL, sachant que la moitié a reçu du SH et l'autre moitié a servi de témoin. Le protocole d'injection du sérum hyperimmun est défini selon les résultats de l'expérience faite sur le 2ème lot de veaux.

Production d'antigène et immunisation du lot 1

Une suspension antigènique de VDVB inactivée et adjuvée est utilisée pour immuniser des vaches afin de produire un sérum hyperimmun.

L'inactivation de la suspension de virus propagés sur cellules MDBK utilise un mélange de 2-bromoéthylamine hydrobromide (99%) et d'hydroxyde de sodium. Un adjuvant à la suspension virale inactivée est ajouté. C'est un mélange de Marcol et de Montanide à la proportion de 9:1 (v/v). Ce dernier mélange est ajouté à la suspension virale inactivée 1:1 (v/v).

Le contrôle de l'inactivation est fait sur culture cellulaire et l'innocuité est approuvée suite à l'administration de vaccin à deux jeunes bovins. Ces derniers n'ont pas présenté de complications post-vaccinales.

La fréquence des vaccinations est de 4 injections par semaine soit 16 injections au total par animal. A chaque vache, 4 ml de suspension antigénique sont injectés par voie intramusculaire.

Un contrôle sérologique hebdomadaire est réalisé afin de préciser le moment opportun pour procéder à la saignée des vaches dans le but de récolter du sérum hyperimmun à haut titre d'anticorps anti-VDVB et de l'injecter ensuite aux veaux.

Caractérisation de la séroprotection du lot 2

Le but de l'expérimentation sur le lot 2 est de caractériser la séroprotection par la sélection de la dose, de la fréquence et de la voie d'injection, et par la définition de la demi-vie des anticorps neutralisants.

Pour un litre de sérum hyperimmun obtenu de vaches, 4/3 de litre de sulfate d'ammonium froid à 40% de saturation est ajouté. Le culot est resuspendu dans du TPS (Tampon Phosphate Saline) pour y être dialysé. La lyophilisation du sérum est ensuite effectuée.

Partant d'une dilution de sérum hyperimmun lyophilisé à 30% (1,2 g de sérum dilué dans 4 ml de TPS), le test de séroneutralisation montre que notre sérum reconstitué neutralise 100 $DICT_{50}$ (Doses Infectantes de Culture de Tissus) de VDVB à la dilution 1/20480. Par conséquent, 1 ml de ce sérum non dilué équivaut à $10^{5,31}$ $DPCT_{50}$ (Doses Protectrices de Culture de Tissus).

Deux doses $d1=10^{6,3}$ $DPCT_{50}$ et $d2=10^{6,5}$ $DPCT_{50}$ permettent de comparer l'effet de doses. Une comparaison de l'effet de fréquence d'injection est faite par l'utilisation d'une simple et d'une double admimistration de sérum. Deux voies d'injection sont utilisées à savoir la voie intramusculaire et la voie intraveineuse.

Tous les veaux du $2^{ème}$ lot ont subi un contrôle sérologique hebdomadaire pendant 11 semaines afin d'évaluer le titre moyen d'anticorps aussi bien par la technique d'IFI (Imunofluorescence Indirecte) que par celle de la SN (Séroneutralisation). Les meilleurs critères de doses, de fréquence et de voie sont retenus pour la séroprotection des veaux du $3^{ème}$ lot.

Epreuve virulente du lot 3

La moitié des veaux appartenant au $3^{ème}$ lot ont reçu du sérum hyperimmun selon les critères définis dans l'expérience effectuée sur ceux du $2^{ème}$ lot. Tous les veaux du $3^{ème}$ lot ont été expérimentalement infectés pour étudier l'efficacité de la séroprotection.

L'épreuve virulente est effectuée par l'utilisation de deux souches cytopathogènes : NADL et Singer (titrant 10^5 DICT50/ml).

A partir de la date de l'infection expérimentale, les veaux sont surveillés cliniquement deux fois par jour (matin et soir). Chaque veau dispose d'une fiche clinique sur laquelle sont notés : des paramètres généraux et des paramètres respiratoires selon le système de cotation établi par Espinasse *et al.* [15].

L'isolement viral a été essayé, reposant sur la détection d'éventuel effet cytopathique. Le titre viral est donné par la dernière dilution qui provoque un effet cytopathogène dans 50% des puits et son calcul se fait selon la formule de Kaerber [18].

La spécificité de l'effet est confirmée par la technique d'immunoperoxydase.

Techniques sérologiques

Les techniques d'IFI, de SN et de RIP (Radioimmunoprécipitation) utilisées dans notre travail sont celles décrites respectivement par Silim et Elazhary [28], Corthier *et al.* [10], et Magar *et al.* [21]. Toutefois afin de les adapter aux conditions du laboratoire, ces techniques ont été modifiées.

Résultats

Etude de la réponse immunitaire des vaches hyperimmunisées (lot 1)

D'après la courbe représentée dans la Figure 1, les anticorps anti-VDVB n'apparaissent qu'au bout de 3 semaines. Ils commencent à croître d'une façon exponentielle jusqu'à former un plateau à partir de la 4ème semaine. Le titre devient constant autour de la 7ème semaine, délai dans lequel une saignée des vaches s'impose. Le pic correspond au titre moyen de 4457 (valeur Log = 8,402 "logarithme népérien") détecté par IFI. Le pic du titre moyen d'anticorps révélés par la SN est de 2229 (valeur Log = 7,709). La comparaison des résultats obtenus des deux tests IFI et SN montre une corrélation positive.

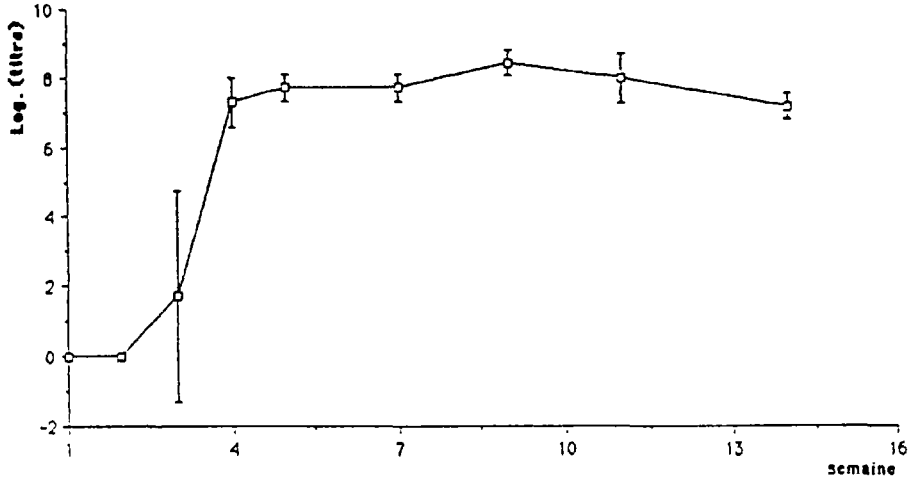


Figure 1a. Cinétique du titre moyen d'anticorps sériques anti-BVDV révélés par le test d'immunofluorescence chez 5 vaches.

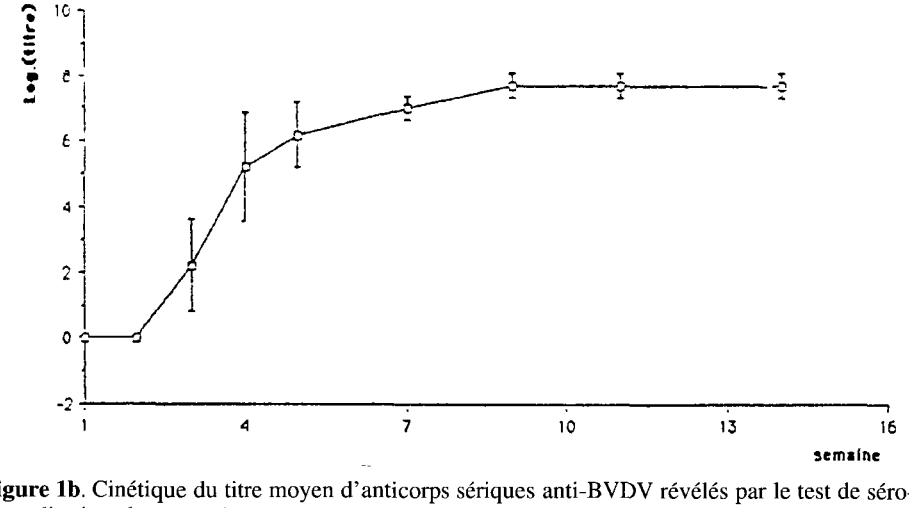


Figure 1b. Cinétique du titre moyen d'anticorps sériques anti-BVDV révélés par le test de séroneutralisation chez 5 vaches.

La Figure 2 montre à la 2ème colonne une immunoprécipitation des polypeptides viraux 66K et 55-53K en très faible quantité par rapport à celle des autres colonnes. Dès la 3ème semaine post-immunisation (colonne 4), une plus grande quantité de polypeptides immunoprécipités 65K et 55-53 K est obsevée. De plus, l'apparition d'autres bandes dues à l'immunoprécipitation des protéines : 120K, 80K, 47K, et 37K est notée. Les résultats sont reproductibles.

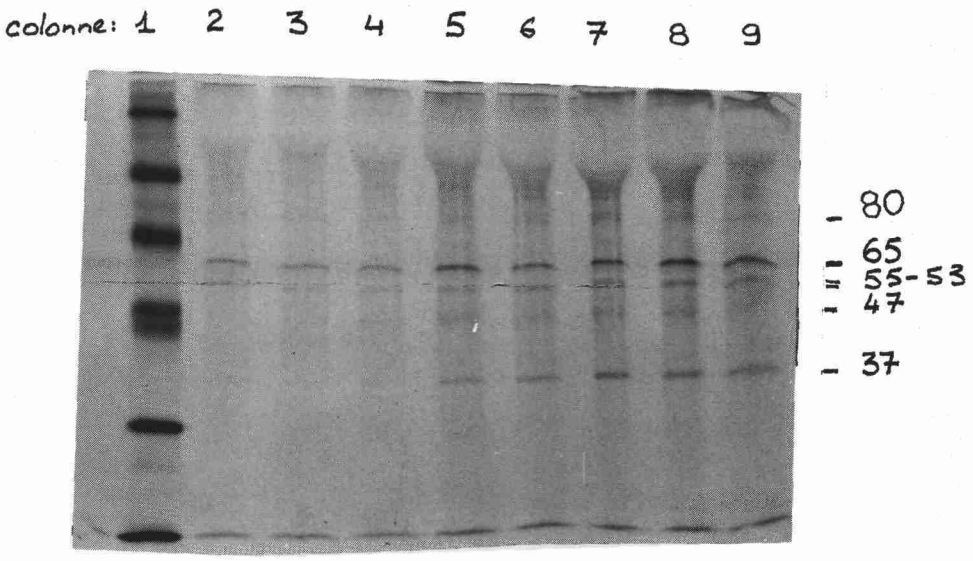


Figure 2. Immunoprécipitation par le test de RIP des polypeptides viraux marqués à la S35-Méthionine de la souche Singer à l'aide de sérums hyperimmums prélevés de la vache n° à différents moments de l'expérience : avant la vaccination (colonne 2) et à la 1ère, 2ème, 3ème, 4ème, 5ème, 7ème, 9ème, et 11ème semaine post-immunisation correspondant respectivement aux colonnes 3,4,5,6,7,8,9. La colonne 1 correspond à la précipitation de protéines marquées au C14, utilisées comme marqueurs.

Sélection du meilleur protocole de séroprotection (lot 2)

L'analyse statistique n'a pas révélé de différence significative, aussi bien pour la fréquence d'injection (simple ou double), que pour les doses utilisées (d1 et d2). Par contre, les résultats du test statistique ont révélé la présence d'une différence significative entre les deux voies d'injection à 1% (la valeur de F trouvée est de 9,52). La voie intramusculaire donne de meilleurs résultats que la voie intraveineuse (Figure 3).

Pour calculer la demi-vie des anticorps neutralisant le VDVB, la moyenne de titres d'anticorps est calculée à partir du 5ème jour post-injection car le titre moyen correspondant est le plus élevé. Dans la Figure 4, la chute des anticorps neutralisants et la droite théorique des moindres carrés sont schématisées. L'équation de cette droite a permis d'en déduire que la demi-vie est de 19 jours.

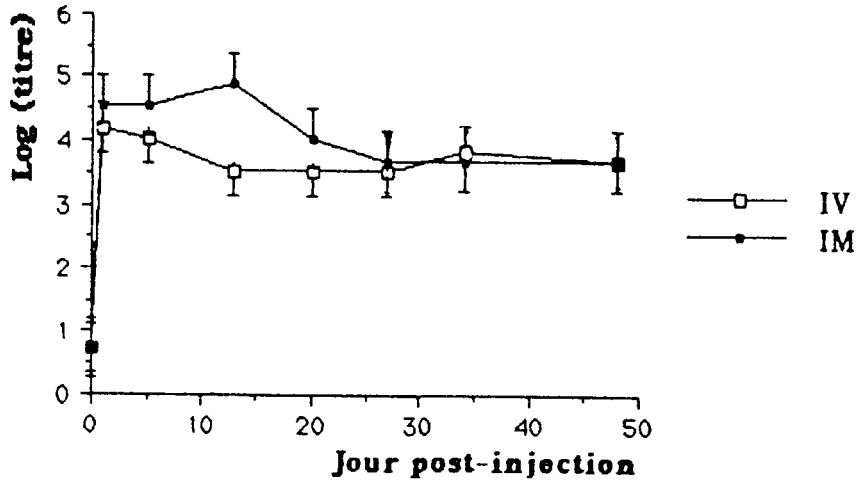


Figure 3. Evolution du titre moyen d'anticorps sériques anti-BVDV révélés par le test d'immunofluorescence chez deux groupes de veaux recevant du sérum hyperimmum par différentes voies (IV = intraveineuse; IM = intramusculaire).

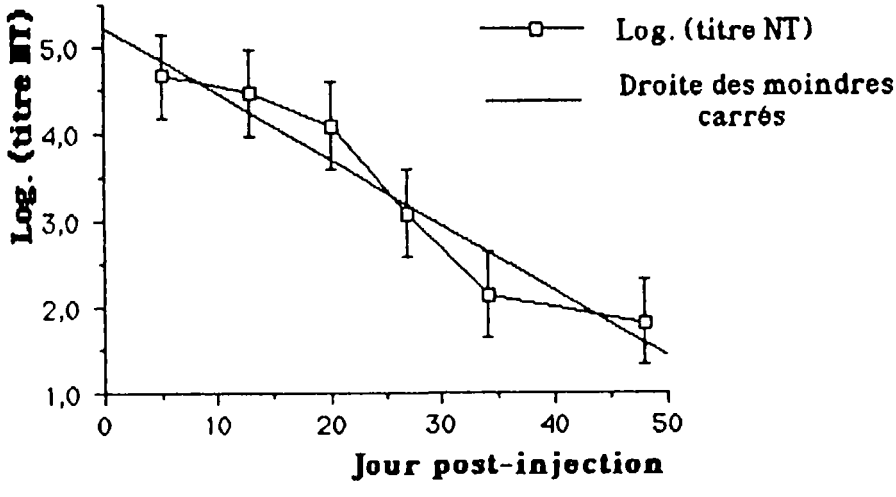


Figure 4. Chute du titre moyen d'anticorps sériques neutralisant le virus BVDV révélés par le test de séroneutralisation chez onze veaux, et représentation de la droite des moindres carrés.

Surveillance des signes cliniques et excrétion virale (lot 3)

Les résultats de l'épreuve virulente montrent que tous les veaux ont présenté une note globale inférieure à 2 excepté le veau n° 16. D'après Espinasse [15], si la note globale moyenne dépasse 2,1, l'animal est atteint d'une maladie grave. Le veau n° 16 a présenté une valeur égale à 2,42 et a succombé au 10ème jour d'expérience. C'est un veau qui, à l'arrivée, présentait un peu de diarrhée souillant le train postérieur et un écoulement nasal. La température, ainsi que la fréquence respiratoire,.étaient normales.

L'examen macroscopique du poumon de ce veau a montré la présence de zones de consolidation étendues dans les lobes crâniaux et moyens. Les parties affectées sont de couleur brun-rougeâtre. L'examen histologique de quelques prélèvements, effectués au niveau du même organe, a montré la présence d'hyperémie et d'une infiltration cellulaire modérée de la muqueuse des bronches. La lumière bronchique contient des polynucléaires neutrophiles et des cellules épithéliales desquamées se trouvant à proximité de capillaires dilatés. Un exsudat purulent, mêlé de fibrine, est noté dans les bronchioles et les alvéoles. L'ensemencement de broyat d'un prélèvement pulmonaire n'a pas donné de croissance bactérienne.

Dans la Figure 5, l'axe des ordonnées représente la note attribuée aux signes cliniques et l'axe des abscisses mentionne le temps en jour. Chaque valeur est une moyenne de 4 notes mais à partir du 10ème jour, nous avons comparé 3 veaux ayant reçu du sérum hyperimmun à 4 veaux témoins. Cette inégalité du nombre de l'effectif des 2 échantillons est prise en considération dans le test statistique, sans pour autant induire d'erreurs d'interprétation. Les veaux ayant reçu du sérum hyperimmun ont obtenu une note globale moyenne inférieure à celle des veaux témoins. A cause du faible nombre de veaux éprouvés, le test statistique n'a pas détecté de différence significative.

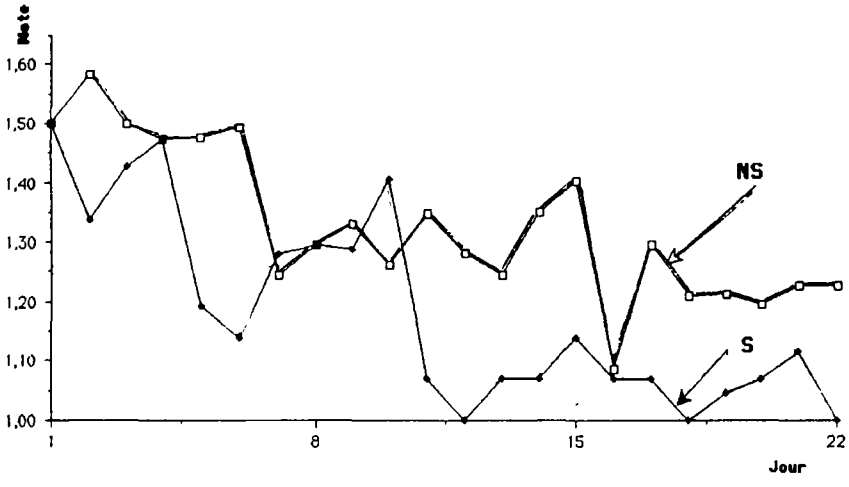


Figure 5. Comparaison des notes correspondant aux signes cliniques de 2 groupes de veaux infectés par BVDV (S et NS).

Le deuxième critère définissant l'efficacité de la séroprotection est la neutralisation virale par le sérum hyperimmun. Nous avons cherché à isoler le virus et à comparer le titre chez les deux groupes de veaux (l'un ayant reçu le sérum hyperimmun et l'autre servant de témoin). Pour ce faire, des prélèvements de sang et d'écouvillon nasal ont été effectués à J0, J1, J2, J3, J4, J6, J8, J13 et J15.

Malgré de nombreux passages "aveugles", nous n'avons pu isoler le virus à partir des sécrétions nasales; nous pensons que le titre y est tellement faible qu'il n'a pu être détecté. Le titre trouvé dans le sang aussi bien chez le groupe ayant reçu du sérum que chez le témoin, est faible, ne dépassant pas 10^2 $DICT_{50}$/50 µl (Figure 6). Les deux courbes se chevauchent au début mais la chute du titre est beaucoup plus importante chez le groupe ayant reçu du sérum. Après 15 jours, le titre moyen du virus s'annnule.

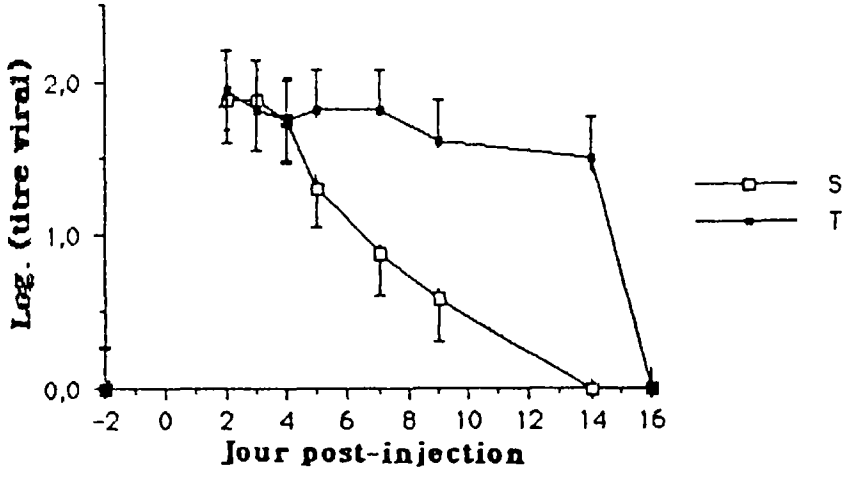


Figure 6. Evolution du titre moyen du VDVB isolé à partir du sang chez un lot de veaux infectés dont la moitié a reçu du sérum hyperimmum (S) et dont l'autre moitié a servi de témoin(T).

Discussion

La vaccination des vaches a induit le développement d'anticorps anti-VDVB n'étant décelables qu'après 21 jours post-injection. Mansfield *et al.* [22] attribuent la rapidité d'apparition des anticorps anti-VDVB au type de vaccin administré. Dans notre étude, nous avons réussi à obtenir un haut titre d'anticorps anti-VDVB, bien qu'il s'agisse d'un vaccin inactivé. Il est compréhensible que la fréquence d'injection en est une raison. Utilisant 4 sortes de vaccins inactivés, Frey (1989) suggère que la présence de 2 biotypes dans un vaccin contribuerait à l'obtention d'un haut titre d'anticorps anti-VDVB. Dans notre expérience de vaccination de vaches, un seul biotype cytopathogène (Singer) est utilisé. L'interprétation la plus raisonnable du haut titre trouvé sans notre travail est donnée par Thomas *et al* [29], insistant sur l'efficacité de l'emploi des immunoadjuvants. L'adjuvant utilisé dans notre travail, composé d'un mélange de Mercol et de Montanide, dont le choix est judicieux, s'avère très efficace.

Les résultats trouvés à partir du test de RIP ont montré, à partir de la 3ème semaine post-immunisation, la présence de polypeptides imunoprécipités : 120K, 80K, 65K, 55-53K, 47K et 37K. Les poids moléculaires de ces protéines concordent avec ceux trouvés dans d'autres travaux [3,21]. Dans notre travail, la comparaison entre les profils électrophorétiques a montré une relation entre la quantité de polypeptides imunoprécipités 55-53K, 47K et 37K à l'aide de sérums prélevés à différents moments de l'expérience, et le titre d'anticorps anti-VDVB révélés par le test de NT. La présence de la protéine 65K, avant même l'immunisation, prouve que le test de RIP est très sensible par rapport aux autres technique utilisées. La protéine n'a pas de rôle direct sur la neutralisation virale puisqu'elle est immunoprécipitée avant l'immunisation et que le titre d'anticorps anti-VDVB sériques détectés par la SN correspondant est négligeable. Corapi *et al.* [8] ont signalé la forte possibilité que la glycoprotéine 62K soit un précurseur de gp48 et gp25. Nous n'avons pas trouvé de 25K mais Dubovi [13] a précisé qu'il était toujours difficile de la détecter. Il a été démontré, par l'utilisation d'anticorps monoclonaux, que la gp55-53K est la plus immunodominante des protéines virales. Elle contribue à la constitution de l'enveloppe virale et est donc impliquée dans la neutralisation virale [7,21]. La protéine 37K apparaît à la quatrième semaine post-immunisation. Bolin et Ridpath [3] ont montré l'immunoprécipitation de cette protéine à l'aide d'un sérum hyperimmun. Dubovi [13] reconnait que la p37K est difficile à détecter à moins que le sérum utilisé soit hyperimmun. Nous pouvons alors conclure que l'immunoprécipitation de la 37K est révalatrice d'un état d'hyperimmunisation. Il semble qu'elle soit la protéine de la nucléocapside.

Dans la 2ème partie de notre travail, nous avons défini les modalités de l'administration du sérum hyperimmun. La demi-vie des anticorps neutralisants calculée dans notre étude est de 19 jours. D'après Levieux [20], la demi-vie des immunooglobulines bovines dans un sérum normal : IgG2 est de 13 et 20 jours respectivement. Kendrick [19] a étudié la chute des anticorps neutralisants contre le VDVB. Les veaux utilisés dans son expérience sont issus de bovins infectés, mais qui ne présentaient pas d'anticorps sériques anti-VDVB avant l'ingestion colostrale. Suite à l'absorption colostrale, les veaux ont été suivis sérologiquement par le même auteur. Ce dernier a trouvé que la demi-vie dépendait du titre d'anticorps absorbés initialement et qu'elle était comprise entre 105 et 230 jours. Coria et McClurkin [9] ont montré que les anticorps transmis par le colostrum aux veaux diminuait au cours des premiers quatre à six mois après la naissance.

Après l'injection du sérum hyperimmun à la moitié du lot 3, tous les veaux du même lot ont été inoculés expérimentalement par deux souches cytopathogènes. Les veaux témoins démontraient une symptomatologie proche de celle impliquée par le VDVB sans toutefois atteindre le degré rencontré chez les animaux infectés naturellement. D'ailleurs Brownlie [4] n'a jamais pu reproduire la maladie clinique sans des conditions expérimentales et Baker [1] approuve le fait que la reproduction de la diarrhée virale bovine est très difficile chez les veaux immunocompétents. Dans notre expérience, les veaux n'ayant pas reçu de sérum hyperimmun ont présenté quelques signes cliniques se traduisant par de la toux, de la diarrhée et surtout un écoulement nasal. Howard *et al.* [17] ont essayé l'effet d'anticorps colostraux suite à une infection expérimentale par la voie nasale. Ils ont trouvé une réduction de la virémie, une excrétion virale moindre et une leucopénie plus faible.

Dans notre expérience, un veau est mort soudainement bien qu'il ait reçu du sérum hyperimmun. Plusieurs hypothèses sont avancées quant à la cause de sa mort : infection persistante, autre infection concommitante ou inefficacité du sérum. Cette dernière hypothèse est à éliminer puisque les autres veaux sont restés en vie même ceux qui n'ont pas

reçu de sérum. Il est difficile d'admettre l'hypothèse d'infection persistante car tous les veaux ont subi un test avant leur admission dans l'expérience, à moins que le titre viral ne soit trop bas pour être décelé. L'utilisation du PCR aurait pu résoudre ce problème mais elle ne fut pas utilisée dans notre travail. Les lésions décrites à l'autopsie du veau n° 16 sont différentes de celles d'une maladie de muqueuses. Les lésions décrites par Jubb *et al.* (1985) n'ont pas été notées dans ce cas particulier. L'hypothèse la plus probable est une infection bactérienne ou virale sévissant d'une manière suraiguë qui s'est déclenchée par le stress dû au transport et aux diverses manipulations de l'infection expérimentale.

L'isolement viral chez les veaux du 3ème lot n'a pu être détecté qu'à partir du sang. Il est vrai que le meilleur échantillon pour isoler le virus est le sang [14], mais nous nous attendions à en trouver dans les sécrétions nasales, ce qui ne fût pas le cas. D'après Brownlie [4], l'isolement à partir de l'écouvillon nasal dépend de l'âge de l'animal. L'absence de virus dans les sécrétions nasales correspondrait probablement à une faible excrétion virale.

Dans l'interprétation de la pathogenèse de l'infection par le VDVB, Brownlie [4] a représenté la cinétique du virus et celle des anticorps anti-VDVB. Les titres trouvés sont similaires à ceux trouvés dans notre travail. Le titre viral commence à diminuer, jusqu'à s'annuler vers le 15ème jour.

La comparaison entre la cinétique du titre viral du groupe ayant reçu du sérum et celle du groupe témoin montre que la chute du titre viral est beaucoup plus importante chez le premier groupe.

Le titre moyen d'anticorps sériques neutralisants chez les veaux ayant reçu du sérum hyperimmun, puis infectés expérimentalement, est de 85. Ce titre est la moyenne de 3 titres des veaux qui ont résisté à l'infection expérimentale. Le titre de 85 protège donc contre une infection, encore faut-il que celle-ci présente les mêmes conditions que celles de notre épreuve virulente. Par ailleurs, nous ne pouvons dire qu'au dessous de cette valeur, le tire d'anticorps ne serait pas protecteur. Ceci nécessite une expérience dans laquelle l'effectif serait divisé en plusieurs lots et où, dans chaque lot, seraient introduits des veaux présentant un certain titre d'anticorps. Le titre protecteur serait donné par la plus faible valeur n'induisant pas d'effet viral.

Bittle [2] a trouvé que les bovins ayant un titre supérieur ou égal à 8 étaient protégés contre l'infecton expérimentale avec du virus virulent. Morter *et al.* [24], utilisant du sérum hyperimmun, ont obtenu un titre moyen d'anticorps passant de 4,6 à 181 mais leur expérience n'était pas suivie d'infection expérimentale permettant d'en déduire l'efficacité. L'expérience de Howard *et al.* [17] a montré que les anticorps d'origine colostrale et spécifiques du VDVB sont protecteurs contre l'infection expérimentale par la voie intranasale. Chapek *et al.* [5] ont voulu essayer un nouveau vaccin vivant préparé à partir de la souche Singer. Ils ont montré que le titre moyen d'anticorps neutralisants protecteurs était de 1/40 pour les veaux vaccinés par la voie sous cutanée et de 1/64 par la voie intramusculaire.

Notre étude montre que l'administration de sérum hyperimmun à de jeunes veaux est facile, efficace et réalisable sur le terrain. Sur le plan fondamental, la même étude permet d'impliquer entre autres la glycoprotéine gp55-53K dans la neutralisation virale, et de savoir que la gp37K est révélatrice d'un état d'hyperimmunisation. Il serait préférable de pratiquer notre expérience sur un échantillon beaucoup plus important et si possible, d'évaluer le coût de cette mesure prophylactique afin de la comparer au coût de la vaccination.

Références

1. Baker J.C. (1990). Clinical aspects of bovine virus diarrhoea virus infection. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* ; 9 : 25-41
2. Bittle J.L. (1968). Vaccination for bovine viral diarrhea-mucosal disease. *J Am Vet Med Assoc* ; 152(6) : 861-870.
3. Bolin S., Ridpath (1990). Range of viral neutralizing activity and molecular specificity of antibidies induced in cattle by inactivated bovine viral diarrhea virus vaccines. *Am J Vet Res* ; 51 (5) : 703-707.
4. Brownlie J. (1990). The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* ; 9(1) : 43-59.
5. Chapek M.L., McClaughry L.E., Wilkins L.M. (1978). Evaluation of a bovine virus diarrhea vaccine. *Mod Vet Pract* : 755-757
6. Collet M.S., Larson R., Belzer S.K., Retzel E. (1988) Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus : the genomic organisation of a pestivirus. *Virology* ; 165 : 200-208.
7. Collet M.S., Larson R., Gold C., Strick D., Anderson D.K., Purchio A.F. (1988) Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology* ; 165 : 191-199.
8. Corapi W.V., Don R.O., Dubovi E.J. (1990). Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhea virus. *Am J Vet Res* ; 51(9) : 1388-1394.
9. Coria M.F., McClurkin A.W. (1978). Duration of active and colostrum-derived passive antibodies to bovine viral diarrhea virus in calves. *Can J Comp Med* ; 42 : 239-243.
10. Corthier C., Aynaud J.M., Galicher C., Gelfi J. (1974). Activité antigénique comparée de deux togavirus : le virus de la peste porcine et le virus de la maladie des muqueuses. *Ann Rech Vet* ; 5 : 373-393.
11. Dannacher G., Moussa A. (1986). Pathogénie et formes cliniques de l'infection par le virus de la diarrhée virale des bovins (BVD). *Rev Méd Vét* ; 137 : 359-365.
12. Della Porta A.J. (1985). Veterinary viral diseases. Their significance in South-East Asia and the Western Pacific. Proc. of international Seminar on Virus Diseases of veterinary importance in South-East Asia and Western Pacific. Aust National Animal Health Laboratory, CSIRO, Geelong, Austria, 27-30 August 1984. Academic Press. Sidney.
13. Dubovi E.J. (1990). Molecular biology of bovine virus diarrhoea virus. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* ; 9(1) : 105-114.
14. Duffel S.J., Harkness J.W. (1985). Bovine virus dirrhoea-mucosal disease infection in cattle. *Vet Rec* ; 117 : 240-245.
15. Espinasse J., Raynaud J.P., Viso M. (1981). L'examen clinique dans les bronchopneumonies infectieuses enzootiques (B.P.I.E.) des jeunes bovins. In : *Affections respiratoires enzootiques des jeunes bovins*. Société belge de Buiatrie. Bruxelles Curenghem 26 Septembre : 1-14.
16. Heuschle W.P. (1986). Bovine viral diarrhea-musocal disease. In : *Current veterinary therapy. Food animal practice* 2. W.B. Saunders. Philadelphia : 485-488.
17. Howard C.J., Clarke M.C., Brownlie J. (1989). Protection against respiratory infection with bovine virus doarrhoea virus by passively acquired antibody. *Vet Microbiol* ; 19 : 195-203.
18. Karber G. (1931). Beitrag zur kollectiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch Exper Pathol Pharmak* ; 162 : 480-483.
19. Kendrick J.W. (1974). Bovine viral diarrhea : decay of clostrum-conferred antibody in the calf. *Am J Vet Res* ; 35(4) : 589-591.
20. Levieux D. (1990). Immunoglobulines et transmission de l'immunité passive chez les ruminants. In : P.P. Pastoret, A. Govaerts, H. Bazin,eds. *Immunologie animale*. Médecine-Sciences Flammarion, Paris : 596-599.
21. Magar R., Minocha H.C., Lecomte J. (1988). Bovine viral diarrhea virus proteins : heteroge-

neity of cytopathogenic and non cytopathogenic strains and evidence of a 53K glycoprotein neutralization epitope. *Vet Microbiol* ; 16 : 303-314.

22. Mansfield M.E., Woods G.T., Platt-Watkins A., Hill R.O. (1986). Clinical, hematological and serological response of beef calves to modified live and inactived bovine viral diarrhea virus vaccines. *Agri Pract* ; 7 : 3-4, 22-30.
23. Marsolais G,. Assaf R., Di Franco E., Montpetit C. (1984). Rapport des activités du laboratoire de diagnostic des infections virales animales. Gouvernement du Québec, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation.
24. Morter R.L., Amstutz H.A., Roussel A.J. (1984). Prophylactic administration of hyperimmune serum when processing feedlot cattle. *The Bov Practit* ; 19 : 45-48.
25. Olafson, Richard (1946).
26. Renard A., Guiot C., Shmetz D., Dagenais L., Pastoret P.P., Dina D., Martial J.A. (1985). Molecular cloning of bovine viral diarrhea viral sequences. *DNA* ; 4 : 429-438.
27. Saurat *et al.* (1972).
28. Silim A., ElAzhary M.A.S.Y. (1983). Detection of infectious bovine rhinotracheitis and bovine virus diarrhea viruses in the nasal epithelial cells by the direct immunofluorescence technique. *Can J Comp Med* ; 47 : 18-22.
29. Thomas P.C., Bass E.P. *et al.* (1986). Can an immunodulating adjuvant enhance and extend the protection of a killed BVD virus Vaccine ? *Vet Med* ; 81 : 974-976.

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 221-233.

22

Evaluation de l'activité protectrice de la fraction de la paroi de *Brucella* insoluble dans le SDS et identification d'antigènes de *Brucella* utilisables pour le diagnostic

C. SAEGERMAN*, V. WEYNANTS*, T.K-O. VO*, L. DE WAELE*, A. TIBOR*, PH. A. DENOEL*, J. GODFROID**, P. MICHEL**, E. SAMAN***, J-J. LETESSON*, J.N. LIMET*

* *Laboratoire d'Immunologie-Microbiologie, FUNDP, Namur, Belgique.*
** *Institut National de Recherches Vétérinaires, Bruxelles, Belgique.*
*** *Innogenetic, Gent, Belgique.*

Résumé

La protection induite par la fraction de la paroi de Brucella abortus *insoluble dans le dodécylsulfate de sodium bouillant (SDS-I) a été comparée à celle procurée par la vaccination sous-cutanée avec la souche vaccinale* B. abortus Buck 19 *chez des génisses gestantes inoculées par la voie conjonctivale avec 16,6 x 10^6* B. abortus 544. *La fraction SDS-I testée retarde les avortements mais ne parvient pas à les empêcher, contrairement au vaccin B19 pourtant administré à faible dose. Contrairement aux animaux des groupes contrôles et vaccinés B19, dont respectivement 25 % et 50 % ont présenté une carcasse non contaminée à l'abattage, presque toutes les carcasses des animaux vaccinés par la fraction SDS-I ont présenté au moins un ganglion contaminé. Le suivi hebdomadaire du*

taux d'anticorps anti-LPS par ELISA a permis de prédire l'avortement, que les génisses soient vaccinées ou non, et ceci plus précocement que les tests classiques usuels. Une étude de la réponse humorale contre les protéines de Brucella a été réalisée en immunoempreinte, ELISA indirect à l'aide de protéines recombinantes et en ELISA de compétition à l'aide d'anticorps monoclonaux. Cette analyse a permis d'identifier une protéine contre laquelle tous les animaux vaccinés puis infectés, ayant avorté ou donné naissance à des veaux infectés, ont produit des anticorps. Cette réactivité était détectable avant l'avortement chez presque tous les animaux. Dès lors, à condition d'améliorer l'activité protectrice de la fraction SDS-I, il serait possible de développer un vaccin, et un ou plusieurs tests de diagnostic utilisant des antigènes différents, capables d'assurer une protection adéquate et permettant l'identification des animaux infectés, sans interférence de l'immunité post vaccinale.

Le lipopolysaccharide (LPS) apparaît comme l'antigène dominant de *Brucella,* avec la réserve que la réponse humorale contre les antigènes protéiques a été étudiée par des techniques peu sensibles [4]. Le dépistage de la brucellose bovine repose sur la recherche des anticorps (AC) spécifiques du LPS de *B. abortus* [12]. La vaccination avec la souche *Buck 19 de B. abortus* (B19) entraîne la formation d'Ac anti-LPS dans le sérum pendant 6 à 12 mois, parfois d'avantage chez 1 % des animaux [11], ce qui constitue le désavantage majeur de ce vaccin, puisque ces Ac interfèrent lors du dépistage des animaux infectés.

La fraction de la paroi de *Brucella* insoluble dans le dodecylsulfate de sodium bouillant (SDS-I) induit, chez la souris, une protection comparable à celle induite par les vaccins cellulaires conventionnels. Cette fraction n'induit pas de réaction cutanée à la brucelline INRA [3,6,7] et pourrait être une alternative à la vaccination B19 [9]. Dans cette optique, nous avons comparé la protection induite par la fraction SDS-I à celle procurée par la vaccination par voie sous-cutanée avec la souche B19 chez des génisses gestantes infectées à 5 mois de gestation par la voie conjonctivale avec 16,6 x 10^6 de *B. abortus 544* .

Matériel et méthodes

Génisses Pie-Noire

Soixante-trois génisses Pie-Noire achetées dans le Morbihan et le Finistère ont été synchronisées et inséminées. Les 26 génisses gestantes obtenues ont été réparties en 3 lots : un lot de 4 non vaccinées, un lot de 12 vaccinées par voie sous-cutanée avec 9 mg de la fraction SDS-I W99-Rev1 dans 2 ml. d'adjuvant BG*, et un lot de 10 vaccinées par voie sous-cutanée avec la souche B19 (150 x 10^6 germes vivants dans 2 ml. d'eau physiologique). Les vaccinations ont eu lieu au $71^{ème}$ jour de la gestation. Les infections expérimentales ont été réalisées au jour 162 par voie conjonctivale à la dose de 16,6 x 10^6 de *B. abortus souche 544* (biovar 1). La fraction SDS-I préparée à partir des souches de *Brucella Rev1* et *99S* a été constituée selon le schéma de préparation, et par G. Dubray de

l'INRA à Tours [6]. L'entretien et le dénombrement des Inocula des souches de *Brucella* utilisées ont été réalisés par J.M. Verger de l'INRA à Tours.

Tests classiques

Le test d'agglutination en présence d'EDTA (EDTA) et le test de déviation du Complément (DC) ont été réalisés au Centre de Dépistage des Maladies du Bétail, Erpent, Belgique. La description de ces tests a été publiée antérieurement [1,2,13].

Test d'hypersensibilité retardée

Les intradermo-réactions (IDR) ont été réalisées avec le Brucellergène de Rhône-Mérieux (lot 96G091). Une seringue à tuberculine montée d'une aiguille de 4 mm. sert pour injecter le produit dans le derme, après avoir préalablement coupé le poil à l'aide d'un rasoir électrique. La différence d'épaisseur de peau est mesurée au cuti-mètre à 72 heures et tout épaississement cutané égal ou supérieur à 1 mm. est considéré comme positif [12].

Suivi bactérioscopique et bactériologique

L'étude de l'excrétion lors de chaque vêlage ou avortement et la recherche des *Brucella* sur la carcasse a été réalisée par P. Desmecht et J. Godfroid à l'INRV. Les techniques mises en oeuvre sont décrites dans Alton *et al.* [1].

Immuno-empreintes

Les protéines ont été séparées par la méthode EGPA-SDS décrite à l'origine par Laemmli dans une cuve Protean II (Bio-Rad). Après l'électrophorèse, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (50V pendant 2 heures). Les sites non occupés de la membrane de nitrocellulose ont été bloqués par une incubation de 30 min dans du TBS-BSA 3% à température ambiante et sous agitation. Les membranes ont été successivement incubées une nuit à 4°C avec les sérums dilués 50 fois dans du TBS-BSA1%-Tw, puis une heure à température ambiante avec l'anticorps monoclonal 1C8 dilué dans le même tampon et 1 heure à température ambiante avec un anticorps anti IgG de souris couplé à la phosphatase alcaline (Dako). Entre chaque incubation, l'excès de réactifs est éliminé par 5 lavages de 5 mn sous agitation avec du TBS-Tw. Avant la révélation des membranes, un dernier lavage est réalisé en TBS. Le développement est réalisé à température ambiante dans la solution de révélation contenant 1mg de NBT et 12µl de BCIP par 10 ml de tampon. La réaction est arrêtée par plusieurs lavages à l'eau de ville.

ELISA

ELISA-LPS

L'ELISA-LPS est réalisé selon la méthode décrite par L. De Waele *et al.* [5]. Pour ce test, la sensibilisation des plaques a été réalisée avec un mélange de LPS extrait à partir des souches de *B. abortus W99* (LPS A dominant) et de *B. melitensis Rev1* (LPS M dominant). Le conjugué utilisé est l'anticorps monoclonal 1C8 [8].

ELISA indirect sur protéines recombinantes

Les plaques de microtitration 69620 (Nunc) sont sensibilisées par une incubation d'une nuit avec les protéines recombinantes diluées à une concentration finale de 1µg/ml dans du GBS 0,05M. Les sites non occupés sont bloqués par une incubation de 3 h à 37°C avec du PBS-caséine. Les sérums sont dilués 50 fois dans du GBS-EDTA-Tw avant d'être déposés dans les puits. Les plaques sont incubées une heure à température ambiante. Les anticorps fixés sont révélés par l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-IgG de bovin couplé à la péroxydase (1C8-PO) dilué dans du GBS-EDTA-Tw contenant 4% d'hydrolysat de caséine (v/v). Le conjugué est incubé une heure à température ambiante. Entre chaque incubation, l'excès de réactifs est éliminé par 6 lavages en NaCl-Tw avec un laveur automatique (Microplate Washer M 96, Titertek). Pour visualiser la fixation, l'O-phenilenediamine (0,4% p/v) et l'H_2O_2 (2mM) dans du tampon citrate-phosphate sont utilisés.

ELISA de compétition

Les plaques de microtitration 69620 (Nunc) sont sensibilisées par une incubation d'une nuit avec des extraits ultrasoniqués de *Brucella melitensis B115* dilués à une concentration finale de 20µg/ml dans du GBS 0,05M. Les sites non occupés sont bloqués par une incubation de 3 h à 37°C avec du PBS-caséine. Les sérums sont dilués 2 fois dans du GBS-EDTA-Tw avant d'être déposés dans les puits (25 µl/puits) et ensuite 25µl de l'anticorps monoclonal, à la dilution appropriée dans le même tampon, sont déposés. Les plaques sont agitées 10 mn puis incubées 50 mn à température ambiante. Les anticorps fixés sont révélés par l'utilisation d'un anticorps anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (SAM-PO, Amersham) dilué 1000 fois dans du GBS-EDTA-Tw contenant 4% d'hydrolysat de caséine (v/v). Le conjugué est incubé une heure à température ambiante. Les conditions de lavages et de révélations sont identiques à ceux de l'ELISA indirect.

Réactifs

- Tampon Salin Glycine (GBS) : 0.17 M NaCl, 0.1 m Glycine et 6 mM NaN_3, pH 9.2.
- GBS-EDTA-TW : tampon GBS contenant 50 mM EDTA et 0.1% Tween 20, pH 9.2
- Hydrolysat de caséine : 25 g de caséine de lait (Fluka, Buchs, Suisse) sont dissous dans 800 ml de NaOH 0.3 N et incubé sous agitation une nuit à 37°C. La solution est ensuite neutralisée par de l'HCl à pH 7 et le volume ajusté à 1 litre puis filtrée.
- PBS-caséine : tampon salin-phosphate (PBS), pH 7.4, contenant 4% (v/v) d'hydrolysat de caséine.
- Tampon citrate-phosphate : 0.051 M Na_2HPO_4, 0.024 M acide citrique, pH 5.
- NaCl-Tw : 0.15 M NaCl contenant 0.01% Tween 20.
- TBS : tampon Tris-salin, 0,15 M NaCl, 10 mM Tris hydrochloride, pH7,5.
- TBS-BSA 3% : TBS contenant 3% de BSA (p/v)
- TBS-Tw : TBS contenant 0,05% de Tween (v/v).
- TBS-BSA1%-Tw : TBS-Tw contenant 1 % de BSA (p/v)

Antigènes

LPS

Le LPS est préparé selon la méthode décrite par L. De Waele *et al.*[5].

Protéines recombinantes

Les protéines ont été identifiées par A. Cloeckaert (1990) et clonées par P. De Vergifosse (communication personnelle) et A. Tibor (communication personnelle). Elles ont été produites et purifiées par la firme Innogenetics (Gent, Belgique).

Brucella abortus 45/20

Les bactéries sont cultivées à 37°C sur du *Brucella*-Agar (Gibco) puis récoltées, lavées et leur concentration est déterminée par lecture à 600nm.

Résultats

Symptômes observés

La Figure 1 illustre l'évolution du nombre d'avortements en fonction du temps et pour différents lots. Chez les animaux non vaccinés (témoins), cette infection a conduit à 100 % d'avortement. La vaccination par le vaccin B19 a réduit de 60 % les avortements. La vaccination par la fraction SDS-I a retardé l'avortement de quelques semaines mais toutes les génisses ont finalement avorté.

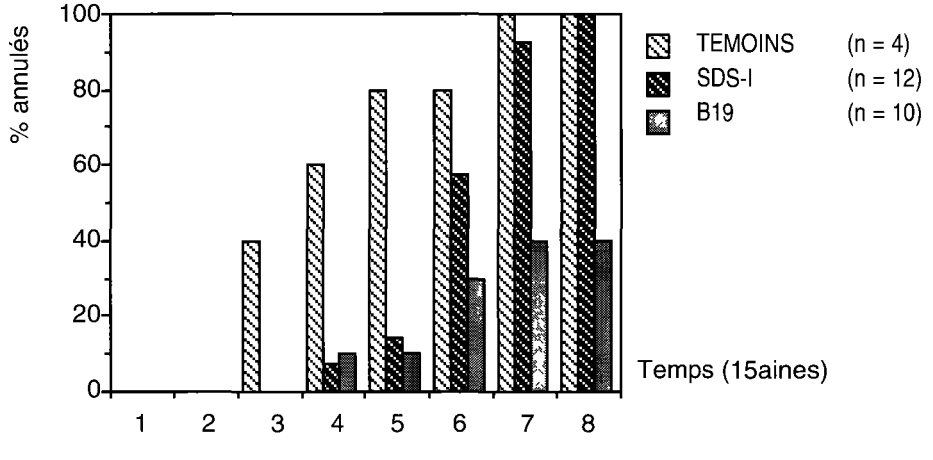
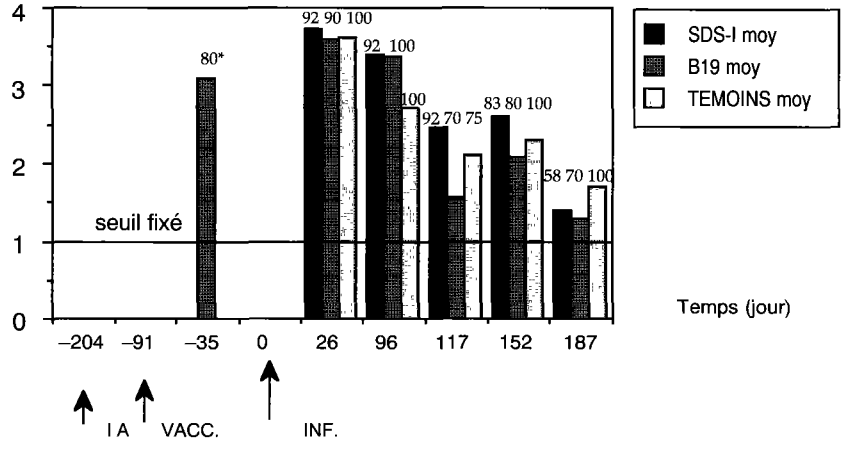


Figure 1. Pourcentages cumulés d'avortements par lot et par quinzaine après l'infection expérimentale par *Brucella abortus* 544.

Par rapport au lot témoin, le pourcentage de rétentions d'arrière-faix, de métrites et de mammites observées dans le lot SDS-I est moindre et moindre encore avec le lot B19 (résultats non montrés).

Suivi de la réponse cellulaire par intradermo-réaction

Les intradermo-réactions (IDR) réalisées avec le Brucellergène de Rhône-Mérieux se sont révélées positives après vaccination B19 pour 80 % des bovins et négatives après vaccination avec la fraction SDS-I (Figure 2). Vingt-six jours après l'infection, 9% des animaux présentaient une IDR positive qu'ils aient été ou non vaccinés. Les animaux qui n'ont pas réagi le 26ème jour ont réagi ultérieurement (résultats individuels non présentés). A part pour 1 génisse, l'infection pouvait être décelée avant l'avortement par le test cutané. Plus on s'écarte du jour de l'infection, plus on constate une décroissance de l'intensité moyenne de l'IDR avec le Brucellergène. Cette décroissance pourrait être mise en relation avec les taux d'anticorps qui augmentent graduellement mais également avec un phénomène de désensibilisation suite aux IDR successives.



* % de bovins positifs à l'IDR par lots.
I.A. : insémination artificielle.

Figure 2. Cinétique par lot de la différence d'épaisseur de peau moyenne de l'IDR avec la Brucellergène (exprimée en mm).

Suivi de la réponse humorale anti-LPS

La réponse humorale anti-LPS des animaux de chaque lot a été suivie par un test ELISA indirect en sensibilisant les plaques par du LPS W99-Rev1 et en utilisant le conjugué 1C8. A titre de comparaison, les tests classiques usuels d'agglutination en présence d'EDTA et de déviation du complément ont également été réalisés.

Les bovins non vaccinés et vaccinés à l'aide de la fraction SDS-I présentent un profil sérologique homogène à l'intérieur de chaque lot. Les Figures 3 et 4 illustrent l'évolution sérologique pour un animal représentatif de chaque lot. Le suivi sérologique post-vaccinal montre que c'est avec l'ELISA que les titres les plus importants en anticorps anti-LPS sont observés.

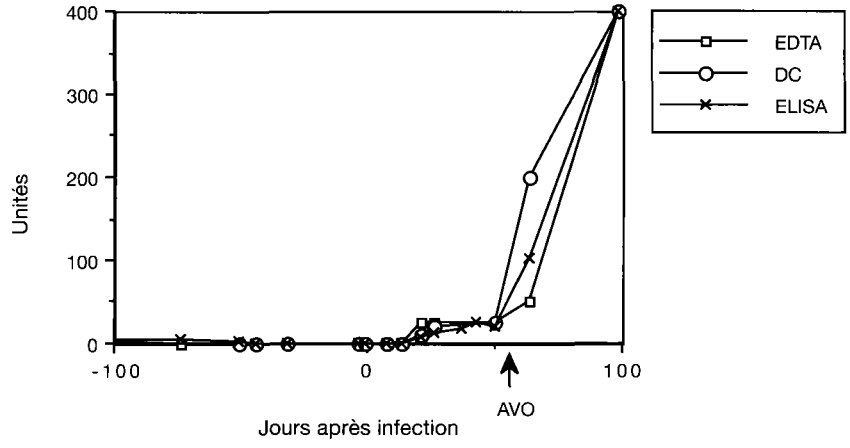


Figure 3. Evolution des titres sérologiques observés chez le bovin n°4, non vacciné et ayant avorté.

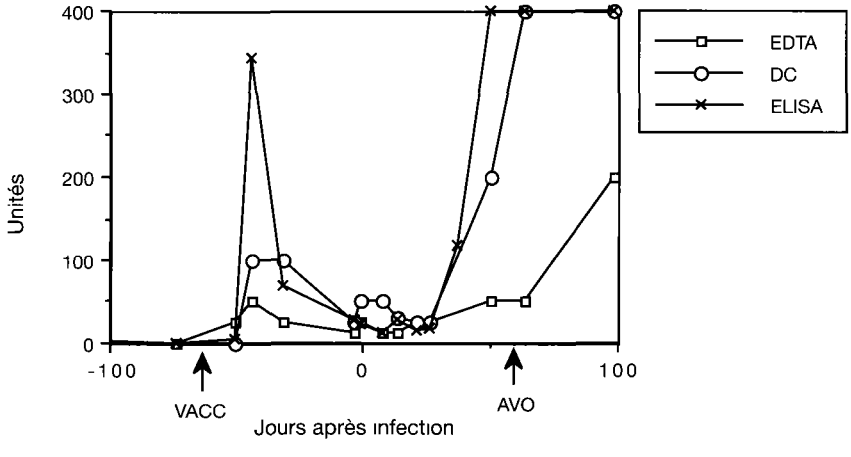


Figure 4. Evolution des titres sérologiques observés chez le bovin n°15, vacciné avec la fraction SDS-I et ayant avorté.

Les bovins vaccinés B19 présentent des profils sérologiques différents selon qu'il y ait eu ou non avortement et isolement de *B. abortus 544* dans les produits d'excrétion et sur la carcasse (Figures 5 et 6). Cependant, que l'animal ait avorté ou mis bas, c'est avec

l'EDTA que l'on observe la réponse humorale post-vaccinale la plus importante. Pour le bovin N°9 (Figure 5), les isolements bactériologiques au vêlage (jour 126) et sur la carcasse sont négatifs et l'infection n'induit pas une seroconversion. Par contre, pour le bovin n°8 (Figure 6), l'inoculation d'épreuve entraîne une nouvelle séroconversion.

Dans les conditions expérimentales, le suivi hebdomadaire du taux d'anticorps anti-LPS par ELISA aurait permis de prédire l'avortement. Les animaux ayant mis bas un veau non infecté n'ont pratiquement pas présenté d'augmentation du taux d'anticorps anti-LPS suite à l'infection. La réponse vaccinale anti-LPS de ces derniers était déjà bien diminuée au moment de l'infection.

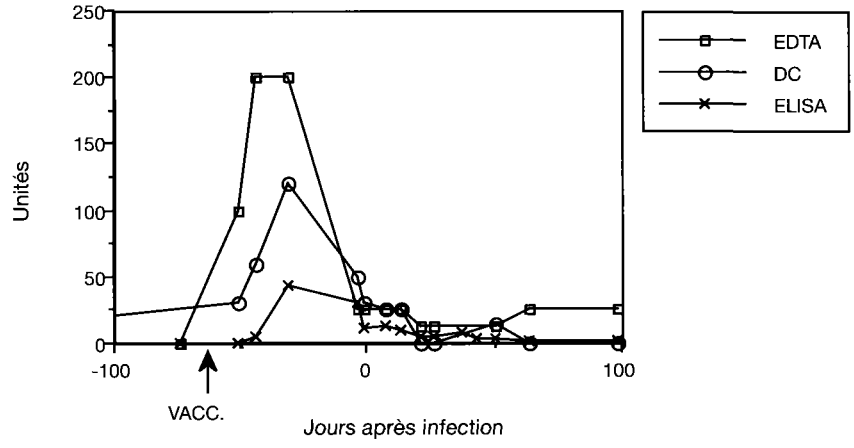


Figure 5. Evolution des titres sérologiques observés chez le bovin n°9, vacciné avec la souche B19 et ayant surmonté l'infection.

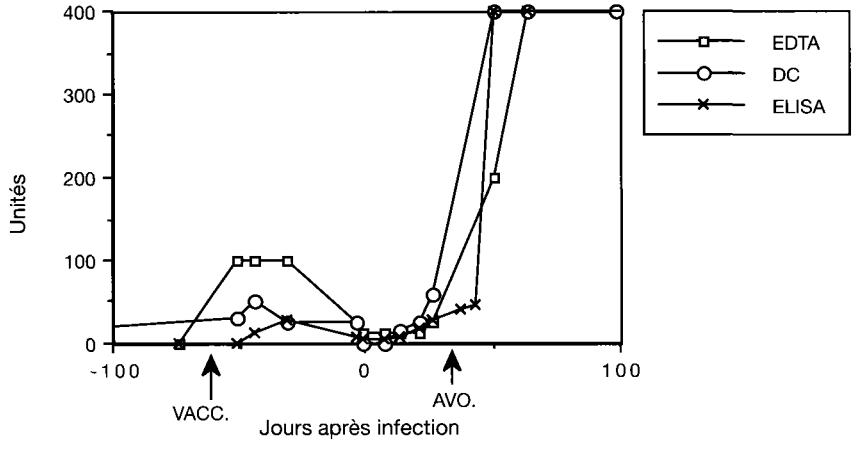


Figure 6. Evolution des titres sérologiques observés chez le bovin n°8, vacciné avec la souche B19 et qui a avorté.

Suivi de la réponse humorale contre les protéines de *Brucella*

Les immuno-empreintes sur extrait protéique de *B. abortus 45/20*, réalisées à l'aide des sérums prélevés 135 jours après l'infection, font ressortir que c'est pour la zone de 60 kDa qu'un fort pourcentage des génisses qui ont avorté ou donné naissance à un veau infecté produisent des anticorps. La zone située entre 14,5 et 17 kDa semble également intéressante puisqu'un grand nombre de génisses produisent également des anticorps qui y révèlent une ou plusieurs bandes.

Des protéines recombinantes correspondant aux OMPs 16,5, 19, 25, 36 de *Brucella* ont également été utilisées en ELISA indirect. Une réponse humorale a été mise en évidence uniquement contre la protéine de 16,5 kDa mais celle-ci est trop tardive pour être utilisable (Tableau I).

Tableau I. Nombre de bovins détectés par des tests ELISA utilisant des protéines recombinantes et des anticorps monoclonaux.

	Nombre de bovins détectés par le test					
	lot témoin	lot B19 ayant donné			lot SDS-I	total
Test ELISA	n=4	avortons n=4	veaux infectés n=3	veaux non infectés n=3	n=12	n=26
Indirect						
PR 16,5 kDA	1**	1*, 2**	1**	2**	2*, 5**	5*, 9**
PR 19 kDA	0	0	0	0	0	0
PR 25 kDA	0	0	0	0	0	0
PR 36 kDA	0	0	0	0	0	0
Compétition						
anti-15,7 kDA	2**	4*	3*	0	11*, 1**	18*, 3**
anti-16,5 kDA	1**	2**	1**	1**	2*, 6**	2*, 11**

PR : protéine recombinante
* : avant avortement ou vêlage
**: après avortement ou vêlage

Afin d'investiguer plus en profondeur la réponse humorale observée en immuno-empreinte dans la zone de 14,5 à 17 kDa, deux anticorps monoclonaux reconnaissant respectivement des protéines de masse moléculaire estimées à 15,7 et 16,5 kDa ont été utilisés en ELISA de compétition. L'AcM anti-15,7 détecte 91 % des génisses avortées ou ayant donné naissance à un veau infecté, dont 78 % avant avortement ou vêlage (Tableau 1). Les données obtenues au moyen de l'anticorps anti-16,5 confirment le caractère tardif de la réponse contre cette protéine déjà observée en ELISA indirect.

Suivi bactériologique

Tous les prélèvements à l'abattage ont été négatifs pour seulement 7 des 26 génisses infectées : une génisse non vaccinée, 5 génisses vaccinées B19 dont 4 ont vêlé normalement et une vaccinée avec la fraction SDS-I (Tableau II). Pour toutes les génisses testées sauf une (n°9, vaccinée B19), il a été possible d'isoler *B. abortus 544* à partir de prélèvements diversifiés lors des avortements ou des vêlages. Sur les carcasses des génisses ayant avorté ou vêlé, le prélèvement de rate permet plus facilement que celui de foie ou d'utérus de mettre en évidence *B. abortus*. Parmi les ganglions prélevés sur l'ensemble des carcasses, *B. abortus* est le plus facilement mis en évidence à partir des ganglions rétro-mammaires et rétropharyngiens. Les taux de réussite sur ces ganglions sont respectivement de 61 et 36%.

Discussion et conclusion

Bien que la fraction SDS-I ait retardé les avortements et que l'infection puisse être décelée avant l'avortement par le test cutané, cette fraction confère une protection inférieure à celle que confère le vaccin B19, qui pourtant a été administré à faible dose.

Dans les conditions de notre expérience, le suivi hebdomadaire du taux d'anticorps anti-LPS par ELISA aurait également permis de prédire l'avortement, que les génisses soient vaccinées ou pas, et ceci plus précocement que les tests classiques usuels.

Une étude de la réponse humorale contre les protéines de *Brucella* réalisée en immuno-empreinte a permis d'identifier deux zones intéressantes situées respectivement aux alentours de 60 kDa et entre 14,5 et 17 kDa. La ou les protéines reconnues dans la première zone pourraient bien être des protéines de chocs thermiques. En effet, d'une part Lin *et al* [10] décrivent chez *Brucella* une protéine de choc thermique de 62 kDa, et d'autre part l'antigène commun des Enterobactériacées a été identifiée comme une protéine de choc thermique ayant une masse moléculaire de 60 kDa. Les protéines de cette zone pourraient donc être des antigènes potentiels pour le diagnostic à condition d'en identifier et d'en isoler les épitopes spécifiques de *Brucella* car les protéines de choc thermiques sont connues pour être très conservées. L'ELISA indirect à l'aide de protéines recombinantes n'a permis de mettre en évidence qu'une protéine immunogène : la protéine recombinante de 16,5 kDa. Cependant, les génisses produisent des anticorps contre cette protéine assez tardivement et généralement après l'avortement. Quant à l'ELISA de compétition, il a, d'une part, confirmé ce qui a été observé en ELISA indirect avec la protéine recombinante correspondant à l'OMP 16,5 et, d'autre part, a permis d'identifier une protéine contre laquelle toutes les génisses vaccinées qui ont avorté ou bien mis bas un veau infectée, produisent des anticorps. Cette réponse humorale est par ailleurs généralement détectée avant l'avortement ou le vêlage infectieux. Une légère réponse a toutefois été observée contre cette protéine de 15,7 kDa chez 80 % des animaux suite à la vaccination par B19.

En ce qui concerne les deux vaccins, on remarque que pour la fraction SDS-I, les titres maxima en anticorps anti-LPS sont observés avec l'ELISA qui révèle des IgG1 bovins, la séro-agglutination (EDTA) étant la technique qui détecte les titres les plus faibles. Par contre, avec le vaccin B19 c'est l'inverse qui est observé puisque c'est avec l'EDTA que l'on observe les titres les plus importants. Cette séro-agglutination met en évidence des

Tableau II. Résultats des cultures de prélèvements réalisés lors des avortements ou vêlages, après le vêlage et sur les carcasses.

bovin	Durée de gestation en jours	Culture de prélèvements diversifiés lors d'avortement ou vêlage				Culture sur lait et mucus	Culture sur prélèvements de la carcasse				Culture sur les veaux (3)
		Avortée ou Vêlée	avorton (1)	Arrière -faix	Colostrum (2)		ggls+/tot ggls (4)	Foie	Rate	Utérus	
Contrôle infection											
1	204	A	+	+	+	+	6/7	+	+	-	
2	223	A	+	+	+	+	1/5	-	-	-	
3	202	A	+	+	+	+	0/7	-	-	-	
4	215	A	+	+	+	+	1/8	-	-	-	
Vaccin Buck 19											
5	252	A	+	+	+	+	3/7	ND	-	+	
6	287	V	cf veau	+	-	+	0/7	-	-	-	-
7	284	V	cf veau	+	+	+	1/8	-	-	-	-
8	206	A	+	+	+	+	5/7	-	+	-	
9	289	V	cf veau	+	-	-	0/8	-	-	-	-
10	249	A	+	+	+	+	1/8	-	-	-	
11	248	A	+	+	+	+	0/7	-	-	-	
12	282	V	cf veau	+	+	+	2/7	-	-	-	-
13	271	V	cf veau	+	+	+	0/8		-	-	-
14	289	V	cf veau	+	-	+	0/8	-	-	-	-
Fraction SDS-I											
15	244	A	+	+	+	+	1/7	-	-	-	
16	246	A	+	+	+	+	0/2	ND	ND	-	
17	254	A	+	+	+	+	6/8	-	+	-	
18	253	A	+	+	+	+	1/8	-	-	-	
19	238	A	+	+	+	+	7/7	-	+	-	
20	251	A	+	+	+	+	3/8	-	-	-	
21	251	A	+	+	+	+	3/8	-	-	-	
22	241	A	+	+	+	+	4/8	-	-	-	
23	244	A	+	+	+	+	6/8	-	+	-	
24	257	A	+	+	+	+	1/8	-	-	-	
25	256	A	+	+	+	+	4/8	-	-	ND	
26	243	A	+	+	+	+	1/7	-	-	-	

ND : non déterminé ;
(1) : liquide de caillette, rate, foie, poumon ;
(2) : colostrum prélevé quartier par quartier ;
(3) : utérus, testicules, rate, foie, ganglions rétromammaires, mésentérique, iliaques, préscapulaires, bronchiques, rétropharyngiens, sous-maxillaires et parotidiens ;
(4) : utérus, rate, foie, ganglions rétromammaires, mésentérique, iliaques, préscapulaires, bronchiques, rétropharyngiens, sous-maxillaires et parotidiens.

IgG2 et ou des IgM et non des IgG1 comme pour l'ELISA. C'est peut-être en partie dans la différence des fonctions biologiques des IgG1 et IgG2/IgM induits par les deux types de vaccination qu'il faut trouver la différence de protection observée au cours de l'expérience. Dès lors, il serait envisageable d'améliorer l'activité protectrice de la fraction SDS-I, soit en orientant correctement la réponse humorale, soit en incluant dans cette fraction un ou des antigène(s) protecteur(s) indispensable(s) et non encore identifié(s). Sur cette base, il serait possible de développer un vaccin et un/ou des test(s) de diagnostic utilisant des antigènes différents, capables d'assurer une protection adéquate et de permettre la discrimination entre des animaux vaccinés et infectés. Les protéines cytoplasmiques ne présentant pas d'activité protectrice dans le modèle murin semblent des candidats très intéressants pour le développement d'un test allergique.

Remerciements

Ce travail a été financé par l'Institut pour l'Encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture (IRSIA), le Fonds de Santé et Production des Animaux (convention n°5300A) et par la Région Wallonne (convention n°2285).
Nous remercions G. Dubray et le personnel affecté aux stations expérimentales de l'Unité de Pathologie Infectieuse et d'Immunologie de l'INRA à Tours. Nous remercions aussi l'INRV à Machelen pour l'entretien et la contention des génisses. Nos remerciements s'adressent également au Centre de Dépistage des Maladies Animales d'Erpent qui a bien voulu réaliser en parallèle les tests classiques d'agglutination et de déviation du complément. Merci également à D. Gilson et M.N. Mattot pour leur aide technique.

Références

1. Alton G.G., Jones L.M., Pietz D.E. (1975) Laboratory techniques in brucellosis. 2nd ed. Genève : WHO Monograph. ser.n°55,177 p.
2. Alton G.G.,Jones L.M., Angus R.D. *et al.* (1988) Techniques for the Brucellosis laboratory. Paris : INRA : 190 p.
3. Bosseray N., Plommet M. (1980). Antagonism between two immunogens extracted from *Brucella* (cell-wall peptidoglycan and lipopolysaccharide fractions) and inactivity of the brucelline allergen in immunization of the mouse. *Ann. Microbiol.* (Inst. Pasteur); 131A : 157-169.
4. Cherwonogrodzky *et al.* (1990).
5. De Waele L., Saegerman C., Gilson D., Thiange P., Vo T. K-O., LimetJ.N., Letesson J-J. (1993). Field evaluation of three serum ELISA using monoclonal antibodies or protein G as peroxidase conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. Soumis pour publication.
6. Dubray G., Plommet M. (1976). Structure et constituants des *Brucella*. Caractérisation des fractions et propriétés biologiques. International Symposium on Brucellosis, Rabat, 1975. *Dev Biol Standard.*, 31 : 68-91. S. Karger, Basel, .
7. Dubray G., Limet J.N., Cloeckaert A., Jacques I. (1992). Identification des antigènes protecteurs et mécanismes de la protection. Proceedings in the International Seminar, La Valette, Malte, 28-30 Oct. 1991 In : Plommet M. éd.*Prevention of Brucellosis in the Mediterranean countries*, Pudoc Publishers, Wageningen : 9-24.
8. Letesson *et al.* (1985).
9. Limet J.N., Vo T. K-O., Saegerman C., De Waele L., Tibor A., Cloeckaert A., de Wergifosse

P., Trunde J-M., Zygmunt M., Letesson J-J., Dubray G. (1992). Identification et clonage des antigènes de diagnostic de la brucellose : perspectives d'application. Proceedings in the International Seminar, La Valette, Malte, 28-30 Oct. 1991 In : Plommet M. éd. *Prevention of Brucellosis in the Mediterranean countries*, Pudoc Publishers, Wageningen, : 252-264.

10. Lin J., Adams L.G., FichtT.A. (1992) Characterization of the heat shock response in *Brucella abortus* and isolation of the genes encoding the GroE heat shock proteins. *Infect Immun* ; 60 (6) : 2425-2431.
11. Plommet M. (1984). Progrès récents en immunisation contre l'infection à *Brucella abortus*. Immunisation chez les bovins. *Prev Vet Med* ; 2 : 205-214.
12. Saegerman C., Limet J.N., Vo T. K-O., De Waele L., Gilson D., Bastin A., Dubray G., Letesson J-J. (1993). Diagnostic de la brucellose bovine par intradermoréaction : mise au point des conditions d'utilisation et première évaluation. Soumis pour publication.
13. Thiange P., Saegerman C., Botton Y., Limet J.N. (1992). Brucellose bovine : le test d'agglutination en présence de facteur rhumatoïde après traitement du sérum par le dithiotréitol, dans la différenciation des animaux vaccinés et infectés. *Ann Méd Vét* ; 136 : 471-476.

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 235-243.

23

Atténuation de 4 isolats de *Theileria annulata* en culture cellulaire à long terme : résultats préliminaires d'une étude *in vitro* du polymorphisme parasitaire par des marqueurs enzymatiques, antigéniques et génomiques, et *in vivo* du degré d'atténuation et du pouvoir protecteur

M.E.A. DARGHOUTH *, L. BEN MILED*, A. BOUATTOUR **, M. KILANI*

* *Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire, Sidi-Thabet, Tunisie.*
** *Institut Pasteur, Tunis, Tunisie.*

Quatre isolats de *T. annulata* collectés dans 3 zones bioclimatiques de Tunisie (Figure 1), (zone sub humide = isolat Béja, zone semi-aride = isolats Batan 2, Djedeida 4 et Sousse, et zone aride = isolat Kairouan) ont été maintenus en culture lymphoblastique à long terme (2 ans) en vue de leur atténuation pour la mise au point d'un vacin vivant atténué. Au cours de cette période, ces 4 isolats ont été suivis *in vitro* par des marqueurs phénotypiques et génomiques, et *in vivo* par l'étude de la virulence et du pouvoir protecteur envers des infections d'épreuve par des surnageants de broyats de tiques infectées par *T. annulata* (S.B.T.I.).

Figure 1. Carte des régions bioclimatiques de Tunisie.

H : Etage bioclimatique humide
SH : Etage bioclimatique sub-humide
SA> : Etage bioclimatique semi-aride supérieur
SA< : Etage bioclimatique semi-aride inférieur
A> : Etage bioclimatique aride supérieur
A< : Etage bioclimatique aride inférieur
S : Etage bioclimatique saharien

Etude *in vitro*

Le polymorphisme des 4 isolats a été étudié pour les cultures non atténuées (moins de 10 passages), ainsi qu'au bout de 6 mois (passage 50), 12 mois (passage 100) et 24 mois de culture (passage 200) par :
- électrophorèse des isomères de la glucose phosphate isomérase,
- l'anticorps monoclonal polymorphique 7E7 mis au point par le laboratoire d'Immuno-pathologie et d'Hématologie de la faculté de Médecine de Tunis. Cet anticorps spécifique du stade schizonte reconnait une bande antigénique de 30 à 32 kD,
- une sonde génomique polymorphique, la sonde Ta T17, developpée au laboratoire d'Immuno-pathologie et d'Hématologie de la faculté de Médecine de Tunis à partir d'un isolat de *T. annulata*.

Les résultats obtenus sur les cultures non atténuées, ainsi qu'aux passages 50, 100, et 200 (p50, p100 et p200) à l'aide des différents marqueurs, sont consignés dans le Tableau I.

Tableau I. Résultats obtenus avec la GPI.

	Sous-population(s) détectée(s) par électrophorèse de la GPI Stade schizonte en culture cellulaire			
	Passage < 10	Passage 50	Passage 100	Passage 200
Batan 2	2 (I et II)*	1 (II)	1 (II)	1 (II)
Béja	1 (I)	1 (I)	1 (I)	1 (I)
Djedeida 4	3 (I,II,III)	3 (I,II)	3 (I,II)	1 (II)
Sousse	2 (I,II) 1 majeure 1 mineure	1 (I) Persistance de la sous-population mineure	1 (I)	1 (I)

* : Les chiffres romains attribués aux sous-populations correspondent à l'ordre de localisation sur l'axe anode cathode

Sur les cultures non atténuées, les 3 marqueurs utilisés dans ce travail confirment l'existance d'un polymorphisme entre les 4 isolats étudiés. De plus la GPI et la sonde génomique Ta T17 révèlent à l'intérieur des isolats Batan 2, Sousse et Djedeida 4 la présence de sous populations distinctes (Tableau II).

Après culture à long terme des 3 isolats polymorphiques (Djedeida 4, Batan 2 et Sousse), la GPI montre une réduction du polymorphisme avec le maintien par isolat d'une seule sous population, probablement la plus adaptée aux conditions de culture. De plus,

cette sélection ne se fait pas toujours en faveur des sous populations dominantes, comme l'illustre le cas de l'isolat Sousse où seule la sous population mineure s'est maintenue. Il est par ailleurs intéressant de noter que pour Batan 2 et Sousse, où cette sélection s'est achevée plus précocement, dès le passage 50, l'atténuation *in vivo* est apparue plus rapidement qu'avec Djedeida 4.

Contrairement à la GPI l'anticorps monoclonal 7E7 n'a pas détecté de variations notables au sein des isolats à différents niveaux de culture. La seule modification a été notée avec Batan 2 où la sous population mineure reconnue par l'anticorps monoclonal 7E7 n'est plus visible dès le 50ème passage.

Tableau II. Résultats obtenus avec l'anticorps monoclonal 7 E 7 et la sonde génomique TaT 17 sur les 4 isolats à différents niveaux de culture.

	Anticorps monoclonal 7E 7				Sonde TaT 17
	Passage < 10	Passage 50	Passage 100	Passage 200	Passage < 10
Batan 2	-*	-	-	-	3 sou-populations
Béja	+	+	+	+	1 sous-population
Djedeida 4	+	+	+	+	4 sous-populations **
Sousse	-	-	-	-	2 sous-populations

+ : Fluorescence sur > 80-95% des cellules
-* : Fluorescence sur 1-2% des cellules
- : Absence de fluorescence
** : Résultats confirmés après clonage

Etudes *in vivo*

Depuis Juin 1992, 3 essais ont été réalisés avec les isolats Béja p2 et p100, Batan 2 p2, p100 et p200 et Djedeida 4 p8, p100 et p200 en vue de déterminer leur état d'atténuation et la protection qu'ils déterminent.

Protocole général de l'étude

Chaque isolat à niveau donné de culture a été inoculé par voie sous cutanée à un groupe de 4 veaux Frison-Holstein agés de 4 à 5 mois, à la dose de 2 x 10 cellules infectées provenant de cultures fraiches. La température des animaux a été prise quotidiennement, l'hématocrite, la parasitémie sur frottis sanguin et la parasitisme sur frottis ganglionnaire ont été suivis 3 fois par semaine. Entre les jours 26 et 44 de l'infection immunisante par les cultures cellulaires de *T. annulata*, les veaux ont subi une infection d'épreuve par des surnageants de broyats de tiques infectées par *T. annulata* (S.B.T.I). Pour chaque essai, des veaux témoins indemnes de theileriose ont été inoculés par le SBTI d'épreuve. Deux SBTI ont été utilisés dans ce travail : le SBTI Djedeida 4 préparé expérimentalement avec des tiques *Hyalomma excavatum* de la colonie de l'E.N.M.V, et administré à 1, 6 tique équi-

valent (te) et le SBTI Chergui préparé directement à partir de tiques *Hyalomma detritum* collectées dans une étable à endémie stable de theileriose (étable Chergui).

Trois essais ont été réalisés au cours de ce travail :

- Essai I conduit en juin-juillet 1992 avec Béja p1 Béja p100, Djedeida 4 p8 et Djedeida 4 p200. Les veaux immunisés ont subi une infection d'épreuve par le SBTI Djedeida 4 à 1,6 te au 28ème jour pour Béja p02, Béja p100 et Djedeida 4 p100 et au 26ème jour pour Djedeida 4 p8. A la suite de l'infection d'épreuve, 3 veaux du groupe Béja p100 ont été traités par la buparvaquone (Butalex ND). Ce traitement a été instauré sur la base des critères suivants :
  - T° > 40° C pendant plus de 5 jours
  - Parasitémie > 50‰
  - Hématocrite < 20%.

- Essai II ayant eu lieu en novembre 1992 - janvier 1993 avec les isolats Batan 2 p2, Batan 2 p100, Batan 2 p200 et Djedeida 4 p200. Au 44ème jour les veaux immunisés ainsi qu'un animal témoin, ont subi l'inoculation d'épreuve au SBTI Djedeida 4 à 1,6 te. Au cours de cet esai 1veau du groupe Batan 2 p2 et un autre du groupe Djedeida 4 p200 ont succombé des suites d'une indigestion acide, consécutive à un excès accidentel d'aliment concentré.

- Essai III : il a été effectué en mai-juillet 1993 avec les isolats Batan 2 p100 et Djedeida 4 p200. L'inoculation d'épreuve a eu lieu au jour 31 avec le SBTI de terrain Chergui à la dose de 7 te. Ce SBTI a été pré-titré sur 2 groupes de 2 veau x infectés respectivement par 5 et 10 te, un troisième lot de 2 veaux témoins a été infecté par le SBTI Chergui à 7 te en même temps que les groupes immunisés.

Résultats et discussion

Les résultats moyens obtenus au cours de ces différents essais sont rapportés dans les Tableaux III, IV et V respectivement pour les réactions à l'infection immunisante et aux inoculations d'épreuve par les SBTI Djedeida 4 et Chergui.

Les 3 isolats non atténués testés dans ce travail présentent des degrés de virulence variables, Djedeida 4, l'isolat de plus complexe, étant notablement le plus pathogène (mortalité de 3 veaux /4) suivi de Batan 2 (mortalité 1 veau /4), et enfin Béja. Dans un autre travail non rapporté ici l'isolat Sousse a présenté une virulence intermédiaire entre Batan 2 et Béja.

Après culture à long terme les 3 isolats Béja, Batan 2 et Djedeida 4 ont présenté un état d'atténuation satisfaisant, avec une disparition des formes érythrocytaires, une réduction de la durée de la fièvre à moins de 2 jours notamment pour les températures > 40°, et une baisse relative de l'hématocrite de moins de 15% avec absence de valeurs d'hématocrite inférieures à 20%. Cette atténuation a été obtenue plus rapidement, à p100 avec Batan 2 et Béja et au contraire plus tardivement à p200 avec Djedeida 4 l'isolat le plus virulent.

Lors de l'essai III ayant eu lieu durant l'été 1993, les durées de fièvre > 39,5° ont été plus longues que dans l'essai II conduit en hiver et cela bien que dans les 2 cas les mêmes isolats Batan 2 p100 et Djedeida 4 p200 aient été utilisés . Cette différence serait probablement due à la tendance des jeunes veaux, durant les périodes de chaleurs estivales, à

Tableau III. Résultats moyens après infection par les isolats en culture.

Groupe	Nombre de veaux	1er jour de Te > 39,5°C	1er jour de Te ≥ 40°C	Veaux en accès fébrile	Durée de l'accès fébrile	Baisse du HT* %	Nombre de jours HT* < 20	Jour apparition ME**	Veaux avec ME**	Traitement	Mortalité	Pic de parasitémie en %
Djed 4 p 08	4	15 (15-20)	17 (14-24)	4/4	6,75 (> 39,5) 3,5 (≥ 40)	50,41	7	16 (14-18)	4/4	3	3/4	7-338
Djed 4 p 101	4	16,75 (12-19)	15,25 (13-21)	4/4	9,75 4,75	23,52	0,5	24 (21-2)8	4/4	0	0/4	<1-9
Djed 4 p 200 (11/92-01/93)	4	13,33 (11-16)	13,33 (11-16)	3/4	3,25 2	13,01	0	31	1/4	0	0/4	0
Djed 4 p 200 (05/93-06/93)	4	13,75 (11-18)	15,75 (14-19)	4/4	6,75 2	14,32	0	-	0/4	0	0/4	0
Bat 2 p 02	4	14	14,75 (14-16)	4/4	9 5	25,09	0,5	15,5 (14-17)	4/4	0	1/4	6-276
Bat 2 p 100 (11/92-01/93)	4	18,25 (17-20)	18	4/4	1,5 0,25	9,5	0	-	0/4	0	0/4	0
Bat 2 p 100 (05/93-06/93)	4	13,33 (13-18)	18 (14-26)	3/4	7 1,75	10,32	0	-	0/4	0	0/4	0
Bat 2 p 200 (11/92-01/93)	4	14,25 (11-17)	13,5 (15-12)	4/4	3,25 0,75	9,66	0	-	0/4	0	0/4	0
Beja p 02	4	17,75 (17-18)	17,5 (17-18)	4/4	5 3,2	13,19	0	20,5 (14-26)	4/4	0	0/4	0
Beja p 100	4	12,67 (12-14)	12,5 (12-13)	3/4	2,25 0,75	6,31	0	0	0/4	0	0/4	0-<1

Tableau IV. Résultats moyens après inoculation d'épreuve par le SBTI Djedeida 4.

	Groupe 1 Lot témoin	Groupe 2 Beja P 02	Groupe 3 Beja p 100	Groupe 4 Djed 4 p 08	Groupe 5 Djed 4 p 101	Groupe 6 Djed 4 p 200 (11/92-01/93)	Groupe 7 Bat 2 p 02	Groupe 8 Bat 2 p 100 11/92-01/93)	Groupe 9 Bat 2 p 200
Infection d'épreuve	1,6 te Dje 4	1,6 te Dje 4	1,6 te Dje 4	1,6 te Dje 4	1,6 te Dje 4	1,6 te Dje 4	1,6 te Dje 4	1,6 te Dje 4	1,6 te Dje 4
Nbre veaux	4	4	4	01*	4	3	2	4	4
1er jour de									
T° >39,5	6	8,75	6,75	14	8	7,5	7,5	6,75	7
T° ≥ 40	6	12,5	7,75	14	10,25	8	8	7	7,75
Nbre jours à									
T° > 39,5	10,75	11,75	22	4	11,75	6	4	11,75	13,25
T° ≥ 40	10	4,25	15		4	2,5	2	7,75	10,25
Hématocrite	22,5	24	18	14	25	28,33	31,5	16	18,75
minimum	12-34	19-30	15-20		20-29	23-31	29-34	11-21	0ct-28
Réduction de l'hématocrite	45%	13,35%	44,03%	32,24%	8,55%	16,65%	27,85%	60,96%	52,75%
Veaux traités	0	0	3	0	0	0	0	0	0
Veaux morts	4	0	0	0	0	0	0	1	0
Nbre de veaux à hématocrite<20	2/4	1/4	2/4	1/1	0/4	0	0	3	2
Nbre de jours à hématocrite<20	1,25	0,5	3	2	0	0	0	4,25 0-8	3,5 0-10
Parasitémie maximale (%)	50-790	<1-5	45-160	4 à 12	<1-1	<1-11	<1-5	24-387	7-326

Tableau V. Résultats moyens après inoculation par le SBTI Chergui.

	Group 10 Lot témoin SBTI Chergui 5 te	Group 11 Lot témoin SBTI Chergui 10 te	Group 12 Lot témoin SBTI Chergui 7 te	Group 13 Batan 2 p100 SBTI Chergui 7 te	Group 14 Djed 4 p200 SBTI Chergui 7 te
Nbre de veaux	2	2	2	4	4
1er jour de					
T° > 39,5°C	6,5	7,5	6,5	7,5	7
T ≥ 40°C	7,5	10	8,5	7,5	8
Nbre de jours de					
T° > 39,5°C	20	21	20	10	12,75
T° ≥ 40°C	17,5	17	14	6,5	7
Hématocrite	16,5	13	23	22	20,5
minimum	16-17	13	15-31	18-27	16-27
Nombre de					
veaux morts	1/2	1/2	1/2	0	0
Nbre de veaux à					
hématocrite < 20	2/4	2/4	1/2	1/4	2/4
Nbre de jours à					
hématocrite < 20	1,5	6	2,5	1	3

présenter des températures comprises entre 39,5° et 40°C même en dehors de toute infection. Cependant en se référant aux valeurs thermiques ≥40°C on retrouve dans les deux essais des accés fébriles de durées très limitées.

L'infection d'épreuve par le SBTI Djedeida 4 à 1,6 te s'avère extrêmement virulente. En pratique dans les conditions de terrain, il est peu probable de trouver des infections similaires (infection exprimée en nombre d'acini infectés). Cette infection d'épreuve a cependant été utilisée ici dans l'unique but de mieux révéler des différences dans les niveaux de protection conférés par les cultures testées. Dailleurs les résultats obtenus montrent que ce degré de protection :

- décroît nettement avec l'atténuation des isolats,
- dépend de la virulence de l'isolat utilisé.

Ainsi Batan 2 et Djedeida 4 protègent mieux que Béja, cette corrélation semble même persister avec les cultures atténuées. Cependant pour Djedeida 4 la meilleure protection obtenue serait probablement liée à l'utilisation d'un SBTI homologue.

Dans le cas de l'essai I l'infection d'épreuve aux jours 26 et 28 pour les groupes Djedeida 4 p8 et p100 est probablement trop précoce, étant données les répercussions importantes de l'infection immunisante sur l'état de santé des animaux, ce qui d'ailleurs expliquerait la protection plus élevée obtenue paradoxalement avec Djedeida 4 à p200 lors de l'essai II.

Enfin la survenue d'un cas de mortalité après infection d'épreuve dans le groupe Batan 2 p100 de l'essai II reste difficile à interpréter compte tenu de la possibilité d'intervention de plusieurs facteurs dans le développement de l'immunité vaccinale et la réaction à l'infection d'épreuve : mauvaise réponse à l'infection vaccinale, phénomène de rejet des cellules vaccinales et enfin réceptivité élevée à l'infection d'épreuve.

Les 2 isolats atténués Batan 2 p100 et Djedeida 4 p200 déterminent un état de protection relative similaire contre le SBTI Chergui à 7 te. Cependant par rapport aux essais précédents avec le SBTI Djedeida 4 cette protection apparaît :
- plus importante avec Batan 2 p100 étant donné la moindre virulence du SBTI Chergui,
- au contraire plus faible avec Djedeida 4 p200 étant donné le caractère hétérologue de ce SBTI.

A la suite des résultats de ces 3 essais l'isolat Batan 2 p100 a été retenu en vue d'essais ultérieurs d'évaluation en conditions expérimentales et sur le terrain pour les raisons suivantes:
- protection relative contre le SBTI Djedeida 4 et le SBTI Chergui, ce dernier étant probablement plus représentatif d'une infection naturelle,
- rendement plus élevé en culture avec formation d'une suspension cellulaire homogène,
- viabilité plus importante après conservation à température du laboratoire (20°C).

Bibliographie

1. Ben Miled L., Darghouth M., Bernadi G., Dellagi K. (1991). Discrimination between Tunisian *Theileria annulata*. In : Singh D.K., Varshney B.C., eds. *Proceedings of the second EEC workshop on orientation and coordination of research on tropical theileriosis*. NDDB, ANAND, INDE : 47.
2. Brown C.G.D. (1987). Theileridae. In : Taylor A.E.R., Baker J.R., eds. In vitro *methods for parasites cultivation*. Academic Press, Londres : 230-253.
3. Darghouth M.E.A., Ben Miled L., Bouattour A., Kilani M., Brown C.G.D. (1992). Epidemiological investigation on tropical theileriosis in Tunisia with relevance to the production of a live attenuated vaccine. EEC contractant Workshop on Resistance or Tolerance to Diseases and Veterinary Epidemiology and Diagnostic Methods. 2-6 Nov 1992, Rethymno, Ile de Crête, Grèce.
4. Melrose T.R., Brown C.G.D., Sharma R.D. (1990). Glucose phosphate isomerase patterns in bovine lymphoblastoid cell lines infected with *T. annulata* and *T. parva* with an improved enzyme visualisation method using meldola Blue. *Res Vet Sci* ; 29 : 298-304.

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp.245-257.

24

Les glycoprotéines des herpès virus bovins 1 et 4

E. THIRY*, E. BARANOWSKI*, P. LOMONTE*, A. VANDERPLASSCHEN*,
M. BUBLOT**, J. DUBUISSON***, P.P. PASTORET*

* *Virologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Sart-Tilman, Liège, Belgique.*
** *Rhône Mérieux, Laboratoire IFFA, Lyon, France.*
*** *Department of Molecular Microbiology, Washington University, School of Medicine Saint Louis, USA.*

Résumé

Les glycoprotéines des herpès virus jouent un rôle primordial dans la conception des vaccins dirigés contre ces virus. D'une part, certaines glycoprotéines possèdent des propriétés immunogénétiques qui en font des composants essentiels des vaccins. D'autre part, l'absence, dans le vaccin, d'une glycoprotéine non essentielle pour la multiplication du virus offre le moyen de distinguer les animaux vaccinés des animaux infectés naturellement.
L'étude des glycoprotéines mineures de l'herpès virus bovin 1 (BHV-1) vise à caractériser des glycoprotéines non essentielles, dont le gène peut être décelé. Une stratégie particulière a été utilisée pour préparer l'antigène destiné à l'immunisation des souris : les glycoprotéines majeures gI, gII et gIV ont été éliminées d'une suspension de glycoprotéines de BHV-1 par immunoaffinité. Les anticorps monoclonaux obtenus par cette

méthode ont permis d'identifier trois glycoprotéines du BHV-1 : il s'agit de gp42, gp93 et gp108.
L'étude des glycoprotéines de l'herpès virus bovin 4 (BHV-4) est destinée à préciser leur rôle biologique dans l'infection virale. Le rôle du BHV-4 dans certaines maladies du bétail amène à considérer le développement des vaccins. Le caratère non-pathogène de certaines souches de BHV-4, comme la souche V.Test, permet leur utilisation comme vecteur viral d'expression de gènes, par exemple dans la perspective de vaccins recombinants pour le bovin. Les gènes codant pour les glycoprotéines non essentielles du BHV-4 sont également des sites potentiels d'insertion de gènes étrangers. Quatre glycoprotéines majeures ont été identifiées : gp1, gp6/gp10/gp17, gp8 et gp11. La glycoprotéine gp8 est impliquée dans la phase d'adsorption du virus sur la membrane cellulaire, par interaction avec les héparan sulfates. L'analyse du génome du BHV-4 a permis de localiser les gènes codant pour les homologues des glycoprotéines gB, gH et gL du virus herpès simplex. Les séquences des gènes des deux glycoprotéines gH et gL ont été obtenues. L'identification des gènes codant pour ces glycoprotéines est la première étape de l'étude qui permettra de définir lesquelles sont essentielles pour la multiplication virale.

Les glycoprotéines des herpès virus jouent un rôle primordial dans les interactions entre ces virus et leurs cellules-hôtes. En effet, ces molécules, présentes à la surface de l'enveloppe virale sont responsables de l'attachement et de la pénétration du virus dans la cellule sensible. A la fin du cycle de multiplication virale dans la cellule, les glycoprotéines sont également impliquées dans les phases de maturation et de sortie du virus, ainsi que dans la propagation du virus de cellule à cellule. Les rôles fonctionnels des glycoprotéines des herpès virus sont donc multiples; ils sont supportés par au moins 10 molécules différentes (glycoprotéines gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM chez le virus herpès simplex (HSV)).

Les glycoprotéines sont des cibles importantes pour la réponse immunitaire de l'hôte. Tant la réponse humorale que la réponse cellulaire sont dirigées contre elles, mais pas de manière exclusive. Aussi, certaines glycoprotéines possèdent des propriétés immunogéniques qui en font des composants essentiels du vaccin. D'autre part, certaines glycoprotéines sont non essentielles, c'est à dire qu'elles ne sont pas indispensables pour la multiplication virale. La délétion du gène codant pour une telle glycoprotéine n'affectera que d'une façon mineure la multiplication du virus. Cette approche a donc été récemment développée pour produire des virus vaccinaux porteurs d'un marqueur sérologique : l'absence d'une réponse sérologique envers la glycoprotéine permet de différencier l'animal vacciné de l'animal infecté de manière naturelle.

L'étude des glycoprotéines des herpès virus 1 et 4 (bovine herpes virus 1 et 4 : BHV-1, BHV-4) revêt donc une importance particulière dans la perspective du développement de vaccins prteurs de délétion dans le cas du BHV-1 et de vecteurs viraux dans le cas du BHV-4. Le présent travail a donc pour but de caractériser les glycoprotéines des deux virus et de préciser leurs rôles dans la biologie de l'infection virale.

Les glycoprotéines gp42, gp93 et gp108 de l'herpès virus bovin 1

Le BHV-1 appartient à la sous-famille des *alphaherpes virinae*. C'est un virus pathogène du bétail responsable de la rhinotrachéite infectieuse bovine, d'avortement et de conjonctivite, ainsi que d'une affection génitale dénommée la vulvo-vaginite infectieuse pustuleuse [14]. Quatre glycoprotéines ont déjà été identifiées par anticorps monoclonaux sur l'enveloppe virale du BHV-1 et sur la membrane plasmique des cellules infectées : gI est un hétérodimère de 130 K composée de deux polypeptides de 74 et 55 K liés par des ponts disulfures; gII est une glycoprotéine de 108 K; gIII et gIV sont des glycoprotéines dimériques, respectivement de 180/91 Ket 140/74 K [26,27,28]. Les glycoprotéines gI, gIII et gIV jouent un rôle très important dans le développement d'une réponse immune protectrice et dans la biologie de l'infection virale. Bien que gIII ne soit pas essentielle pour la multiplication virale, cette glycoprotéine intervient dans l'attachement viral par interaction avec les héparan sulfates de la membrane cellulaire [18]. Les glycoprotéines gI et gIV sont essentielles pour l'infectivité du virus. Elles interviennent également dans l'attachement ; gI et principalement gIV sont impliquées dans la pénétration virale, le phénomène de fusion et le passage de cellule à cellule.

La production de vaccins porteurs de délétion envers le BHV-1 est orientée dans deux directions. La première approche a conduit à une délétion dans le gène codant pour la glycoprotéine gIII. Un BHV-1 porteur d'une telle délétion protège les bovins contre l'épreuve virulente [16]. Néanmoins, cette glycoprotéine gIII est un immunogène majeur pour la réponse de cytotoxicité médiée par les lymphocytes T [4], et elle possède un rôle fonctionnel important dans l'attachement du virus sur la cellule. Le gène codant pour gIII n'apparaît donc pas comme le meilleur site de délétion. La deuxième approche utilise le gène codant pour la glycoprotéine gE comme site de délétion [23], en s'apuyant sur les résultats obtenus chez le virus de la maladie d'Aujeszky par délétion du gène codant pour la glycoprotéine homologue gI [20]. Il existe actuellement un manque crucial d'information sur d'autres glycoprotéines dont le gène pourrait être un site potentiel de délétion.

L'objectif de ce travail est d'identifier des glycoprotéines mineures du BHV-1 et d'étudier leurs propriétés dans la perspective de leur utilisation comme marqueur sérologique. L'analyse génomique du BHV-1 révèle en effet que, à l'instar du virus HSV, le virus possède au moins sept gènes de glycoprotéines : les gènes codant pour gI, gIII, gIV et gH ont été identifiés et séquencés [1]; les gènes codant pour les glycoprotéines gE, gI et gG homologues du virus HSV ont été localisés sur le génome du BHV-1. L'immunisation de souris avec un antigène contenant des virus BHV-1 complets a toujours mené à l'obtention d'anticorps monoclonaux dirigés contre les trois glycoprotéines majeures gI, gIII et gIV. Seuls deux anticorps monoclonaux anti-gII sont décrits dans la littérature [13,28]. Pour parvenir à produire des anticorps monoclonaux envers des glycoprotéines mineures, une stratégie particulière a été utilisée pour préparer l'antigène destiné à l'immunisation des souris : les glycoprotéines gI, gIII et gIV ont été éliminées d'une suspension de protéines de BHV-1 par imunoaffinité. Les anticorps monoclonaux obtenus par cette méthode ont permis d'identifier trois glycoprotéines de BHV-1 différentes de gI, gIII et gIV : il s'agit de gp42, gp93 et gp108.

Matériel et méthodes

Les méthodes de purification de l'antigène viral, d'obtention des anticorps monoclonaux, de radioimmunoprécipitation, d'électrophorèse en SDS-PAGE et le test de neutralisation virale sont décrits par Baranowski *et al.* [1].

Résultats

Plusieurs procédures d'immunisation de souris ont été utilisées. Les détails concernant chaque immunisation sont repris dans le Tableau I. Les surnageants d'hybridomes ont été criblés par immunofluorescence. Cent cinquante-quatre clones ont été obtenus. Les antigènes reconnus par les anticorps monoclonaux ont été caractérisés par radioimmunoprécipitation de lysat de cellules infectées marquées à la glucosamine ^{3}H. Du lysat de cellules non infectées a été utilisé comme contrôle négatif.

Tableau I . Production d'anticorps monoclonaux envers les glycoprotéines de l'herpès virus bovin 1 selon les différentes procédures d'immunisation.

Anticorps monoclonaux	Source d'antigène pour l'immunisation des souris		
	lysat de virus	Lysat de cellules infectées	
		Tolérisation des souris par le lysat de cellules	Tolérisation des cellules par le lysat cellulaire plus gI, gIII, gIV et les nucléocapsides
Anti-BHV-1	82	60	12
Anti-gI	3	4	1
Anti-gIII	-	-	-
Anti-gIV	2	-	-
Anti-gp108	18	14	7
Anti-gp42	-	1	-
Anti-gp93	-	1	-

Les glycoprotéines précipitées par les anticorps monoclonaux provenant de lysat de cellules infectées marquées à la glucosamine ^{3}H ont été analysées par électrophorèse SDS-PAGE en conditions réductrices. Trois glycoprotéines virales ont été identifiées et dénommées gp108, gp42 et gp93 en fonction de leur poids moléculaire (Figure 1).

Du lysat cellulaire infecté ou non, marqué à la méthionine ^{35}S, a été utilisé pour compléter la caractérisation de ces glycoprotéines. En conditions réductrices, le même profil électrophorétique était observé pour gp108 ; la glycoprotéine gp42 était co-précipitée avec un polypeptide de 12,5 K (Figure 2). La glycoprotéine gp93 n'était pas détectée par le marquage à la méthionine ^{35}S. Néanmoins, gp93 était co-précipitée avec deux polypeptides de moindre intensité de 63 et 47 K. Le marquage à la leucine ^{3}H a permis d'observer cette glycoprotéine (Figure 2). En conditions non réductrices, le même profil

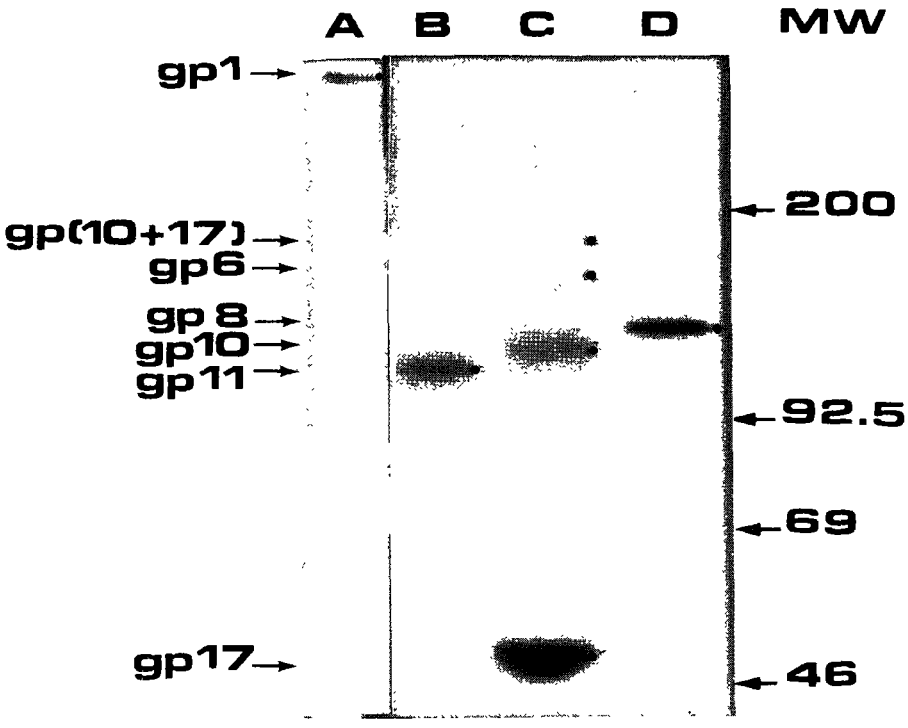


Figure 1. Profil des glycoprotéines de l'herpès virus bovin 1 (BHV-1) identifiées par les anticorps monoclonaux. Immunoprécipitation de polypeptides marquées à la glucosamine ^{3}H à partir de cellules infectées par le BHV-1 (V) ou de cellules non infectées (C). Electrpophorèse SDS-PAGE (10%) en conditions réductrices. Les protéines sont précipitées par des anticorps monoclonaux anti-gp42 (A), anti-gp108 (B), et anti gp93 (C), ou par des IgG de lapin anti-immunoglobulines de souris, comme contrôle (D). Les valeurs des standards de poids moléculaire sont indiqués en marge de la figure (reproduit d'après Baranowski *et al.* [1], avec permission).

électrophorétique était observé pour gp42 et gp93, indiquant que des ponts disulfures n'étaient pas impliqués dans leur interaction avec les polypeptides co-précipités.

Neuf anticorps monoclonaux sur 32 dirigés contre gp108 ont neutralisé le BHV-1. Cette activité n'était pas influencée par la présence de complément. Trois anticorps monoclonaux anti-gp108 non neutralisants étaient capables de réduire le développement des plages de lyse lorsque le virus se multipliait en présence de ces anticorps monoclonaux. Aucune activité neutralisante n'a été détectée pour l'anticorps monoclonal anti-gp93 ni pour l'anticorps monoclonal anti-gp42.

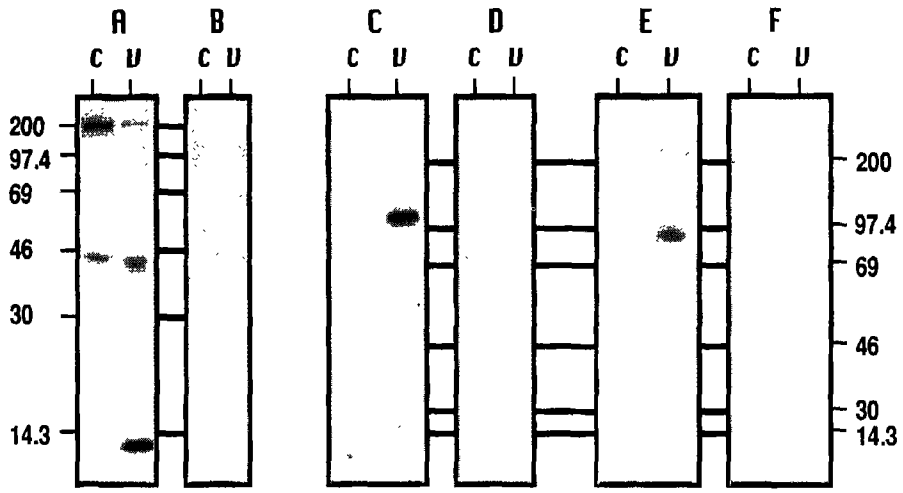


Figure 2. Profil des polypeptides de l'herpès virus bovin 1 (BHV-1) identifiées par les anticorps monoclonaux. Immunoprécipitation de polypeptides marqués à la méthionone ^{35}S (A,B,C,D) ou à la leucine ^{3}F (E,H) à partir de cellules infectées par le BHV-1 (V) ou de cellules non infectées (C). Electrophorèse en SDS-PAGE (15% : A, B; 10% : C, D, E, F) en conditions réductrices. Les protéines sont précipitées par des anticorps monoclonaux anti-gp42 (A), anti-gp108 (C), et anti-gp93 (E), ou par des IgG de lapin anti-immunoglobulines de souris (B, D, F). (reproduit d'après Baranowski *et al.* [1], avec permission).

Discussion

Trois nouvelles glycoprotéines du BHV-1 ont été identifiées dans le lysat de cellules infectées par le BHV-1. L'identification des gènes codant pour ces glycoprotéines permettra de définir leur homologie avec des gènes de glycoprotéines du HSV. La glycoprotéine gp108 possède le même poids moléculaire que gII. Les deux glycoprotéines sont probablement identiques.

Le rôle fonctionnel de la gp108 a été approché par l'étude de l'effet d'anticorps monoclonaux anti-gp108 sur les plages de lyse. La réduction du développement des plages permet d'impliquer en première approche la glycoprotéine gp108 dans la transmission du virus de cellule à cellule. Cette transmission peut se produire par deux phénomènes : soit par fusion de cellules résultant dans l'apparition de polycaryons, soit par un passage direct sans fusion de membranes plasmiques. La formation de polycaryons est très rare dans les cultures de cellules infectées par leBHV-1. Il est donc probable que la gp108 agisse sur la transmission directe du virus de cellule à cellule. Le rôle fonctionnel des deux autres lycoprotéines reste à définir.

En conclusion, les trois nouvelles glycoprotéines identifiées sont des cibles potentielles pour le marqueur sérologique à introduire dans les vaccins de nouvelle génération contre la rhinotrachéite infectieuse bovine. Ce sont des glycoprotéines mineures, puisqu'elles sont présentes en faible quantité , mais leur caractère non essentiel n'est pas encore démontré. La réponse sérologique développée chez le bovin envers ces différentes glycoprotéines est en cours d'étude, de manière à vérifier leur intérêt comme marqueur sérologique.

Les glycoprotéines gp1, gp6/gp10/gp17, gp8 et gp11 de l'herpès virus bovin 4

Le bovine herpès virus 4 (BHV-4) est un herpès virus répandu dans le monde entier, appartenant à la sous-famille des *gamaherpesvirinae*. Certaines souches de BHV-4 ont été isolées de bovins malades, d'autres ont été isolées de bétail apparemment sain ou même de culture de cellules primaires. Peu d'isolats de BHV-4 sont réellement pathogènes; la majorité d'entre eux n'induisent que peu de signes cliniques lors d'infections expérimentales de bovins [22,23].

Le BHV-4 infecte des cellules mononucléées sanguines [19]. Il peut être isolé virtuellement de tous les organes. Son isolement d'un tissu ou d'un organe ne signifie pas son rôle dans les lésions observées, mais peut simplement résulter de sa présence incidente dans des cellules sanguines au moment de la récolte du prélèvement. L'implication du BHV-4 dans les maladies du tractus génital est étayée par plusieurs résultats. Le virus a été associé à la métrite post-partum et la reproduction expérimentale de cette affection a été réussie [30]. Le virus a aussi été isolé de cas d'avortement, mais son rôle n'est pas définitivement élucidé [31].

Il existe donc un double intérêt à étudier les glycoprotéines du BHV-4. Tout d'abord, le rôle du BHV-4 dans certaines maladies du bétail amène à considérer le développement de vaccins. Ensuite, le caractère non pathogène de souches du BHV-4, comme la souche V.Test [5,7,21], permet leur utilisation comme vecteur viral d'expression de gènes, par exemple dans la perspective de vaccins recombinants pour le bovin. Les gènes codant pour des glycoprotéines non essentielles du BHV-4 sont en effet des sites potentiels d'insertion de gènes étrangers.

Matériel et méthodes

L'obtention des anticorps monoclonaux dirigés contre les glycoprotéines du BHV-4 est décrite dans Dubuisson *et al.* [6,11,12]). Les techniques de radioimmunoprécipitation et l'étude de la glycosylation par les enzymes endoglycosidase Fet N, et la glycosydase F, sont également décrits par les mêmes auteurs. Les techniques d'inhibition de l'adsorption virale par l'héparine, d'utilisation des enzymes héparinase I et chondroïtinase ABC, la production de virus marqué par la thymidine ^{3}H et la chromatographie d'affinité utilisant la sépharose-héparine sont décrites par Vanderplasschen *et al.* [25]. Les méthodes de séquençage du DNA et l'analyse par ordinateur des séquences sont décrites par Bublot *et al.* [3]).

Résultats

Vingt-neuf protéines structurales sont identifiées dans le virus purifié et une protéine de140K est probablement la protéine majeure de capside [6]. Parmi ceux-ci, dix polypeptides sont glycosylés. Quatre glycoprotéines ont été caractérisées jusqu'à présent (Figure 3) : gp1 possède un haut poids moléculaire (>300K) et contient des glycans N-liés [12]. Gp6/gp10/gp17 est un complexe de trois glycopolypeptides contenant des glycans N-liés [8] : gp10 etgp17 sont liés par des ponts disulfures; gp6 est liée aux autres par des liaisons non covalentes. Le précurseur p(gp10/gp17) a aussi été identifié [6,10]. Gp8 est une glycoprotéine présente à la fois dans le virion et dans le milieu de culture des cellules

infectées [11]. Elle est peu glycosylée. Gp11 contient des glycans N-liés et est liée de manière non covalente à un polypeptide non glycosylé, VP24 [8,10].

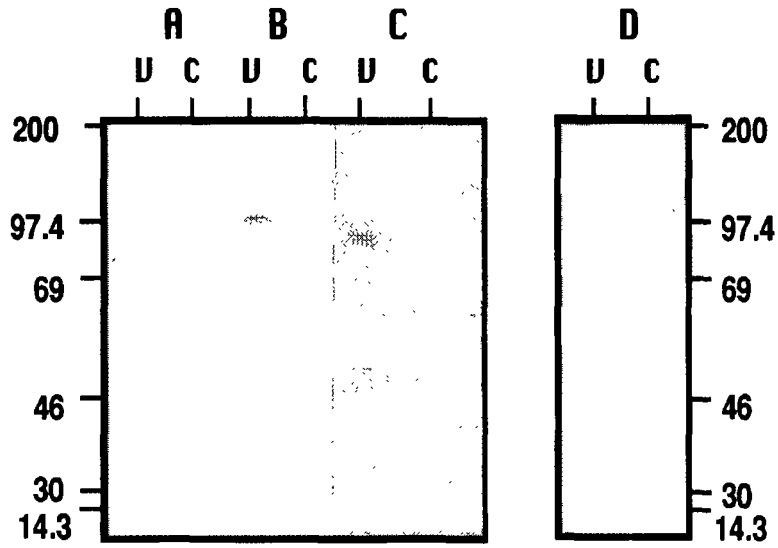


Figure 3. Profil des glycoprotéines du BHV-4. Immunoprécipitation de polypeptides marqués à la glucosamine ^{3}H à partir de lysats de cellules infectées. Les protéines sont précipitées par des anticorps monoclonaux anti-gp1 (A), anti-gp11 (B), anti-gp6/gp10/gp17 (C), anti-gp8 (D). (reproduit d'après Thiry *et al.* [24], avec permission).

Le rôle fonctionnel de la glycoprotéine gp8 a été étudié plus en détail. Cette glycoprotéine interagit avec les héparan sulfates présents à la surface de la cellule et intervient donc dans le processus d'adsorption du virus. Plusieurs données étayent ce résultat. L'héparine soluble est capable de bloquer l'infection de cellules GBK (*Georgia bovine kidney*) par le BHV-4, en inhibant l'attachement viral (Figure 4). Néanmoins, après adsorption du virus sur cellules GBK, l'héparine est capable de détacher partiellement le virus adsorbé. La digestion enzymatique des héparan sulfates de la surface cellulaire diminue la liaison des virus aux celluels et rend les cellules partiellement résistantes à l'infection, tandis que la digestion enzymatique des chondroïtines sulfates n'altère pas la liaison du virus aux cellules. Le BHV-4 purifié et marqué par un isotope radioactif se lie aux cellules CHO (*Chinese hamster ovary*) K1, alors que la liaison du virus aux cellules CHO déficientes dans l'ensemble des glycosaminoglycans ou déficientes uniquement en héparan sulfate est significativement diminuée. Par chromatographie d'affinité envers l'héparine, la glycoprotéine gp8 a été connue comme la protéine virale se liant à l'héparine immobilisée. Elle est éluée en présence d'héparine soluble (Figure 5) [25].

Parmi les glycoprotéines du BHV-4 identifiées, il convient de définir lesquelles sont essentielles pour la multiplication virale. L'identification des gènes codant pour ces glycoprotéines est la première étape de cette étude.

La comparaison de séquences nucléotidiques disposées sur l'ensemble du génome du BHV-4 avec les génomes de l'herpès virus saimiri (HVS) et du virus Epstein-Barr (EBV)

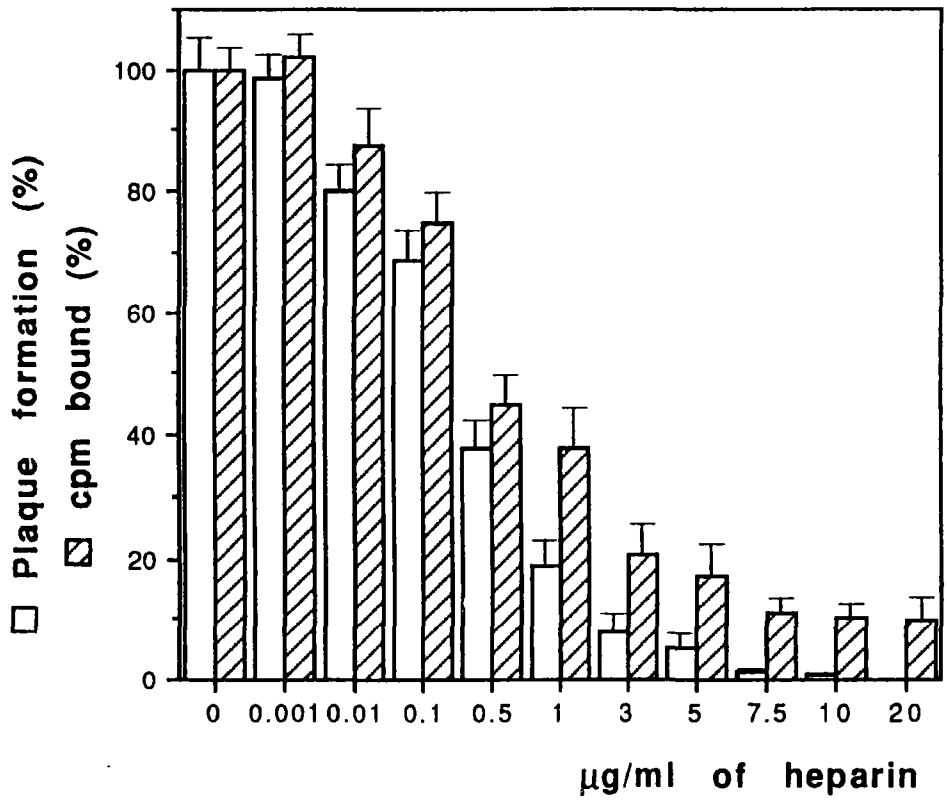


Figure 4. Effet de l'héparine sur la formation de plages de lyse et l'adsorption de BHV-4. Des cellules GBK confluentes ont été incubées à 37°C pendant 1 h avec du PBS contenant de l'albumine sérique bovine (PBSA) et les concentrations indiquées d'héparine et avec le virus purifié ou 10^5 cpm de virus purifié à la thymidine ^3H. Le contrôle représente environ 200 unités formant plages. Pour les essais de liaison, le nombre de coups qui restaient associés à la culture cellulaire était déterminé après lavage au PBSA. Dans cette expérience, approximativement 27% de la radioactivité restait associée aux cellules après adsorption virale sans addition d'héparine. Les résultats sont exprimés comme le pourcentage du contrôle. (Reproduit d'après Vanderplasschen *et al.*. [25], avec permission).

[3] ont permis de localiser trois gènes de glycoprotéines : les homologues des glycoprotéines gB, gH et gL du virus herpès simplex. Le gène codant pour gB se trouve dans le premier bloc de gènes conservés; les gènes codant pour gH et gL se trouvent dans le deuxième bloc de gènes conservés parmi les *gammaherpesvirinae* (Figure 6). Le gène codant pour la glycoprotéine gH se trouve adjacent au gène codant pour la thymidine kinase [17]. Le séquençage de gB a été réalisé par ailleurs [15]; les séquences des gènes des deux glycoprotéines gH et gL ont été obtenues. Des expériences d'expression de ces gènes en système eucaryote sont en cours afin de déterminer s'ils codent pour l'une des quatre glycoprotéines déjà identifiées. L'analyse de séquences du BHV-4 qui contiennent des gènes susceptibles de coder pour d'autres glycoprotéines est en cours d'étude.

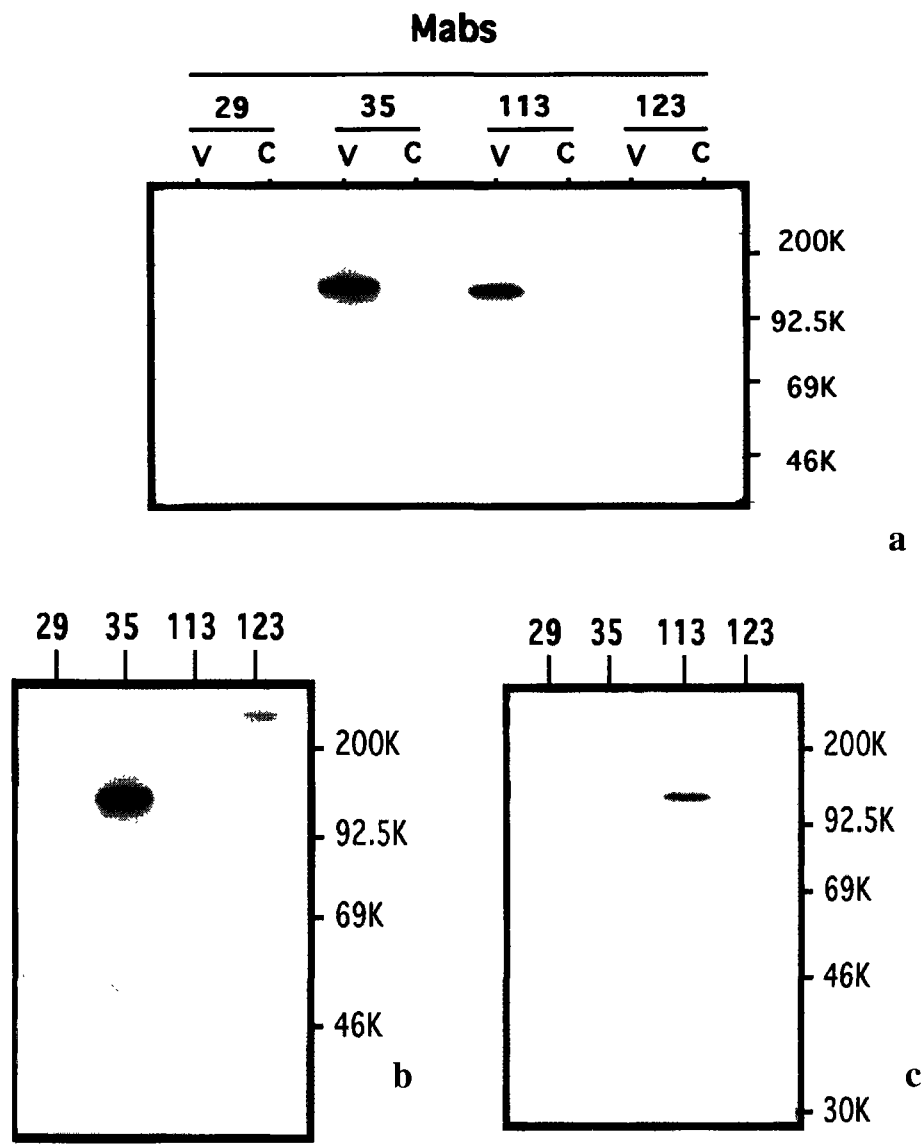


Figure 5. La glycoprotéine gp8 de l'herpèsvirus bovin 4 (BHV-4) est liée à l'héparine.
a : lysat cellulaire infecté et marqué par un radio-isotope (V); lysat cellulaire marqué non infecté (C).
b : le matériel non lié obtenu après incubation du lysat cellulaire infecté marqué avec des billes de sépharose-héparine a été immunoprécipité par des anticorps monoclonaux dirigés contre les glycoprotéines du BHV-4.
c : le matériel lié élu par l'héparine a été immunoprécipité par des anticorps monoclonaux dirigés contre les glycoprotéines du BHV-4.
Mab 29 : reconnaît la glycoprotéine gp11/VP24.
Mab 35 :r econnaît la glycoprotéine gp6/gp10/gp17
Mab 113 : reconnaît la glycoprotéine gp8
Mab 123 : reconnaît la glycoprotéine gp1.
(Reproduit d'après Vanderplasschen *et al.* [25], avec permission.)

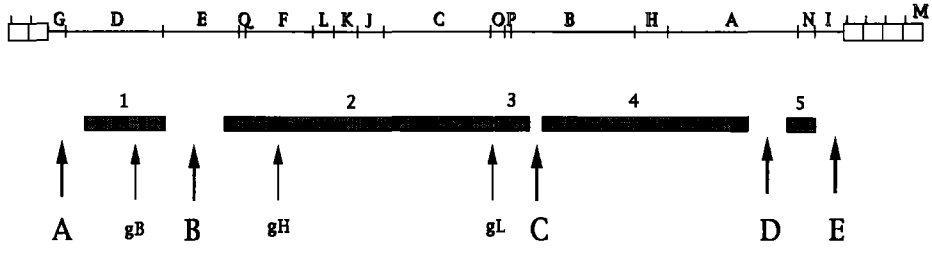


Figure 6. Le génome de l'herpès virus bovin 4 (BHV-4) est représenté par la carte de restriction *Eco* RI. Les cinq blocs de gènes conservés parmi les *gammaherpesvirinae* sont schématisés par des barres horizontales noircies. Les lettres majuscules (A à E) précisent les zones génomiques non conservées parmi les *gammaherpesvirinae*. La position des gènes codant pour les homologues des glycoprotéines gB, gH et gL du virus herpès simplex est indiquée par des flèches.

Discussion

Quatre glycoprotéines ont été identifiées jusqu'à présent chez le BHV-4. Il est vraisemblable que le BHV-4 possède d'autres glycoprotéines, à l'instar des autres herpès virus. Parmi ces glycoprotéines, gp8 posède un rôle fonctionnel important, puisqu'elle intervient dans la phase d'adsorption du virus sur la membrane cellulaire. Le rôle de ces glycoprotéines dans la réponse immune doit encore être déterminé.

L'expression de gènes codant pour des homologues des glycoprotéines gB, gH et gL permettra de déterminer si leurs produits correspondent à l'une des quatre glycoprotéines du BHV-4 déjà identifiées.

Conclusions générales

Les résultats obtenus ont permis d'accroître le nombre de glycoprotéines connues du BHV-1 et du BHV-4 et de les caractériser comme protéines : gp42, gp93 et gp108 pour le BHV-1; gp1, gp6/gp10/gp17, gp8et gp11 pour le BHV-4. Parmi celles-ci certaines se révéleront de bons candidats, soit pour la délétion du gène dans la perspective d'un vaccin porteur d'un marqueur sérologique (BHV-1), soit pour la création d'un virus vecteur (BHV-4); d'autres, par leurs caractéristiques antigéniques, seront définies comme des éléments indispensables des vaccins. La glycoprotéine gp108 du BHV-1 et la glycoprotéine gp 8 du BHV-4 possèdent toutes les deux des propriétés fonctionnelles importantes pour la biologie du virus, qui font de leurs gènes de mauvaises cibles pour la délétion ou l'insertion.

Remerciements

Les recherches sur les glycoprotéines du BHV-1 sont subsidiées par l'Institut pour l'encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture. Les

recherches sur les gènes de glycoprotéines du BHV-4 sont financées par un programme d'actions de recherches concertées de la Communauté française de Belgique. Le texte présente des résultats de recherche du Programme national d'impulsion à la recherche fondamentale dans les Sciences de la vie, mis en oeuvre à l'initiative de l'Etat belge -services du Premier Ministre- Programmation de la Politique scientifique. La responsabilité scientifique est assumée par ses auteurs. A. Vanderplasschen est Aspirant au Fonds National de la Recherche Scientifique.

Références

1. Baranowski E., Dubuisson J., Pastoret P.-P., Thiry E. (1993). Identification of 108K, 93K, and 42K glycoproteins of bovine herpesvirus-1 by monoclonal antibodies. *Arch Virol* ;
2. Bublot M., Van Bressem M.-F., Thiry E, Dubuisson J., Pastoret P.-P. (1990). Bovine herpesvirus 4 genome : cloning, mapping and strain variation analysis. *J Gen Virol* ; 71 : 133-142.
3. Bublot M., Lomonte P., Lequarré A.S., Albrecht J.C., Nicholas J., Biesinger B., Biller B., Fleckenstein B., Pastoret P.P., Thiry E. (1992). Genetic relationship between bovine herpesvirus 4 and the gammaherpesviruses Epstein-Barr virus and herpesvirus saimiri. *Virology* ; 190 : 654-655.
4. Denis M., Slaoui M., Keil G., Babiuk L.A., Ernst E., Pastoret P.P., Thiry E. (1993). Identification of different target glycoproteins for bovine herpes virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes depending on the method of *in vitro* stimulation. *Immunology* ; 78 : 7-13.
5. Dubuisson J., Thiry E., Thomas I., Coignoul F., Bublot M., Van Heule G., Dekegel D., Pastoret P.P. (1987). Infection expérimentale de taureaux par injection intratesticulaire d'une souche de bovid herpesvirus isolée d'un cas d'orchite. *Ann Méd Vét* ; 131 : 37-48.
6. Dubuisson J., Boulanger D., Bublot M., Thiry E., Pastoret P.P. (1989). Proteins specified by bovine herpesvirus type 4. Structural proteins of the virion and identification of two major glycoproteins by using monoclonal antibodies. *J Gen Virol* ; 70 : 1743-1753.
7. Dubuisson J., Thiry E., Bublot M., Thomas I., Van Bressem M.F., Coignoul PF., Pastoret P.P. (1989). Experimental infection of bulls with a genital isolate of bovine herpesvirus-4 and reactivation of latent virus with dexamethasone. *Vet Microbiol* ; 21 : 97-114.
8. Dubuisson J., Guillaume J., Boulanger D., Thiry E., Bublot M., Pastoret P.P. (1990). Neutralization of bovine herpesvirus type 4 by pairs of monoclonal antibodies raised against two glycoproteins and identification of antigenic determinants involved in neutralization. *J Gen Virol* ; 71 : 647-653.
9. Dubuisson J., Danyi S., Bublot M., Pastoret P.P., Thiry E. (1991). Comparison of proteins of simian herpesvirus aotus type 2 and bovine herpesvirus type 4. *J Gen Virol* ; 72 : 1145-1150.
10. Dubuisson J., Bublot M., Wellemans G., Pastoret P.P., Thiry E. (1991). Bovine herpesvirus 4 isolates : a comparison of three major glycoproteins. *Vet Microbiol* ; 29 : 251-259.
11. Dubuisson J., Koromyslov I., Pastoret P.P., Thiry E. (1992). Proteins of bovine herpesvirus type 4 released into the culture medium of productively infected cells : identification of a 135 K glycoprotein involved in viral attachment. *J Gen Virol* ; 73 : 189-194.
12. Dubuisson J., Pastoret P.P., Thiry E. (1992). Identification and characterization of the gp1 glycoprotein of bovine herpesvirus type 4 *J GenVirol* ; 73 : 1293-1296.
13. Friedli K., Metzler A.E. (1987). Reactivity of monoclonal antibodies to proteins of a neurotropic bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strain and to proteins of representative BHV-1 strains. *Arch Virol* ; 94 : 109-122.
14. Gibbs E.P.J., Rweyemamu M.M. (1977). Bovine herpesvirus. Part I. Bovine herpesvirus-1. *Vet Bull* ; 47 : 317-342.
15. Goltz M., Broll H., Gielow A., Weigelt W., Mankertz J., Ludwig H., Buhk H.J., Borchers K.

(1992). Bovine herpesvirus 4 gB : phylogenetic and functional relatedness with equivalents of herpesvirus saimiri (HVS) and Epstein-Barr virus (EBV). 17th International Herpesvirus Workshop, Edinburgh, Scotland, 1-7 août 1992.

16. Liang X., Babiuk L.A., Zamb T.J. (1992). An *in vivo* study of a glycoprotein gIII-negative bovine herpesvirus 1 (BHV-1) mutant expressing b-galactosidase : evaluation of the role of gIII in virus infectivity and its use as a vector for mucosal immunization. *Virology* ; 189 : 629-639.
17. Lomonte P., Bublot M., Pastoret P.P., Thiry E. (1992). Location and characterization of the bovine herpesvirus type 4 thymidine kinase gene : comparison with thymidine kinase genes of other herpesvirus. *Arch Virol* ; 127 : 327-337.
18. Okasaki K., Matsuzaki T., Sugahara Y., Okada J., Hasebe M., Iwamura Y., Ohnishi M., Kanno T., Shimuzu M., Honda E., Kono Y. (1991). BHV-1 adsorption is mediated by the interaction of glycoprotein III with heparinlike moiety on the cell surface. *Virology* ; 181 : 666-670.
19. Osorio F.A., Reed D.E. (1983). Experimental inoculation of cattle with bovine herpesvirus-4 : evidence for a lymphoid-associated persistent infection *Am J Vet Res* ; 44 : 975-980.
20. Quint W., Gielkens A.L.J., Van Oirschot J.T., Berns A., Cuypers T. (1987). Construction and characterization of deletion mutants of pseudorabies virus : a new generation of "live" vaccines. *J Gen Virol* ; 68 : 523-534.
21. Thiry E., Pastoret P.P., Dessy-Doizé C., Hanzen C. Calberg-Bacq C.M., Dagenais L., Vindevogel H., Ectors F.(1981). Réactivation d'un herpès virus en culture de cellules testiculaires prélevées chez un taureau atteint d'orchite et d'azoospermie. *Ann Méd Vét* ; 125 : 207-214.
22. Thiry E., Bublot M., Dubuisson J., Pastoret P.P. (1989). Bovine herpesvirus 4 (BHV-4) infections of cattle. In : G. Wittmann ed. *Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs.* Kluwer Academic Publishers, Norwell : 96-115.
23. Thiry E., Dubuisson J., Bublot M., Van Bressem M.F., Pastoret P.P. (1990). The biology of bovine herpesvirus-4 infection of cattle. *Dtsche Tierärzlt Wochenschr* ; 97 : 72-77.
24. Thiry E., Bublot M., Dubuisson J., Van Bressem M.F., Lomonte P., Lequarre A.S., Vanderplasschen A., Pastoret P.P. (1992). Molecular biology of bovine herpesvirus type 4. *Vet Microbiol* ; 3 : 79-92.
25. Vanderplasschen A., Bublot M., Dubuisson J., PastoretP.P., Thiry E. (1993). Attachment of the gammaherpesvirus bovine herpesvirus 4 is mediated by the interaction of the g8 glycoprotein with heparinlike moieties on the cell surface. *Virology* ; 196 : 232-240.
26. van Drunen Littel-van den Hurk S., Babiuk L.A. (1985). Effect of tunicamycin and monenesin on biosynthesis, transport, and maturation of bovine herpesvirus type-1 glycoproteins. *Virology* ; 144 : 204-215.
27. van Drunen Littel-van den Hurk S., Babiuk L.A. (1986). Synthesis and processing of bovine herpesvirus glycoproteins. *J Virol* ; 59 : 401-410.
28. van Drunen Littel-van den Hurk S., van den Hurk J.V., Gilchrist J.E., Misra V., Babiuk L.A. (1984). Interactions of monoclonal antibodies and bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) glycoproteins : characterization of their biochemical and immunological properties. *Virology* ;135 : 466-479.
29. Van Engelenburg F.A.C., Kaashoek M.J., Rijsewijk F.A.M., van den Burg L., Moerman A., Gielkens A.L.J., van Oirschot J.T. (1992). Deletion of the glycoprotein E gene or thymidine kinase gene of bovine herpesvirus type 1 produces attenuated vaccine strains. 17th International herpesvirus Workshop, Edinburg, Scotland, 1-7 août 1992.
30. Wellemans G., Van Opdenbosch E., Mammerickx M. (1986). Inoculation expérimentale du virus LVR 140 (herpès bovin IV) à des vaches gestantes et non gestantes. *Ann Rech Vét* ; 17 : 89-94.
31. Wellemans G., Van Opdenbosch E. (1989).Association entre l'infection par le BHV4 et l'avortement chez la vache. *Ann Méd Vét* ; 133 : 347-350.

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 259-266.

25

Eimeria tenella : vaccination des poulets au niveau local et caractérisation des antigènes immunodominants

A. RHALEM*, H. SAHIBI*, B. BERRAG*, P. PERY**

* *IAV Hassan II, Département de Parasitologie, Rabat, Maroc.*
** *INRA, Unité de Virologie et d'Immunologie Moléculaire, Centre de Recherches de Jouy-en-Josas, Jouy-en-Josas, France.*

Les animaux ayant déjà été infectés par des espèces du genre *Eimeria*, sont capables de résister aux infections ultérieures contre les mêmes espèces [11]. De plus, on notera que malgré les nombreuses études portant sur l'immunologie des coccidies, on n'a pas pu décrire le mécanisme précis par lequel cette résistance est acquise. En général, on a accepté le fait que cette immunité affecte les stades sporozoïte et mérozoïte, et que les principaux mécanismes immunitaires qui conduisent à l'acquisition d'un état de résistance, se déroulent au niveau local site du développement du parasite [6]. Dans ce travail nous avons pu démontrer l'importance des IgA biliaires chez des poulets infectés par *E. tenella* et nous avons essayé d'étudier les mécanismes de l'induction d'une immunisation par voie locale et de caractériser les antigènes importants.

Importance des anticorps sécrétoires

L'existence d'une réponse immune sécrétoire contre les infections par le genre *Eimeria* a été rapportée par plusieurs auteurs [5,14]. En entreprenant cette étude, nous avons donné

plus d'importance aux anticorps (Acs) sécrétoires, eu égard à leur rôle dans les altérations structurales des parasites et dans l'inhibition de développement de ceux-ci. Nous avons essayé, d'une part, de déterminer le compartiment (intestin, duodénum, caecum et bile) où la concentration des Acs est importante, afin de les utiliser dans la purification et la caractérisation de molécules antigèniques importantes et, d'autre part, d'étudier l'effet de la dose et des infections répétées sur la production de ces Acs. Les constituants de surface de sporozoïtes ont été utilisés comme source d'antigènes (Ags), pour mettre en évidence les Acs spécifiques correspondants (test ELISA).

Au niveau de l'intestin et du duodénum, les Acs ne sont décelés que d'une façon transitoire. Au niveau du caecum, lieu du développement du parasite *E. tenella*, ce taux est plus important. Les concentrations maximales de ces Acs ont été observées au niveau de la bile.

Au niveau biliaire, les seules immunoglobulines (CIg) détectées à la suite d'une primo-infection sont les IgA et les IgM. Les IgM ne sont observées que pendant une courte durée (jour 5 à jour 9) et leur concentration reste faible par rapport aux IgA. Ces dernières apparaissent à partir du 5ème jour et leur titre maximal est atteint entre le 7ème et le 11ème jour; durée pendant laquelle l'élimination des oocystes est importante.

Nous avons constaté qu'au niveau de la bile, quel que soit le nombre d'oocystes sporulés, administrés, les IgG ne sont pas décelées, et que l'apparition des IgM est toujours très brève. Les IgA biliaires apparaissent dès le 5ème jour PI après une infection, par un nombre important d'oocystes (supérieur ou égal à 10.000 oocystes), alors que pour l'immunisation par 100 ou 1000 oocystes, elles sont décelées au 7ème jour PI. Le titre des IgA croît en fonction du nombre d'oocystes innoculés; ainsi à la dose de 25.000 oocystes, on note que, même au jour 17, ce taux reste à un niveau élevé, avec toutefois une importante diminution du titre au jour 9 (période coïncidant avec l'élimination des oocystes).

Des expériences réalisées pour étudier l'effet des infections répétées ont montré qu'elles agissent au niveau biliaire, à la fois sur la production des différentes classes d'Ig et sur la précocité de l'augmentation des titres d'Acs, tout particulièrement celui des IgA. Les IgM ne sont pas détectées à la suite de la seconde et de la troisième infection. Alors que le rappel entraîne l'augmentation du taux des IgA dès le 5ème jour PI, indiquant l'existence d'une réponse immunitaire secondaire.

Il ressort de cette étude que l'isotype majeur synthétisé au niveau local est l'IgA. Toutefois, les IgM sont transportées par le même mécanisme vers la lumière digestive, surtout lorsque la concentration en IgA est faible [12]. Les tissus sous-épithéliaux, au niveau intestinal, contiennent un grand nombre de cellules plasmatiques qui sécrètent des IgA dans une forme capable de se combiner à un récepteur membranaire au niveau épithèlial [2]. En outre, une proportion importante d'IgA synthétisée dans l'intestin passe, à travers les circulations sanguine et lymphatique, dans le foie d'où elles sont sécrétées dans la lumière intestinale par la bile. Ainsi les IgA spécifiques aux infections coccidiennes peuvent être recherchées, aussi bien dans la bile, que dans les sécrétions intestinales et caecales [13].

Nous avons constaté qu'au niveau caecal les IgA ne sont pas décelées durant la phase d'élimination des oocystes (7ème jour PI). Ceci peut être expliqué par le fait que les IgA, à ce stade important du développement parasitaire, sont mobilisées et complexées par les Ags des coccidies. A la suite d'une primo-infection , le taux d'IgA biliaire reste inchangé pendant la phase d'élimination des oocystes et, puisqu'elles ne sont pas attirées au niveau caecal, il est probable qu'elles n'exercent pas leur effet à la suite d'un premier contact

avec le parasite. D'ailleurs, les mécanismes immunitaires impliqués dans la résistance contre les infections coccidiennes ne se manifestent qu'à la suite de la réinfection [19].

Il a été démontré que les IgA sécrétoires agglutinent les sporozoïtes et que cette réaction est associée à un phénomène de "capping" des Ags de surface [25]. Cependant, ce phénomène ne semble pas avoir de signification claire dans la protection immunitaire *in vivo* [3].

Il a été démontré que les IgA sécrétoires jouent un rôle important dans l'inhibition du mécanisme d'invasion des sporozoïtes et les maintiennent donc exposés à un endommagement non spécifique par les protéases du tube digestif. Des études réalisées pour établir la corrélation entre le degré de résistance et le titre d'IgA, nous ont permis de conclure que la réponse immunitaire chez les poulets infectés par *E. tenella* est dose dépendante de l'Ag. Le degré de résistance est important lorsqu'on augmente le nombre d'oocystes durant l'immunisation et que la concentration des IgA augmente aussi en fonction du nombre d'oocystes inoculés. Ceci montre l'existence d'une corrélation positive entre le degré de résistance acquise et le titre de ces Acs.

Activation des lymphocytes *in vitro* et transfert de l'immunité adoptive

La réponse immunitaire cellulaire joue un rôle crucial dans l'acquisition de la résistance immunitaire. Les poulets déjà infectés par des parasites du genre *Eimeria* réagissent par une réaction d'hypersensibilité de type retardée à l'injection intradermique d'Ags préparés à partir du parasite [7]. Le transfert de l'immunité par des suspensions lymphocytaires contre une infection coccidienne a été démontré par Rose et Hesketh [18]. Dans cette partie nous avons étudié les propriétés immunologiques des Ags de sporozoïtes purifiés par immunoadsorption à l'aide des IgA biliaires provenant de poulets immuns.

L'effet protecteur des cellules siègeant au niveau des tissus lymphoïdes de l'intestin a été bien établi. Cependant, peu de laboratoires maîtrisent les techniques d'isolement, de purification et de culture des lymphocytes de la muqueuse intestinale. C'est ainsi que nous avons eu recours à l'utilisation des cellules de la rate, organe lymphoïde qui, malgré son éloignement du système immunitaire local, semble participer dans l'acquisition de l'immunité contre les coccidies.

Les cellules proviennent de poulets infectés à 2 reprises par *E. tenella.* La stimulation antigénique a été réalisée *in vitro* pendant des durées variables (4, 12 et 20 h). Les animaux ont subi l'infection d'épreuve 6 heures après le transfert des cellules. Les résultats obtenus révélent l'effet protecteur des cellules spléniques réinjectées. Nous avons constaté que le pouvoir protecteur varie avec le nombre de cellules transférées et avec la durée de stimulation. Après une stimulation de 4 heures les cellules immunes n'acquièrent pas la capacité protectrice même avec l'administration d'un nombre important de cellules. A partir d'une stimulation de 12 h avc l'Ag brute de sporozoïtes, une réduction de 50% de la production d'oocystes a été obtenue par injection de 5.10^7 cellules immunes seulement. Ce taux de réduction atteint 71,9% lorsque cette durée est portée à 20 h, et que l'utilisation des Ags purifiés à l'aide des IGA permet d'obtenir une réduction de l'ordre de 89% dans les mêmes conditions.

L'utilisation des Ags de sporozoïtes purifiés (13 protéines), en "rappel" secondaire *in vitro*, a sensibilisé les cellules et a permis un transfert de l'immunité à l'aide d'un nombre

relativement faible de cellules, alors que Rose et Hesketh [18] ont décrit que le nombre de 10^8 à 10^9 cellules est nécessaire pour conférer l'immunité à des poulets naïfs contre *E. tenella.*

Nous soulignons, dans cette étude, l'importance des Acs sécrétés au niveau de la bile d'animaux immuns, qui ont permis l'élution de 13 protéines hautement actives *in vitro* sur les lymphocytes.

Immunisation des poulets au niveau local

La stimulation du système immunologique au niveau du tractus digestif, dans le but de vacciner les animaux, n'est possible que dans des conditions particulières. Une des conditions préalables à la vaccination est que le système immunitaire local soit capable d'exprimer une mémoire immunologique [8]. Le protocole de sensibilisation de ce système immunitare local doit être pris en considération pour induire l'immunité protectrice. Il semble que dans tous les cas on a intérêt à déposer l'antigène le plus près possible de la muqueuse intestinale [15].

L'immunité protectrice au niveau local s'exprime bien si l'antigène est administré sous forme d'un organisme vivant. Dans le cas des Ags solubles, de fortes doses sont nécessaires, ce qui a conduit à rechercher des adjuvants de l'immunité. Des travaux ont montré que l'association de l'antigène avec des lipides stimule le système immunitaire sécrétoire [9]. Les liposomes, qui sont de nature lipodique, semblent augmenter les réponses immunitaires suscitées par l'injection d'Ags. Des liposomes contenant des Ags du parasite *Nippostrongylus brasiliensis* administrées localement induisent une forte synthèse d'Acs de type IgA chez la souris [16]. Ces sphères lipidiques microscopiques constituées des mêmes phospholipides que les membranes plasmiques cellulaires ont une forte affinité pour la membrane épithéliale [10]. On pense que le rôle joué par les liposomes est dû à leur capacité à présenter l'Ag aux cellules immunocompétentes [1].

Nous avons démontré auparavant dans le modèle *E. falciformis*-souris [17], le rôle protecteur des Ags de surface du parasite. Dans le modèle *E. tenella*-poulet, nous avons essayé d'immuniser les animaux par les Ags de surface de sporozoïtes qui ont été obtenus par le traitement de ces derniers dans un milieu contenant des détergents doux. Les Ags isolés ont été enrobés dans des liposomes.

Les résultats des essais de vaccination révèlent le pouvoir protecteur de cette préparation antigénique, et l'efficacité des liposomes et du schéma d'immunisation. Toutefois, l'immunité acquise dépend de la dose et du nombre des administrations antigéniques. S'il a été bien établi, *in vivo* et *in vitro*, que les sporozoïtes d'*E. tenella* constituent la cible importante de la réponse immunitaire, les résultats de notre étude confirment ces observations et révèlent aussi le rôle des structures de surface dans l'induction de l'immunité protectrice.

Caractérisaion des Ags de surface d'*E. tenella*

Le rôle des Acs sécrétoires dans l'inhibition de la pénétration des sporozoïtes d'*E. tenella ,in vitro*, et le blocage du développement du parasite *E. falciformis, in vivo* (transfert passif par le contenu intestinal), a été décrit. Cependant, leur utilisation dans les caracté-

risations immunochimiques n'a pas été rapportée. Dans nos expérimentations de transfert de l'immunité adoptive, nous avons révélé le rôle important des IgA biliaires provenant de poulets hyperimmuns qui ont permis la purificaion de 13 Ags de sporozoïtes, activant les lymphocytes *in vitro* en réponse secondaire, les rendant capables de conférer efficacement par la suite la protection aux animaux. Nous avons aussi démontré une corrélation positive entre le degré de la résistance établie (qui est dose dépendant) et le titre des Acs sécrétoires. Ces résultats encourageants nous ont incité à l'utilisation des Acs sécrétés au niveau local pour l'identification des Ags de surface importants.

L'analyse du spectre antigénique des constituants de sporozoïtes d'*E. tenella* par la technique d'immunoempreinte révèle l'existence d'un nombre important de molécules de surface dont le caractère antigénique est démontré par les interactions spécifiques avec les Acs sériques ou sécrétoires (Figure 1).

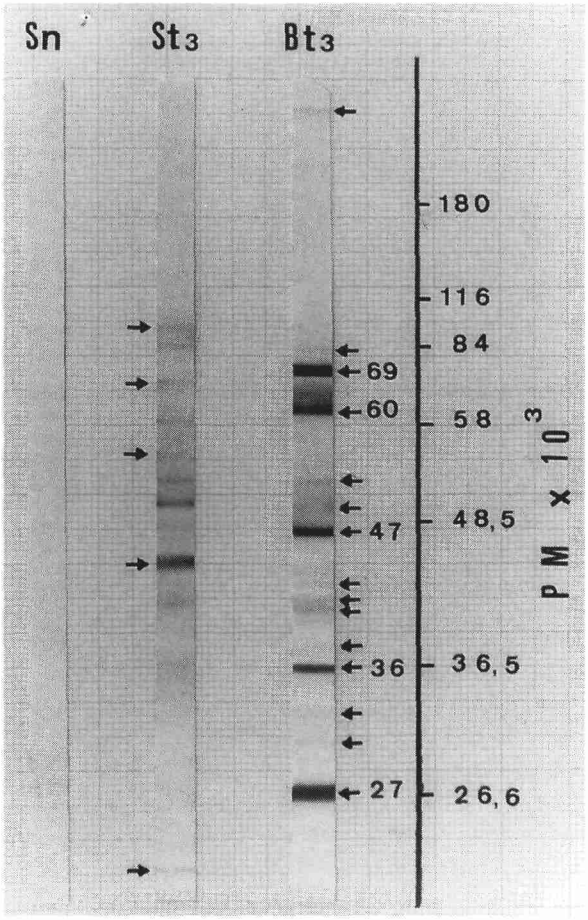


Figure 1. Mise en évidence du caractère antigénique des protéines de surface de sporozoïtes du parasite *E. tenella* : Révélation par la technique d'immunoempreinte.
Sn : Sérum normal.
St3 : Sérum anti *E. tenella* (poulets infectés à 3 reprises).
Bt3 : Bile anti *E. tenella* (poulets infectés à 3 reprises).

Au total, 20 polypeptides dont le PM varie entre 22 et 230 Kd ont été solubilisés par le traitement des sporozoïtes dans un milieu contenant des détergents doux. Parmi ces molécules, certaines sont très peu immunogènes et nécessitent des inoculations répétées pour induire la synthèse d'Acs au niveau local, contre les Ags de 230 et 60 Kd à la suite de la seconde infection, et contre les Ags de 43, 38,4, 32 et 31 Kd après la troisième infection (Figure 2).

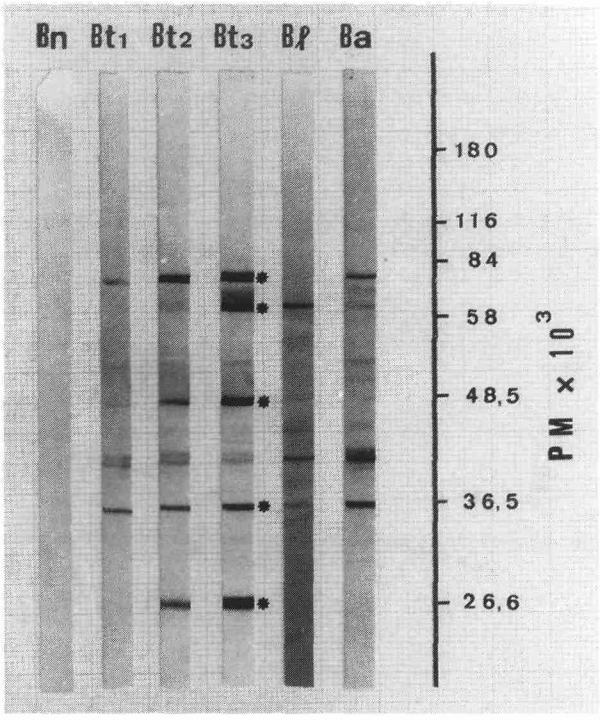


Figure 2. Identification des déterminants antigéniques de surface de sporozoïtes du parasite *E. tenella* : Utilisation des Acs biliaires (technique d'immunoempreinte)
Bn : Bile normale.
Bt_1 : Bile de poulets infectés 1 fois par *E. tenella,*
Bt_2 : Bile de poulets infectés à 2 reprises par *E. tenella.*
Bt_3 : Bile de poulets infectés 3 fois par *E. tenella*
Bl : Biles de poulets immunisés par les Ags d'*E. tenella* inclus dans des liposomes
Ba : Bile de poulets infectés 3 fois par *E. acervulina.*

Parmi les Ags caractérisés, 5 sont immunodominants (69, 60, 47, 36 et 27 Kd) et stimulent efficacement la synthèse d'Acs sécétoires, alors que seul l'Ag de 36 Kd est reconnu par les Acs sériques.

Certains Ags sont communs au parasite *E. acervulina*. Les Acs sécrétoires provenant de poulets infectés 3 fois par cette dernière, reconnaissent 8 déterminants antigéniqes parmi lesquels 3 sont immunodominants (69, 60 et 36 Kd).

L'immunisation des poussins par les Ags de surface enrobés dans des liposomes stimule la synthèse d'Acs. Nous n'avons pas étudié la nature des isotypes produits localement, mais ceux-ci réagissent avec une gamme restreinte de 5 Ags dont deux sont immunodominants (60 et 36 Kd) et trois autres ont des Ags mineures (52,2, 45 et 40Kd).

Au terme de cette étude, nous pouvons conclure que le nombre d'Ags révélé est important, mais il nous semble que certains déterminants antigéniqes ne jouent pas un rôle dans l'acquisition de l'immunité. Toutefois, le rôle protecteur des molécules fortement immunogéniques ne peut être démontré que *in vivo*. D'après l'étude immunochimique que nous avons effectuée, certains Ags constituent une cible de la réponse immunitaire et sont probablement des Ags "candidats" vaccins potentiels.

Parmi ces Ags "candidats" vaccins, deux sont immunodominants (69 et 36 Kd) alors que quatre sont des Ags mineurs (56, 52,2, 41 et 40 Kd). Tous ces Ags sont communs entre *E. tenella* et *E. acervulina*. Les Ags de 69, 56 et 41 Kd ne stimulent pas la synthèse d'Acs au niveau de la bile lorsqu'ils sont enrobés dans des liposomes, mais puisque nous n'avons pas étudié d'une façon approfondie leurs propriétés immunologiques chez les poussins immunisés, ils restent aussi des candidats potentiels dans l'induction de l'immunité. L'Ag de 60 Kd même s'il est immunodominant, n'est pas doué de propriétés protectrices dans une infection par *E. acervulina* [4].

Références

1. Allison A.C., Gregoriadis G. (1974). Liposomes as immunological adjuvants. *Nature* (London) : 252.
2. Befus D.J., Bienenstock J. (1982). The mucosa-associated immunes systeme of the rabbit. In : Hay J.G ed *Animal models of immunological processes*. Academic Press : 167-220.
3. Crane M.J., Norman D.J., Gnozzio M.J., Cate A.C., Gammon M., Murray P.K; (1986). *Eimeria tenella* : Quantitative *in vitro* and *in vivo* studies on the effects of mouse polyclonal and monoclonal antibodies on sporozoites. *Parasit Immunol* ; 8 : 467-480.
4. Danforth H.D. (1989). Antigenic make-up of *Eimeria*. In : Pyvore ed. *Coccidia and intestinal coccidiomrphs*, Vth International Coccidiosis Conference, Tours, France, INRA : 49.
5. Davis P.J., Porter P. (1978). The role of secretory IgA in anticoccidial immunity in the chicken. *Immunol* ; 34 : 879-888.
6. Davis P.J. (1981). Immunity to coccidia in avian immunology. Rose M.E. , Payne L.N., Freeman B.M., eds. Edinburg British Poultry Science : 361-383.
7. Giambrone J.J., Klesius P.H., Edgar S.A. (1980). Avian coccidies : evidence for cell mediated immune response. *Poult Sci* ; 59 : 38-43.
8. Hamilton S.R., Yardley J.H., Brown G.D. (1979). Suppression of local intestinal immunoglobulin A immune response to Cholera toxin by subcutaneous administration of *Cholera tonoides*. *Infect Immun* ; 24 : 422-426.
9. Heatley R.V. (1975). Immunogenicity of lipid-conjugated protein in intestine. *Immunol* ; 29 : 143-149.
10. Hemker H.C., Hermens W.T., Muller A.D., Zwaal R.F. (1980). Oral treatment of haemophilia A by gastrointestinal absorption of factor VIII entrapped in liposomes. *Lancet* ; 12(8159) : 70-71.
11. Horton-Smith C., Long P.L., Pierce A.E., Rose M.E. (1963). Immunity to coccidia in domestic animals. In : Garham P.C.C., Pierce A.E., Roitt I, eds. *Immunity to protozoa*.Blackwell Scientific Publication, Oxford : 273-295.
12. Lawrence F.C., Arnaud-Battandier F., Kosky I.R., Doolly N.J., Muchmore A.V., Blaese R.M.

(1979). Tissue distribution of immunoglobulin-secreting cells in normal and IgA-deficient chickens. *J Immunol* ; 123 : 1767-1771.

13. Lemaitre-Coelho I., Jackson G.D.F., Vaerman J.P. (1978). Relevance of biliary IgA antibodies in rat intestinal immunity. *Scand J Immunol* ; 8 : 459-463.
14. Liilehoj H.S. (1987). Secretory IgA response in SC and FP chickens experimentally inoculated with *E. tenella* and *E. acervulina*. In : *Recent developments in mucosal immunology*. Plenum Press, New-York : 977.
15. Pierce N.F. (1978). The role of antigen form and fonction in the primary and secondary intestinal immune response to cholera toxin toxoid in rats. *J Exp Med* ; 148 : 195-206.
16. Rhalem A., Luffau G., Bordieu C, Pery P. (1988). Vaccination of mice with liposome entrapped adult antigens of *Nippostrongylus brasiliensis*. *Ann Immul Inst Pasteur* ; 139 : 157-166.
17. Rhalem A., Bekhti K., Bourdieu C., Luffau G., Pery P. (1989). Vaccination de la souris contre la coccidiose murine par ingestion de protéines de surface d'*Eimeria falciformis* incorporées dans des lipopsomes. *C R Acad Sci Paris* ; 309(III) : 19-23.
18. Rose M.E., Hesketh P. (1982). Immunity to coccidiosis : adoptive transfer with peripheral blood lymphocytes and spleen cells. *Parasit Immun* ; 5 : 171-180.
19. Rose M.E. (1986). Immune response to *Eimeria* infections. In : Mc Douglad L.R., Joynre L.P., Long L.P., eds. *Research in avian coccidiosis*. University of Georgy, Dept of Poultry Sciences Athens, USA : 446-449.
20. Wisher M.H., Rose M.E. (1987). *Eimeria tenella* sporozoites : the method of excystation affects the surface membrane proteins. *Parasitol* ; 95 : 479-480.

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 267-274.

26

Essai de vaccination chez les petits ruminants contre la PPR : utilisation du vaccin homologue

K. BIDJEH*, M. OUAGAL*, A. DIALLO**

* *Laboratoire de Recherches Zootechniques et Vétérinaires de Farcha, Ndjaména, Tchad.*
** *CIRAD-EMVT, Maisons-Alfort, France.*

Résumé

Un essai de vaccination contre la peste des petits ruminants (PPR) avec le vaccin homologue a été réalisé sur 353 ovins et caprins répartis dans trois villages au Tchad. Une enquête sérologique préliminaire a révélé la présence d'anticorps anti-PPR chez des animaux à des titres faibles : sérum positif au 1/10 pour 19% des animaux et au 1/5 pour 5%. Cependant ces anticorps ainsi détectés semblent ne pas être protecteurs ou ne sont pas suffisants pour protéger contre une épreuve virulente. En effet, certains de ces animaux ont été inoculés avec du virus PPR virulent et ils ont fait la maladie.

Des chèvres et des moutons, 353 au total, ont été vaccinés dans 3 villages à l'aide du vaccin homologue anti-PPR. Ils ont tous fait une séroconversion 3 mois après l'intervention, bien que 12,5% d'entre eux, séronégatifs au départ, aient des titres de sérum au 1/5. Par la suite, on note une très nette augmentation des taux d'anticorps car à six mois post-vaccination, près de 94% des sérums ont des titres supérieurs ou égaux au 1/100. Certains

vont cependant subir un infléchissement vers 9 mois. Les expériences sont en cours pour étudier l'évolution des anticorps anti-PPR chez ces animaux vaccinés, mais aussi apprécier la durée de l'immunité post-vaccinale par des épreuves virulentes.

La peste des petits ruminants (PPR) est une maladie virale spécifique des petits ruminants. Elle est extrêmement contagieuse et elle constitue un frein au développement des productions animales d'origine ovine et caprine dans les pays où elle existe : Afrique Intertropicale Nord et Moyen-Orient. Son importance est telle qu'elle a été choisie comme un des thèmes de discussion lors de la session générale de l'Office Internationale des Epizooties (O.I.E.) en 1990.

Au Tchad, la présence de la PPR a été révélée par les enquêtes sérologiques. Aussi il paraît très important de prendre, dès maintenant, des mesures prophylactiques pour combattre ce fléau. La lutte anti-PPR a été assurée jusqu'à présent par l'emploi du vaccin antipeste bovine, profitant ainsi de l'immunité croisée existant entre les virus PPR et peste bovine. En 1989, a été mis au point au CIRAD-EMVT un vaccin homologue anti-PPR [5]. Ce vaccin a été testé sur plus de 20 000 petits ruminants en Côte d'Ivoire et en Mauritanie et il s'est montré très efficace (A. Diallo, communication personnelle). Dans la présente communication, nous rapportons des résultats préliminaires d'expériences conduites au Tchad en vue :

- d'étudier le comportement d'animaux non vaccinés mais porteurs de faibles taux d'anticorps anti-PPR au départ puis inoculés avec du virus PPR virulent,
- de suivre l'évolution des anticorps anti-PPR après vaccination,
- de déterminer le taux minimal d'anticorps anti-PPR neutralisants nécessaire pour assurer la protection d'un animal contre la maladie.

Matériel et méthodes

Animaux d'expérience

Pour les expérimentations au laboratoire, 40 chèvres naines (race kirdimi), âgées de 7 à 12 mois, ont été achetées sur le marché au bétail de N'Djamena. Dès leur arrivée au laboratoire, les animaux sont mis en quarantaine. Cette période est mise à profit pour procéder à leur identification (bague à l'oreille), leur traitement antibiotique préventif, leur déparasitage et aux prises de sang en vue du titrage des anticorps anti-PPR. Leur alimentation est constituée par de la paille supplémentée avec du tourteau de coton. Suivant le résultat de titrage de leurs sérums, 28 animaux ont été retenus et répartis en quatre groupes (7/groupe):

- groupe 1, animaux dont les sérums sont positifs en anticorps anti-PPR au 1/5,
- groupe 2, animaux dont les sérums sont positifs à la dilution 1/10,
- groupes 3 et 4 dont les sérums sont négatifs en anticorps anti-PPR.

Dans chacun des 3 premiers lots, 5 animaux sont soumis à une épreuve virulente avec du virus PPR sauvage et 2 sont gardés comme témoins de contact. Le groupe 3 est ainsi le témoin positif d'épreuve. En revanche le n°4, dont tous les sujets sont inoculés avec du milieu de culture, sert de témoin négatif.

En plus de ces animaux achetés pour le laboratoire, 353 chèvres et moutons de 3 villages ont fait partie de la présente expérience suite à un accord avec les paysans. Ils ont été identifiés et les renseignements suivants ont été recueillis : espèce, race, âge, sexe et gestation. Ils ont tous reçu le vaccin homologue anti-PPR et ont subi des prises de sang en vue de récolter le sérum avant vaccination, puis à 3, 6, 9 mois après l'intervention.

Tous les sérums récoltés sont gardés à - 20°c jusqu'au moment du titrage des anticorps.

Les cellules

Les cellules Vero ont été utilisées pour la multiplication des virus et le titrage des anticorps par séroneutralisation. Le milieu de culture est constitué par du MBE (Laboratoire Eurobio, France) additionné d'acides aminés, de vitamines, de sérum de veau fœtal (10%), de pénicilline (100 u/ml) et de streptomycine (0,05 mg/ml). Une fois que le tapis cellulaire est complet dans la boîte de culture, le milieu est remplacé par un autre contenant 1% de sérum (milieu d'entretien).

Virus

Le vaccin utilisé est la souche PPR 75/1 atténuée par Diallo *et al.* [5]. Il est utilisé à la dose de 10^3 DICT50/animal et par voie sous-cutanée. Le virus PPR isolé en Côte d'Ivoire en 1989 a été utilisé comme virus d'épreuve (PPR C.I. PM_2) à la dose de $10^{3,7}$ DICT50/animal et par voie S/C.

Séroneutralisation

Les sérums sont décomplémentés par incubation à 56°c pendant 30 mn. Pour leur titrage, ils sont dilués dans des tubes "vénoject" stériles et incubés avec 10^3 DICT50 de virus vaccinal à 37 °C pendant 1 h. Ensuite 0,2 ml de ce mélange virus-sérum est ajouté à 2 ml de cellules Vero (10^5 cellules/ml) dans des tubes Leighton. Ces derniers sont incubés dans une étuve à 37 °C en présence de 5% de co_2. La lecture, pour la présence de l'effet cytopathogène, est effectuée à J6, J8, J10 post-infection des cellules.

Résultats

Dans le Tableau I sont résumées toutes les observations cliniques faites sur les animaux des groupes I, II, III. Deux mortalités, survenues dès le lendemain de l'inoculation du virus PPR C.I. PM_2, ne peuvent être imputées à la PPR et sont dues à une autre maladie non diagnostiquée. Chez tous les autres animaux qui ont reçu ce virus ou qui ont été en contact avec les inoculés, on constate une hyperthermie qui a duré de 4 à 22 jours suivant les cas, hyperthermie qui amorce toujours le début de la maladie. La durée d'incubation a été de 2 à 10 jours pour les chèvres inoculées et de 6 à 18 jours pour les animaux de contact. A part un seul cas, le jetage a été constaté chez tous les sujets malades. En revanche, les autres signes cliniques de la PPR (larmoiement, diarrhée et lésions buccales) n'étaient pas constants : seuls 3 animaux ont exprimé tous ces symptômes. Le larmoiement a été le moins fréquent (6 animaux/19) alors que 14/19 chèvres ont eu la diarrhée. On a noté la mort de 4 sujets qui n'ont d'ailleurs pas eu tous les signes de la PPR.

Tableau I. Récapitulatif des signes cliniques observés chez les animaux inoculés avec PPRV souche sauvage.

N° lot	N° animal	Durée incubation (jour)	Durée pyrexie (jour)	Signes cliniques observés					Mort Jour après début T
				Hyperthermie (mini-maxi °C)	Jetage	Larmoiement	Diarrhée	Lésions buccales	
	1.090 inf	4	4	39,7-40,3	+	+	+	+	-
	1.065 inf	4	5	40,6-41,2	+	-	+	+	-
S.N.+	1.769 inf	4	4	39,9-40,7	+	-	+	+	-
au	1.775 inf	2	6	39,6-41,1	+	-	+	-	8
1/5	1.772 inf	10	5	40,3-40,5	+	-	+	+	9
	1.796 cont	7	6	39,7-40,9	+	-	+	+	8
	1.770 cont	6	22	39,9-40,4	+	+	-	-	-
	1.008 inf	2	6	39,5-40,6	+	+	+	+	-
	1.005 inf	2	6	40,2-41,3	+	-	+	-	8
S.N.+	1.003 inf				-	-	-	-	1 PI
au	1.061 inf				-	-	-	-	1 PI
1/10	1.724 inf	2	7	39,7-40,5	+	-	+	+	-
	1.011 cont	10	6	40,4-40,9	+	-	légère	-	-
	1.779	18	7	39,5-40,3	+	-	+	-	-
	1.018 cont	10	8	39,5-40,7	+	-	-	+	-
	1.742 inf	4	5	40,0-40,0	+	+	-	+	-
	1.794 cont	6	7	39,9-40,5	+	+	-	+	-
III	1.057 inf	2	6	39,6-40,7	+	-	légère	+	-
SN -	1.767 inf	3	5	39,7-40,6	+	+	+	+	-
	1.094 inf	2	5	39,5-40,5	-	-	-	-	-
	1.097 inf	4	6	39,7-41,0	+	-	+	+	-

inf : inoculation par voie sous-cutanée
cont : contact étroit
SN : séroneutralisation
PI : post-inoculation

D'après le Tableau I, on constate qu'il n'y a aucune différence significative entre les animaux des différents groupes vis-à-vis de l'épreuve virulente : qu'ils soient dépourvus d'anticorps anti-PPR ou que ces derniers soient détectés aux dilutions 1/5 et 1/10 de sérum, tout le monde réagit à l'infection par le virus virulent.

Les Tableaux II et III indiquent la répartition des animaux vaccinés selon la classe d'âge, la race, l'espèce. Dans le groupe 0-1 an, seuls les individus de plus de 6 mois ont

été vaccinés. Il y avait en tout 353 chèvres et moutons répartis dans 3 villages. Le suivi clinique a été réalisé sur 9 mois. La vaccination n'a eu aucun effet néfaste chez les femelles gestantes. On n'a d'autre part noté aucune mortalité dans les 3 premiers mois suivant l'intervention. Cependant sur le Tableau IV et pour la même période, on remarque une chute importante du nombre d'animaux soumis à l'expérience. Ceci est dû non seulement aux nombreuses ventes d'animaux survenues dans la période, mais aussi aux abattages. La diminution du nombre des animaux suivis se poursuit pendant tout le reste de la surveillance, mais à un rythme plus lent que lors des trois premiers mois.

Tableau II. Répartition des animaux vaccinés par classe d'âge et par espèce.

Espèce / âge	0 - 1	1 - 2	2 - 3	3 - 4	4 - 5	> 5	Total
Ovine	50	28	18	10	10	10	126
Caprine	73	56	29	29	19	21	227
Total	123	84	47	39	29	31	353

Tableau III. Répartition des animaux vaccinés selon les races locales.

Espèce / race	Kirdimi (naine)	Sahélienne	Total
Ovine	77	49	126
Caprine	100	127	227
Total	177	176	353

Tableau IV. Mouvement des animaux pendant la période de suivi.

Village	Avant vaccination	3 mois après vaccination	6 mois après vaccination	9 mois après vaccination
Koundoul	77	43	45	24
Mandalia	173	110	99	65
Maïlao	103	60	33	27
Total	353	213	177	116

Dans le Tableau V, sont résumés les résultats de titrage des sérums des animaux vaccinés. On y constate qu'environ 19% et 5% des animaux avaient, avant vaccination, des anticorps anti-PPR respectivement aux dilutions de sérum 1/10 et 1/5. Trois mois après la vaccination, 87,4% des animaux contrôlés avaient des titres de sérum compris entre 1/25 et 1/400. Après 6 mois, on enregistre une augmentation du taux d'anticorps anti-PPR dans le sang : 84% des sérums titrent entre 1/100 et 1/1600. A 9 mois post-vaccination, la proportion des animaux possédant un titre fort a diminué : de 13,5% de sérums positifs au 1/1600 à 6 mois post-vaccination, il n'y a plus que 0,9% 3 mois plus tard.

Parmi tous les animaux vaccinés et suivis jusqu'à la fin de l'expérience, 25 avaient un titre de sérum au 1/10 pour les anticorps anti-PPR. Ils ont bien réagi à l'inoculation du vaccin car ont montré une montée rapide d'anticorps, prouvant ainsi que le virus vaccinal s'est bien multiplié dans l'organisme.

Les Tableaux VI et VII résument l'évolution des anticorps anti-PPR chez les animaux par espèce. A 6 mois post-vaccination, et si on ne considère que les individus à fort taux d'anticorps (>1/100), on ne trouve aucune différence entre les chèvres et les moutons.

Discussion et conclusion

La PPR est une maladie très contagieuse due à un virus très apparenté à celui de la peste bovine. Ils font partie du groupe des *Morbillivirus*. Cliniquement, elle est caractérisée par de l'hyperthermie, du larmoiement, du jetage, des lésions érosives de la muqueuse buccale puis de la diarrhée [1,7,8,9]. Tous ces symptômes ont été retrouvés dans les expériences évoquées ci-dessus. Cependant, bien que des chèvres kirdimi, chèvres naines réputées très sensibles à la PPR [7], aient été utilisées, tous ces signes n'ont pas été exprimés par les mêmes animaux hormis 3 cas. Ainsi, le larmoiement a été le symptôme le plus inconstant. Ceci doit refléter certaines situations de la maladie naturelle dont la sévérité dépend non seulement de l'espèce animale, la chèvre étant plus sensible, mais aussi de l'âge de l'animal, de la race et très certainement de la souche virale. Et même pour ce dernier cas, les symptômes sont inconstants d'un passage à l'autre du virus sur des cellules en culture (A. Diallo, communication personnelle). Ici, le virus Côte d'Ivoire a été utilisé au passage PM_2 à la dose de $10^{3,7}$ DICT50. Il n'a entraîné que 4 cas de mortalité pour 19 animaux infectés. En revanche le passage $vero_4$ a provoqué 100% de mortalité chez les chèvres naines de Côte d'Ivoire inoculées avec 10^2 DICT50 [2].

Au cours des expériences ci-dessus évoquées, nous n'avons constaté aucune différence, après épreuve virulente, entre les animaux dépourvus d'anticorps anti-PPR et ceux qui, non vaccinés, en possèdent encore aux dilutions 1/5 et 1/10 de leurs sérums. Ils ont tous fait la maladie. Ces résultats sont à mettre en parallèle avec ceux déjà publiés par Bourdin *et al.* [4]. Ces derniers ont fait état de la non résistance à la PPR des chèvres non vaccinées et possédant des anticorps anti-peste bovine aux dilutions de sérum allant jusqu'au 1/40. Etant donné que l'historique de ces animaux est inconnu, rien ne prouve que les anticorps détectés soient spécifiques de la PPR. Aussi de telles expériences sont à refaire avec des animaux à faibles taux d'anticorps mais connus pour avoir été vaccinés ou infectés par du virus PPR sauvage (expériences en cours).

Le vaccin homologue anti-PPR a été testé sur plus de 350 chèvres et moutons. Ce vaccin n'a entraîné aucun effet morbide chez les récipients et a suscité la production d'anticorps anti-PPR à de très forts taux. En effet, 9 mois après la vaccination, 93% des sérums

Tableau V. Evolution des titres d'anticorps pendant la période de suivi des troupeaux.

Période	<1/5	1/5	1/10	<1/25	1/25	1/100	1/125	1/200	1/400	1/800	1/1600	Total
Avant vaccination.	75,3*	5,4	19,3	-	-	-	-	-	-	-	-	100%
3 mois après. vaccination.	-	12,6	-	22,1	36,1	2,8	5,2	7,5	13,6	-	-	100%
6 mois après. vac.cination	-	-	6,2	-	-	9,6	-	13,0	31,6	26,0	13,5	100%
9 mois après. vaccination.	-	-	6,9	-	-	18,1	-	40,5	19,8	13,8	0,9	100%

* : Intervalle de confiance pour le risque consenti de 5%.

Tableau VI. Evolution des titres d'anticorps pendant le suivi chez les ovins

Période	<1/5	1/5	1/10	<1/25	1/25	1/100	1/125	1/20	1/400	1/800	1/1600	Total
Avant vaccination	92	3	31	-	-	-	-	-	-	-	-	126
3 mois après vaccination	-	14*	-	34	27	5	2	1	10	-	-	93
6 mois après vaccination	-	-	4	-	-	9	-	11	24	17	7	72
9 mois après vaccinatin	-	-	4	-	-	4	-	18	7	9	1	43

* : Titre < 1/10

Tableau VII. Evolution des titres d'anticorps pendant le suivi chez les caprins

Période	<1/5	1/5	1/10	<1/25	1/25	1/100	1/125	1/200	1/400	1/800	1/1600	Total
Avant vaccination	174	16	37	-	-	-	-	-	-	-	-	227
3 mois après vaccination	-	13*	-	13	50	1	9	15	19	-	-	120
6 mois après vaccination	-	-	7	-	-	8	-	12	32	29	17	105
9 mois après vaccination	-	-	4	-	-	17	-	29	16	7	-	73

* : Titre < 1/10

ont des titres supérieurs au 1/100. Des animaux hébergeant au départ des anticorps anti-PPR à la dilution de sérum 1/10 ont aussi réagi par une importante production d'anticorps. Ces derniers résultats sont similaires à ceux obtenus par Wafula et Wamwayi [10] pour le vaccin bovipestique : les bovins non vaccinés mais possédant des anticorps maternels anti-peste bovine au 1/5 répondent positivement à la vaccination par une forte production d'anticorps; le virus se multiplie donc dans leur organisme. En revanche ceux dont le titre de sérum est au minimum égal au 1/100 neutralisent aussitôt le virus vaccinal.

L'analyse de l'évolution des anticorps après la vaccination a montré qu'à 3 mois, 88,5% des sérums recueillis sont positifs aux dilutions comprises entre 1/25 et 1/400. A 6 et 9 mois, ils sont plus de 93% à avoir des titres situés entre 1/100 et 1/1600, le reste n'étant positif qu'au 1/10. Les travaux sont en cours pour poursuivre cette analyse et de l'associer à des épreuves virulentes pour déterminer le seuil minimal de taux d'anticorps anti-PPR conférant une protection contre la maladie.

Remerciements

Ce travail a été réalisé grâce à l'appui financier de la fondation internationale pour la science (FIS). Qu'elle trouve ici notre profonde gratitude.

Références

1. Abu Elzein E.M., Hassanien M.M., Al-Afaleq A.I., Housawi F.M. (1990). Isolation of peste des petits ruminants from goats in Saudi Arabia. *Vet Rec* ; 127 : 309-310.
2. Angba A., Couassy-Hymann E., Domenech J. (1990). Rapport Projet Peste des Petits Ruminants, IEMVT-CEE/DGXII, STD n°002/326.
3. Bidjeh K., Idriss A.O., Diguimbaye C., Ganda K., Maurice Y. (1989). Incidence des anticorps peste bovine chez les petits ruminants au Tchad. *Bul Cent Rech App* ; 5 : 31-36.
4. Bourdin P., Rioche M., Laurent A. (1969). Etude immunologique de la peste des petits ruminants (PPR)- Colloque O.C.A.M. sur l'élevage, Fort-Lamy, 8-13 Décembre 1969.
5. Diallo A., Taylor W.P., Lefevre P.C., Provost A. (1989). Atténuation d'une souche du virus de la peste des petits ruminants : candidat pour un vaccin homologue vivant. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop* ; 42(3) : 311-319.
6. Gargadennec L., Lalanne A. (1942). La peste des petits ruminants. *Bul Serv Zoot Epiz AOF* ; 5(1) : 16-21.
7. Idriss A., Bidjeh K., Ganda K., Diguimbaye C., Maurice Y. (1989). Sensibilité des races ovines et caprines tchadiennes au virus de la PPR. In : African Small Ruminant Research and Development Proceedings, Bamenda (Cameroun), 18-25 January 1989 : 370-381.
8. Rowland A.C., Scott G.R., Ramachandran S. (1971). A comparative study of "peste des petits ruminants" and "Kata" in western african dwarf goats. *Trop Anim HLTH Prod* ; 3(4) : 241-247.
9. Withney J.C., Scott G.R., Hill D.H. (1967). Preliminary observation on a stomatitis and enteritis of goats in Southern Nigeria. *Bull Epiz Dis Afr* ; 15 : 31-41.
10. Wafula J.S., Wamwayi H.M. (1989). Some factors which could cause rinderpest vaccination failure in cattle. *Bull Anim Hlth Prod Afr* ; 37 : 251-254.

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 275-282.

27

Essai de vaccination contre le charbon symptomatique en milieu réel

A. RANAIVOSON

Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques, Université d'Antananarivo, Antananarivo.

Résumé

Un vaccin polyvalent contre le charbon bactérien et le charbon symptomatique a été mis au point. Il est composé de spores de la souche "sterne" et d'anacultures purifiées de Clostridium chauvoei *biotypes 735 et 335. Les anacultures ont été obtenues par la méthode de filtration sélective en cascade aboutissant à la séparation des anatoxines et des corps bactériens. Des essais ont été menés dans les zones à enzooties saisonnières ou permanentes de charbon symptomatique rebelle à la vaccination classique avec une anaculture total de* Clostridium chauvoei *biotype 735.*
Les résultats sont consignés, analysés et discutés dans le présent travail.
La protection à vie, ou pour 3 à 4 ans, n'est pas obtenue dans les zones considérées. Par contre une régression de la maladie a été observée. Le taux de mortalité due au charbon symptomatique est passé de 2,6 % en 1983 à 1,3% en 1992.

En août 1969, le charbon symptomatique frappait pour la première fois le cheptel bovin malgache. Il a envahi en moins d'un an tout le territoire national de 600.000 km^2 environ faisant plus de 300.000 morts et causant 100 % de morbidité et de mortalité dans les élevages touchés en absence d'interventions médicales. Un vaccin tué constitué d'anaculture totale de *Clostridium chauvoei* souche 735, isolé à partir des premières victimes dans la zone de maladie initiale a été utilisé pour contrôler l'épizootie. Ce vaccin associé aux spores de *Bacteridium anthracis* souche Sterne constitue le "Bichar" utilisé contre les deux charbons : symptomatique et bactéridien.

Vingt ans après, la maladie sévit encore sous forme sporadique sur les hauts plateaux malgaches, et enzootique saisonnière ou permanente dans de nombreuses zones d'élevage extensif naisseur du Sud et de l'Ouest du pays, pouvant se transformer en épizootie lorsque les conditions favorisantes sont réunies.

L'objectif des présents essais est double :
- contrôler, ou si possible, éradiquer la maladie de ces zones infectées en permanence,
- conférer une protection de longue durée (3 ans) aux animaux avec une intervention unique.

La démarche adoptée est la vaccination de tous les animaux des zones identifiées avec un nouveau vaccin constitué d'anatoxine de deux biotypes de *Clostridium chauvoei.*

Matériel et méthode

Matériel

Lieux des essais

Il s'agit du milieu réel, c'est à dire des zones d'élevage extensif avec un encadrement classique, un chef de poste vétérinaire pour 25 à 30 000 têtes de bovins qui parcourt à pied une étendue de 500 km^2 environ pour les interventions vétérinaires et zootechniques. Deux zones ont été identifiées :
- une zone d'enzooties permanentes malgré la vaccination annuelle obligatoire,
- une zone d'enzooties saisonnières, où les jeunes animaux succombent régulièrement à la maladie à la fin et au début de la saison de pluie (mars-avril et octobre-novembre).

Animaux

Ce sont des zébus de tout âge appartenant à :
- des collectivités (au nombre de 7126 animaux),
- des particuliers volontaires : répartis en 2 groupes selon les soins apportés par les propriétaires :
  - 2385 bovins appartenant à 6 éleveurs qui vaccinent et déparasitent régulièrement leurs animaux,
  - 1967 bovins vaccinés régulièrement et déparasités occasionnellement appartenant à 8 éleveurs.

Vaccin

Mélange d'anatoxine de 2 biotypes de *Clostridium chauvoei* : 735 et 335 et de spores de *Bacteridium anthracis* souche "Sterne".

Matériel d'injection

Un dermojet.

Méthode

Préparation

L'anatoxine a été obtenue par culture séparée de *Clostridium chauvoei* biotype 735 et 335 en fermenteur, extraite par la méthode de double filtration selective.

Injection

Tous les animaux de 2 mois et plus sont vaccinés par voie intra-dermique à la base de la queue (pli sous-caudal) à la dose de 0,5 ml. La 1ère injection est suivie d'une 2ème injection de rappel 21 jours après.

Contrôle

L'observation et le suivi sont assurés par le propriétaire en permanence, par un agent de l'élevage tous les mois et par nous même tous les 3 mois. L'efficacité est jugée par comptage des malades et des morts par le charbon symptomatique durant 13 ans.

Résultats

Troupeaux collectifs

7126 animaux appartenant à des éléveurs du Firaisana (arrondissement de Fenoarivo), poste vétérinaire d'Ankaramena, ont reçu en avril 1984 deux injections "d'anatoxine" associée aux spores "sterne" à 21 jours d'intervalle contre les charbons symptomatique et bactéridien. Cette méthode de vaccination a été renouvelée tous les ans jusqu'au 1987. De 1988 à 1993, on est revenu à l'utilisation du "Bichar" classique, faute d'anatoxine, le laboratoire de fabrication ayant cessé sa production.

Les résultats durant 13 ans sont jugés sur le nombre de malades et de morts observés (Tableau I).

Ils nous montrent une nette diminution de morbidité due à la vaccination et une absence même de mortalité en 1986 grâce à l'intervention de l'agent du service de l'élevage chargé de suivre plus particulièrement cette zone d'expérience. La recrudescence de la maladie à partir de 1990 serait liée à l'abandon de l'anatoxine mais plus sûrement à la pénurie de vaccins à la suite des grèves politiques de longue durée suivie de flottements dans les services publics durant cette période.

Tableau I.

Vaccins utilisés	Bichar*			Anatoxine**				Bichar					
Années	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993***
Effectif	7126	6879	6791	6688	6812	6905	6730	6847	6214	6373	6608	6794	6968
Morbidité par charbon symptomatique	204	212	166	117	44	38	58	89	105	93	149	98	152
Pourcentage	2,8	3	2,4	1,8	0,6	0,5	0,8	1,3	1,5	1,3	2	1,4	2,2
Mortalité par charbon symptomatique	181	167	114	19	5	0	12	4	17	25	40	31	81
Pourcentage	2,5	2,4	1,6	0,3	0,07	0	0,2	0,06	0,2	0,4	0,6	0,45	1,2
Mortalité totale	511	418	413	370	314	303	348	294	390	275	353	392	240
Pourcentage	7	6	6	5,6	4,7	4,4	5	4,2	5,5	4	5	5,8	3,4
Taux de croissance	?	-3,4	-1,3	-1,5	+1,8	+1,4	-2,5	+1,7	-9,2	+2,5	+3,7	+2,8	+2,5

* : Bichar : vaccin composé d'anaculture totale de *Clostridium chauvoei* biotype 735 + "spores sterne".
** : Anatoxine : vaccin constitué d'anatoxine de *Clostridium chauvoei* biotypes 735 et 335 + "spores sterne".
*** : L'année 1993, jusqu'au mois d'août, a été marquée par un retard et une pénurie dans l'approvisionnement en vaccins, causant une grosse morbididté due au charbon asymptomatique. La mortalité globale augmentera à la fin de la saison sèche.

Troupeaux d'éleveurs individuels

Tous les animaux de 2 mois et plus ont été vaccinés dans les mêmes conditions que précédemment en avril 1984. Les années suivantes, seuls les animaux neufs (nés ou achetés) non vaccinés lors de la première intervention ont été immunisés jusqu'en 1987. De 1988 à 1993, on utilisait le "Bichar" pour tous les animaux sans distinction. Les résultats sont donnés par groupe d'éleveurs en fonction des soins appliqués aux animaux.

Animaux vaccinés et déparasités régulièrement

2385 animaux de 6 éleveurs volontaires de Mandonto et d'Ambatolahy,vaccinés régulièrement contre les charbons symptomatique et bactéridien ainsi que contre l'entérite colibacillaire, et déparasités périodiquement contre la fascilose, l'ascaridose et les strongyloses, ont été vaccinés. Les résultats sont consignés dans le Tableau II.

L'application de l'anatoxine a donné un très bon résultat dans la lutte contre le charbon symptomatique dans ce milieu conscientisé. Mais la protection n'a pas duré plus de 2 ans car les non vaccinés annuellement constituent la plupart des victimes observées.

Animaux vaccinés, non déparasités

1967 animaux de 8 éleveurs de Ranohira et d'Ambatolahy vaccinés régulièrement contre les même maladies que précédemment mais non déparasités ont servi de sujets d'expérience pour tester l'anatoxine.

Le Tableau III nous donne des résultats moins bons que ceux obtenus chez des animaux déparasités régulièrement aussi bien pour la morbidité due au charbon symptomatique que pour la mortalité globale.

Discussion

Les résultats obtenus sont le fruit de l'utilisation de l'anatoxine conjuguée à la vigilance de l'éleveur et du technicien de terrain. La régression de la morbidité due au charbon symptomatique attribuée à l'immunisation conférée par le vaccin polyvalent et la contamination à petite dose dans la nature dans les zones à enzooties permanentes. L'identification de la maladie est coutumière aux éleveurs qui se trompent sûrement sur les tumeurs suivies de boiterie matière de charbon symptomatique.

La difficulté de l'éradication de cette maladie réside essentiellement dans la pérennité des causes favorisantes : les dures conditions d'élevage restent les mêmes, les us et coutumes (vols de bœufs, partage des viandes issues d'animaux malades, etc), les champs maudits s'avèrent très difficiles à vaincre.

L'abandon de la production d'anatoxine ainsi que la connaissance incomplète des biotypes de *Clostridium chauvoei* en cause, les irrégularités dans l'approvisionnement en vaccin sont autant d'obstacles à la réussite de la prévention de cette maladie.

Tableau II. Troupeaux vaccinés et déparasités régulièrement.

Vaccins	Année	Effectif	Age (en années)	Charbon symptomatique								Mortalité		Taux de croissance
				Morbidité						Mortalité				
				12/02	03/05	06/08	09/11	Totale	%	totale	%	globale	%	
			0-1	2	18	2	9							
	1981	2385	1-4	1	6	4	11	57	2,4	42	1,8	149	6,2	?
			>4	0	0	0	4							
			0-1	1	16	4	0							
Bichar	1982	2046	1-4	3	4	5	7	45	2,2	40	2	153	7,5	-14,2
			>4	1	1	1	2							
			0-1	0	24	0	9							
	1983	2094	1-4	1	11	5	6	65	3	45	2,1	137	6,5	+2,3
			>4	6	0	1	2							
			0-1	0	12	0	3							
	1984	2118	1-4	1	9	1	1	32	1,6	10	0,5	121	5,7	+1,2
			>4	1	0	7	0							
			0-1	0	8	1	0							
	1985	2203	1-4	0	1	2	2	17	0,8	1	0.05	106	4,8	+4
Anatoxine			>4	0	0	0	3							
			0-1	0	3	1	2							
	1986	2290	1-4	1	4	0	0	12	0,5	0	0	108	4,7	+4
			>4	0	0	0	1							
			0-1	0	6	0	0							
	1987	1802	1-4	0	0	2	4	14	0,8	2	0,1	94	5,2	-2
			>4	0	1	0	1							
			0-1	0	9	0	2							
	1988	1894	1-4	0	6	0	4	23	1,2	0	0	109	5,7	+5
			>4	0	0	2	0							
			0-1	0	12	0	0							
	1989	1712	1-4	0	4	0	10	28	1,6	12	0,7	114	6,6	-9,6
			>4	1	0	0	2							
			0-1	1	14	4	1							
Bichar	1990	1840	1-4	2	2	0	2	22	1,2	4	0,2	110	6	+7
			>4	0	0	0	2							
			0-1	1	12	0	4							
	1991	2001	1-4	0	7	3	0	33	1,6	11	0,5	127	6,3	+8,75
			>4	0	0	5	1							
			0-1	0	11	4	1							
	1992	2114	1-4	1	1	6	2	29	1,3	21	1	138	6,5	+5,3
			>4	0	0	1	2							
			0-1	0	12	3	-							
	1993	2209	1-4	1	4	1	-	21	0,95	10	0,5	61	2,8	4,5
			>4	0	0	0	-							

Tableau III. Animaux vaccinés, non déparasités.

Vaccins	Année	Effectif	Age (en années)	Charbon symptomatique – Morbidité 12/02	03/05	06/08	09/11	Totale	%	Mortalité totale	%	Mortalité globale	%	Taux de croissance
			0-1	3	14	1	5							
	1981	1967	1-4	0	5	6	7	44	2,2	35	1,8	136	6,9	?
			>4	0	0	1	2							
			0-1	1	12	2	6							
Bichar	1982	1880	1-4	0	1	5	3	34	1,8	28	1,5	141	7,5	-4,4
			>4	1	0	0	4							
			0-1	2	16	1	2							
	1983	1992	1-4	0	4	0	8	35	1,75	30	1,5	129	6,5	+5,6
			>4	0	0	0	1							
			0-1	0	10	2	3							
	1984	2014	1-4	1	3	0	5	29	1,4	13	0.6	115	5,7	+1,1
			>4	0	0	2	3							
			0-1	0	8	0	1							
	1985	2189	1-4	1	0	5	0	17	0,8	0	0	104	4,7	+8,6
Anatoxine			>4	0	0	1	1							
			0-1	0	7	0	1							
	1986	2220	1-4	0	0	2	4	18	0,8	5	0,2	126	5,6	+1,4
			>4	0	1	1	2							
			0-1	1	6	0	2							
	1987	2065	1-4	0	0	5	2	21	1	11	0,5	121	5,8	-7
			>4	0	1	1	3							
			0-1	0	6	0	4							
	1988	2159	1-4	1	3	6	2	27	1,25	9	0,4	120	5,5	+4,5
			>4	1	0	0	4							
			0-1	0	10	1	1							
	1989	1708	1-4	0	1	3	5	26	1,5	13	0,8	131	7,6	-20
			>4	1	1	2	1							
			0-1	0	8	3	4							
	1990	1800	1-4	0	2	7	0	31	1,7	15	0,8	136	7,5	+5,4
Bichar			>4	1	0	2	4							
			0-1	0	15	0	4							
	1991	1950	1-4	0	3	10	0	39	2	19	1	134	6,8	+8,3
			>4	1	0	3	3							
			0-1	0	18	1	1							
	1992	2068	1-4	1	2	8	1	40	1,9	27	1,3	148	7,1	+6
			>4	0	1	3	4							
			0-1	0	20	5	-							
	1993	2119	1-4	1	3	10	-	43	2	35	1,65	132	6,2	+2,4
			>4	1	2	1	-							

Conclusion

Les essais de vaccination en milieu réel s'avèrent importants dans la lutte contre les maladies et particulièrement contre le charbon symptomatique. La simple présence permanente du technicien influe sur les résultats. Il en est de même des conduites d'élevage adoptées par l'éleveur. Deux conditions nous semblent primordiales pour réussir le contrôle de cette maladie : la meilleure connaissance de l'étiologie et de l'épidémiologie et la présence du technicien au sein des éleveurs qui lui font confiance.

Références

1. Blancou J. (1974). Etude d'un vaccin mixte contre le charbon bactéridien et le charbon symptomatique. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop* ; 27(2) : 183-187.
2. Joubert L., Valette L. (1976). Les échecs de la vaccination antisymptomatique et les méthodes de contrôle d'activité des vaccins. *Dev Biol Stand* ; 32 : 151-155.
3. Ranaivoson A. (1985). Notes sur les obstacles à la réussite de la prophylaxie des maladies telluriques à Madagascar. Acad Mal ; Actes du colloque sur l'amélioration de l'élevage en zones tropicales de Madagascar : 205-210
4. Ranaivoson A. (1991). Le charbon symptomatique à Madagascar. Contribution à l'étude épidémiologique, étiologique et prophylactique. Thèse de Doctorat ès Sciences, Clermont Ferrand II, France.
5. Ranaivoson A., Rajaonarison J.J. (1984). Vaccins mixtes contre le charbon des bovins à Madagascar. *Acad. Malg*
6. Seifert H.S.H., Ranaivoson A. (1984). Prophylaxie des maladies telluriques des ruminants à Madagascar par l'application en intradermique de l'anatoxine obtenue à partir des germes de *Clostridia* locaux. *Anim Dev* ; 19 : 67-82.

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 283-293.

28

Les stratégies de modifications du patrimoine génétique des animaux domestiques, destinées à les rendre plus résistants aux maladies infectieuses et parasitaires : l'apport de la zootechnie des animaux de laboratoire

J.L. GUENET

Institut Pasteur, Paris, France.

Modifier le patrimoine génétique des animaux domestiques afin de les rendre plus résistants aux agressions de l'environnement, en particulier à celles qui mettent en cause des parasites ou des agents infectieux, est une des branches les plus prometteuses de la zootechnie moderne. A terme elle pourrait permettre de réduire les pertes résultant des maladies infectieuses et parasitaires et, par conséquent, de rentabiliser encore les élevages.

Pour parvenir à ce but il existe a priori plusieurs stratégies :

- la première, la plus simple, consiste à sélectionner génération après génération les géniteurs qui résistent le mieux aux maladies infectieuses ou parasitaires. Cette sélection se fait de manière plus ou moins consciente depuis que l'homme a commencé à domestiquer des animaux de rente mais les progrès récents de la génétique permettent d'espérer une augmentation considérable de son efficacité.
- la seconde, consiste à manipuler le patrimoine génétique en ajoutant, *in ovo*, un ou plusieurs gènes codant pour une caractéristique jugée intéressante a priori et prélevés dans une autre race, voire même dans une autre espèce.

- la troisième consiste à modifier sélectivement certains gènes codant pour des protéines dont on connaît la fonction, afin de modifier de manière significative la physiopathologie des maladies infectieuses.

Dans les lignes à venir nous passerons en revue ce qui a été fait et ce qu'il sera sans doute possible de faire dans un avenir proche chez la souris de laboratoire, le mammifère modèle par excellence, en considérant que les résultats acquis dans cette espèce peuvent, au moins en théorie, être transposés aux autres mammifères domestiques.

La sélection sur la résistance

Les êtres vivants réagissent de façons très diverses aux agressions des éléments pathogènes présents dans leur environnement. Dans certains cas, comme celui de la rage par exemple, la rencontre hôte-agent pathogène, sans traitement, est régulièrement fatale pour l'hôte et ceci même si le nombre de particules infectantes est très petit. Dans d'autres cas, au contraire, la résistance de l'hôte est totale, elle est innée. C'est ce qui se passe, par exemple, avec le bacille tuberculeux qui peut facilement infecter l'organisme des bovidés et des suidés mais qui, dans les conditions naturelles, n'infecte pas les équidés. Ici, la résistance des organismes concerne l'espèce toute entière et elle est, de toute évidence, sous contrôle génétique. Cette situation est presque toujours la règle dans le cas des infections virales et parasitaires.

Dans la plupart des cas les choses sont plus nuancées et il existe une multitude de situations où la rencontre entre l'hôte et l'agent pathogène s'accompagne de toute une série d'états pathologiques très variables à la fois en gravité et en durée. Il arrive fréquemment, par exemple après un épisode infectieux explosif survenant au sein d'un troupeau, que certains animaux guérissent complètement alors que d'autres restent infectés et plus ou moins affaiblis.

Avec le temps et l'expérience les hommes ont trouvé les moyens de faire fréquemment tourner le conflit hôte-agent pathogène au profit de l'hôte en utilisant des sérums ou des produits chimiques variés. Avec les vaccins ils sont même arrivés à faire disparaître en totalité certains agents pathogènes tels que, par exemple, le virus de la variole et sans doute bientôt celui de la poliomyélite. Malgré tout la pathologie infectieuse et la pathologie parasitaire restent des problèmes préoccupants pour les vétérinaires en raison de leurs conséquences économiques.

Quelques exemples de différences génétiquement déterminées en matière de résistance naturelle aux infections

Le déterminisme génétique de la résistance aux infections bactériennes ou virales ou aux infestations parasitaires présente des aspects très divers. Il se traduit parfois, dans des cas relativement rares, par un phénotype en tout ou rien faisant apparaître deux classes d'animaux au sein de la même espèce : ceux qui sont sensibles (ou susceptibles) à l'infection et ceux qui y sont résistants. C'est le cas par exemple de certaines diarrhées du porcelet, provoquées par certains sérotypes de la bactérie *Escherichia coli*, pour lesquelles il existe des individus génétiquement résistants et d'autres génétiquement sensibles. C'est aussi le cas des infections de la souris par les orthomyxovirus où l'espèce *Mus musculus* se répartit clairement en deux catégories : celle des souris sensibles et celle des souris résis-

tantes, ces dernières supportant l'inoculation expérimentale d'une dose 500 fois plus forte que les souris sensibles.

Lorsque la résistance à la maladie dépend d'un déterminisme génétique aussi simple ceci signifie qu'il y a une relation directe entre le produit du (ou des) gène(s) concerné(s) et la physiopathologie de l'infection. Avec les agents bactériens et surtout les agents viraux la sensibilité ou la résistance dépend fréquemment de la présence ou de l'absence d'un récepteur à la surface des cellules. L'absence ou la mutation de cette protéine (ou de cette glycoprotéine) vers une forme altérée rend l'infection impossible et l'espèce est alors totalement résistante.

Dans la plupart des cas la résistance à la maladie dépend d'un déterminisme plus complexe où l'on rencontre, à la fois, des gènes qui agissent indépendamment les uns des autres et des gènes dont les effets sont additifs, voire même synergiques. Ceci s'explique par le fait que, contrairement aux exemples donnés précédemment, les mécanismes qui confèrent la résistance à la maladie ne sont dans la plupart des cas ni simples ni directs. Le Tableau I rend compte de travaux réalisés avec la souris sur le déterminisme génétique de la résistance à quelques infections bactériennes ou virales.

Tableau I.

Agent pathogène	Déterminisme génétique	Mécanismes impliqués
Rickettsia tsutsugamushi	Un gène de résistance Ric Chr 5	Macrophages
Rickettsia ackari	Polygénique	Macrophages
Salmonella typhimurium	Un gène de résistance Ity Chr 1 Un gène de résistance Xid Chr X Un gène de résistance Lps Chr 4	Macrophages
Pseudomonas æruginosa	Polygénique	Macrophages ?
Corynebacterium kutscheri	Un gène de résistance Ack Chr ?	Contrôle de la mutiplication précoce
Listeria monocytogenes phase précoce	Un gène de résistance Autosomal	Contrôle de la mutiplication précoce
Listeria monocytogene phase tardive	Un gène de résistance lié au CMH	Contrôle de la mutiplication précoce
Mycobacterium bovis	Un gène de résistance Bcg Chr 1	Macrophages
Flaviviridae	Un gène de résistance Autosomal	?
Hepatite virale murine type 2	Un gène de résistance Autosomal	?
Orthomyxovirus	Un gène de résistance Mx Chr 16	Protéine MX + Interféron
Herpès simplex type 1	Polygénique	??
Herpès simplex type 2	Un gène de résistance Xid Chr X	??
Cytomégalovirus	Polygénique	??
Oxyrudæ	Un gène de sensibilité Autosomal	??
Bilharziose	Un gène de résistance Autosomal	

Dans cette espèce une bonne vingtaine de gènes responsables de déficits immunitaires plus ou moins profonds ont été identifiés et localisés génétiquement.[6]. Parmi ceux-ci on peut citer: *Xid* (X-linked immune deficiency : Chr X) qui provoque un déficit des cellules B et une forte réduction du taux d'IgM, *scid* (severe combined immune deficiency : Chr 16) qui est responsable d'un déficit grave de l'immunité cellulaire et de l'immunité humorale et *me* (motheaten : Chr 6) qui est également responsable d'un déficit immunitaire grave. On peut logiquement penser que de tels gènes ont un équivalent chez tous les mammifères et que des allèles mutants ou défectifs ségrègent peut être aussi dans les populations d'animaux domestiques, rendant certains sujets plus sensibles aux infections que d'autres. Ces gènes mutants sont bien entendu des candidats de première ligne pour une éventuelle contre sélection, et la recherche d'homologies interspécifiques, au niveau chromosomique, qui devient de plus en plus facile à mesure que s'élabore la carte génétique des principales espèces domestiques, revêt de ce point de vue une importance considérable [13].

Dans certains cas le phénotype de résistance est étroitement spécifique d'un agent pathogène. En 1964, J. Lindenmann [8] observa le premier qu'il existait chez les souris de laboratoire une différence considérable de sensibilité à un inoculum virulent du virus de l'influenza. La plupart des lignées testées succombent à l'inoculation en 48/72 heures alors que la lignée consanguine A2G résiste définitivement à une dose 500 fois plus forte. Cette différence de sensibilité, qui prend ici des proportions extrêmes, est contrôlée par un gène unique, le gène *Mx* (Myxovirus résistance : Chr 16), qui possède deux allèles: Mx^+, l'allèle de résistance et Mx^- l'allèle de sensibilité, Mx^+ étant dominant sur Mx^-. Le mécanisme cellulaire de cette résistance a été élucidé [17],et il se révèle être d'une extraordinaire spécificité. Stimulées par l'interféron de type I (qui est produit lors d'infection virale), les macrophages des souris portant l'allèle Mx^+ synthétisent une protéine nucléaire de 72kD (symbolisée MX), et codée précisément par le gène *Mx*, qui inhibe spécifiquement la réplication du génome du virus influenza. O. Haller et ses collaborateurs [7] ont montré que le gène *Mx* des lignées Mx^- présentait soit une délétion de 424 nucléotides (lignée BALB/c), soit une mutation non-sens (lignée CBA/J), qui conduisait, dans un cas comme dans l'autre, à un défaut de synthèse de la chaîne polypeptidique MX.

Un exemple très similaire a été étudié par Miura et ses collaborateurs [10] à propos de l'encéphalite à virus Japonaise (JEV) pour laquelle les auteurs ont montré qu'un seul gène, localisé sur le chromosome 2, déterminait la plus ou moins grande sensibilité de la souris à l'infection expérimentale. Le gène ici encore est en cours de clonage.

Plusieurs autres gènes pouvant intervenir de manière moins spécifique dans le phénotype de résistance ont également été identifiés chez la souris. Ainsi la résistance à l'infection par *Salmonella typhimurium* est conditionnée par au moins trois gènes: *Ity* (dominant, Chr 1), *Xid* que nous avons déjà mentionné ci-dessus et *Lps* (dominant, Chr 4).

Un autre exemple de résistance génétiquement déterminée à une infection bactérienne particulière est fourni par la résistance à *Listeria monocytogenes* pour laquelle un gène contrôlerait l'élimination précoce de la bactérie tandis qu'un autre influencerait l'évolution plus tardive de l'infection. On ignore encore les mécanismes précis par lesquels ces deux gènes agiraient mais, ici encore, il est probable qu'ils ont leur équivalent dans toutes les espèces [6].

La résistance à l'infection par *Salmonella typhimurium* est conférée aux souris qui portent l'allèle Ity^r alors que les souris Ity^s/Ity^s sont sensibles à cette infection [12]. De même

les souris *Bcg*^{r} résistent-elles à une infection par le bacille tuberculeux ou le bacille de la lèpre et les souris *Lsh*^{r} résistent à l'infection par *Leishmania donovani.*

Les trois gènes *Ity, Bcg, Lsh* ont été localisés dans une même région sur le chromosome 1 de la souris et les allèles *Ity*^{r}, *Bcg*^{r}, *Lsh*^{r}, qui sont tous les trois responsables d'une plus grande efficacité des défenses macrophagiques, ségrègent toujours ensemble de sorte qu'on ne sait pas encore si ces trois symboles désignent un complexe multigénique (un haplotype) ou s'ils ne représentent qu'un seul et même gène qui contrôlerait, par le même mécanisme, la résistance à au moins trois types d'infections. Depuis les travaux remarquables de Skamene et de son équipe, à Montréal [18], on sait que le gène *Bcg* produit son effet en modifiant la structure d'une protéine de structure fondamentale exprimée dans les macrophages.

Un même gène peut contrôler plusieurs phénotypes de sensibilité/ résistance. C'est le cas du gène *Lps* qui est impliqué dans la résistance de la souris à plusieurs infections: *Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Rickettsia ackari, Klebsiella pneumoniae*, et *Neisseria meningitidis*. Les souris qui possèdent l'allèle *Lps*^{d} sont sensibles à ces infections et ne reconnaissent pas le lipide A du lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram négatif. Chez les souris résistantes le LPS joue le rôle de facteur chimiotactique, stimule la réaction inflammatoire et favorise l'élimination de l'infection.

Les travaux de Biozzi et collaborateurs [1] concernant la sélection systématique de lignées de souris fortes et faibles productrices d'anticorps à la suite d'une stimulation antigénique complexe, ont permis de mieux comprendre la physiopathologie des défenses naturelles antiinfectieuses. Ils ont permis en particulier de mettre en évidence une corrélation négative, dans ces lignées, entre le niveau de production d'anticorps et l'intensité de la réponse phagocytaire. Les lignées à faible réponse humorale résistent mieux aux infections contrôlées par les macrophages, tandis que les lignées à forte réponse humorale sont moins sensibles aux infections dans lesquelles le rôle des anticorps et des cellules T spécifiques d'antigène est prépondérant; enfin, les deux types de lignées résistent de la même façon aux infections contrôlées par une réaction inflammatoire locale.

La sélection de lignées résistantes

Les quelques exemples que nous venons de mentionner à propos de la souris de laboratoire ont été mis en évidence par l'observation et interprétés grâce à des expériences conçues dans ce but. Malheureusement il n'est pas très raisonnable de concevoir la réalisation de telles expériences avec les animaux domestiques car leur coût serait prohibitif. Par contre il est logique de penser que des mécanismes similaires voire même complètement identiques, existent chez tous les mammifères, ce qui permet alors d'utiliser la souris comme modèle pour la mise au point d'une stratégie de sélection. Celle ci peut alors se faire sur le phénotype ou sur le génotype.

La sélection sur le phénotype

Le choix systématique de géniteurs parmi les animaux qui résistent le mieux aux maladies, lorsqu'il est perpétré génération après génération, modifie progressivement la fréquence des allèles dans la population en question. Imaginons une situation qui doit sans doute être assez courante dans la nature et dans laquelle la constitution génotypique des individus leur confère une aptitude plus ou moins grande à résister à une infection à virus

enzootique, et admettons que cette caractéristique relève d'un déterminisme monogénique simple avec deux allèles au locus *A*, *a* présent dans la population avec une fréquence p, et *a'* présent dans la population avec une fréquence (1 - p) = q.
Supposons maintenant que les individus ayant un génotype *a/a* ou *a/a'* résistent à l'enzootie tandis qu'une partie qui a un génotype *a'/a'* meurt et ne participe pas à la formation de la génération G+1.

Si la population était panmictique avant l'apparition de l'enzootie, c'est à dire de très grande taille, nous aurions par définition, p^2 individus de génotype *a/a*, 2pq de génotype *a/a'* et q^2 de génotype *a'/a'*. Si nous admettons qu'une proportion μ des *a'/a'* meurt de maladie infectieuse, la proportion des différents génotypes qui vont composer le pool de géniteurs qui devra engendrer la génération G+1 sera alors de:

p^2 *a/a*, 2pq *a/a'* et $(1 - \mu)q^2$ *a'/a'*

et l'effectif des individus parvenant à la reproduction sera de :

$$p^2 + 2pq + (1 - \mu)q^2 = (p + q)^2 - \mu q^2 = 1 - q^2$$

Ce qui veut dire, en d'autres termes, que tous les animaux survivants à l'enzootie sont des géniteurs potentiels.
La fréquence de *a'* à la génération G+1 va alors devenir :

$$q' = \frac{2pq + 2q^2 (1 - \mu)}{2 (1-\mu q^2)} = \frac{pq + q^2 (1 - \mu)}{1 - \mu q^2}$$

$$\text{comme } p = 1 - q : \quad q' = \frac{q - \mu q^2}{1-\mu q}$$

la variation de fréquence de l'allèle *a'* est alors de $\Delta q = q - q'$,

$$\text{autrement dit :} \quad \Delta q = \frac{q - \mu q^2}{1 - \mu q^2} = \frac{\mu q^2 (1 - q)}{1 - \mu q^2}$$

Cette relation montre que, si $\mu \neq 0$, la classe des homozygotes *a'/a'* est réduite d'un certain pourcentage génération après génération aussi longtemps que dure l'enzootie et il est intuitif que la fréquence de l'allèle *a'* évolue en fonction de G, le nombre de générations, en suivant une courbe hyperbolique pour laquelle q se rapproche de 0 à mesure que G augmente sans toutefois jamais l'atteindre.

Cette présentation mathématique des faits permet de souligner deux points très importants en matière de sélection. Le premier est que la sélection ne peut avoir d'effets sur les caractéristiques de la population que dans la mesure où il existe un certain degré de polymorphisme génétique dans cette population. Si ce n'est pas le cas, si par exemple il n'y avait pas l'allèle *a* dans la population précédente mais seulement *a'*, on observerait toujours qu'une partie des individus meurent pendant l'enzootie (ils seraient bien sûr tous homozygotes pour *a'*) mais dans ce cas la sélection serait parfaitement inefficace.

Le deuxième point est corrélé au précédent. Il résulte du fait que les animaux fondateurs des races actuelles ont été sélectionnés sur des critères zootechniques précis tels que la prolificité, la robustesse, la taille, etc... Cette sélection a abouti à la perte de certains allèles et à la fixation de certains autres d'une manière irréversible. Ceci peut constituer un inconvénient majeur si un programme de sélection sur la résistance aux maladies doit être entrepris ultérieurement car, lorsqu'on sélectionne en faveur d'un caractère on sélec-

tionne aussi, et en général sans s'en rendre compte, pour tous les caractères qui sont déterminés par les gènes qui lui sont liés au gène qui détermine le caractère sélectionné, tout simplement parce qu'ils sont portés par le même chromosome. La sélection de certains caractères entraîne probablement aussi la fixation concomitante et quasi-inévitable de certains allèles non liés à ceux qui sont sélectionnés, pour des raisons d'épistasie, car la valeur adaptative d'un caractère génétique doit toujours être appréciée en fonction des autres composantes du génome. En appliquant une sélection phénotypique on risque donc d'observer, dans certains cas, des effets adverses. A quoi servirait-il par exemple d'avoir sélectionné des moutons résistants à la Listériose si le prix à payer est une réduction du nombre de gestations gémellaires!

Pour toutes ces raisons il est toujours préférable, à chaque fois que cela est possible, de réaliser une sélection génotypique.

La sélection sur le génotype

La sélection génotypique consiste à repérer, dans un premier temps, sur quel chromosome, ou sur quels chromosomes, sont localisés les gènes qui déterminent tel ou tel caractère intéressant dans le programme de sélection. Fort de ce renseignement le généticien utilise alors un "marqueur génétique" facile et rapide à reconnaître qui lui permet d'identifier génération après génération le bon génotype avant qu'il n'ait atteint l'âge de se reproduire. Cette pratique permet de gagner un temps considérable et donne évidemment l'assurance que la sélection sera efficace. Elle impose par contre d'avoir au préalable une bonne connaissance de l'organisation du génome et c'est à ce niveau que les animaux de laboratoire peuvent sans doute jouer un rôle important. Chez la souris de laboratoire nous avons, par exemple, pu montrer qu'il était possible de localiser génétiquement des gènes ou des groupes de gènes directement impliqués dans la sensibilité à une infection virale [2]. La stratégie que nous avons utilisé pour la reconnaissance de ces gènes peut être appliquée à n'importe quel agent infectieux chez la souris et les résultats obtenus peuvent être transposés à l'homme ou à d'autres espèces domestiques, à condition que la région d'homologie chromosomique entre les deux espèces soit connue. Ceci montre combien il est indispensable de développer pour les animaux de la ferme une cartographie des gènes aussi documentée que possible. Une bonne connaissance de la carte génétique, qui permettrait de localiser les gènes qui sont impliqués dans l'intensité de la réponse immune, permettrait aussi de gagner un temps précieux dans un programme de sélection et, surtout, de diriger celle-ci en évitant certains effets indésirables.

Pour conclure sur ce sujet faisons encore remarquer une dernière chose. Le fait que la sélection soit inopérante lorsqu'elle agit sur une population non polymorphe impose au zootechnicien la nécessité de conserver au maximum le polymorphisme génétique pour chacune des espèces domestiques. Cela veut dire qu'il faut absolument conserver, au besoin sous forme d'embryons congelés lorsque cela est possible, le plus grand nombre possible de races. Cela veut dire aussi qu'il faut éventuellement retourner à l'espèce sauvage, lorsqu'elle existe encore, ou à des espèces voisines lorsque l'hybridation interspécifique est possible, pour récupérer dans la nature la matière première de la sélection : le polymorphisme génétique.

Le transfert de gènes de résistance par transgénèse

La sélection de races ou de lignées résistantes présente deux inconvénients majeurs :
- elle n'est possible, comme nous l'avons dit, que dans la mesure où la population de départ comporte des individus où ségrègent des allèles capables de conférer la résistance à une maladie déterminée,
- elle ne peut se faire qu'au terme d'un très grand nombre de croisements accompagnés d'un travail de sélection ininterrompu et parfois coûteux.

C'est une des raisons pour lesquelles les généticiens ont envisagé d'autres moyens de rendre une espèce animale génétiquement résistante à une maladie. Parmi ces moyens, la transgénèse est le plus prometteur.

Cette technique consiste à produire un embryon dans lequel on a littéralement "greffé" un gène cloné pouvant éventuellement provenir d'une autre espèce, d'un autre genre, ou même d'une autre classe. Ceci peut se faire directement, c'est à dire mécaniquement, en injectant avec une pipette de verre étiré, très peu de temps après la fécondation de l'ovocyte, le gène cloné dans l'un des pronuclei. Ceci peut aussi se faire en infectant les cellules embryonnaires avec un rétrovirus génétiquement manipulé ou en injectant dans un embryon receveur des cellules embryonnaires modifiées génétiquement *in vitro*.

Le gène greffé dans les cellules de l'embryon se transmet ensuite à la manière d'un nouveau caractère mendélien. Dans certains cas il s'exprime, c'est à dire qu'il est transcrit en ARN puis traduit en protéine.

Cette technique de transgénèse est une véritable révolution pour la génétique. Entre autres choses elle permet le transfert direct de caractères génétiques sans passer par la voie sexuée et de ce fait représente une génétique par addition qui s'oppose à la génétique traditionnelle, par substitution, dans laquelle au maximum deux allèles d'un même gène peuvent se trouver dans un génome déterminé.

En plus de la souris et du rat, la transgénèse est également au point dans plusieurs espèces domestiques : Porc, Mouton, Chèvre, Boeuf, Lapin et elle a été utilisée dans trois directions :
- parfois pour augmenter les performances zootechniques (production excessive d'hormones de croissances, de *Growth hormone releasing factor* ou GRF, d'*Insulin like growth factor* ou IGF1, etc...),
- surtout pour faire élaborer chez les animaux de la ferme des protéines d'intérêt médical ou économique (immunoglobulines, hormones, etc...) dans le sérum sanguin ou le lactosérum (c'est le gène farming ou molecular "pharming"),
- plus rarement pour modifier la sensibilité des animaux domestiques aux maladies infectieuses ou parasitaires en raison de notre ignorance relative des mécanismes moléculaires impliqués dans le déroulement des premières étapes de l'infection. Trois expériences intéressantes ont été cependant publiées et il est probable que d'autres le seront à brève échéance.

Le transfert de la résistance à l'influenza par addition au génome du gène Mx de la souris.

Comme nous l'avons déjà mentionné plus haut certaines lignées de souris sont totalement résistante à certains virus de l'influenza [7]. Certains chercheurs considérant que, s'il pouvait exister dans la nature de tels animaux devenus résistants à la "grippe" grâce au pro-

duit du gène *Mx*, il devait être possible "d'emprunter" ce mécanisme de résistance que l'évolution a mis au point chez les muridés pour le transposer dans d'autres espèces domestiques en greffant purement et simplement le gène qui code la protéine *MX*. C'est ainsi que le gène *Mx* a été cloné [17] puis transféré sous une forme légèrement modifiée par transgénèse dans le génome du porc [11].

Pour l'instant l'expérience n'est pas concluante car la production de la protéine *MX* chez les animaux transgéniques est, semble-t-il, insuffisante pour entraîner la résistance mais il est probable qu'une meilleure construction du transgène aboutira bientôt à une synthèse suffisante de cette protéine conférant alors au porc la résistance héréditaire à cette infection.

Addition de séquences d'ADN capables de gouverner la synthèse d'anticorps préformés.

Lo et ses collaborateurs [9] ont réussi à faire s'exprimer, chez des agneaux et chez des porcs, des transgènes réalisés à partir des gènes codant pour la chaîne lourde et la chaîne légère de la souris. Les animaux transgéniques étudiés produisent en quantité non négligeable des IgA de souris dirigées contre la phosphorylcholine. Ces expériences, qui demandent à être reproduites et confirmées, représentent une stratégie très intéressante pour conférer de manière héréditaire la résistance vis à vis d'une infection bactérienne quelconque dès lors que l'on connaît certains déterminants antigéniques de la membrane bactérienne. Elle doit par contre être améliorée pour éviter que des anticorps hybrides résultants d'associations entre chaînes lourdes et légères des deux espèces n'aboutissent à la production d'anticorps de trop faible efficacité.

Résistance induite vis-à-vis du virus de Visna

Pursel et Rexroad [14] ont créé des agneaux trangéniques pour un rétrovirus défectif réalisé à partir du virus de Visna et ne contenant plus que le LTR et la partie codant pour la protéine d'enveloppe. De la même façon Crittenden et Salter [3] ont également réalisé des poulets transgéniques pour des virus défectifs.

Ces expériences sont encore à un stade préliminaire de leur analyse, mais il a été rapporté que l'expression de la protéine d'enveloppe avait été observée chez trois agneaux transgéniques ce qui devrait, en principe, procurer ultérieurement aux animaux une certaine résistance au virus de Visna.

Les modifications du génome induites par recombinaison homologue *in vitro* et leur utilisation potentielle chez les animaux domestiques

Chez la souris il est possible de cultiver *in vitro* des embryons non encore implantés et d'obtenir à partir de ceux-ci, dans certaines conditions expérimentales bien précises, des cultures cellulaires permanentes qui conservent toutes les caractéristiques des cellules embryonnaires précoces et qui, en particulier, sont capables de coloniser la lignée germinale lorsqu'on les injecte mécaniquement dans la cavité d'un blastocyste receveur. Ces cellules permettent aussi de faire de la génétique *in vitro* exactement comme on le ferait avec des cellules somatiques.

On peut alors utiliser ces cellules pour produire des mutations dans un gène déterminé dès lors que celui-ci est cloné. Il suffit pour cela de transfecter des cellules ES convenablement préparées avec des copies mutées *in vitro* du gène en question. Cette technique est maintenant bien au point chez la souris et de très nombreux animaux mutants ont déjà été produits. Il est possible, au moins en théorie, d'utiliser cette stratégie pour tenter de muter *in vitro* le récepteur cellulaire d'un parasite, d'un virus, ou d'une bactérie et de rendre ainsi l'animal totalement résistant à l'infection. Cela implique cependant que le récepteur n'ait pas d'autre fonction physiologique chez l'animal normal ce qui n'est malheureusement pas toujours le cas.

Cette stratégie ouvre des perspectives intéressantes pour produire des animaux génétiquement résistants mais elle ne sera transposable aux espèces domestiques que lorsqu'il existera dans ces espèces des lignées de cellules ES cultivables *in vitro* et capables de coloniser régulièrement la lignée germinale. Ceci n'est pas encore le cas.

Conclusions

La souris de laboratoire, entre les mains des généticiens moléculaires, s'est rendue complice d'une véritable révolution. On peut cloner ses gènes, même si leur produit n'est pas connu, on peut ajouter à son génome des gènes qui proviennent d'une autre espèce, éventuellement après les avoir modifiés, enfin on peut muter sélectivement tous les gènes de son génome qui sont clonés. Cette révolution permet de conférer à l'espèce des caractéristiques qu'elle n'avait pas, ou qu'elle n'avait plus, comme par exemple la résistance à certaines maladies infectieuses ou parasitaires. On peut prévoir et même souhaiter qu'une voie de développement de la zootechnie de demain passe par de telles pratiques chez les animaux domestiques. Elles auraient l'avantage d'affranchir nos campagnes des pollutions qui résultent de l'utilisation continuelle de produit chimiques pesticides ou médicamenteux et, parce qu'elles permettraient la transmission des caractéristiques transférées génération après génération, elles réduiraient considérablement les coûts de production.

Référence

1. Biozzi G., Stiffel C., Mouton D., Bouthillier Y., Decreusefond C. ( ).Sélection artificielle pour la production d'anticorps chez la souris. *Annales de l'Institut Pasteur* ; 115 : 965-967.
2. Bureau J.F., Montagutelli X., Bihl F., Lefebvre S., Guénet J.L., Brahic M. (1993). Mapping loci influencing the persistence of Theiler's virus in the murine central nervous system. *Nature Genetics* ; 5 : 87-91,.
3. Crittenden L.B., Salter D.W.(1990). Expression of retroviral genes in transgenic chickens. *J Reprod Fertil (Suppl.)* ; 41 : 163-165.
4. Cundiff L.V., Bishop M.D., Johnson R. K. (1993). Challenges and opportunities for integrating modified animals into traditional animal breeding plans. *J Anim Sci* ; 71 (3) : 20-25,
5. Ebert K.M., Schindler J.E.S. (1993). Transgenic farm animals : Progress Report. *Theriogenology* ; 39 : 121-135, .
6. Green M.(1988). Catalog of mutant genes and polymorphic loci. In : Lyon M.F., Searle A.G. eds. *Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse 2nd edition*. Oxford University Press.
7. Haller O., Acklin M., Staeheli P.(1988). Genetic Resistance to influenza virus in wild mice.

Curr Top Microbiol Immunol ; 127 : 331-337.

8. Lindenmann J. (1964). Inheritance of resistance to influenza virus in mice. *Proc Soc Exp Biol Med* ; 116 : 506-509.
9. Lo D., Pursel V., Linton P.J., Sandgren E., Behringer R., Rexroad C., Palmiter R.D., Brinster R.L. (1991). Expression of mouse IgA by transgenic mice, pigs and sheep. *Eur J Immunol ;* 21 : 1001-1006.
10. Miura K., Onodera T., Nishida A., Goto N., Fujisaki Y. (1990). A single gene controls resistance to Japanese encephalitis virus in mice. *Arch Virol* ; 112 : 261-270.
11. Muller M., Brem G. (1991).Disease resistance in farm animals. *Experientia* ; 47 : 47-923.
12. Nauciel C., Ronco E., Guénet J.-L. (1988). Genetic control of *Salmonella typhimurium*-induced depression of delayed-type hypersensitivity to sheep erythrocytes in mice. *Infect Immun* ; 56 : 310-313, .
13. O'Brien S. (1993). *Genetic maps.* Sixth edition, book 4, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
14. Pursel V.G., Rexroad C.E. Jr. (1993). Status of research with transgenic farm animals. *J Anim Sci* ; 71(3) : 10-19.
15. Renard J.P., Babinet C. (1987). Genetic engineering in farm animals : the lessons from the genetic mouse model. *Theriogenology* , 27 : 181-193, .
16. Seidel G.E. Jr. (1993). Resource requirements for transgenic livestock research. *J Anim Sci* ; 71(3) : 26-33, .
17. Staeheli P.O., Haller O., Boll W., Lindenmann J., Weissmann. (1986). MX protein : Constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus. *Cell* ; 44 : 147-151.
18. Vidal S.M., Malo D., Vogan K., Skamene E., Gros P. (1993). Natural resistance to infection with intracellular parasites : Isolation of a candidate for Bcg. *Cell* ; 73 : 469-485.

Note : La lecture du livre "*Genetics of resistance to bacterial and parasitic infection.* Wakelin D.M., Blackwell J.M. eds. Taylor and Francis Publishers, London, 1988" est vivement conseillée.

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 295-304.

29

Résistance génétique des animaux aux maladies : cas de parasitoses gastro-intestinales chez les petits ruminants

A. LAHLOU-KASSI*, S. TEMBELY*, R. L. BAKER**

* *Centre International pour l'Elevage en Afrique (CIPEA), Addis Ababa, Ethiopie.*
** *Centre International pour l'Elevage en Afrique (CIPEA), Nairobi, Kenya.*

Résumé

Dans ce document nous passons en revue l'état de nos connaissances actuelles sur la résistance génétique des petits ruminants aux parasites internes. Plusieurs auteurs rapportent l'existence d'une variation importante dans cette résistance génétique entre les races de moutons et de chèvres et au sein d'une même race. Il a été démontré que la résistance aux parasites internes (mesurée par le nombre d'œufs par gramme de fèces) est héréditaire. Le taux d'héritabilité varie de 0,3 à 0,5 ce qui a permis la mise en place avec succès de programmes de sélection pour ce caractère. La biotechnologie contribuera à l'identification du ou des marqueurs génétiques lié(s) à cette résistance et permettra ainsi d'identifier d'une manière précise et précoce les individus résistants. L'exploitation de la variation génétique inter et intra-races offre de nouvelles perspectives dans le contrôle des parasitoses gastro-intestinales, notamment dans le continent africain.

L'importance des verminoses tient à leur universalité, à leur fréquence, aux pertes économiques résultant des mortalités et aux pertes de production qu'elles engendrent. Par exemple, en Uraguay (Amérique latine) il a été estimé que les affections parasitaires occasionnent une perte de 50 kg de poids vif par bovin, avec un coût global de 220 US $, par an. En Australie, les pertes sont estimées à près de 300 millions de $ australiens par an, malgré l'utilisation extensive des anthelminthiques [9]. En Afrique, des pertes annuelles de 20 à 40 millions de $ ont été signalées dans certains pays [2,3].

D'une manière générale, ces pertes de production se manifestent par une réduction de poids vif, une baisse de la production laitière et lainière, des saisies en viande et en organes, s'ajoutant au coût très élévé des anthelmintiques, notamment dans les pays en voie de développement.

Les animaux s'infestent au pâturage et acquièrent une certaine résistance, qui se manifeste par un certain degré de protection vis-à-vis des ces parasites. Cependant, dans beaucoup de cas, cette réponse immunitaire est trop faible pour pouvoir produire une protection complète contre l'infestation.

Une variation génétique de l'hôte en ce qui concerne sa résistance ou sa tolérance vis-à-vis des parasites internes a été observée et rapportée depuis les années 40-50, chez les petits ruminants par Stewart *et al.*[35], Gregory [16], Emik [13], Whitlock [42]. Ces dernières années, un regain d'intérêt s'est manifesté dans ce domaine, particulièrement en Australie et en Nouvelle Zélande, parce que ces pays sont de plus en plus confrontés aux problèmes de la résistance des parasites vis-à-vis des anthelmintiques. Les parasites pour lesquels des études ont été ménées sont : *Haemonchus contortus, Trichostrongylus spp.* et *Ostertagia spp.*, représentatifs du fait de leur importance vétérinaire et économique dans la plupart des pays en voie de devéloppement.

Dans ce document nous nous proposons de faire le point sur l'état de nos connaissances sur l'existence de ces races résistantes, la nature et les mécanismes sur lesquels cette résistance ou tolérance est basée. Ensuite nous donnerons notre point de vue sur le rôle possible que pourrait jouer la biotechnologie dans la mise en oeuvre des approches décrites ci-dessus.

Variations génétiques de la résistance

Les notions de résistance et de susceptibilité sont très difficiles à définir et ont été très souvent utilisées pour décrire le comportement des animaux vis-à-vis de certaines maladies. Au cours de l'atelier de planification de la recherche sur la résistance des petits ruminants aux parasites internes, tenu à Addis Ababa en Ethiopie par ILCA/CIPEA [21], les participants ont convenus d'adopter les définitions suivantes :

- La résistance est le commencement et le maintien des réponses immunitaires induites par l'hôte pour empêcher l'implantation des parasites et/ou provoquer l'expulsion des parasites dejà implantés. Elle joue un rôle assez important dans l'épidémiologie des parasitoses, puisqu'elle diminue le risque de contamination pour les jeunes, du fait d'une diminution de l'infestation des pâturages.
- La résilience par contre indique l'aptitude de l'hôte à maintenir un niveau de production acceptable sous l'effet du parasitisme.
- La tolérance enfin, détermine l'aptitude de l'hôte à survivre à l'effet du parasitisme.

Dans ces deux derniers cas, les pâturages sont soumis à une contamination continue parce que les animaux n'ont aucun contrôle sur la production des œufs de parasites. Il est important de noter que la plupart des travaux de recherche sur la résistance génétique des petits ruminants aux parasites internes ont été orientés jusqu'ici vers la recherche des indices de résistance.

Les critères d'appréciation ou d'identification de ces animaux résistants ont été définis sur la base de l'analyse quantitative coprologique (comptage des œufs de parasites), le bilan parasitaire, le dégré d'anémie (l'hématocrite), l'évolution pondérale, et le taux de survie. Le comptage des œufs reste jusqu'ici la méthode la plus couramment utilisée dans le diagnostic de la résistance aux parasites internes puisqu'il s'opère sur le vivant de l'animal. Un examen critique, au cours de deux saisons consécutives, de la relation entre le comptage et la charge parasitaire réelle après autopsie sur des descendants considérés résistants et susceptibles de la race Romny (Australie), a montré une très forte corrélation entre la présence effective des parasites et le nombre d'œufs par gramme de matières fécales [8].

Variations inter-races

Depuis les années 30, de nombreuses publications ont fait état de l'existence d'une importante variation de la résistance vis-à-vis des parasites internes, entre les races de moutons, en particulier avec *Haemonchus contortus, Ostertagia circumcincta*, et *Trichostrongylus colubriformis*. D'une manière générale, les races autochtones ont montré une nette supériorité dans la résistance, par rapport aux races Européennes importées. Les critères dans l'évaluation de ces races ont porté sur le comptage des œufs, l'hématocrite, le bilan parasitaire, le taux de survie et l'évolution pondérale. Les animaux, qui comprenaient aussi bien les agneaux que les brebis et les béliers, étaient exposés, soit à une infestation naturelle, soit à un challenge artificiel. Le Red Massai au Kenya, la Florida native aux USA, la Lacaune en France illustrent quelques exemples de races ovines résistantes aux parasites internes (Tableau I).

Chez les chèvres, la situation est quelque peu différente car nous ne disposons que de très peu de données. Les seuls exemples dénotant une différence dans la résistance de chèvres vis-à-vis des parasites internes sont ceux rapportés par Cabaret et Anjorand [10], et Richard [31] dans leurs études comparatives entre le Saanen et l'Alpine en France, suite à des infestations naturelles par *Trichostongylus circumcincta*. Au Kenya, Preston and Allonby [30] ont pu également démontrer que le Saanen est plus résistant aux parasites internes que le Galla et la East African (Tableau II). Selon Gruner [18], il est probable qu'il existe une différence dans le mécanisme et le niveau de résistance chez les moutons et les chèvres du fait de leurs habitudes alimentaires. Etant donné que les chèvres préfèrent les pâturages aériens, elles seront moins soumises à la sélection naturelle, et par conséquent plus susceptibles aux parasitoses gastro-intestinales. D'après le même auteur, le dégré de susceptibilité pourrait être différent selon les espèces de parasites.

Variations intra-races

L'existence de la variation dans la résistance des moutons aux parasites internes, à l'intérieur d'une race ou au sein d'une population, a été montrée pour la première fois par Gregory [16], Gregory *et al.* [17], Emik [13], Warwick *et al.*[37], et Whitlock [40,41]. Des

Tableau I. Quelques exemples de races ovines résistantes aux parasites internes.

Pays	Races résistantes	Races témoins	Trait	Type d'infection	Espèces parasites	Age des animaux (mois)	Auteurs
	Rommey...	Rambouillet Southdown Shorpshire	O	N	Oc	6-20	Stewart *et al.* [35]
USA	Florida native...	Rambouillet Hamsphire	O,Bp,S	N	Hc	agneaux/brebis	Loggins *et al.* [24]
	Florida native...	Rambouillet	O,H	N	Hc	brebis	Jilek & Bradley [22]
	Florida native...	Dorset X Rambouillet	O,Bp	N	Hc,Ts,Os	brebis	Zajac *et al.* [45]
France	Lacaune.	Romanov Rom. X Lacaune	O,Bp	N	Os, Nsp	brebis	Gruner *et al* .[19]
Royaume Uni	Scottish blackface...	Dorset	Bp,S	A	Ta	agneaux	Ross (1970)
	Red Massai...	Black head Persian Merino Dorper Corriedale	O,Bp,S	N	Hc	brebis et mâles castrés	Preston & Allonby [30]
Kenya							
	Red Massai .	Dorper Black head Somali Rommey	O,H,Bp,S	N/A	Hc	brebis	Kari & Oda (1992) (unpublished)
	Red Massai...	Dorper Dorper X Red Massai	O,H,S	N	Hc,Ts		Baker *et al.* [7]
Ghana	Djallonké	Nungua black head	O	N	Os,Hc,Ts	agneaux et brebis	Assoku [4]

Tableau II. Quelques exemples de races caprines résistantes aux parasites internes.

Pays	Races résistantes	Races témoin	Trait	Type d'infection		Espèces parasites	Age des animaux	Auteurs
	Saanen...	East African Galla		O,BP,S	A	Hc	24-26	Preston & Allonby [30]
Kenya	East African...	Galla Toggenburg X EA		O,H,Bp,S P	A	Hc	10-14	Shavulimo *et al.* [34]
	EA & EA X Galla	Anglo-nubian métissés Toggenburg métissés		O,H	N	Mixtes (avec prédominance Hc)	10-12	Robrer *et al.* [33]
	Alpine...	Saanen		O	N	Mixtes		Cabaret *et al.* [10]
	Alpine...	Saanen		O	N	Tc	daines	Richard *et al.* [31]

O : œufs par gramme de fèces
H : hématocrite
P : poids
Bp : bilan parasitaire
S . survie
Source : Baker *et al.* [6]

recherches plus récentes, ménées sur les races Merinos, Dorset, Romney et Carriedale, ont démontré l'existence d'une variation individuelle à l'intérieur de chacun des génotypes de ces races ovines vis-a-vis de *T. colubriformis* [43] et d'infestation mixtes composée de *H. contortus, T. colubriformis, O. circumcincta* et *Nematodirus spp.* [29,39]. En Australie et en Nouvelle Zélande, des études ont montré que le degré de transmission, des parents aux descendants, de certains traits de caractères, tels que le nombre des œufs de nématodes dans les matières fécales, ou la valeur de l'hématocrite, étaient intimement liés au dégré de résistance de l'animal. De nombreuses recherches ont confirmé la constance des valeurs de l'héritabilité de la résistance variant de 0,3 à 0,5 [5,39]. Ces taux d'héritabilité sont similaires à ceux connus pour les traits de production, tels que la quantité de lait produite par animal et par lactation, le gain moyen quotidien, le poids à la naissance, le poids au sevrage et la finesse de la laine. Par ailleurs, dans le cas d'infestation à *H. contortus* et à *T. colubriformis*, les chercheurs Australiens ont trouvé une très faible corrélation génétique avec les caractères de production, même en l'absence de l'infestation [2,43], ce qui signifie que la sélection pour la résistance à ces parasites n'entrave pas les programmes de sélection déjà en place pour l'accroissement de la production.

Programmes de sélection

La mise en évidence des taux d'héritabilité similaires à ceux connus pour les traits de production ont amené les chercheurs à mettre en place des programmes de sélection d'animaux résistants aux parasites internes. Les critères proposés pour la selection de ces animaux ont été largement décrits par Pfister [27]. Ces critères comprennent : le comptage des œufs, le type d'hémoglobine, l'hématocrite, le bilan parasitaire, les réponses humorales et à médiation cellulaire, les pertes de production au cours des tests-infection.

Par ailleurs, Windon [42] avait mené avec succès une sélection de lignées de moutons résistants à *T. colubriformis*, sur la base de leur réponse à la vaccination. Un certain nombre de programmes de sélection ont été mis en place avec succès en Australie, en Nouvelle Zélande et en France sur la base de l'analyse coprologique (comptage des œufs) et la détermination de l'hématocrite. Les races qui ont fait l'objet d'une sélection pour leur résistance aux parasites internes, notamment *Haemonchus contortus* et *Trichostrongylus colubriformis*, sont : le Merinos [1,11,23,42,44], le Romney [5], le Perendale [38] et le Romanov [18]. Du point de vue interêt économique, Piper and Barger [28] ont estimé que la mise en place d'un programme de sélection permet d'améliorer le gain moyen de 10%, environ, par an et par exploitation.

Nature et mécanisme de la résistance

Plusieurs hypothèses ont été avancées dans la recherche des mécanismes de la résistance des animaux aux parasites internes qui demeure jusqu'ici assez mal comprise. Quel que soit le mécanisme impliqué, il a été établi que cette résistance est génétiquement dépendante et que les réactions immunologiques semblent jouer un rôle déterminant dans son expression. Il a été démontré que les animaux résistants ont la capacité de montrer une réponse plus rapide aux parasites que les sujets susceptibles. La réaction de l'hôte résistant se traduit par un taux assez élévé d'élimination des vers (il a été observé un taux

d'établissement des parasites chez l'hôte de 0,05 pour les sujets résistants et 0,61 pour les sujets susceptibles) accompagné par des réactions immunologiques spécifiques et non spécifiques. L'examen du rôle des cellules T dans le contrôle de la réponse immunitaire aux parasites a été l'objet de recherches intenses. Gray and Gill [15] ont passé en revue l'état actuel de nos connaissances dans la recherche du ou des mécanismes de résistance aux parasites gastro-intestinaux. Il a été démontré par plusieurs auteurs que les lymphocytes T sont largement impliqués dans les réactions immunitaires observées. Par ailleurs, des antigènes de ces lymphocytes ont été identifiés comme marqueurs génétiques et ont fait l'objet d'utilisation dans la sélection des individus résistants [12,26].

Rôle de la biotechnologie dans l'étude de la résistance génétique aux maladies

La biotechnologie pourrait jouer un rôle déterminant dans :
- l'identification des races résistantes par l'amélioration des méthodes existantes de diagnostic à travers l'utilisation des épreuves sérologiques telles que l'ELISA;
- l'isolement, la purification et la caractérisation des antigènes des parasites pour améliorer la spécificité et la sensibilité de ces tests et le développement de vaccins synthétiques ou même biologiques;
- l'identification des marqueurs génétiques, par l'utilisation de la sonde nucléique de l'ADN permettra de sélectionner les animaux résistants même en l'absence de la maladie;
- la recherche d'une meilleure définition du mécanisme de la résistance (immunité humorale ou cellulaire, rôle des macrophages et eosinophiles).

Perspectives pour le continent africain

Le continent Africain offre, du point de vue ressources naturelles, une diversité génétique importante et un nombre important de races bovines, ovines et caprines. Dans la plupart des régions, ces races ont été soumises, durant des siècles à des taux d'infestation parasitaires élévés, compte tenu des conditions favorables au développement et à la survie des parasites, du type de système de production (extensif), du fait que les animaux font rarement l'objet de déparasitage interne, du faible revenu de l'éléveur. Ces éléments ont probablement contribué à l'émergence de races ou d'individus résistants aux parasites internes. L'exemple du Red Massai au Kenya (jusqu'ici la seule race Africaine confirmée [7]) en est une bonne illustration. Par ailleurs, et comme nous venons de le souligner plus haut, des critères d'identification d'individus résistants relativement simples (comptages des œufs) et très peu coûteux sont disponibles. Il est donc possible d'envisager un programme de caractérisation des races ovines africaines, quant à leur résistance génétique aux parasites internes, et qui pourrait aboutir éventuellement à la mise en place d'un programme de sélection. C'est ainsi que le CIPEA a initié un programme multi-disciplinaire à long terme sur la recherche de la résistance/tolérance des petits ruminants aux parasites gastro-intestinaux. Ce programme qui comporte deux phases (identification des races résistantes et étude du mécanisme de la résistance) est en cours en Ethiopie, au Kenya et au Sénégal.

Les objectifs de cette recherche visent à déterminer et à comparer la variation génétique dans la résistance aux parasites internes entre les races et au sein de la même race de moutons et de chèvres. Il est également possible d'étendre ces activités à d'autres maladies économiquement importantes, en tenant compte des paramètres de production tels que la croissance, la reproduction et la mortalité. Les races ovines actuellement concernées par cette étude sont le Red Massai, le Dorper, le Red Massai x Dorper au Kenya; le Menz et le Horro en Ethiopie; le Djallonké et le Peulh-Peulh au Sénégal. Les races caprines sont le Galla, le East African, le Kenya dual Purpose au Kenya; la race naine de l'Afrique de l'Ouest et le type Sahelien au Sénégal.

Références

1. Akerejola O. O., Schillhorn van Veen T.W. Njoku C.O. (1979). Ovine and caprine diseases in Nigeria : a review of economic losses. *Bull Anim Hlth Prod Afr* ; 27 : 65-70.
2. Albers G.A.A., Gray G.D., Piper L.R., Barker J.S.F., LeJambre L.F., Barger I.A. (1987). The genetics of resistance and resiliense to *Haemonchus contortus* infection in young Merino sheep. *Int J Parasitol* ; 17 : 1355-1363.
3. Allonby E. W. (1975). Annual report of the sheep and goat development Project, Kenya.
4. Assouku R.K.G. (1981). Parasitic helminths of sheep and goats in Ghana. *Bull Anim Hlt. Prod Afr* ; 29 : 1-10.
5. Baker R.L., Watson T.G., Bisset S.A., Vlassoff A., Douch PG. (1991). Breeding sheep in New Zealand for resitance to internal parasites : Research results and commercial application. In : Gray G.D., Woolaston R.R. eds; *Breeding for disease Resistance in Sheep.* Aust Wool Corporation, Melbourne : 19-32.
6. Baker R.L., Lahlou-Kassi A., Rege J.E.O., Reynolds L., Tekelye B., Mukassa-Mugerwa E., Rey B. (1992). A review of genetic resistance to endoparasites in small ruminants and and outline of ILCA's research programme in this area. Proceedings of the 10th Scienfific Workshop of the Small Ruminant Collaborative Resaech Support Program (SR-CRSP), 26-27 February, 1992, Nairobi, Kenya : 79-104
7. Baker R.L., Reynolds L., Mwomachi D.M., Ouma J., Mogodi M., Miller J.E. (1993). Genetic resistance to gastro-intestinal parastes in Dorper and Red Massai x Dorper lambs in coastal Kenya. Proceedings of the 11th SR-CRSP Scientiofic Workshjop, 3-4 March, 1993, Nairobi, Kenya.
8. Bisset S.A., Vlassoff A., Morris C.A., Southey B.R., Baker R.L., Parker A.G.H. (1992). Heritability of, and genetic correlations amoung, faecal egg counts and productivity traits in Romney sheep. New Zealand. *J Agri Res* ; 35 : 51-58.
9. Brunsdon R.V. (1988). The economic impact of nematode infection in sheep : implicatios for future research and control. In :.A.C.G. Heath ed. *The economic importance of parasites of livestock in New Zealande*, New Zealand Society for Parasitol., miscellaneous publications no. 1 : 4-16
10. Cabaret J., Anjorand N. (1984). Comparaison de l'infestation naturelle par les strongles et *Monezia* sp. chez les races caprines Alpine et Saanen. *Bull Soc Fran Parasitol* ; 2 : 49-52.
11. Cummings L.J., Thompson R.L., Yong W.K., Riffki, G.G., Goddard M.E., Callinon A.P.L., Saunders, M.J. (1991). Genetics of Ostertagia selection lines. In : Gray G.D., Woolaston R.R. eds. *Breeding for Disease Resistance in Sheep.* Australian Wool Corporation, Melbourne : 11-18.
12. Douch P.G.C., Outtteridge P.M. (1989). The relationship between ovine lymphocyte antigen and parasitological and production parameters in Romney sheep. *Int J Parasitol* ; 19 : 35-41.
13. Emik L.O. (1949). The effects of environmental and heredity factors on trichostrongylid worm

infestation in sheep. *J Anim Sc* ; 8 : 73-80.
14. Gill H.S., Watson D.L., Brandon M.R. (1993). Monoclonal antibody to CD4+ T cells abrogates genetic resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. *Immunology* ; 78 : 43-49
15. Gray D.G., Gill H.S. (1993). Host genes, parasites and parasitic infections. *Int J Parasitol* ; 23 (4) : 485-494.
16. Gregory P. W. (1937). The possibility of establishing within breed lines of sheep that are genetically resistant to stomach worm. *Am Soc Anim Prod* : 316-324.
17. Gregory P.O., Miller R.F., Stewart,M.A. (1940). An analysis of environmental and genetic factors influencing stomach worm infestations in sheep. *J. Genet* ; 39 : 391-400.
18. Gruner L. (1991). Breeding for helminth resistance in sheep and goats. In : Axford R.F.E., J.B. Owen eds. *Breeding for Diseases Resistance in faem Animals.* CAB International, Wallingford, U.K. : 187-200.
19. Gruner L., Cabaret J., Sauve C., Pailhovies R. (1986). Comparative susceptibility of Romalnov and Lacaune sheep to gastro-intestinal nematodes and small lungworms. *Vet Parasitol* ; 19 : 85-93.
20. Gruner L., Cabaret J, Bouix J., Molenat G. (1987). Comparative susceptibilityof Merinos and Romanov sheep to different helminth parasites. In : proceeding of 12th Conf of the World Assoc for the Adv of Vet Par 12-15 July 1987, Montreal Canada - McGill Univ., Montreal, Canada 57p.
21. ILCA. (1991). Resistance to endoparasites in Small Ruminants - Proceeding of the Research Planning Workshop - Addis Ababa Ethiopia. 5-7 Feb.
22. Jilek A.F., Bradley R.E. (1969). Haemoglobin types and resistance to *Haemonchus contortus. Amer J Vet Res* ; 30 : 1773-1778.
23. Karlsson L.J.E., Macleod I.M., Leelawardana D.H., Sissoev K., Simmons J. (1991). Selection for nematode resistance in sheep in the Australian Mediterranean climate zone. In : Gray G.D., Woolaston R.R. eds. *Breeding for disease resistance in Sheep.* Australian Wool Corporation, Melbourne : 131-1389.
24. Loggins P.E., Swanson L.E., Koger M. (1965). Parasite levels in sheep as affected by heredity. *J Anim Sc* ; 24 : 286-287.
25. Mitchell G.F. (1979). Responses to infection with metazoan and protozoan parasites in mice. *Adv Immunol* ; 28 : 451-511.
26. Outteridge P.M., Windon R.G., Dineen J.K. (1988). An ovine lymphocyte antigen marker for acquired resistance to *Trichostrongylus colubriformis. Int J Parasitol* ; 18 : 853-858.
27. Pfister K. (1991). Genetic resistance to helminth infections in indigenous breeds of livestock. How could this be exploited ? In : *Expert Consultation on Helminth Infections of Livestock in Developing Countries.* FAO, Rome, Italy.
28. Piper L.R., Barger,- I.A. (1988). Resistance to gastro-intestinal strongles : faisibility of a breedring programme. In : Proceedings 3e World Congress Sheep and Beef cattle breeding, INRA, Paris 1 : 593-611.
29. Piper L.R., LeJambre L.F., Southcott W.H., Chang T.S. (1978). Natural worm burden in Dorset Horn, Merino and Corriedale weaners and their crosses. *Aust Soc Anim Prod* ; 12 : 276.
30. Preston J.M., Allonby, E.W. (1978). The influence of breed on the susceptibility of sheep and goats to a single experimental infection with *Haemonchus contortus. Vet Rec* ; 103 : 509-512.
31. Richard S. (1988). Parasitisme helminthique des caprins : susceptibilité comparée des races Alpine et Saanen. Thèse Université de Tours, 104p.
32. Richard S., Cabaret J., Cabourg C. (1990). Genetic and environment factors associated with nematode infection of dairy goats in Northwestern France. *Vet Parasitol* ; 36 : 237-243.
33. Rohrer G.A., Taylor J.F., Davis S.K., Waruiru R.M., Ruvuna F., Mwandotto B.A.J., McGuire T., Rurangirwa, F. (1991). The use of randomly amplified polymorphic DNA markers in analysis of susceptibility to *Haemonchus* and *Coccidia.* Proceedings of the 9th Scientific Workshop of the Small Ruminant Collaborative Research Support Program pp 71-85.

34. Shavulimo R.S., Rurangirwa F., James A.D., Ellis P.R., McGuire T. (1988). Genetic resistance to gastro-intestinal nematodes, with special reference to Haemonchus contortus, in three breeds of goats in Kenya. *Bull Anim Hlth Prod Afr* ; 36 : 233-241.
35. Stewart M.A., Miller R.F, Douglas J.R. (1937). Resistance of sheep of different breeds to infestation by *Ostertagia circumcincta*. *J Agric Res* ; 55 : 923-930.
36. Wakelin D. (1988). Helminth infections. In : Wakelin D., Blackwell J.M eds. *Genetics of resistance to bacterial and parasitic infections.* Taylor & Francis, London : 153-22
37. Warnick B.L., Berry R.P., Turk R.D., Morgan, C.O. (1949). Selection of sheep and goats for resistance to stomach worms, Haemonchus contortus. *J Anim Sc* ; 8 : 609-610.
38. Watson T.G., Hoskin, B.C. (1992). Developments in breeding Perendale sheep with resistance or susceptibility to internal parasites following artificial infection. *New Zeal Soc Anim Prod* ; 52 : in press.
39. Watson T.G., Baker L.R., Harvey, T.G. (1986). Genetic variation in resistance or tolerance to internal parasites in strains of sheep at Rotomahana. *New Zeal Soc Anim Prod* ; 46 : 23-26.
40. Whitlock J.H. (1955). A study of the inherence of resistance to trichostrongylodosis in sheep. *Corn Vet* ; 45 : 422-439.
41. Whitlock J.H. (1958). The inherence of resistance to trichostrongylodosis in sheep. I. Demonstration of the validity of the phenemenon. *Corn Vet* ; 48 : 127-133.
42. Windon R.G. (1991). Resistance mechanisms in the *Trichostrongylus* selection flock. In : G.D. Gray, R.R. Woolaston eds. *Breedings for Disease Resistance.* Australian Wool Corporation, Melbourne : 77-86.
43. Windon R.G., Dineen J.K. (1984). Parasitological and immunological competence of lambs selected for high and low responsiveness to vaccination with irradiated *Trichostrongulus colubriformis* larvae. In : Dineen J.K., Outteridge P.M. eds. *Immunogenetic Approaches to the Control of Endoparasites*, CSIRO, Melbourne : 11-18.
44. Woolaston R.R., Barger I.A., Piper L.R. (1990). Response to helminth infection of sheep selected for resistance to *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* ; 20 : 1015-1018.
45. Zajac A.M., Herd R.P., McClure K.E. (1988). Trichostrongylid parasite populations in pregnant or lactating and unmated Florida native and Dorset Rambouillet ewes. *Int J Parasitol* ; 18 : 981-985.

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 305-311.

30

Résistance génétique à la cowdriose

L. PEPIN***, J.C MAILLARD*, G. RUFF***, D. VAIMAN**, S. KEMP****,
E. CAMUS*, A. BENSAID*

* *EMVT-CIRAD, Maisons-Alfort, France;*
Mission Antilles Guyane, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe.
** *INRA, Laboratoire de GénétiqueBiochimique, Jouy en Josas, France.*
*** *Université de Berne, Ecole Vétérinaire, Berne, Suisse.*
**** *ILRAD, Nairobi, Kénya.*

Les méthodes d'étude du génome

Depuis ces dix dernières années la génétique moléculaire des mammifères a connu un essor considérable. Les techniques d'exploration des génomes se sont améliorées et de nouvelles techniques, telles que l'amplification en chaîne de la polymérase (APC), sont venues compléter la palette des outils de la biologie moléculaire. Néanmoins toutes ces nouvelles connaissances n'ont pas bouleversé les règles fondamentales de la génétique mendélienne. C'est en effet sur le principe de base de la ségrégation des caractères, défini par Mendel, que la plupart des recherches en génétique se poursuivent. Ce qui a profondement changé c'est la vitesse à laquelle la molécule d'ADN, support de l'hérédité, est décriptée. Si, pour des raisons pratiques évidentes, le modèle souris est privilégié, il n'en demeure pas moins qu'un effort considérable au niveau international a été fourni pour élucider la cartographie du génome humain. Avec des moyens plus modestes, la carte génétique des ruminants d'intérêt économique a été entreprise. En raison de la valeur économique et sociale du bovin, la cartographie du génome bovin a été privilégiée, néan-

moins, des projets sur le génome des ovins et des caprins sont aussi en cours. Du fait que les petits ruminants sont phylogénétiquement proches du bovin, la stratégie d'étude sur les petits ruminants, et en particulier les caprins, est d'utiliser les outils et réactifs obtenus sur le bovin. Cette approche permet d'établir de manière synchrone une cartographie comparée du génome des ruminants, laquelle est comparée aux cartes génétiques humaines et murines. D'ici l'an 2000, les cartes génétiques seront complétées à un point tel qu'il sera possible d'établir un arbre généalogique de l'évolution des mammifères, basé sur la molécule d'ADN.

La ségrégation des gènes et la notion de marqueur

La fonction de beaucoup de gènes connus à ce jour reste encore élusive et les interactions entre gènes, qui conditionnent les grandes fonctions physiologiques d'un organisme, sont loin d'être élucidées. Ainsi, il est encore impossible d'assigner certains caractères donnés (poids, production laitière, résistance ou sensibilité à une maladie...) à l'action d'un ou plusieurs gènes. Si la différence de certains caractères entre animaux d'une même espèce peuvent être attribués à la différence de séquences entre gènes homologues, la plupart des caractères sont le résultat d'une cascade de régulations géniques, faisant intervenir à la fois des régions codantes et non-codantes. De plus les gènes et les séquences régulatrices de ces gènes, conditionnant un catactère donné, ne sont pas portés par un même chromosome. Il parait donc indispensable, lors d'études génétiques sur des caractères dont le nombre de gènes impliqués est inconnu, d'établir l'héritabilité des caractères. La constitution de familles informatives est un point crucial quant à l'étude de l'héritabilité des caractères, et du choix des géniteurs dépendra le résultat final. Il est maintenant bien admis qu'il y a tout interêt à constituer des couples dont le mâle et la femelle sont extrêmes vis-à-vis du caractère étudié. Cette approche ne se fait pas sans problèmes, lorsque le caractère étudié est la résistance à une maladie mortelle. En effet, à moins que les expérimentateurs aient recours à des méthodes d'insémination artificielle, ou à des partages d'embryons, les géniteurs portant réellement le caractère de sensibilité à la maladie ne peuvent être identifiés qu'après l'épreuve. Le deuxième problème, et qui concerne plus particulièrement les ruminants, est lié au faible nombre d'animaux obtenus lors d'une portée. Ainsi, il est souvent nécessaire de réaliser deux accouplements successifs, en utilisant les mêmes couples mâle et femelle, afin d'obtenir un nombre suffisant de F1. La détermination du nombre de F1 est directement influencée par le degré d'hétérozygotie des géniteurs et par le nombre de chromosomes que possède l'espèce étudiée. Les ruminants comptent une trentaine de paires autosomiques de chromosomes. Il en résulte que toute étude doit se faire sur un nombre élevé de F1, de manière à suivre la ségrégation de chacun des chromosomes appartenant aux géniteurs. Comme conséquence, la détermination de la formule génétique de chaque individu entrant dans le plan d'expérimentation est cruciale. Pour être suivi, chaque chromosome doit être identifié par des marqueurs.

Un marqueur génétique est une zone chromosomique bien déterminée variant d'un animal à un autre; par ailleurs un marqueur génétique peut être le produit d'un gène à condition qu'il varie d'un animal à un autre. Donc les deux critères principaux définissant un bon marqueur sont sa capacité à ségréger de façon mendélienne et son polymorphisme. Avec 200 marqueurs polymorphiques équidistants, une carte génétique à 20cM pourrait être réalisée chez les ruminants. A l'heure actelle, plus de 250 marqueurs sont connus chez

les ruminants et, grâce aux techniques décrites dans les paragraphes suivants, une première carte génétique entière du bovin est sur le point d'être réalisée.

Les outils sérologiques classiques

Très utilisés à l'époque où les chercheurs n'avaient pas directement accès à la molécule d'ADN, les outils sérologiques sont encore très utilisés de nos jours. Ainsi, le typage des groupes sanguins chez les ruminants est un excellent indicateur du degré d'hétérozygotie, car ils sont contrôlés par de multiples loci et sont très polymorphes. Le typage des molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité s'effectue toujours grâce à la méthode de microcytotoxicité et 55 allèles distribués entre les loci A et B ont été identifiés. La sérologie pour le typage des antigènes de classe II est beaucoups plus ardue, à cause du manque de réactifs monospécifiques, mais cette méthode tend à être substituée par l'ACP. Comparées aux groupes sanguins et au complexe majeur d'histocompatibilité, les protéines sériques, telles que l'albumine ou la transférine, ont un polymorphisme plus modeste chez le bovin et il est très réduit chez la chèvre. Avec les nouvelles techniques de biologie moléculaire, les méthodes sérologiques sont de plus en plus délaissées.

Les outils issus de la génétique moléculaire

L'hybridation in situ *de chromosomes*

Parce que la plupart des gènes de mammifères montrent une grande homologie de séquence entre eux, il a été possible de cloner beaucoup de gènes de ruminants, en utilisant comme sonde les gènes homologues appartenant à des espèces différentes. Pour la cartographie des ruminants, ces gènes clonés ont été utilisés comme sonde dans des expériences d'hybridation *in situ* sur des chromosomes. Ceci a permis de localiser, sur les trente chromosomes que compte l'espèce bovine, plus de 100 gènes. L'identification des chromosomes bovins n'est pas facile car la prupart d'entre eux ont la même taille et sont acrocentriques. Des techniques de coloration sont nécessaires pour pouvoir les distinguer.

Actuellement, les gènes à assigner sur un chromosome sont marqués par un fluorochrome et la révélation de l'hybridation se fait sous microscope à fluorescence.

Les hybrides somatiques

Quand des cellules tumorales de hamster sont fusionnées avec des lymphocytes de bovins, il se forme un hybride. Le matériel génétique bovin est par la suite préférentiellement expulsé. Qand les hybrides se stabilisent après quelques divisions, un grand nombre d'hybrides possèdent un ou un nombre limité de chromosomes bovins distribués de manière aléatoire. Après clonage, une collection d'hybrides est obtenue, représentative du génome bovin. De l'ADN est purifié de chaque hybride ainsi que de la lignée tumorale parentale. Après digestion enzymatique de l'ADN, migration sur gel d'agarose et transfert sur membrane, un gène marqué est hybridé. Les hybrides révélés positifs sont identifiés puis un deuxième gène marqué est hybridé. Si des signaux positifs avec les deux gènes testés sont obtenus sur les mêmes clones, on considère que les gènes en question sont en synthénie, et avec une probabilité non négligeable d'être portés sur le même chromosome. Ainsi, 27 groupes de synthénie ont été réalisés et nommés de U1 à U27. L'alternative à l'hybrida-

tion est de disposer d'amorces nucléotidiques synthétiques flanquant la totalité ou une partie de la région génétique à cartographier, et d'effectuer sur les ADN des hybrides une ACP. Les produits d'amplification sont repérés après électrophorèse. La seule restriction à cette technique, beaucoup plus rapide que l'hybridation par sonde, est que les amorces utilisées ne doivent pas hybrider avec l'ADN de hamster. Grâce à cette méthode, de très nombreux marqueurs ont été assignés à un groupe de synthénie. Néanmoins, cette technique ne détermine pas l'ordre des marqueurs par rapport au chromosome; seule la technique d'hybridation *in situ* permet de répondre à cette question.

Les microsatellites

Les microsatellites sont des séquences simples répétées de di ou tri nucléotides, réparties de manière uniforme le long du génome. Leur nombre est estimé à plus de 10 000 et leur caractéristique principale est d'être variables d'un individu à l'autre. Flanqués de séquences uniques dans le génome, ces microsatellites sont d'excellents marqueurs génétiques. La détection de macrosatellites s'effectue en criblant une librairie génomique à l'aide d'oligonucléotides sunthétiques, $(GT)_{12\text{-}18}$. En moyenne, les fragments génomiques insérés dans un plasmide ont une taille de 500 à 1000 pb, ce qui permet de séquencer les clones positifs et de repérer les séquences qui flanquent les microsatellites. A partir de ces séquences, des amorces sont synthétisées puis utilisées sur de l'ADN des individus à typer à l'aide de l'ACP. Le degré de polymorphisme des produits amplifiés est évalué par gel d'agarose, ou en gel de polyacrylamide dénaturant, si la résolution est souhaitée à la base près. Par le degré de polymorphisme détecté, ce type de marqueurs est désormais très employé en génétique des ruminants. Plus de 250 microsatellites ont été caractérisés chez le bovin et nombre d'entre eux assignés, soit à un groupe de synthénie, soit à une position donnée sur un chromosome. A l'heure actuelle, ces microsatellites constituent l'outil privilégié pour la cartographie des génomes et la détection de polymorphismes. L'utilisation d'amorces dérivées des séquences bovines sur de l'ADN de chèvre a permis de déterminer si les outils développés dans une espèce de ruminants pouvaient être appliqués sur une autre. Sur soixante microsatellites bovins, 24 se sont révélés pleinement exploitables sur le système caprin. En effet, ces microsatellites sont polymorphiques (3 allèles et plus) sur plusieurs races caprines et ségrègent de manière mendélienne. Les séquences caprines se trouvant entre les amorces et les microsatellites ont été déterminées et comparées avec des séquences bovines équivalentes. A part quelques substitutions ponctuelles de nucléotides, ces séquences sont identiques entre le caprin et le bovin. Ces résultats suggèrent que la position de ces microsatellites est conservée entre bovins et caprins et que, par conséquent, 40% des microsatellites identifiés à l'origine chez le bovin pourront servir de marqueurs chez le caprin.

En conclusion, l'étude fondamentale du génome des ruminants est une aire de recherche très active et en constant progrès. Si la plupart des efforts sont dirigés pour l'étude du génome bovin, une grande partie des marqueurs bovins sont directement exploitables sur d'autres ruminants. L'avantage certain de travailler sur les petits ruminants est essentiellement lié à la possibilité d'obtenir de 2 à 3 générations tous les 2 ans. Cette propriété des petits ruminants facilite les études d'héritabilité des caractères.

La cowdriose

La pathologie

Cowdria ruminantium est une bactérie transmise par des tiques en particulier du genre *Amblyoma variegatum*. Cette bactérie est l'agent causal de la cowdriose, maladie mortelle des ruminants sensibles. *C. ruminantium* est un organisme intracellulaire obligé ayant un tropisme très marqué pour les neutrophiles et pour les cellules endothéliales de capillaires cérébraux. Il est à noter qu'*in vivo* la bactérie ne se développe pas dans les neutrophiles. Cette maladie existe dans presque toute l'Afrique subsaharienne, Madagascar et la Guadeloupe, où elle a été importée avec le bétail des esclaves africains.

Après piqûre de la tique, les premiers symptômes apparaissent en l'espace de 2 à 3 semaines. Ces symptômes sont d'abord de la fièvre (40 à 42°C), pouvant persister jusqu'à une semaine, puis des torticolis suivis de mouvements désordonnés. Le stade final se traduit par des pédalages de l'animal qui a de très fortes difficultés à respirer. L'autopsie révèle un hydropéricarde et un hydrothorax. Très souvent, des splénomégalies, ainsi que des infiltrations au niveau du cerveau, sont constatées. Cette symptomatologie ne va pas sans rappeler des processus inflammatoires, en particulier en ce qui concerne le passage des fluides au travers de l'endothélium.

Des études récentes menées *in vitro* sur des cellules endothéliales de capillaires cérébraux, ainsi que sur des cellules endothéliales jugulaires ont montré que, suite à une infection par *Cowdria* des interleukines 1,6 et 8 sont induites. Ces interleukines sont bien connues pour induire des inflammations et ont été impliquées lors de phénomènes immunopathologiques liés à des infections bactériennes. Néanmoins, une cowdriose ne s'accompagne pas d'une bactériémie importante au niveau du sang circulant et la plupart des souches ne donnent que des infections discrètes au niveau de l'endothélium cérébral. Ainsi, il semble bien que la pathologie de cette maladie soit due à un dérèglement de la physiologie de l'animal qui n'irait qu'en s'amplifiant plutôt qu'à la prolifération et au dommage provoqué par la bactérie elle-même.

Résistance à la cowdriose

Observations de terrain

L'existence de maladies a été bien souvent constatée en introduisant des populations d'animaux exotiques dans des zones d'élevage traditionnelles où une population autochtone de ruminants ne montre pas de signes pathologiques apparents. Ainsi la cowdriose est le plus souvent mortelle pour des ruminants n'ayant jamais été en contact avec la bactérie. Par contre, là où la cowdriose sévit de manière endémique, certaines populations de ruminants ne sont pas atteintes par cette maladie. Ce phénomène semble plus lié au caractère de certains troupeaux plutôt qu'à la race. Cette apparente résistance à la cowdriose semble être le fruit d'une longue sélection. La possibilité d'un transfert d'immunité passive par la mère a été exclue, ainsi que les phénomènes de prémunité chez le très jeune animal.

En Guadeloupe, la cowdriose n'a été diagnostiquée qu'en 1980 bien que cette maladie ait été introduite au dix-huitième siècle. Comme en Afrique, ce sont les races européennes ou croisées qui sont indicatrices de la présence de la maladie. Par contre la race bovine

créole est parfaitement résistante à la cowdriose. Cette race, bien adaptée à son environnement, est le résultat de croisements entre taurins et zébus importés d'Afrique de l'ouest. La chèvre créole est par contre moins résistante à la cowdriose car dans les zones endémiques il a été estimé que 10% des pertes sont dues à la cowdriose.

Les premières données expérimentales

Basée sur l'hypothèse qu'une pression sélective forte devrait conduire à l'émergence d'animaux résistants à la cowdriose, une première expérience a été entreprise en Guadeloupe. Trois populations de chèvres ont été sélectionnées en fonction de la présence ou l'absence de la tique *Amblyoma*. Les chèvres, en provenance de la ferme de Gardel, zone endémique où sévit la cowdriose, ont servi à constituer un troupeau à la ferme de Duclos. Cette population de Duclos a évolué pendant 20 ans dans un environnement sans tique. La troisième population est issue de l'île des Saintes où la tique *Amblyoma* n'a jamais été introduite. Les chèvres des Saintes sont de race créole et ont été introduites sur cette île il y a 200 ans. Les effectifs étaient de 85, 90 et 36 chèvres pour les populations des Saintes, Duclos et Gardel respectivement. Après épreuve, les taux de mortalité enregistrés étaient de 25% pour la population Gardel, 55% pour la population Duclos et 75% pour la population des Saintes. Les filiations ayant été enregistrées pour les populations de Gardel et de Duclos, un "effet père" associé à la survie après épreuve a été contaté (Matheron *et al.*, 1987). Ces expériences suggéraient qu'une partie de la population de chèvres créoles est résistante à la cowdriose et que l'héritabilité de ce caractère dépendait en partie du père.

Nouvelles données expérimentales

A la lumière des résultats précédents, une étude plus approfondie sur l'héritabilité et la dilution du caractère de résistance à la cowdriose s'imposait. Mâles et femelles résistants des manipulations précédentes ont été sélectionnés de manière à créer des familles. Egalement des chèvres supposées sensibles à la cowdriose ont été importées des Saintes. Ainsi 4 familles ont été constituées suivant le Tableau I.

Tableau I. Constitution de 4 familles de chèvres supposées sensibles à la cowdriose.

Mâle	R1	R2	S1	S2
Femelle	8R	10S	13R	10S
F1	4/9	4/6	4/18	9/15
Mortalité	55%	71%	22%	53%

Après épreuve par tiques infectées, les animaux F1 issus de pères "sensibles" se montrent plus résistants que les F1 issus de pères résistants. Bien que surprenants ces résultats ne sont pas encore conclusifs. En effet, une nouvelle portée obtenue en gardant la même structure de familles devrait être mise à l'épreuve dans le futur, ainsi que les progéniteurs "sensibles". Ainsi, les effectifs des F1 seront supérieurs à 100, et donc suffisants pour faire une étude d'héritabilité. Sur tous ces animaux, des typages de groupes sanguins et du complexe majeur d'histocompatibilité ont été effectués. De plus de l'ADN a été purifié

sur tous ces animaux et les microsatellites exploitables sur chèvre sont en cours d'utilisation. Le but ultime de ces analyses génétiques est de trouver un ou plusieurs marqueurs qui corrèlent avec le caractère de résistance ou de suceptibilité à la cowdriose.

Discussion et conclusion

Si les observations faites sur les population de ruminants dans leur environnement naturel indiquent qu'il y a une résistance à la cowdriose, les dernières données expérimentales, essayant d'étudier l'héritabilité de ce caractère, se sont montrées décevantes. Néanmoins, ces résultats ne sont encore que parcellaires et incomplets. En effet le nombre de F1 testé n'est pas encore suffisant pour conclure et, d'autre part, un animal sensible n'est reconnu tel qu'après épreuve. Il faut aussi souligner que la terminologie "sensible" ou "résistant" désigne des animaux qui survivent ou meurent.. La grande majorité des animaux qui survivent à la maladie subissent un accès fébrile et présentent des symptômes presque aussi importants que les animaux qui meurent. Par contre, chez le bovin, le caractère de résistance est souvent plus tranché dans la mesure où les symptômes sont presque inexistants. Il en découle que l'espèce caprine n'est peut-être pas le bon modèle expérimental pour étudier la résistance génétique à la cowdriose. A l'heure actuelle, les études sur bovin sont rendues très difficiles à cause de la lourde charge économique qu'ils font peser sur les laboratoires de recherche et du temps de génération qui est long. La deuxième critique concerne le mode d'épreuve. Bien que se rapprochant de la réalité, l'épreuve par tique ne permet pas de certifier que chaque animal a reçu la même dose de *Cowdria*. De plus, le nombre de tiques gorgées récoltées arès la dépose varie fortement d'un animal à un autre (2 à 18 tiques gorgées pour une dépose de 20 tiques) ce qui indique que chaque animal a reçu une dose infectante différente. Néanmoins, le fait que des animaux, sur lesquels seulement 2 tiques gorgées aient été retrouvées, soient morts de cowdriose, indique que la grande majorité des tiques étaient infectantes et donc, que les chèvres ont subi une épreuve sévère. Une épreuve par injection par voie intraveineuse de *Cowdria* cultivées *in vitro* permettrait d'administrer la même dose à chaque animal.

Bibliographie

Les ouvrages de synthèse cités après englobent toutes les données techniques et expérimentales évoquées dans cet exposé

1. Camus E. (1989). Etude épidémiologique de la cowdriose à *Cowdria ruminantium* en Guadeloupe. Etudes et synthèses de l'IEMVT, EMVT-CIRAD ed, Maisons-Alfort, France.
2. Fries A., Eggen A., Womack J.E. (1993). The bovine genome map. *Mammalian Genome* ; 4 : 405-428.
3. Scook L.B., Lewin H.A., McLaren D.G. (1991). gene mapping : techniques and applications. New-York : Marcel Dekker, Inc.

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.
Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 313-318.

31

L'utilisation du test de détection des antigènes trypanosomiens pour l'amélioration génétique du bétail trypanotolérant

G. d'IETEREN

Centre International pour l'Elevage en Afrique, Nairobi, Kenya.

La caractérisation du bétail trypanotolérant débute à la fin des années 1970, lorsque le CIPEA, l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) et le Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE), travaillèrent avec des chercheurs de 18 pays d'Afrique occidentale et centrale pour évaluer les relations existantes entre le risque trypanosomien et les performances animales [1]. En utilisant toutes les informations récoltées dans le passé, par plusieurs projets basés dans ces pays, des relations nettes entre le niveau de risque et les performance animales ont été mises en évidence.

Au cours des années 1980, la plupart des travaux ont porté sur la race N'Dama qui était considérée alors comme la race trypanotolérante la plus importante. Dans plusieurs pays d'Afrique occidentale et centrale, beaucoups d'études furent réalisées au sein du Réseau Africain sur le Bétail Trypanotolérant par des chercheurs nationaux. Ces travaux ont confirmé que la possibilité de contrôler à la fois le niveau de parasitémie et le développement de l'anémie étaient des indicateurs-clés du caractère trypanotolérant, et que ces phénomènes, bien que sous contrôle génétique, n'étaient pas nécessairement liés génétiquement l'un à l'autre [8].

Lors d'études sur le terrain, le degré d'anémie peut être facilement quantifié en mesurant l'hématocrite. Ceci a permis de progresser en établissant la relation existant entre le

contrôle du développement de l'anémie et la productivité animales [13], en mettant au point un test de terrain permettant d'évaluer l'aptitude qu'ont les jeunes mâles N'Dama de lutter contre l'anémie et de se baser sur les résultats de ce test pour choisir les animaux de remplacement [12], et en étudiant les possibilités d'une sélection génétique de la trypanotolérance basée sur la mesure de l'hématocrite [14].

Par contre, le niveau de parasitémie n'était pas si facile à évaluer car il dépendait de la mise en évidence des trypanosomes dans le sang périphérique, par des techniques d'examens parasitologiques. L'approche la plus précise sur le terrain a été la détection de trypanosomes dans le sang par la méthode du "buffy coat" [7] sur fond noir et la mesure de l'intensité de l'infection comme indicateur du niveau de parasitémie [11].

A la fin des années 80, il semble donc possible d'élaborer des programmes d'amélioration basés sur le contrôle de l'anémie par mesure de l'hématocrite au cours d'une infection, mais non par la mesure de la parasitémie à l'aide de la technique du "buffy coat" [5].

Le test de détection des antigènes pour la mesure plus précise des infections trypanosomiennes

En 1990, débutèrent des travaux de terrain utilisant un nouveau test immunologique (test ELISA), mis au point par Nantulya [10] pour la détection d'antigènes dans le cas d'infections à *Trypanosoma vivax, T. congolense* et *T. brucei.* Le test est basé sur la reconnaissance par des anticorps monoclonaux d'antigènes spécifiques aux trois espèces de trypanosomes. Le test ELISA s'est avéré être plus sensible que la technique du "buffy coat" pour la détection des infections dues à *T. congolense* chez les bovins [6]. En effet, cette technique ne met en évidence que les trypanosomes présents dans le sang périphérique. Leur nombre, à ce niveau, est parfois trop faible pour qu'ils puissent être detectés, bien qu'ils soient présents dans d'autres organes, tels que la rate, le foie et les nodules lymphatiques. Le test ELISA, par contre, permet de mettre en évidence les antigènes circulants libérés par les trypanosomes lysés où qu'ils soient. La sensibilité de ce test ne semble donc pas dépendre du nombre de parasites présents dans la circulation périphérique. Ce test est donc très sensible car la présence de trypanosomoses peut être détectée alors que la parasitémie ne pourrait l'être.

Une expérience préliminaire à été réalisée par le CIPEA en collaboration avec l'Office Gabonais de Promotion de la Viande (OGAPROV) [15]. Elle a porté sur 106 jeunes N'Dama exposés à un risque naturel de trypanosomose pendant 92 jours. Pendant cette période, 6 tests de détection des antigènes trypanosomiens ont pu être réalisés en moyenne (Tableau I).

Des antigènes trypanosmiens ont été détectés chez 90% des animaux détectés positifs parasitologiquement par la technique de concentration par le buffy coat. Plus important encore, des antigènes trypanosomiens ont été détectés chez 40% des animaux négatifs à l'examen parasitologique. La proportion d'animaux avec infection mixte (*T. congolense* et *T. vivax*), lors de 6 examens d'antigènes, a été de 27%, donc plus haute que les 17% d'infections mixtes détectées par l'examen microscopique. De plus si l'on observe les échantillons de sang individuellement, on trouve 13% d'infections mixtes alors qu'à l'examen microscopique ces infections mixtes sont rarement détectées. Il est donc possible que cette différence s'explique par la sensibilité différente des deux tests.

Tableau I. Parasitémie et antigènémie.

Parasitémie	Antigénémie	Animaux	
		Nombre	%
Positif	Positif	38	90
Positif	Négatif	4	10
		42	
Négatif	Positif	43	40
Négatif	Négatif	63	60
		106	

Dans un autre travail réalisé par le CIPEA en collaboration avec l'Office Gabonais de Promotion de la Viande (OGAPROV) [16], il a été possible d'évaluer les relations entre les infections trypanosomiennes mesurées par la détection des antigènes trypanosomiens, l'anémie mesurée par l'hématocrite et les performances animales mesurées par le gain quotidien moyen durant l'expérience. Dans cette expérience, 99 bovins N'Dama on été exposés naturellement à la trypanosomiase, à un risque naturel de trypanosomose à l'âge de 11,5 mois et pour une durée de 13 semaines. Les paramètres ont été mesurés régulièrement à quatorze reprises pendant cette période [16].

Dans cette dernière expérience, approximativement la moitié des animaux ont été positifs au test de détections des antigène,s lors de 5 des examens réalisés : 38% avec *Trypanosoma congolense*, 13% avec *T. vivax* et 49% avec une infection mixte. 14% des infections détectées l'étaient avec les deux espèces de trypanosomes, 9 infections mixtes.

Effets des infections à *T. congolense* sur la croissance

Une infection à *T. congolense* avait un effet significatif négatif sur la croissance alors qu'une infection à *T. vivax* n'en avait pas.

Le calcul d'une régression, chez les animaux avec infections mixtes, du gain quotidien moyen sur le nombre d'infection à *T. vivax* dans les infections mixtes a donné les valeurs suivantes : 1,0 ± 3,3 gr./ jour, alors que la même régression du gain sur les infections à *T. congolense* était de -6,2 ± 2,9 gr./jour dans les mêmes infections mixtes. Lorsque l'effet de l'espèce de trypanosome n'était pas inclue dans le modèle, la regression du gain quotidien moyen sur le nombre total d'infection détectée donnait la valeur suivante: -3,6 ± 2,1 gr./jour. Ceci démontre l'importance de l'identification de l'espèce de trypanosome infestant dans toute étude rigoureuse.

D'autres éléments déjà publiés ont été confirmés par cette expérience. Les animaux infectés le plus souvent par des *T.congolense* avaient des valeurs moyennes d'hématocrite inférieures à celles des animaux infectés le moins souvent. Les animaux capables de maintenir leur hématocrite stable, même si ils étaient détectés antigènémiques à de nombreuses occasions, grandissaient de la même façon que ceux détectés négatifs, alors que les animaux maintenant des valeurs basses pour le même nombre d'infections, avaient des performance de croissance sensiblement réduites.

Contrôle génétique du développement parasitaire

Dans la première expérience rapportée ci-dessus, il a été possible de déterminer le père de la plupart des animaux grâce à la détermination des groupes sanguins des parents et de leur progéniture. Ainsi, 79 animaux ont pu être attribués individuellement à l'un des 21 pères possibles [15].

Lorsque les animaux détectés positifs pour les antigènes, mais négatifs pour les parasites circulants sont considérés comme les plus capables de contrôler le développement des trypanosomes, et par là les plus trypanotolérants pour le critère parasitémie, un "effet taureau" significatif a été mis en évidence. Cette observation laisse à penser que cette capacité de maitriser le développement du parasite est sous contrôle génétique, et qu'il serait donc possible de l'améliorer par la sélection (Tableau II).

Tableau II. Estimation de l'héritabilité du gain quotidien moyen et des critères de trypanotolérance mesurés par la parasitémie et par l'antigènémie combinées.*

	$h^2 \pm$ S.E.
Gain quotidien moyen	0.33 ± 0.47
Hématocrite le plus bas	0.45 ± 0.48
Hématocrite moyen	0 57 ± 0.49
Contrôle de s parasites	1.08 ± 0.50

* : 79 progénitures de 21 taureaux

Il est donc clair que la détection des antigènes trypanosomiens par la technique ELISA offre une possibilité concrète et pratique de sélectionner sur la trypanotolérance en se basant sur le critère "infection trypanosomienne".

Conclusion

Les résultats de ces récents travaux [5,19] indiquent que nous aurons bientôt la possibilité d'augmenter fortement l'efficacité de la sélection du bétail trypanotolérant N'Dama en se basant sur la détection des parasites ou de leurs produits. En effet, le test ELISA de détection des antigènes trypanosomiens peut y contribuer par trois voies :
- l'identification précise de l'espèce des trypanosomes infestants particulièrement dans les infections mixtes, clarifie les liens entre infections, anémie et performance;
- la détection des animaux antigènémiques mais non parasitémiques pourrait bien permettre l'identification des animaux les plus trypanotolérants;
- la détection plus précise de la proportion de temps qu'un animal est réellement infecté permet une évaluation plus précise de sa capacité de maltriser l'anémie [5].

Pour permettre de relier entre eux les différents paramètres mentionnés, des efforts sont déployés pour rassembler un grand nombre d'animaux sevrés de race N'Dama dans un site à risque trypanosomien au Zaire. Nous avons à notre disposition un grand nombre de

groupes "semi-apprentés" pour réaliser le test ELISA, en plus des méthodes courantes de mesure de l'hématocrite et du "buffy coat" [20,21].

L'approche du CIPEA pour améliorer la résistance à la maladie continuera de reposer sur la génétique quantitative en incluant les résultats obtenus en biologie moléculaire (p.e. la cartographie du génome pour identifier des marqueurs génétiques de résistance....). Ces informations seront d'une valeur pratique directe utilisable pour la mise en place de programmes de sélection [3].

De cette façon, les travaux doivent pouvoir estimer de façon précise l'expression génétique des différents aspects de la trypanotolérance en vue de concevoir et d'évaluer des programmes de sélection pour la race N'Dama [5].

Un travail à grande échelle a débuté. La sélection de bovins N'Dama ayant des performances supérieures a démarré dans des régions où le risque trypanosomien varie de moyen à élevé. De plus un système informatique de gestion et d'analyse standardisés des données est à l'étude pour la sélection en ferme des bovins trypanotolérants [19,22,23].

D'autre part, dès que les premiers marqueurs d'ADN spécifiques à la race et à la résistance à la trypanosomose seront produits, leur utilité sera évaluée selon les même critères que ceux utilisés pour estimer le contrôle de l'anémie et la parasitémie. La possibilité de collaboration entre le CIPEA et les Services Nationaux de Recherches Agronomiques permet la mise en place, pour un long terme, de banques de données contenant des informations clairement analysées sur les relations productivité/trypanotolérance ainsi que, pour chaque animal, du matériel gènétique (DNA) et des informations sur son état de santé et ses performances [5].

Cela permettra d'évaluer l'impact des recherches des laboratoires travaillant sur l'identification de marqueurs associés à la trypanotolérance du bétail N'Dama.

Références

1. ILCA/FAO/UNEP. (1979). Trypanotolerant livestock in West and Central Africa. Monograph No. 2, International Livestock Centre for Africa, Addis Ababa, Ethiopia.
2. d'Ieteren G.D.M., Trail J.C.M. (1992). ILCA's involvement in trypanosomiasis and trypanotolerance research. FAO *Anim Product Health Pap* ; 94 : 117-121.
3. d'Ieteren G., Trail J.C.M. (1992). Genetic improvement of trypanotolerant cattle : ILCA's current and future plans. Trypanotolerant Livestock, FAO *Newsletter* ; 6 : 7-10.
4. d'Ieteren G.D.M.(1993). Trypanotolerant livestock, a sustainable option for increasing livestock production in tsetse affected areas. In : Procedings of Workshop on Towards Increased Utilisation and Adoption of Trypanotolerance. Current Status of Research and Future Directions, ILRAD/ILCA, Nairobi, Kenya.
5. d'Ieteren G.D.M., Trall J.C.M. (1993). Field research on measurement and use of trypanotolerance criteria to enhance livestock productivity. 1. ILCA's achievements and future plans. In : Procedings of Workshop on Towards IM reased Utilisation and Adoption of Trypanotolerance. Current Status of Research and Future Directions, ILRAD/ILCA, Nairobi, Kenya.
6. Masake R. A., Nantulya V.M. (1991). Sensitivity of an antigen detection enzyme immunoassays for diagnosis of *Trypanosoma congolense* infections in goats and cattle. *J Parasitol* ; 77.
7. Murray C., Murray M., Murray P.K., Morrison W.I., Pyne C., McIntyre W.I.M. (1977). Diagnosis of African trypanosomiasis in cattle. Improved sitological and seroerological techniques. In : International Scientific Council for Trypanosomiasis Research and Control 15th Meet. The Gambia, OAU/STRC ; 110 : 247-254.
8 Murray M., Trail J.C.M., d'Ieteren G.D.M. (1990). Trypanotolerance in cattle and prospects for

the control of trypanosomiasis by selective breeding. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* ; 9(2) : 369-386.

9. Nantulya V.M. (1990). Trypanosomiasis in domestic animals : the problems of diagnosis. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* ; 9(2) : 357-367.
10. Nantulya V.M., Lindqvist K.J. (1989). Antigen-detection enzyme immunoassay for the diagnosis of *Trypanosoma vivax, T. congolense* and *T. brucei* infections in cattle. *Trop Med Parasitol* ; 40 : 267-272.
11. Paris J., Murray M., McOdimba F. (1982). An evaluation of the sensitivity of current parasitological techniques for the diagnosis of bovine African trypanosomiasis. *Acta Trop* ; 39 : 307-316.
12. Trail J.C.M., d'Ieteren G.D.M., Colardelle C., Maille J.C., Ordner G., Sauveroche B., Yangari, G. (1991). Evaluation of a field test for trypanotolerance in young N'Dama cattle. *Acta Trop* ; 48 : 47-57.
13. Trail J.C.M., d'Ieteren G.D.M., Feron A., Kakiese O., Mulungo M., Pelo M. (1991). Effect of trypanosome infection, control of parasitaemia and control of anaemia development on productivity of N'Dama cattle. *Acta Trop* ; 48 : 37-45.
14. Trail J.C.M., d'Ieteren G.D.M., Maille J.C., Yangari G. (1991). Genetic aspects of control of anaemia development in trypanotolerant N'Dama cattle. *Acta Trop* ; 48 : 285-291.
15. Trail J.C.M., d'Ieteren G.D.M., Maille J.C., Yangari G., Nantulya V.M. (1992). Use of antigen-detection enzyme immunoassays in assessment of trypanotolerance in N'Dama cattle. *Acta Trop* ; 50 : 11-18.
16. Trail J.C.M., d'Ieteren G.D.M., Viviani P., Yangari G., Nantulya V.M. (1992). Relationships between trypanosome infection measured by antigendetection enzyme immunoassys, anaemia and growth in trypanotolerant N'Dama cattle. *Vet Parasitol* ; 42 : 213-223.
17. Trail J.C.M., d'Ieteren G.D.M., Murray M., Ordner G., Yangari G., Maille J.C., Viviani P., Colardelle C., Sauveroche, B. (1993). Measurement of trypanotolerance criteria and their effect on reproductive performance of N'Dama cattle. *Vet Parasitol* ; 45 : 241-255.
18. Trail J.C.M., d'Ieteren G.D.M. (1992). Phenotypic and genetic parameter estimates of factors related to the performance of trypanotolerant livestock. FAO Animal Production and Health paper ; 94 : 6-19.
19. Trail J.C.M., Wissocq N., d'Ieteren G.D.M.(1993). Field research on measurement and use of trypanotolerance criteria to enhance trypanotolerant livestock productlvlty. 2. Recent results quantifying trypanotolerance Indicators. In : Procedings of Workshop on Towards Increased Utilisation and Adoption of Trypanotolerance. Current Status of Research and Future Directions, ILRAD/ILCA, Nairobi, Kenya.
20. Trail J.C.M., Wissocq N.M., d'Ieteren G.D.M., Kakiese O., Mulungo, M., Murray M .Quantitative phenotyping of N'Dama cattle for aspects of trypanotolerance under field tsetse challenge. *Vet Parasitol* ; in press.
22. Wissocq N.M., Trail J.C.M., Kakiese O., d'Ieteren G.D.M., PeloM., Mulungo, M. (1993). Importance of trypanosome species in relationship between infection, anaemia and reproductive performance in N'Dama cattle. In : Proceedings of 21st Meeting of the International Scientific Council for Trypanosomiasis Research and Control, Yamoussoukro, Côte d'Ivoire, 1991 : 278.
23. Wissocq N., d'Ieteren G., Trail J.C.M., Kakiese O.(1993). Quantification of the relative importance of trypanotolerance measurements on productivity of N'Dama cattle. In : Proceedings of 22nd Meeting of the International Scientific Council for Trypanosomiasis Research and Control, Kampala, Uganda.
21. Trail J.C.M., Wissocq N.M., d'Ieteren G.D.M., Kakiese O., Mulungo, M., Murray M.(1993). Patterns of *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense* infection differ in young N'Dama cattle and their dams. *Vet Parasitol.*; in press.

Achevé d'imprimer par Corlet, Imprimeur, S.A.
14110 Condé-sur-Noireau (France)
N° d'Imprimeur 7175 - Dépôt légal novembre 1994

Imprimé en C.E.E.

Créée à l'initiative de l'**Université des Réseaux d'Expression Française,** la collection *Universités francophones* s'insère, depuis 1988, dans le paysage éditorial international. L'**UREF** met ainsi à la disposition des étudiants et des chercheurs des ouvrages de haute qualité scientifique.
Rédigés par des équipes à caractère multilatéral, manuels, monographies et actes de colloques abordent des problématiques intéressant l'ensemble du monde francophone. En outre, ils s'adaptent, grâce à une politique de prix particulière, à ses différentes réalités économiques : autant de conditions contribuant à la reconnaissance et au succès de la collection.

180,00 FF
60,00 FF – UREF / Prix préférentiel : Afrique, Asie, Amérique du Sud, Haïti

59.4637.1
9 782742 000746

AUPELF•UREF

John Libbey EUROTEXT