

Académie De Nantes
UNIVERSITE DU MAINE

Année universitaire : 2009-2010

THESE
Présentée pour l'obtention du
DIPLOME DE DOCTORAT
Spécialité : Biologie des organismes

Présentée par
Lotfi Bounaadja

**DEVELOPPEMENT D'UNE PCR EN TEMPS REEL POUR LA
DETECTION DES *BRUCELLA* ET RELATIONS AVEC LE
GENRE *OCHROBACTRUM***

Thèse soutenue le 29 janvier 2010 devant le jury composé de :

Pr Hervé PREVOST	Professeur, ONIRIS, Nantes	Président
Pr Gwénnola ERMEL	Professeur, Université Rennes-1	Rapporteur
Dr Holger SCHOLZ	Professeur Adjoint, Munich	Rapporteur
Pr Benoît CHENAIS	Professeur, Université du Maine	Directeur de thèse
Dr Sylvie POLIAK	Directrice, Laboratoire Dép. de la Sarthe	Co-directrice de thèse

Académie De Nantes
UNIVERSITE DU MAINE

Année universitaire : 2009-2010

THESE
Présentée pour l'obtention du
DIPLOME DE DOCTORAT
Spécialité : Biologie des organismes

Présentée par
Lotfi Bounaadja

**DEVELOPPEMENT D'UNE PCR EN TEMPS REEL POUR LA
DETECTION DES *BRUCELLA* ET RELATIONS AVEC LE
GENRE *OCHROBACTRUM***

Thèse soutenue le 29 janvier 2010 devant le jury composé de :

Pr Hervé PREVOST	Professeur, ONIRIS, Nantes	Président
Pr Gwénnola ERMEL	Professeur, Université Rennes-1	Rapporteur
Dr Holger SCHOLZ	Professeur Adjoint, Munich	Rapporteur
Pr Benoît CHENAIS	Professeur, Université du Maine	Directeur de thèse
Dr Sylvie POLIAK	Directrice, Laboratoire Dép. de la Sarthe	Co-directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Je remercie solennellement le Conseil Général de la Sarthe pour leur financement sans lequel ce travail de thèse n'aurait pu aboutir.

Je remercie les membres du jury de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail, le président, le professeur Herve Prevost, ainsi que le professeur Gwennola Ermel et le docteur Holger Scholz qui ont accepté d'être les rapporteurs.

Egalement, un grand grand merci chaleureux et tout particulier à la directrice Sylvie Poliak du laboratoire départemental de la Sarthe (LVD72) et au professeur Benoît Chénais de l'université du Maine pour leur accueil, la confiance qu'ils m'ont accordé, leurs conseils, leurs encouragements et leurs motivations continus... Merci.

Je tiens à remercier aussi les docteurs Bruno Garin-Bastuji de l'AFSSA de Maisons-Alfort ainsi que Michel Zygmunt et Axel Cloeackaert de l'INRA de Tours de m'avoir donné la chance de travailler dans leur laboratoire, de m'avoir donné les moyens d'effectuer ce travail et de m'avoir aidé à mener à bien ce projet. Je les remercie vivement et remercie de même David Albert de l'AFSSA de Maisons-Alfort... Grand merci à toi pour ton encadrement et ton aide si précieuse. Merci aussi pour tes déplacements à Tours et au Mans que tu faisais pour le suivi de mon travail et pour les riches discussions que nous avons eu ensemble.

Une immense pensée également à l'ensemble du personnel des 4 laboratoires qui m'a accueilli de la meilleure des façons et m'a conseillé, entre autre, la technicienne Elisabeth Pradier, qui m'a encadré lors de mon passage à l'université du Maine, je lui souhaite aujourd'hui, de profiter pleinement de sa retraite avec les siens. Merci à Frédéric Pauloin, comptable du LVD72, d'avoir répondu à chaque fois à mes demandes et à mes besoins.

Pendant ces 3 années, le travail a été réalisé sur les 4 laboratoires. Les déplacements furent nombreux avec toutes les contraintes que cela impliquent, mais quelle richesse cela fut pour moi. C'est à la fin de ce doctorat, une fois le stress et la pression retombés que je me rends compte de la chance que j'ai. J'ai beaucoup appris lors de ces 3 années.

Grand merci également à ma famille, ma belle-famille et mes amis pour leur soutien continu et nécessaire. Merci aussi et surtout à mon épouse qui m'a tant soutenu et que j'ai tant fatiguée... Merci de me remettre à chaque fois en confiance quand le doute s'installe et m'invite à l'abandon.

Un merci infini à vous tous qui m'avez beaucoup appris.

Ce doctorat fut pour moi une école, « l'école de la vie ».

RESUME

Le genre *Brucella* appartient à la classe des α -proteobacteries et inclut 10 espèces de classe III infectant les animaux et accidentellement l'homme, pour certaines d'entre elles. Dans le but d'améliorer le diagnostic direct des brucelloses animales à partir d'échantillons biologiques, les performances des techniques de PCR conventionnelles (PCR-conv) et PCR en temps réel (PCR-TR) ont été évaluées et comparées en ciblant les gènes *bcs_p31*, *per* et *IS711* (séquence répétée du génome). La PCR-TR se révèle plus rapide et plus sensible que la PCR-conv. et la cible *IS711* offre la sensibilité la plus élevée dans les deux cas. Les performances de la PCR-TR ont ensuite été évaluée sur une série de prélèvements biologiques d'animaux sains ou malades et comparées avec la méthode de bactériologie qui reste la méthode de référence pour la détection de *Brucella*. La PCR-TR montre une bonne spécificité pour les 3 gènes cibles mais une sensibilité diagnostique supérieure en faveur de l'*IS711*. La PCR-TR reste inférieure à la bactériologie.

Dans le but de confirmer la proximité génétique des genres *Brucella* et *Ochrobactrum* précédemment décrite dans la littérature, la présence des séquences *IS711* et BRU-RS (site préférentiel d'insertion d'*IS711*) a été recherchée par Southern blot et PCR-TR dans un panel de souches d'*Ochrobactrum* représentant les 11 espèces. Si la séquence BRU-RS est présente chez *Ochrobactrum*, *IS711* en est absente. De même les gènes codant les protéines membranaires Omp 10, Omp 16 et Omp 19 et la protéine périplasmique BP26 sont présents dans les bactéries des deux genres. Une analyse par ELISA utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre ces protéines a révélé l'existence dans les souches d'*Ochrobactrum* d'épitopes communs avec *Brucella*, mais aussi une variabilité antigénique au sein des espèces d'*Ochrobactrum*.

En conclusion, la présence de la séquence d'insertion *IS711* est bien spécifique des bactéries du genre *Brucella* et représente une cible de choix pour l'identification de cette bactérie.

SUMMARY

The genus *Brucella* belongs to the α -proteobacteria group and consists of 10 recognized species that infects animals and occasionally humans for some of them. In order to improve the direct diagnosis of animal brucellosis from biological samples, the performances of newly designed real-time PCR (PCR-TR) assays using TaqMan[®] probes and conventional PCR assays (PCR-conv.) were compared by targeting the 3 following specific genes: (i) *bcs31*, (ii) *per* and (iii) the IS711 (repeated sequence of the genome). The PCR-TR is faster and more sensitive than PCR-conv. and the target IS711 offers the highest sensitivity in both cases. The PCR-TR method was then validated on biological samples from animals, and its performance was compared to the performance of bacteriological method that remains the reference method for detection of *Brucella*. For the 3 target genes, PCR-TR showed a good specificity, but IS711 offers a diagnostic sensitivity superior than *bcs31* and *per* genes but lower than bacteriology.

In order to confirm the genetic proximity between *Brucella* and *Ochrobactrum* described previously in the literature, the presence of IS711 sequence (specific of *Brucella*) and BRU-RS (known as insertion preferential site of IS711) was sought by Southern blot and PCR-TR in a panel of *Ochrobactrum* strains (representing the 11 species). The BRU-RS sequence is present in *Ochrobactrum* contrary to IS711. Moreover, genes encoding outer membrane proteins Omp 10, Omp 16 and Omp 19 and the periplasmic protein BP26 are present in both genus. An analysis by ELISA on *Ochrobactrum* strains using monoclonal antibodies directed against these proteins revealed common epitopes with *Brucella* with antigenic variability within *Ochrobactrum* species.

In conclusion, the specificity of insertion sequence IS711 in *Brucella* is confirmed, the insertion sequence IS711 is therefore a good target for the identification of the genus *Brucella*.

SOMMAIRE

RESUME	1
SUMMARY	2
LISTE DES ABBREVIATIONS	9
I. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	11
A. <i>Brucella</i> et Brucellose	12
1. Introduction	12
2. Données épidémiologiques	15
a) <i>Situation mondiale</i>	15
b) <i>Situation en méditerranée</i>	18
c) <i>Situation en France</i>	19
3. Pathogénie et aspects cliniques	19
4. Le genre <i>Brucella</i>	23
a) <i>Les alpha-proteobacteries</i>	23
b) <i>Description du genre <i>Brucella</i></i>	23
c) <i>Taxonomie et hôte</i>	27
d) <i>Le génome</i>	30
e) <i>Antigènes</i>	34
B. Relation entre <i>Brucella</i> et <i>Ochrobactrum</i>	35
1. Présentation du genre <i>Ochrobactrum</i>	35
a) <i>Description</i>	35
b) <i>Taxonomie</i>	36
c) <i>Manifestations cliniques</i>	36
2. Relation entre <i>Brucella</i> et <i>Ochrobactrum</i>	37
C. Diagnostic des Brucelloses animales	38
1. Généralités	38
2. Diagnostic bactériologique	38
3. Diagnostic sérologique de <i>Brucella</i>	40
4. Diagnostic moléculaire	41
D. Gènes et protéines d'intérêt de l'étude	43
1. Gène <i>bcs31</i>	43
2. Séquence d'insertion IS711 et séquence répétées BRU-RS1, BRU-RS2	44
3. Protéines membranaires : <i>Omp10</i> , <i>Omp16</i> et <i>Omp19</i>	47
4. Protéine périplasmique : <i>BP26</i>	48
5. Gène pérosamine synthétase (<i>per</i>)	48
E. But de l'étude	51
II. RESULTATS	52
A. Résultats de la 1^{ère} partie : Développement d'un outil de diagnostic du genre <i>Brucella</i> basé sur la PCR temps réel	53
1. Détection des <i>Brucella</i> par la technique de PCR conventionnelle et en temps réel	53
a) <i>Choix des cibles</i>	53
b) <i>Etude d'exclusivité</i>	57
c) <i>Etude d'inclusivité</i>	66
d) <i>Limite de détectabilité</i>	67
e) <i>Répétabilité et reproductibilité</i>	68
2. Choix et validation de la PCR en temps réel sur des échantillons biologiques	69
a) <i>Etude préliminaire : échantillons de rates de sangliers et d'animaux expérimentalement infectés</i>	69
b) <i>Echantillons biologiques d'animaux négatifs</i>	73
c) <i>Echantillons biologiques d'animaux positifs</i>	74
d) <i>Analyse de la sensibilité et de la spécificité diagnostique</i>	79
e) <i>Détermination du seuil de positivité en PCR temps réel</i>	83
B. Résultats de la 2^{ème} partie : Etude phylogénétique entre le genre <i>Brucella</i> et le genre <i>Ochrobactrum</i>	89
1. Recherche de la séquence répétée BRU-RS et de la séquence d'insertion IS711 chez <i>Ochrobactrum</i>	89
2. Détection de séquences homologues à celles des gènes <i>omp10</i> , <i>omp16</i> , <i>omp19</i> et <i>bp26</i> de <i>Brucella</i> spp. dans un panel d'espèces d' <i>Ochrobactrum</i>	96

3. Recherche d'épitopes communs sur un panel d'espèces <i>Ochrobactrum</i> par utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre <i>Omp10</i> , <i>Omp16</i> , <i>Omp19</i> et BP26 de <i>Brucella</i> spp.....	101
III. DISCUSSION.....	106
IV. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	116
V. MATERIELS ET METHODES.....	119
A. Matériel biologique utilisé.....	120
1. Souches <i>Brucella</i>	120
2. Souches <i>Ochrobactrum</i>	120
3. Bactéries ayant un lien avec <i>Brucella</i>	120
4. Autres bactéries.....	121
5. Echantillons biologiques.....	121
B. Techniques bactériologiques.....	122
1. Souches <i>Brucella</i>	122
2. Souches <i>Ochrobactrum</i>	122
3. Autres bactéries.....	122
4. Echantillons biologiques.....	123
C. Préparation de l'ADN.....	123
D. Amorces et sondes.....	124
E. Technique de PCR conventionnelle simple et double amplification.....	125
F. Technique PCR en temps réel.....	126
1. Technique PCR en temps réel.....	126
2. Répétabilité et reproductibilité.....	132
G. Sensibilité et spécificité analytique.....	133
H. Choix du seuil de détection en PCR temps réel.....	133
1. Estimation de la sensibilité et de la spécificité diagnostique.....	133
2. Courbe ROC.....	134
3. Indice de Youden.....	135
4. Comparaison de la moyenne des différence : "le test de t apparié".....	136
5. Comparaison de 2 moyennes observées.....	136
6. Comparaison de pourcentages de réponses positives de 2 séries appariées.....	136
I. Technique du Southern Blot.....	137
J. ELISA.....	138
1. Inactivation des bactéries.....	138
2. Choix des anticorps.....	138
3. Technique ELISA.....	139
VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	140
VII. COMMUNICATION AFFICHEE ET PUBLICATION.....	161
VIII. ARTICLE.....	163
IV. ANNEXE.....	173
Annexe 1 : Espèces et biovars de <i>Brucella</i> utilisés dans l'étude.....	174
Annexe 2 : Souches <i>Ochrobactrum</i> utilisées dans l'étude.....	176
Annexe 3 : Micro-organismes non- <i>Brucella</i> utilisés pour l'étude de spécificité.....	177
Annexe 4 : Préparation de milieux de culture.....	181
Annexe 5 : Préparation d'ADN génomique par la méthode phénol-chloroforme.....	183
Annexe 6 : Protocole d'extraction : kit Macherey Nagel (Genomic DNA from tissue)...	184
Annexe 7 : Protocole d'extraction : kit Roche (High Pure PCR Template Preparation)..	185
Annexe 8 : Protocole d'extraction : kit BioRad (InstaGene Matrix).....	186
Annexe 9 : Protocole d'extraction : kit manuel Qiagen (DNeasy Blood & Tissue).....	187
Annexe 10 : Protocole d'extraction : kit robot Qiagen (MagAttract® DNA Mini M48, BioRobot® M48 workstation).....	188

Annexe 11a : Caractéristiques des amorces et sondes utilisées pour la détection de <i>Brucella</i> par PCR-conv et PCR-TR	189
Annexe 11b : Caractéristiques des amorces et des sondes testées pour la détection de <i>Brucella</i> par PCR-TR et pour l'étude de la relation entre <i>Brucella</i> et <i>Ochrobactrum</i> ..	191
Annexe 12 : Marquages des sondes utilisées en Southern Blot et contrôle de leur qualité	192
Annexe 13 : Solutions utilisées pour le Southern Blot.....	193
Annexe 14 : Protocole de révélation du Southern Blot.....	194

FIGURES :

Figure 1 : Inter-relations entre l'homme et les animaux réservoirs	14
Figure 2 : Incidence mondiale de la brucellose humaine	15
Figure 3 : Statut de la brucellose humaine en Europe.....	17
Figure 4 : Evolution du nombre de cas de brucellose humaine en France de 1976 à 2008 ...	18
Figure 5 : Représentation du trafic intracellulaire de <i>Brucella</i> dans la cellule HeLa et dans le macrophage.....	20
Figure 6 : Arbre phylogénétique des bactéries appartenant au groupe des alpha-protéobactéries.....	24
Figure 7 : Schéma structural du lipopolysaccharide (LPS) de <i>Brucella</i> spp.....	26
Figure 8 : Représentation de l'évolution possible de la structure génomique des différentes lignées de <i>Brucella</i> à partir d'un ancêtre commun possédant un seul chromosome31	
Figure 9 : Organisation génétique de 5 Ilots Génomiques	33
Figure 10 : Alignement des séquences IS711 et IS6501 de <i>B. ovis</i>	45
Figure 11 : Représentation schématique d'organisation de l'IS711	46
Figure 12 : Organisation génétique du cluster wbk chez <i>B. melitensis</i> 16M	49
Figure 13 : Comparaison de différentes combinaisons de couples d'amorces et de sondes ciblant les gènes <i>bcs31</i> , <i>per</i> et IS711 pour la détection de <i>B. ovis</i>	55
Figure 14 : Réalisation d'une courbe standard pour le calcul de l'efficacité des PCR-TR ciblant les gènes <i>bcs31</i> , <i>per</i> et IS711 pour la détection de <i>B. ovis</i>	56
Figure 15 : Amplification obtenue à partir des amorces ciblant <i>bcs31</i> (Da Costa et al., 1993) révélée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%	58
Figure 16 : Etude de spécificité des nouvelles combinaisons amorces-sondes ciblant l'IS711.....	59
Figure 17 : Position des nouvelles combinaisons amorces-sondes ciblant la séquence d'insertion IS711	60

Figure 18 : Etude de spécificité utilisant le SYBR Green basée sur les gènes <i>IS711</i> , <i>bcp31</i> et <i>per</i> à partir de 68 souches non- <i>Brucella</i>	63
Figure 19 : Répétabilité intra-plaque (A) et reproductibilité inter-plaque (B) de la PCR-TR <i>IS711</i>	69
Figure 20 : Distribution des PCR-TR positives après 45 cycles d'amplification basée sur les gènes <i>IS711</i> , <i>bcp31</i> et <i>per</i> en fonction du Ct pour 160 échantillons positifs en bactériologie	78
Figure 21 : Courbes de ROC pour les 3 tests de détection de <i>Brucella</i> à partir de prélèvements biologiques par PCR-TR : détermination du Ct seuil de positivité pour le diagnostic de <i>Brucella</i>	85
Figure 22 : Calcul de l'indice de Youden pour les 3 tests de détection de <i>Brucella</i> à partir de prélèvements biologiques par PCR-TR : détermination du Ct seuil de positivité pour le diagnostic de <i>Brucella</i>	86
Figure 23 : Recherche de la séquence de BRU-RS sur un panel de souches d' <i>Ochrobactrum</i> par Southern Blot.....	93
Figure 24 : Alignement des séquences protéiques des protéines Omp10, Omp16, Omp19 et BP26 entre <i>Brucella</i> et <i>Ochrobactrum anthropi</i>	98
Figure 25 : Recherche de la séquence <i>bp26</i> sur un panel de souches d' <i>Ochrobactrum</i> par PCR	99
Figure 26 : Recherche de la séquence <i>omp10</i> sur un panel de souches d' <i>Ochrobactrum</i> par PCR	99
Figure 27 : Recherche de la séquence <i>omp16</i> sur un panel de souches d' <i>Ochrobactrum</i> par PCR	100
Figure 28 : Recherche de la séquence <i>omp19</i> sur un panel de souches d' <i>Ochrobactrum</i> par PCR	100
Figure 29 : Système de détection de l'amplicon par le SYBR Green	127
Figure 30 : Illustration d'analyse de la courbe de fusion	128
Figure 31 : Système de détection par sonde Taqman.....	129
Figure 32 : Différentes étapes de l'augmentation de la fluorescence au cours du temps d'une PCR en temps réel.....	130
Figure 33 : Illustration d'une droite standard obtenue après dilution en série d'un échantillon standard	131
Figure 34 : Exemple de 3 courbes ROC différentes.....	135

TABLEAUX :

Tableau 1 : Différentiation des biovars des espèces du genre <i>Brucella</i>	25
Tableau 2 : Caractéristiques des espèces de <i>Brucella</i>	28
Tableau 3 : Génome séquencé des espèces de <i>Brucella</i>	30
Tableau 4 : Comparaison de différents couples d'amorces et de différentes sondes ciblant les gènes <i>bcp31</i> , <i>per</i> et <i>IS711</i> pour la détection de <i>B. ovis</i> en PCR-TR.....	54
Tableau 5 : Bactéries non- <i>Brucella</i> utilisées pour l'étude de spécificité.....	57
Tableau 6 : Etude de spécificité avec différents couples d'amorces et différentes sondes ciblant l' <i>IS711</i> pour la détection de <i>B. ovis</i>	61
Tableau 7: Détection non spécifique à partir de 68 souches non- <i>Brucella</i> par utilisation du SYBR Green.....	65
Tableau 8 : Comparaison des valeurs de Ct obtenus en PCR-TR à partir des amplifications des gènes <i>bcp31</i> , <i>per</i> et <i>IS711</i> au sein de souches de référence de <i>Brucella</i>	66
Tableau 9 : Comparaison du seuil de détection des PCR-conv et PCR-TR.....	68
Tableau 10 : Valeur moyenne des Ct obtenus à partir de <i>B. ovis</i> , de rates de sangliers dopés et des organes d'animaux infectés dopés.....	70
Tableau 11 : Résultats bactériologiques et PCR-TR sur les 3 cibles étudiées, à partir d'échantillons de rates de sangliers et d'organes d'animaux infectés.....	71
Tableau 12 : Nature des matrices artificiellement contaminées.....	73
Tableau 13 : Comparaison entre une extraction manuelle et robotisée à partir de 22 prélèvements issus d'un foyer de brucellose : 16 prélèvements ont présenté une amplification.....	75
Tableau 14 : Concordance entre les résultats bactériologiques et les résultats de PCR-TR....	77
Tableau 15 : Corrélation entre le nombre de colonies observés en bactériologie et les résultats en PCR-TR à partir des 160 échantillons issus d'animaux provenant d'un foyer de brucellose.....	79
Tableau 16 : Résultats obtenus par PCR-TR après 45 cycles d'amplification à partir des échantillons positifs et négatifs.....	80
Tableau 17 : Sensibilité et spécificité diagnostique de la PCR-TR sur l'ensemble des échantillons positifs en bactériologie : statut établi au niveau de l'échantillon.....	81
Tableau 18 : Résultats obtenus par PCR-TR au niveau du statut de l'animal : évaluation à 45 cycles.....	82
Tableau 19 : Sensibilité diagnostique de la PCR-TR sur l'ensemble des échantillons positifs en bactériologie : statut établi au niveau de l'animal.....	83

Tableau 20 : Détection des paires de ganglions d'animaux issus de foyer de brucellose par PCR-TR sur les cibles IS711, <i>bcs</i> p31 et <i>per</i>	83
Tableau 21 : Calcul des valeurs Se, Sp, (100-Sp) et J au niveau du statut échantillon, en fonction du Ct seuil choisi	84
Tableau 22 : Nombre de faux positif théorique et observé sur l'ensemble des échantillons négatifs en bactériologie (n=65)	87
Tableau 23 : Pourcentage d'identité basé sur la séquence ARNr 16S entre le genre <i>Brucella</i> et différentes espèces d' <i>Ochrobactrum</i> (selon Scholz et al., 2008)	90
Tableau 24 : Souches des différentes espèces d' <i>Ochrobactrum</i> utilisées	92
Tableau 25 : Profils majeurs obtenus après Southern Blot BRU-RS sur l'ensemble des espèces d' <i>Ochrobactrum</i>	95
Tableau 26 : Densité optique normalisée (DOc) révélant la liaison des anticorps monoclonaux anti- <i>Brucella</i> testés sur différentes espèces d' <i>Ochrobactrum</i> en ELISA.....	102
Tableau 27 : Tableau de contingence	133
Tableau 28 : Anticorps dirigés contre les protéines Omp10, Omp16, Omp19 et BP26 utilisés dans l'étude.....	139

LISTE DES ABBREVIATIONS

µl : microlitre

µg : 10^{-6} g

ABC : ATP-Binding Cassette

Ac : Anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFSSA : Agence française de sécurité sanitaire des aliments

ARN : Acide ribonucléique

ARNr : ARN ribosomique

ARNt : ARN de transfert

BCSP31 : *Brucella* Cell Surface Protein

BET : Bromure d'éthidium

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

Brucella en phase R : *Brucella* en phase rugueuse (ou Rough)

Brucella en phase S : *Brucella* en phase lisse (ou Smooth)

CNR : Centre National de Référence

Ct : threshold cycle

DO : Densité optique

DOc : DO corrigée ou annexée

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

Fg : femtogramme : 10^{-15} g

GI : Genomic Island ou îlots génomiques

IC : Intervalle de confiance

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

IR: séquences répétées

IS : séquences d'insertion

ITS : Intergenic Transcribed Spacer

kb : kilobase

kDa : kilodalton

LPS : Lipopolysaccharide

LPS-R : LPS porté par les *Brucella* de forme Rough (R)

LPS-S : LPS porté par les *Brucella* de forme Smooth (S)

LVD 72 : Laboratoire Départemental de la Sarthe

ng : nanogramme : 10^{-9} g

dNTP : Désoxynucléotide triphosphate

OIE : Office international des épizooties

Omp = Outer membrane protein

ORF : Open Reading Frame ou cadre de lecture ouvert

pb : Paire de base

PBS : Phosphate buffered saline ou tampon phosphate

PCR : Polymerase chain reaction ou réaction de polymérisation en chaîne

PCR-TR : PCR en temps réel

PCR-conv : PCR conventionnelle

PCR nichée : PCR avec double amplification

Per : gene de la pérosamine synthétase

Rev1: souche vaccinale de *B. melitensis* biovar 1

ROC : Receiver Operating Characteristics

S19 : souche vaccinale 19 de *B. abortus* biovar 1

Se: Sensibilité

Sec: secondes

Sp : Spécificité

Tm: melting temperature ou temperature de fusion

TS : Trypticase-Soja

UFC: Unité Formant Colonie

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

A. *Brucella* et Brucellose

1. Introduction

Au cours de son histoire, la brucellose s'est vu donnée plusieurs noms comme fièvre de malte, de Chypre, de Gibraltar (pour les hommes), fièvre méditerranéenne, abortive, ondulante, sudoro-algique, ou encore Mélitococcie, maladie de Bang, septicémie de Bruce, avortement épizootique ou contagieux (pour les animaux) ou encore épépidymite contagieuse du bélier (chez les ovins) (Souk-Aloun, 1989).

La première description clinique de la maladie a été publiée par Martson en 1859 sous le nom de fièvre méditerranéenne (Roux, 1989) et présentait la maladie comme fébrile et ondulante.

Mais c'est en 1887 que l'agent responsable de la maladie est isolé par David Bruce, médecin militaire anglais, à partir de la rate d'un soldat décédé de la maladie. Il observe avec l'aide d'un microscope un grand nombre de bactérie. Ce germe reçoit alors l'appellation de "*Micrococcus melitensis*" (Roux, 1989).

En 1897, Bang, un vétérinaire danois, isole un bacille de produits d'avortements bovins qu'il appelle *Bacillus abortus bovis* ; et Wright met au point le premier test diagnostique sérologique qui porte son nom : réaction d'agglutination de Wright.

En 1905, le bactériologiste maltais Zamitt découvre par la réaction d'agglutination de Wright que les chèvres de l'île de Malte infectent les hommes par le lait et constituent ainsi un réservoir de la maladie.

En 1914, Traum isole une bactérie semblable à celle isolée par Bang, à partir de fœtus porcine et la nomme *Bacillus abortus suis*. Quatre ans plus tard, une bactériologiste américaine, Alice Evans, propose une parenté entre ces deux micro-organismes. C'est ainsi que le genre *Brucella* est établi par Meyer et Shaw en 1920 (Roux, 1989) en l'honneur de David Bruce.

En 1929, Huddleson développe des méthodes bactériologiques permettant de distinguer les espèces *B. melitensis*, *B. abortus* et *B. suis*.

En 1930, aux Etats Unis, Buck démontre le pouvoir protecteur de la souche non virulente *Brucella abortus* S19 sur des bovins qui sera plus tard utilisée comme vaccin pour prévenir la brucellose bovine (Schurig et al., 2002). En 1932, Wilson et Miles affirment la présence d'antigènes de structure lipopolycaccharidique chez *Brucella*, appelés A et M et inégalement répartis selon les espèces.

La souche *B. abortus* 45/20 est testée pour la première fois comme vaccin en 1938 par Mc Ewen et Priestley ; les travaux cumulés de Edwards et collaborateurs et de Taylor et collaborateurs, en 1945 et 1949 en font la première souche vaccinale inactivée mise au point

(Schurig et al., 2002). La première souche vaccinale vivante atténuée, *B.melitensis* Rev1, est développée par Elberg et Faunce en 1957 (Schurig et al., 2002).

En 1953, Buddle et Boyes identifient en Australie et en Nouvelle Zélande *B. ovis* comme agent responsable d'épididymite chez les ovins (Nicoletti, 2002).

La souche *B. neotomae* est isolée en 1957 par Stoenner et Lockman chez des rongeurs du désert (*Neotoma lepida*) dans l'Utah aux USA (Maurin, 2005). *B. canis* est reconnue en 1966 par Carmichael et Bruner comme agent responsable d'avortements chez les canidés.

Pour la première fois en 1994, l'avortement d'un dauphin en captivité en Californie est attribué à une infection à *Brucella* (Ewald et al 1994). Depuis, de nouvelles souches ont été isolées de divers mammifères marins : dauphins, marsouins, phoques (Foster et al, 2002). Les espèces *B. ceti* (cétacé) et *B. pinnipedialis* (pinnipèdes) sont alors proposées (Foster et al., 2007). L'espèce *B. microti* est isolée du campagnol (*microtus arvalis*) en république tchèque et proposée en 2008 (Hubalek et al., 2007 ; Scholz et al., 2008b). Enfin, l'espèce *B. inopinata* est isolée et caractérisée en 2009 aux Etats-Unis (Scholz et al., 2009b).

La brucellose est une zoonose, maladie animale transmissible à l'homme, de répartition mondiale plus fréquente sur le pourtour méditerranéen et causée par l'agent pathogène *Brucella*. L'importance de la maladie varie selon les pays en fonction des mesures de lutte mises en œuvre pour son éradication, et des populations animales locales. La brucellose est responsable de pertes économiques importantes en élevage en raison de la stérilité, des avortements des animaux malades et de la baisse de production laitière du troupeau qu'elle provoque, elle a également de lourdes répercussions sur les échanges commerciaux.

Brucella est une bactérie à large spectre d'hôtes. Elle est capable d'infecter des animaux aussi différents que des ruminants (en majorité), des suidés, des canidés, des équidés et des mammifères marins (Figure 1).

La lutte contre la brucellose animale repose sur l'utilisation d'un ou plusieurs outils : dépistage sérologique, abattage partiel ou total des effectifs infectés, vaccination dans les troupeaux. Le choix de la stratégie de lutte se fait en fonction de la prévalence de l'infection dans le pays et des moyens dont il dispose.

2. Données épidémiologiques

La brucellose humaine est généralement transmise par les animaux d'élevage et fait partie des zoonoses les plus répandues dans le monde. Les espèces les plus impliquées sont *Brucella abortus* et *B. melitensis* cette dernière étant responsable des cas les plus graves. La brucellose humaine est étroitement liée à l'infection animale, qui atteint surtout les ruminants (bovins, caprins, ovins) et les porcs.

a) Situation mondiale

Au niveau mondial, la brucellose humaine a énormément évolué pour des raisons sanitaires, socio-économiques et politiques. Après y avoir été endémique, elle a été éradiquée dans plusieurs pays comme l'Australie, le Canada, Israël, le Japon, la Nouvelle Zélande et plusieurs pays d'Europe dont la France. La plupart des pays d'Amérique Latine ont réussi à contrôler la maladie (Figure 2).

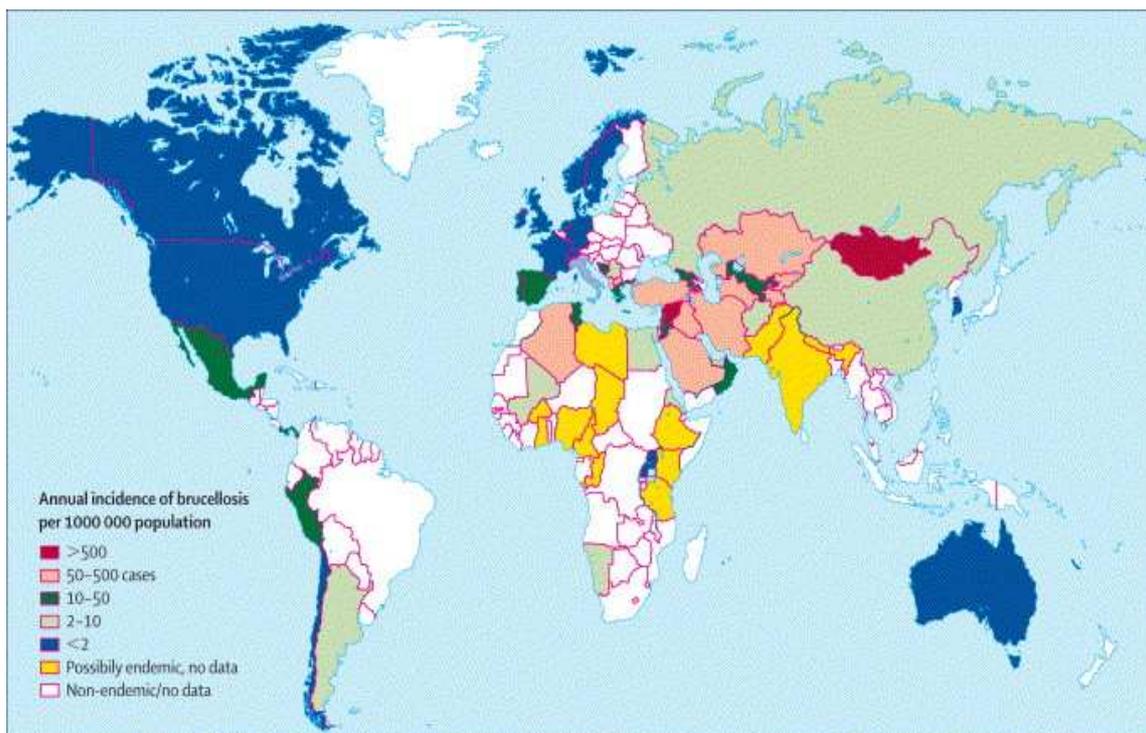


Figure 2. Incidence mondiale de la brucellose humaine (Pappas et al., 2006a)

- Aux USA

Les cas de brucellose humaine ont fortement diminué depuis les années 1950 : 6321 cas déclarés en 1947, contre une incidence moyenne de 1056 cas dans la période 1993-2003.

Jusqu'aux années 1960, la brucellose était principalement due à *B. abortus*, aujourd'hui elle est surtout causée par *B. melitensis*.

Dans le nord du pays, une grande partie des cas correspondent à une maladie acquise après un voyage international ou à une importation de produits alimentaires infectés venant de pays où la brucellose est endémique. Dans l'est et le sud du pays, la brucellose, attribuée à *B. melitensis*, touche essentiellement la population hispanique et la maladie est importée du Mexique par l'intermédiaire de produits laitiers infectés (Pappas et al., 2006a).

- **En Amérique Latine**

L'agent pathogène le plus impliqué en Amérique latine est *B. abortus* avec les bovins comme principaux réservoirs naturels de *Brucella*. Le Salvador est le pays le moins atteint par la brucellose bovine, tandis que les pays les plus touchés sont le Guatemala, le Costa Rica et le Mexique. Au Mexique, la brucellose humaine est une des maladies d'origine bactérienne les plus sérieuses, avec 3008 cas rapportés en 2003 (Pappas et al., 2006a). De plus le caractère endémique de la brucellose au Mexique a une influence sur l'épidémiologie de la maladie aux Etats-Unis. En effet, la perméabilité de la frontière entre ces deux pays est telle qu'un programme d'éradication de la brucellose aux Etats-Unis pourrait s'avérer peu efficace.

En Amérique du sud la brucellose humaine est considérée comme endémique, son incidence (cas annuelle par million de population) est de 71,55 (dont 34,9 sont représenté par le Pérou). Ces cas sont dus à *B. melitensis* au Pérou et en Argentine et à *B. abortus* dans l'est de l'Argentine et dans les autres pays d'Amérique du sud (Pappas et al., 2006a).

- **En Afrique**

Dans de nombreux pays africains les populations, souvent défavorisées, vivent auprès du bétail dont elles sont complètement dépendantes. Entre 2003 et 2004, des cas de brucellose humaine ont été recensés au Cameroun, en Ethiopie, au Kenya, au Nigeria, en Tanzanie, en Ouganda, au Burkina Faso, en République du Congo, en Erythrée, au Mali, en Namibie et au Swaziland. De plus, des études épidémiologiques basées sur la sérologie ont montré que le Ghana, le Togo et le Tchad étaient probablement des zones de brucellose endémique (Young et Corbel, 1989).

Par ailleurs, les modes de vie traditionnels, les maladies infectieuses endémiques beaucoup plus graves comme la malaria et les conditions économiques rendent la lutte contre la brucellose animale difficile dans certains de ces pays.

- En Europe

En Europe, le statut de « pays indemne de brucellose » est reconnu par l'Union Européenne aux pays suivants : Suède, Danemark, Finlande, Allemagne, Grande Bretagne (exceptée l'Irlande du Nord), Autriche, Pays-Bas, Belgique, Suisse, Norvège et Luxembourg. Cependant, certains de ces pays recensent quelques cas de Brucellose humaine tous les ans, ces cas étant généralement importés par des voyageurs ou des immigrants provenant de pays endémiques (Figure 3).

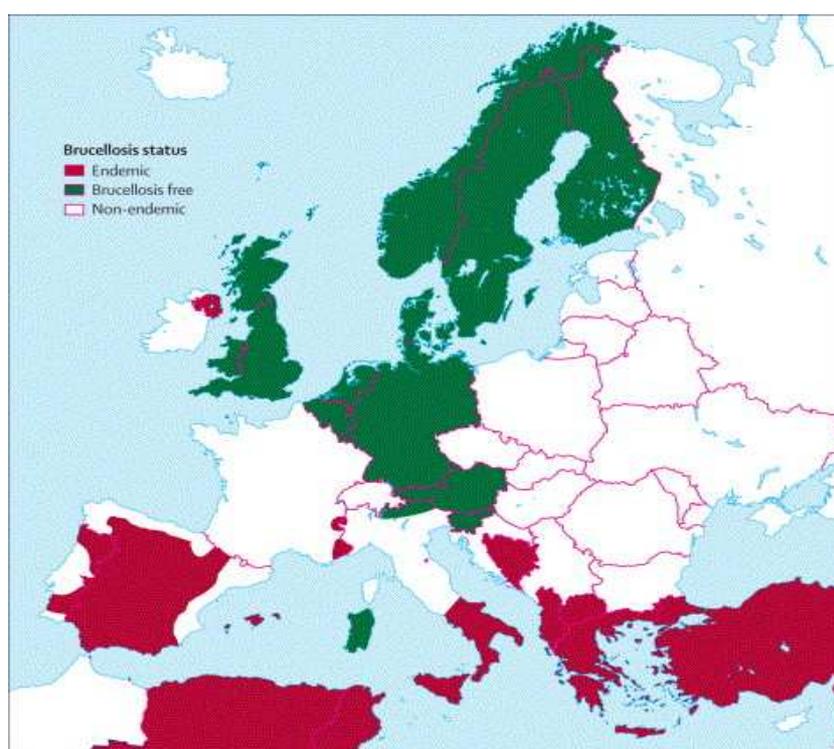


Figure 3. Statut de la brucellose humaine en Europe (Pappas et al., 2006a)

L'incidence de la brucellose humaine en Europe atteint une valeur de 340,2 cas par million, dont 0,5 correspondent à la France. Cette dernière est un exemple dans l'efficacité du programme d'éradication : le pays est passé de plus de 800 cas en 1976, à 405 cas en 1983, et à 44 cas en 2000 (Pappas et al., 2006a ; INVS, France) (Figure 4). La plupart de ces cas sont liés à la consommation de produits laitiers importés d'Espagne, du Portugal, d'Algérie ou de Turquie (Durr et al., 2003).

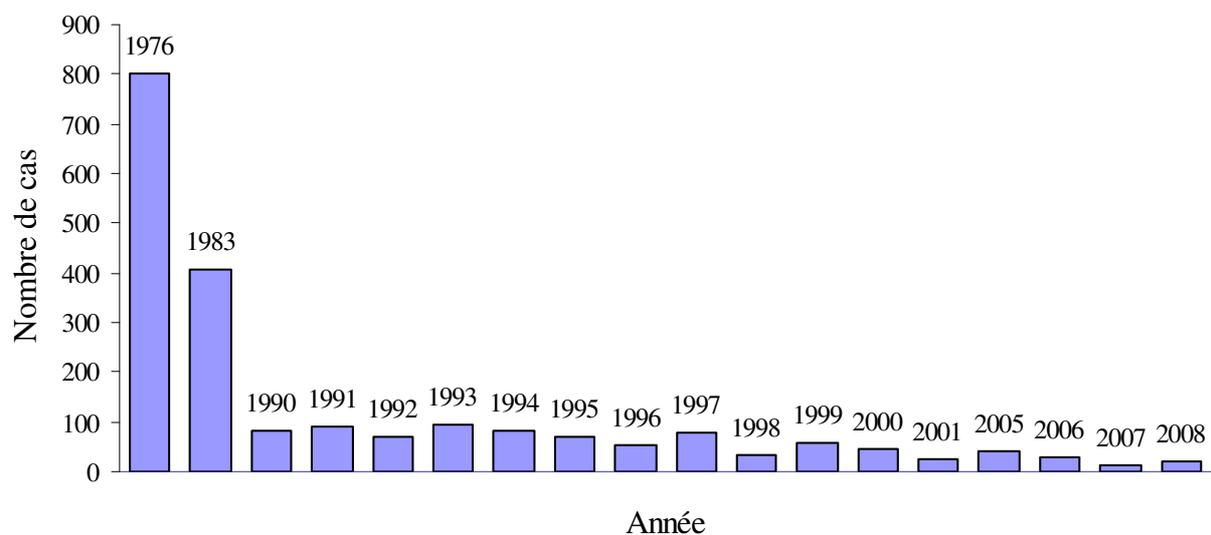


Figure 4 : Evolution du nombre de cas de brucellose humaine en France de 1976 à 2008 (d'après l'Institut de Veille Sanitaire et Pappas et al., 2006a)

b) *Situation en méditerranée*

La région méditerranéenne est une zone très sensible aux zoonoses de par sa biodiversité, sa variabilité environnementale et climatique et de par les mouvements migratoires de l'Homme et des animaux. D'ailleurs, la brucellose, dite également fièvre méditerranéenne, fait partie des zoonoses les plus répandues dans cette région (tout comme la rage, l'échinococcose kystique, la leishmaniose et les infections alimentaires causées par exemple par certaines espèces de *Salmonella* ou *Escherichia Coli*) (Seimenis et al., 2006). Pourtant dans certains pays méditerranéens, le nombre de cas rapportés est souvent sous-estimé par manque de sensibilisation des médecins.

Les pays du nord méditerranéen ont élaboré des programmes d'éradication et de contrôle de la maladie basés sur la surveillance sérologique des animaux, le suivi de l'abattage des animaux positifs et la vaccination. Ils obtiennent depuis quelques décennies des progrès encourageants. Les principaux réservoirs d'infections sont les moutons et les chèvres puis, les autres animaux d'élevage (vaches, porcs, chevaux ...), les buffles et les chameaux.

Les pays présentant l'incidence de brucellose humaine la plus élevée sont l'Algérie, l'Arabie Saoudite, l'Iran, l'Autorité Palestinienne, la Syrie, l'Egypte et l'Oman (Pappas et al., 2006a ; Refai, 2002).

c) *Situation en France*

La brucellose bovine causée par *B. abortus* est éradiquée en France (considérée désormais comme pays indemne de brucellose bovine). Cependant, l'infection de certains animaux sauvages par *B. suis* biovar 2, comme les sangliers et les lièvres est répandue et représente une menace pour les élevages porcins en plein air (Garin-Bastuji et Delcueillette, 2001).

Généralement, les cas de brucellose humaine surviennent dans les régions montagneuses, notamment dans les Alpes, les Pyrénées, ou la Corse. Il s'agit de façon prédominante d'infections à *B. melitensis* biovars 1 et 3, et plus rarement à *B. abortus* biovars 3 et 4. L'espèce *B. suis* est exceptionnellement responsable de brucellose humaine depuis l'industrialisation des élevages porcins, et l'espèce *B. canis* n'a jamais été isolée chez l'homme en France (Garin-Bastuji et Delcueillette, 2001).

D'ailleurs sur les 21 cas humains déclarés en 2008, 13 ont été causés par l'espèce *B. melitensis* biovar 3 et 2 par *B. melitensis* biovar 1 :

- Sur les 21 cas de brucellose déclarés en 2008, 19 ont été « importés ». Le pays de contamination était la Turquie pour 8 patients, l'Algérie pour 6 patients, l'Italie pour 2 patients, le Portugal, l'Espagne et la Tunisie (1 patient chacun). Tous ces patients ayant voyagé, soit ils ont été en contact direct avec des animaux d'élevage, soit ils ont consommé du lait cru ou des produits laitiers à base de lait cru (yaourts, fromage frais) (INVS, France).
- Les 2 cas autochtones étaient un technicien de laboratoire ayant manipulé des souches de *Brucella* et un professionnel en contact avec des animaux d'élevages, depuis plusieurs années, y compris avant l'obtention par la France du statut indemne de brucellose bovine (INVS, France).

3. Pathogénie et Aspects cliniques

Les *Brucella* sont connues pour être des bactéries intracellulaires facultatives. La pénétration de la bactérie se fait généralement via les muqueuses orale, du nasopharynx, des conjonctives, par voie génitale et parfois, par des lésions cutanées. Une fois parvenue dans le système lymphatique de l'hôte, les bactéries se répandent par voie sanguine ou lymphatique dans les différentes parties de l'organisme jusqu'à atteindre divers organes, pouvant causer une infection localisée au niveau du tissu atteint. Les mécanismes moléculaires de virulence de *Brucella* permettent l'invasion de la bactérie, l'échappement à la lyse par les phagocytes lui

procurant ainsi, une niche intracellulaire pour sa réplication (Gorvel et Moreno, 2002 ; Michaux-Charachon et al., 2002). La localisation intracellulaire de la bactérie lui permet d'échapper aux défenses immunitaires, ce qui rend la maladie persistante. *Brucella* a la capacité de se répliquer dans les cellules phagocytaires comme le macrophage, mais également d'être internalisée par des cellules non phagocytaires comme les fibroblastes ou les cellules HeLa, (Figure 5) en utilisant les mêmes mécanismes que ceux utilisés dans le macrophage (Detilleux et al., 1990 ; Rabinovitch, 1995 ; Liautard et al., 1996).

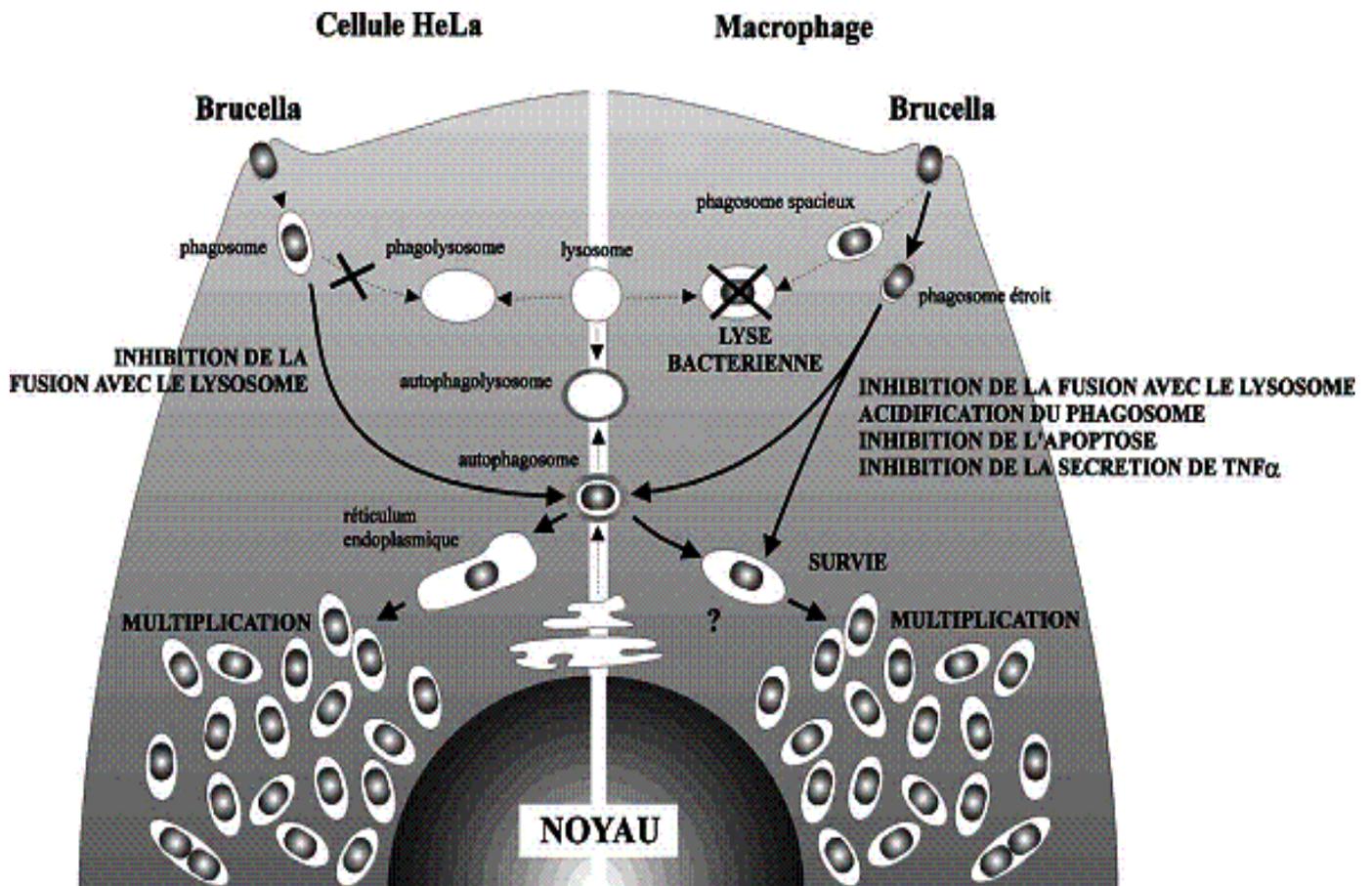


Figure 5 : Représentation du trafic intracellulaire de *Brucella* dans la cellule HeLa et dans le macrophage (d'après Michaux-Charachon et al., 2002)

Après son entrée dans une cellule non phagocytaire comme la cellule HeLa ou dans un macrophage (Figure 5), la bactérie est ingérée et se retrouve dans un phagosome précoce, puis dans un autophagosome où elle est capable de se multiplier après inhibition de la fusion phagolysosomiale. Dans le macrophage, la grande majorité des *Brucella* sont tuées après leur entrée mais la faible proportion de bactéries retrouvées dans l'autophagosome suffit pour maintenir la survie et la multiplication de la bactérie dans le macrophage (Michaux-Charachon et al., 2002). De plus, l'acidification rapide et importante (pH 4) du phagosome semble être un signal inducteur de facteurs de virulence essentiel pour la bactérie (Michaux-

Charachon et al., 2002). Il a été mis en évidence qu'un système de régulation à deux composants, appelé BvrS/BvrR, et qu'un système de sécrétion de type IV étaient essentiels à la virulence de *Brucella*. En effet, chez des bactéries présentant des mutations affectant le système de régulation BvrS/BvrR, il a été montré une incapacité à inhiber la fusion lysosomiale et à se multiplier dans la cellule (Sola-Landa et al., 1998). De même, des bactéries présentant des mutations dans l'opéron codant pour les protéines du système de sécrétion de type IV, appelée *virB* sont incapables de se multiplier dans les macrophages (O'Callaghan et al., 1999). Le système de sécrétion de type IV VirB secrète des effecteurs impliqués dans la survie de la bactérie et l'inhibition du phagosome avec les lysosomes (Starr et al., 2008).

Une fois la niche intracellulaire de réplication établie, les bactéries vont tenter de se maintenir dans la cellule le plus longtemps possible en inhibant l'apoptose (Michaux-Charachon et al., 2002).

La réponse humorale est dirigée principalement contre l'antigène majeur de *Brucella*, à savoir la chaîne O de son lipopolysaccharide (LPS, un composant de la membrane externe). Ces anticorps anti-LPS induisent une lyse bactérienne, par la voie classique du complément ainsi que par opsono-phagocytose. Une réponse se développe aussi contre des protéines de la membrane extérieure, du périplasme, et du cytoplasme, mais plus tardivement. Le LPS de *Brucella* possède une structure (voir plus bas, Figure 7) qui module la réponse immunitaire de l'hôte et confère une résistance aux activités antimicrobiennes et agit comme facteur de virulence pour la survie et la réplication intracellulaire (Lapaque et al., 2005).

Chez l'homme, les espèces de *Brucella* les plus répandues sont *B. melitensis* et *B. abortus* mais les formes d'infections dues à *B. melitensis* sont souvent plus sévères. Au début de la maladie, on parle de primo-infection. C'est la période d'incubation de la maladie. Puis, des symptômes non caractéristiques apparaissent et peuvent passer inaperçus ou être négligés. Ces premiers, correspondant à la brucellose aiguë, sont l'apparition d'une asthénie, de douleurs musculaires ou articulaires, des sueurs et d'une fièvre ondulante appelée fièvre ondulante sudoroalgique, correspondant aux décharges bactériémiques. Une antibiothérapie entraîne une diminution rapide des symptômes mais la convalescence est longue et difficile. Sinon, il peut s'en suivre une brucellose subaiguë focalisée, caractérisée par des infections focales. On peut alors observer différentes formes d'infection : des formes ostéo-articulaires peuvent apparaître telles que des arthrites, synovites, ostéo-périostites ou ostéo-arthrites ; des formes nerveuses telles que des méningo-neurobrucelloses, des méningo-myélo-radicalite ou des ménago-

encéphalites. Des localisations hépato-spléniques, génitales et bronchiques peuvent survenir mais sont plus rares. Enfin, après une durée variable, la brucellose chronique peut faire suite à une brucellose aiguë ou subaiguë, ou survenir en l'absence de tout épisode antérieur. A ce moment là, l'antibiothérapie n'a aucun effet. Les cas d'infections de longue date non diagnostiqués sont caractérisés par des troubles psychiques (anxiété, dépression).

Contre la brucellose aiguë, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande depuis 1986 un traitement associant de la doxycycline (200 mg/jour) à de la rifampicine (600 à 900 mg/jour) pendant six semaines (Maurin, 2005).

L'homme peut être contaminé par ingestion de produits contaminés, contact direct avec un animal infecté, inoculation accidentelle ou inhalation. Mais c'est la consommation de lait ou de produits laitiers contaminés qui est la principale cause d'infection chez l'homme. En effet, le lait frais non pasteurisé ou les produits laitiers tels que les fromages, le beurre, les yaourts ou les crèmes glacées, préparés à partir de lait non pasteurisé provenant d'animaux infectés, sont susceptibles de contenir des quantités importantes de la bactérie. Les professionnels en contact avec les animaux (éleveurs, fermiers, vétérinaires et employés d'abattoirs) sont plus particulièrement exposés à la maladie. Les personnels de laboratoire lors de la manipulation du pathogène *Brucella* (la manipulation de culture bactérienne ou de vaccin nécessite un travail en laboratoire confiné de type 3) sont également sujets à un risque d'infection.

La transmission interhumaine existe, elle a été suggérée par l'infection de l'épouse d'un microbiologiste travaillant sur *Brucella* (Ruben et al., 1991) et par l'infection d'un nouveau né, probablement contaminé par le lait maternel de sa mère atteinte de brucellose (Palanduz et al., 2000).

Chez l'animal, la brucellose est essentiellement une maladie de la reproduction. Elle est caractérisée par l'atteinte de l'appareil génital, chez les femelles et les mâles, avec une stérilité possible dans les 2 cas. L'infection se traduit généralement par des avortements chez les femelles. Ils peuvent avoir lieu quelques semaines à plusieurs mois après l'infection. Chez les mâles, la localisation des *Brucella* est fréquente dans les testicules et les épидидymes ; des orchites ou orchi-épididymites sont observées, ainsi qu'une excréation de la bactérie dans le sperme.

La transmission peut se faire directement par absorption d'un aliment contaminé ou par contact indirect avec un élément de l'environnement contaminé par les matières virulentes. Les sources principales de contamination chez les animaux sont surtout d'origine génitale à partir de l'avorton, du placenta ou des sécrétions génitales. Le lait, les selles et les aérosols que ces produits peuvent provoquer sont également des matières virulentes.

4. Le genre *Brucella*

a) *Les alpha-proteobacteries*

Les alpha-protéobactéries regroupent, sur la base de l'analyse phylogénétique utilisant la séquence du gène de l'ARN ribosomique (ARNr) 16S, un grand nombre de bactéries à Gram négatif (Woese et al., 1985). Elles sont capables d'établir des relations étroites avec la cellule eucaryote. On retrouve une structure génomique variée avec des chromosomes multiples, circulaires ou linéaires pouvant être associés à de grands plasmides dont la taille peut dépasser la mégabase (Teyssier et al., 2004).

Le genre *Brucella* appartient à la classe des alpha-protéobactéries, à l'ordre des Rhizobiaceae et à la famille des Brucellaceae (Moreno et al., 1990; Yanagi et al., 1993) (Figure 6).

b) *Description du genre Brucella*

Les *Brucella* sont des petits coccobacilles intracellulaires facultatifs à Gram négatif, mesurant de 0,6 à 1,5 µm de long et de 0,5 à 0,7 µm de diamètre. Les cellules sont immobiles, non *capsulées*, non sporulées et ne forment pas de flagelles. Les bactéries sont aérobies strictes, catalase et oxydase positives (uréase variable), mais certaines souches se développent mieux en atmosphère contenant 5 à 10% de CO₂ (Tableau 1). La température optimale de croissance est de 34°C, mais la température tolérée peut varier entre 20 et 40°C sur un milieu adéquat, bien que les *Brucella* soient habituellement cultivées à 37°C. Le pH exigé pour la croissance varie entre 6,6 et 7,4 avec un pH optimal de 6,8. L'isolement des *Brucella* à partir de prélèvements contaminés par d'autres bactéries ou par des champignons nécessite l'utilisation de milieux sélectifs correspondant à des milieux de base (tels que les bouillons ou géloses trypticase Soy, tryptosé ou encore Albimi) auxquels sont rajoutés des antibiotiques et des antifongiques (Roux, 1989).

De plus, cet isolement des *Brucella* nécessite un temps d'incubation d'au moins 3 à 4 jours. Les colonies sont translucides, rondes à bords réguliers. La culture en milieu liquide présente un trouble léger. Les espèces *Brucella microti* et *Brucella inopinata* identifiées récemment (Hubalek et al., 2007) se distinguent des autres espèces par leur croissance obtenue après seulement 24h de culture.

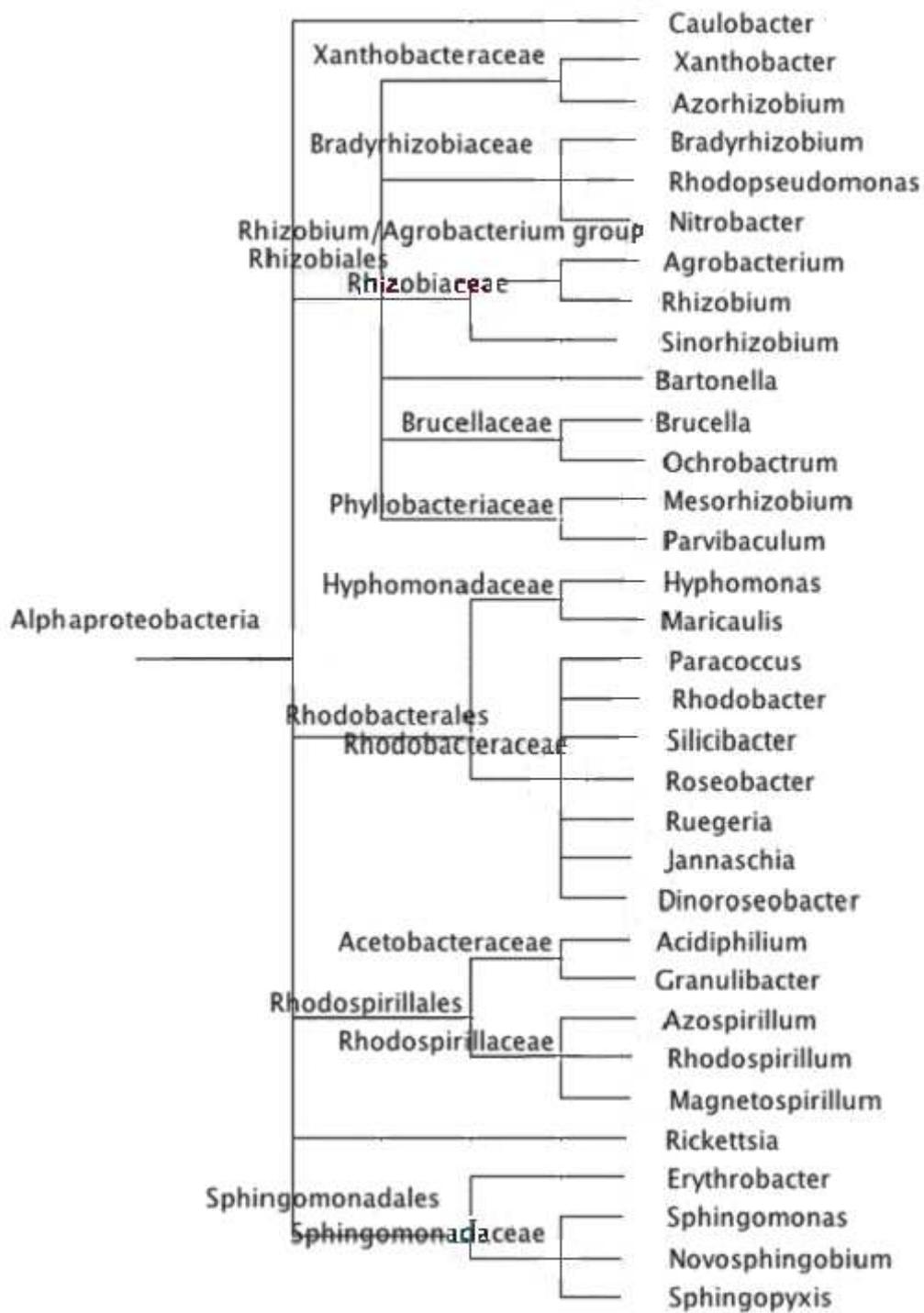


Figure 6 : Arbre phylogénétique des bactéries appartenant au groupe des alpha-protéobactéries (d'après Qi et al., 2009).

Tableau 1 : Différentiation des biovars des espèces du genre *Brucella* (d'après OIE *Terrestrial Manual* 2008 et Scholz et al., 2008b)

Espèces	Biovar	Dépendance en CO ₂	Production de sulfures H ₂ S	Production d'Uréase	Croissance en présence de colorant ^a :		Agglutination par les sérums monospécifiques		
					Thionine	fuchsine Basique	A ^h	M ^h	R ^{h,i}
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	+	+	+	-	+	-
	2	-	-	+	+	+	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i>	1	+ ^b	+	- ^g	-	+	+	-	-
	2	+ ^b	+	+	-	-	+	-	-
	3	+ ^b	+	+	+	+	+	-	-
	4	+ ^b	-	+	-	+ ^c	-	+	-
	5	-	-	+	+	+	-	+	-
	6	-	+	+	+	+	+	-	-
	9	+ ou -	-	+	+	+	-	+	-
<i>B. suis</i>	1	-	+	+	+	- ^d	+	-	-
	2	-	-	+	+	-	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	+	-	-
	4	-	-	+	+	- ^e	+	+	-
	5	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>B. neotomae</i>		-	+	+	- ^f	-	+	-	-
<i>B. ovis</i>		+	-	-	+	- ^e	-	-	+
<i>B. canis</i>		-	-	+	+	- ^e	-	-	+
<i>B. ceti</i>		-	-	+	+	+	+	- ^e	-
<i>B. pinnipedialis</i>		+	-	+	+	+	+	- ^e	-
<i>B. microti</i>		-	-	+	+	+	-	+	-

^aConcentration finale du colorant : 20 µg/ml, ^ben général positif lors de l'isolement primaire, ^cquelques souches ne croissent pas, ^dquelques souches résistantes à la fuchsine ont été isolées, ^enégatif pour la plupart des souches, ^fcroissance à la concentration de 10 µg/ml de thionine, ^g la souche 544 (*B. abortus* biovar 1) et quelques souches de terrain sont négatives. ^hA : sérum anti-*Brucella* obtenu à partir de *B. melitensis*, M : sérum anti-*Brucella* obtenu à partir de *B. abortus*, R : sérum anti-*Brucella* en phase R. ⁱ*B. canis* et *B. ovis* possèdent naturellement un phénotype rugueux (R-LPS) et les autres espèces possèdent à l'état sauvage un phénotype lisse (S-LPS).

La membrane externe est principalement constituée de phospholipides, de protéines et de LPS.

On distingue deux formes différentes du LPS chez *Brucella* : le LPS-S pour les *Brucella* Smooth (S) caractérisées par un aspect lisse des colonies poussant à la surface de milieux solides et le LPS-R pour les *Brucella* Rough (R) caractérisé par un aspect rugueux. *B. ovis* et *B. canis* sont des espèces qui se trouvent naturellement à l'état rugueux. Le LPS-S est constitué de trois entités: le lipide A, le noyau et la chaîne O (appelée aussi antigène O), alors que le LPS-R ne contient pas la chaîne O (Figure 7). Le lipide A enchâssé dans la membrane externe, représente la partie proximale du LPS, le noyau sa partie médiane, et la chaîne O sa partie distale « libre » dans le milieu extérieur. Plusieurs rôles biologiques sont associés à la chaîne O comme la protection vis-à-vis de la lyse médiée par le complément, ou encore la survie et la réplication de *Brucella* chez l'hôte (Gomes-Cardoso et al., 2006). Plusieurs études ont d'ailleurs cité le LPS comme un facteur de virulence (Freer et al., 1996 ; Rasool et al., 1992 ; Velasco et al., 2000, Lapaque et al., 2005).

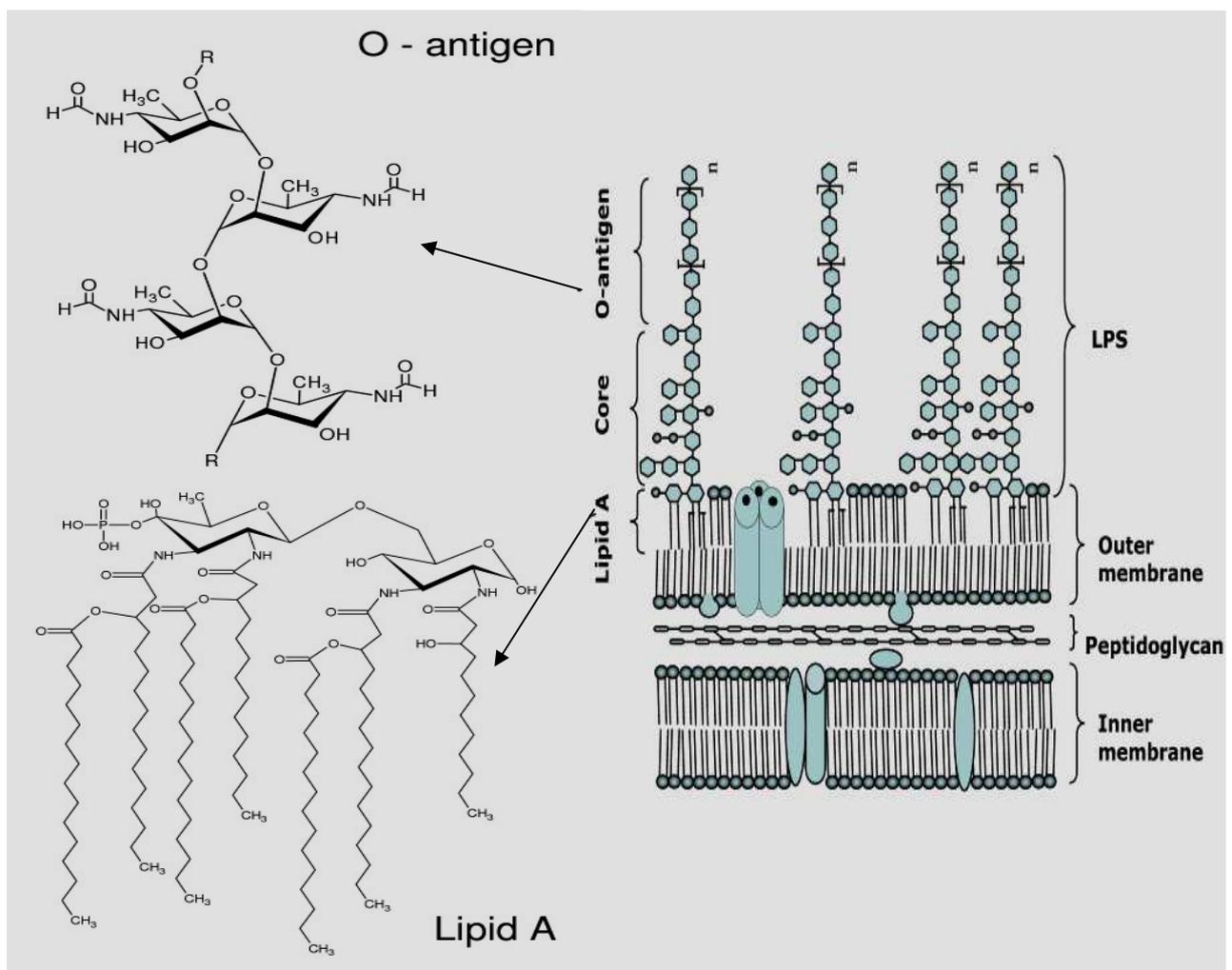


Figure 7 : Schéma structural du lipopolysaccharide (LPS) de *Brucella* spp. (Cardoso et al., 2006).

c) Taxonomie et hôte

En 1920, Meyer et Shaw proposent la création du genre *Brucella*. Les espèces bactériennes les plus proches sur le plan phylogénique sont les *Bartonella*, autres bactéries responsables de zoonoses, et des bactéries de l'environnement exceptionnellement retrouvées chez l'homme, comme *O. anthropi* ou *Afipia*, *Bosea*, et des bactéries pathogènes ou symbiotes de plantes telles que *Rhizobium* et *Agrobacterium*. La méthode d'hybridation ADN-ADN représentant la méthode de référence pour la définition d'une espèce bactérienne, a été utilisée pour comparer les génomes de *Brucella* et *O. anthropi* d'une part, et *Brucella* et *Rhizobium tropici* d'autre part : les pourcentages d'identités constatés sont de 30% et de 12% respectivement. (Gándara et al., 2001)

Sur le plan taxonomique, le genre *Brucella* est classiquement divisé en six espèces, elles-mêmes séparées en biovars, en fonction notamment d'une relative spécificité vis-à-vis de leur hôte animal naturel (Tableau 2) : *B. melitensis* (3 biovars), *B. abortus* (7 biovars), *B. suis* (4 biovars), *B. canis*, *B. ovis* et *B. neotomae*.

Tableau 2 : Caractéristiques des espèces de *Brucella* (d'après Papas et al., 2005; Garin-Bastuji, 2001 ; Hubalek et al., 2007)

Espèces	Biovars	Hôte(s)	Zone géographique	Pathogénicité chez l'homme
<i>B. melitensis</i>	1-3	moutons, chèvres, ongulés sauvages, camélidés	Pays méditerranéens Moyen-Proche orient	Elevée
<i>B. abortus</i>	1 à 4	bovins	Europe, Amérique	Modérée
	5, 6 et 9	ongulés sauvages, camélidés, yaks, buffles	Afrique et Asie	
<i>B. suis</i>	1 et 3	suidés	Amérique, Asie, Océanie, Chine	Elevée
	2	suidés, lièvres sauvages	Europe central Europe de l'ouest	Faible
	4	suidés, caribou, rennes	Amérique du nord Russie	Modérée
	5	rongeurs sauvages	Russie	Elevée
<i>B. canis</i>		canidés	USA Amérique du sud Europe centrale	Faible
<i>B. ovis</i>		ovins (mâles)	Pays méditerranéens	Aucune
<i>B. neotomae</i>		rats du désert	USA	Inconnue
<i>B. pinnipedialis</i>		pinnipèdes	Océan atlantique Nord Océan Pacifique	Quelques cas décrits
<i>B. ceti</i>		cétacés	Océan arctique Océan antarctique mer méditerranée	
<i>B. microti</i>		campagnols, renards	République Tchèque Autriche	Inconnue
<i>B. inopinata</i>		homme	USA	Inconnue

Les techniques d'hybridation ADN/ADN mettent en évidence plus de 90% d'identité des séquences ADN entre les différentes espèces. Il a été proposé par Verger et collaborateurs. (Verger et al., 1985) une espèce unique, *B. melitensis*, dans le genre *Brucella*, avec différents biovars. Néanmoins, à ce jour, le sous-comité de taxonomie des *Brucella* a conservé la classification en plusieurs espèces, classification justifiée par l'étude du phénotype, par l'épidémiologie, par l'importance de ces bactéries dans la santé animale et humaine et par l'utilisation potentielle de ces bactéries dans la guerre bactériologique (Pappas et al., 2006b). Malgré cette forte homologie, les premières études sur la variabilité génétique basées sur la digestion de l'ADN génomique par *HindIII* ont montré que *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. canis* et *B. ovis* présentaient des profils différents (O'Hara et al., 1985).

A partir des années 90, des souches de *Brucella* ont été isolées à partir de mammifères marins tels que dauphin, phoque, marsouin, baleine et loutre (Ewalt et al., 1994 ; Dawson et al., 2004 ; Ross et al., 1994, 1996 ; Foster et al., 1996 ; Clavareau et al., 1998 ; Abalos Pineda et al., 2009 ; Dagleish et al., 2008). Deux nouvelles espèces ont alors été proposées : *B. ceti* pour les *Brucella* isolées de dauphins, et *B. pinnipedialis* pour celles isolées de pinnipèdes, notamment phoques, otaries et morses (Foster et al., 2007). Cette nouvelle classification est basée sur la préférence d'hôte et sur différentes études de classification (Ohishi et al., 2003 ; Bricker et al., 2000 ; Cloeckart et al., 2001a ; Cloeckart et al., 2003 ; Dawson et al., 2008 ; Groussaud et al., 2007). Des hybridations ADN-ADN ont révélées un pourcentage d'identité supérieur à 77% entre ces nouvelles espèces issues de mammifères marins et les espèces de *Brucella* issues de mammifères terrestres, ce qui conforte l'idée d'un genre monospécifique (Verger et al., 2000 ; Bricker et al., 2000; Yanagi et al., 1993; Verger et al., 1985; Gandara et al., 2001).

En 2008, une neuvième espèce de *Brucella* a été identifiée : *B. microti*. Celle-ci a été isolée du campagnol des champs (*Microtus arvalis*) lors d'une épidémie de mortalité chez des campagnols du sud de la Moravie (République Tchèque), et a été retrouvée chez des renards rouges sauvages (*Vulpes vulpes*) en Autriche (Scholz et al., 2009a ; Hubálek et al., 2007). Après des tests basés sur le profil métabolique, ces souches furent identifiées au départ comme des souches d'*O. intermedium* avant d'être reconnues comme *Brucella* (Hubálek et al., 2007). Enfin, la découverte d'une souche bactérienne apparentée aux *Brucella* en 2009 aux Etats-Unis à partir de la prothèse mammaire d'une patiente, et nommée *B. inopinata* porte le nombre d'espèces de *Brucella* à 10 à ce jour (Scholz et al., 2009b).

d) *Le génome*

Le génome des *Brucella* suivantes a été entièrement séquencé : *B. melitensis* 16M, *B. abortus* 9-941, *B. abortus* S2308, la souche vaccinale *B. abortus* S19 , *B. suis* 1330 et *B. microti* CCM 4915 (Tableau 3). Quatre autres génomes de *Brucella* sont également accessibles sur GenBank : *B. melitensis* biovar 2, *B. suis* biovar 2, *B. ovis* 63/290 et *B. canis* RM6/66. Chaque cellule contiendrait environ 5 fg (fg = femtogramme, 10^{-15} g) d'ADN (Queipo-Ortuño et al., 2005), la présence de plasmide n'a jamais été décrite.

Tableau 3 : Génome séquencé des espèces de *Brucella*

Espèces	Taille des chromosomes	Numéro accession	Référence
<i>B. melitensis</i> 16M	1,17 Mpb 2,11 Mpb	AE008917 AE008917	Michaux et al., 1993 DeVecchio et al., 2002 Paulsen et al., 2002
<i>B. melitensis</i> biovar 2	1,18 Mpb 2,12 Mpb	CP001489 CP001488	GeneBank
<i>B. abortus</i> 9-941	2,12 Mpb 1,16 Mpb	AE017223 AE017224	Halling et al., 2005
<i>B. abortus</i> S2308	1,15 Mpb 2,12 Mpb	AM040264 AM040265	Chain et al., 2005
<i>B. abortus</i> S19	1,16 Mpb 2,12 Mpb	CP000888 CP000887	Crasta et al., 2008
<i>B. suis</i> 1330	2,10 Mpb 1,20 Mpb	AE014292 AE014291	Paulsen et al., 2002
<i>B. suis</i> biovar 2	1,40 Mpb 1,92 Mpb	CP000912 CP000911	GeneBank
<i>B. ovis</i> 63/290	1,18 Mpb 2,11 Mpb	CP000709 CP000708	GeneBank
<i>B. canis</i> RM6/66	1,20 Mpb 2,10 Mpb	CP000873 CP000872	GeneBank
<i>B. microti</i> CCM 4915	1,22 Mpb 2,12 Mpb	CP001579 CP001578	Audic et al., 2009

L'organisation chromosomique des espèces *B. abortus*, *B. ovis*, *B. neotomae* et *B. suis* biovar 1 présente une forte similarité avec celle de *B. melitensis* (Paulsen et al., 2002 ; Jumas-Bilak et al., 1998). On remarque que les espèces de *Brucella* possèdent la même organisation génomique à deux chromosomes à l'exception de *B. suis* biovar 3 qui ne possède qu'un seul chromosome de 3,1 Mpb. Tous ces éléments ont permis de proposer un schéma d'évolution (Figure 8) présentant l'espèce *B. suis* biovar 3 à un chromosome comme très proche de l'ancêtre commun des *Brucella* (Jumas-Bilak et al., 1998).

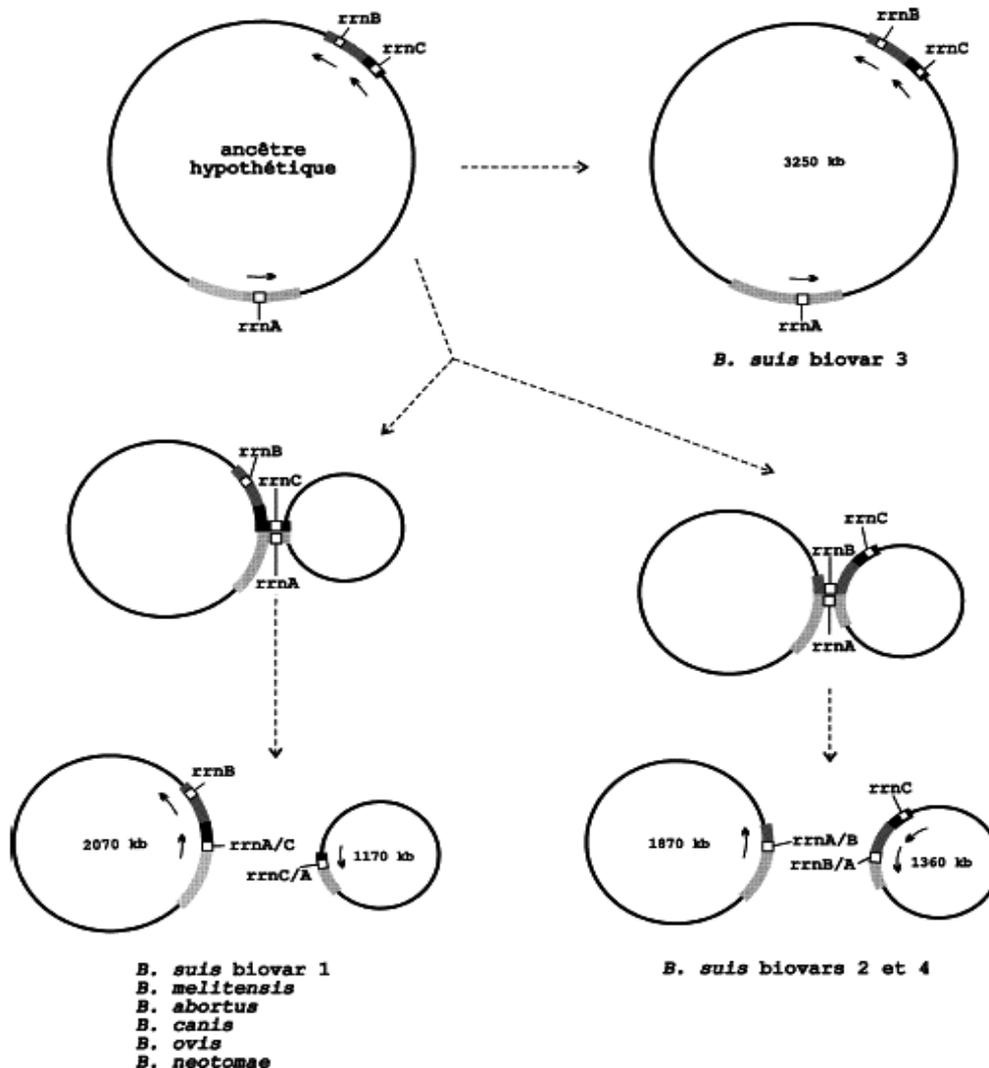


Figure 8 : Représentation de l'évolution possible de la structure génomique des différentes lignées de *Brucella* à partir d'un ancêtre commun possédant un seul chromosome (d'après Jumas-Bilak et al., 1998).

L'origine de réplication du chromosome II est typique des chromosomes bactériens, alors que l'origine de réplication du chromosome I est de type plasmidique. Malgré cela, on parle de deux chromosomes indépendants car ils contiennent des gènes essentiels à la survie et à la physiologie de la bactérie (Michaux et al., 1993 ; Michaux-Charachon et al., 1997). De plus, le pourcentage en guanosine et cytosine (% GC) est quasiment identique pour les deux chromosomes.

La diversité génomique des espèces de *Brucella* est limitée mais suffisante pour induire la spécificité d'hôte ainsi que des différences phénotypiques. En effet, contrairement à *B. ovis* et à *B. neotomae*, *B. abortus*, *B. melitensis* et *B. suis* sont pathogènes pour l'homme, alors que pour *B. canis* les infections humaines restent rares. De plus, les séquences génomiques des espèces *B. microti* et *B. suis* présentent 99,8 % d'identité sur les régions alignées malgré les différences de virulence et métaboliques constatées (Audic et al., 2009).

Des analyses génomiques réalisées sur les espèces *B. suis* et *B. melitensis* montrent que certains gènes sont uniques pour chaque espèce, et qu'ils sont essentiellement liés à des îlots génomiques (GI pour Genomic Island) (Paulsen et al., 2002).

En 2004, Rajashekara et collaborateurs ont comparés les génomes de cinq espèces différentes de *Brucella* (*B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* et *B. neotomae*) à celui de *B. melitensis* 16M, choisie comme référence pour sa forte pathogénicité pour l'homme. Après analyses par microarray et confirmation par PCR, les résultats ont mis en évidence la présence de 9 GIs (Rajashekara et al., 2004). Ces études ont montré que ces îlots étaient spécifiques d'une ou de plusieurs espèces de *Brucella*. Par exemple, 84 ORFs (Open Reading Frame ou cadre de lecture ouvert) retrouvés sur 5 GIs présents chez *B. melitensis* sont absents chez *B. ovis* Réo198 (Rajashekara et al., 2004). Ces GIs ont une taille qui varie de 4,4 kb (GI-7) à 44,1 kb (GI-5) et présentent entre 4 ORFs (GI-9) et 42 ORFs (GI-5) codant principalement pour des protéines hypothétiques, des régulateurs de transcription, des transposases ou des intégrases. Il a également été constaté que les GIs observés chez *B. melitensis* 16M présentaient un pourcentage en GC différent du reste du génome de *Brucella* spp., suggérant une acquisition par transfert horizontal. Deux de ces îlots, un de 15,1 kb (GI-2) et un autre de 44,1 kb (GI-5) présentent des caractéristiques des îlots de pathogénicité et sont flanqués aux extrémités par des séquences d'insertions (IS) et des gènes ARNt (Rajashekara et al., 2004) (Figure 9).

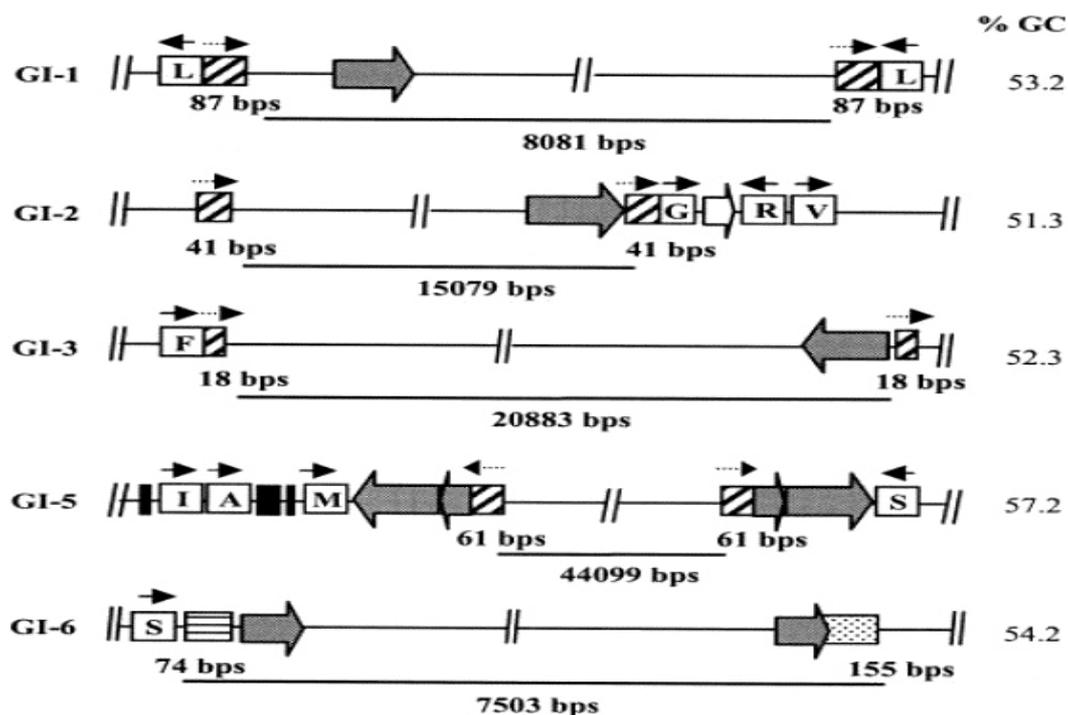


Figure 9 : Organisation génétique de 5 Ilots Génomiques GIs (GI-1, GI-2, GI-3, GI-5 et GI-6). Les gènes ARNt associés avec les GIs sont représentés par des cases blanches avec une lettre indiquant l'acide aminé codé, leur orientation de transcription est indiquée par une flèche pleine au-dessus de la boîte. Les boîtes noires indiquent les gènes ARNr. La ligne continue en dessous de chaque GI indique la taille de la séquence. Les ORFs codant des intégrases et les IS retrouvés aux extrémités des GI sont indiquées par des flèches gris clair. Le contenu en GC de chaque GI est indiqué sur la droite. (D'après Rajashekara et al., 2004).

L'îlot GI-2 de 15,1 kb comporte 20 ORFs codant pour des protéines hypothétiques, une transposase et une intégrase et 2 ORFs impliqués dans la biosynthèse du LPS (Vizcaino et al., 2004), et l'îlot GI-5 de 44,1 kb possède des ORFs qui codent pour des protéines de type ABC (*ATP-Binding Cassette*) : ces transporteurs importent ou exportent une grande variété de substrats en utilisant l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP (Mourez et al., 2000) dont les protéines homologues présentes chez d'autres bactéries comme *Agrobacterium tumefaciens* sont importantes pour la survie intracellulaire, l'interaction avec la cellule hôte et la virulence (Rajashekara et al., 2006). Cependant, Rajashekara et collaborateurs ont montré que la délétion de GI-5 n'avait pas d'effet sur la virulence, alors qu'une délétion de GI-2 chez *B. melitensis* 16M entraînait une atténuation de sa croissance dans les macrophages, une

baisse de virulence dans le modèle murins et une apparition de phénotype rugueux (Rajashekara et al., 2008).

On constate donc une variation des îlots génomiques entre les espèces de *Brucella*. Les îlots absents chez *B. ovis* sont présents chez les *Brucella* pathogènes pour l'homme et suggèrent leur implication dans la pathogénicité. Cependant, *B. neotomae* possède ces îlots alors qu'elle ne semble pas pathogène pour l'homme.

Les différences génétiques constatées entre les *Brucella* pourraient donc expliquer la différence de spécificité d'hôte et les différences de pathogénicité (Michaux-Charachon et al., 2002 ; Rajashekara et al., 2004).

e) Antigènes

Plusieurs composants antigéniques ont été caractérisés chez *Brucella*, dont certaines protéines membranaires, périplasmiques ou cytoplasmiques, mais l'immunogénicité du LPS est de loin la plus importante (Freer et al., 1995 ; Ko et Splitter., 2003 ; Michaux-Charachon et al., 2002).

Le LPS est caractérisé par une variation de phase, à l'origine des phénotypes lisses (S-LPS) et rugueux (R-LPS). Le LPS de toutes les *Brucella* en phase S possède des antigènes A et M inégalement répartis selon les espèces. L'antigène A domine chez *B. abortus*, l'antigène M chez *B. melitensis* et existe en proportion égale chez *B. suis*. Ceci explique pourquoi les *Brucella* en phase S agglutinent toutes avec un sérum anti-*Brucella* obtenu à partir de *B. melitensis*, *B. abortus* ou *B. suis*. Les *Brucella* en phase R, *B. canis* et *B. ovis* n'ont pas d'antigène A et M mais possèdent l'antigène R. Des sérums anti-R permettent l'agglutination de ces espèces (Tableau1).

Les chaînes latérales polysaccharidiques (chaîne O) du LPS-S sont constituées d'un homopolymère comprenant environ cent résidus de 4-formamido-4,6-didéoxy-D-mannopyranosyl, support essentiel des réactions croisées entre *Brucella* spp. et *Yersinia enterocolitica* O:9, ou plus accessoirement *Stenotrophomonas maltophilia*, *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae* O:1, *Escherichia hermannii*, *E. coli* O:157, et *Salmonella* O:30 (Corbel, 1997).

Des antigènes alternatifs ont été évalués et représentent des candidats sérieux pour le diagnostic de la brucellose ou l'élaboration de vaccins. Parmi ces antigènes, on retrouve les

protéines cytoplasmiques p17, p15, et p39 (Letesson et al., 1997), la protéine périplasmique BP26 (Cloekaert et al., 2001b ; Seco-Mediavilla et al., 2003), les protéines ribosomales L7/L12 (Bachrach et al., 1994) et une protéine cytoplasmique de 18 kDa (Goldbaum et al., 1993). Cependant, aucun de ces antigènes n'égale l'immunogénicité dominante du LPS, cible des tests diagnostics classiques qui présentent donc toujours de meilleures performances pour le moment.

Toutefois, le manque de spécificité des tests basés sur le LPS pousse depuis longtemps les chercheurs à mettre en place un test alternatif basé sur un autre antigène ayant la capacité de garder les mêmes propriétés de sensibilité tout en ayant une meilleure spécificité. Récemment, Kumar et collaborateurs ont produit des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine périplasmique BP26 pour la détection de *Brucella* spp. (Kumar et al., 2007). Ces anticorps ne présentent pas de réactions croisées avec *Y. enterocolitica* O: 9, *V. cholerae*, *S. Typhimurium*, et *E. coli* O157. Les auteurs ont également développé un test de type ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) basé sur la protéine BP26 recombinante pour une détection indirecte de *Brucella* spp. et présentent leurs résultats comme hautement sensibles et spécifiques (Kumar et al., 2008).

B. Relation entre *Brucella* et *Ochrobactrum*

1. Présentation du genre *Ochrobactrum*

a) Description

Les *Ochrobactrum* sont des bacilles à Gram négatif, non sporulés, aérobies stricts, mobiles, de phénotype oxydase et catalase positif et indole négatif.

La croissance des *Ochrobactrum* est rapide et optimale pour une température comprise entre 20 et 37 °C. Après 24 heures de culture à 37°C sur gélose Trypticase-Soja (TS), on observe différents aspects de colonies selon les espèces. Par exemple, les souches d' *O. anthropi* donnent des colonies opaques et non muqueuses contrairement aux colonies d' *O. intermedium* et d' *O. pseudintermedium* qui ont un aspect muqueux ou aux colonies d' *O. gallinifaecis* qui sont translucides. Les géloses au sang de mouton donnent également satisfaction.

b) Taxonomie

Le genre *Ochrobactrum* a été proposé en 1988 par Holmes et collaborateurs (Holmes et al., 1988) et la première espèce à avoir été décrite est *O. anthropi*. Le genre *Ochrobactrum* est phylogénétiquement très proche des genres bactériens faisant partie du groupe des alpha-protéobactéries, notamment des genres *Phyllobacterium* et *Brucella*. Sur la base de l'analyse de séquence de l'ARNr 16S, le genre *Ochrobactrum* a donc été intégré à la famille des *Brucellaceae* dans le sous-groupe alpha des protéobactéries (Teyssier et al., 2003). En 1998, Velasco et collaborateurs ont décrit une nouvelle espèce nommée *O. intermedium* car cette espèce présente avec *Brucella* 98,6% d'identité au niveau de la séquence d'ARNr 16S (Velasco et al., 1998).

Le genre *Ochrobactrum* est aujourd'hui composé de 11 espèces : *O. anthropi*, *O. intermedium*, *O. tritici*, *O. grignonense*, *O. gallinifaecis*, *O. lupini*, *O. oryzae*, *O. cytisi*, *O. pseudintermedium*, *O. haematophilum* et *O. pseudogrignonense* (Holmes et al., 1988 ; Kämpfer et al., 2003 ; Lebuhn et al., 2000 ; Teyssier et al., 2007 ; Tripathi et al., 2006 ; Trujillo al., 2005 ; Velasco et al., 1998 ; Zurdo-Piñeiro et al., 2007 ; Kämpfer et al., 2007). Récemment, deux nouvelles espèces très proches d'*Ochrobactrum* et de *Brucella* ont été identifiées, mais les données phylogénétiques, physiologiques et biochimiques ont conduit à classer ces souches dans un nouveau genre nommé *Pseudochrobactrum* (Kämpfer et al., 2006).

c) Manifestations cliniques

L'habitat des *Ochrobactrum* sp. est constitué par le sol, l'eau et les végétaux. Toutefois, *O. anthropi*, *O. intermedium* et *O. pseudintermedium* ont été isolées à partir de malades en tant que pathogènes opportunistes (Mahmood et al., 2000 ; Stiakaki et al., 2002 ; Teyssier et al., 2007).

La présence de ces espèces dans l'environnement hospitalier et leur résistance multiple aux antibiotiques (Higgins et al., 2001 ; Bizet et al., 1995), conduisent à une augmentation de leur isolement. Les infections les plus fréquemment décrites sont des bactériémies, des endocardites et des infections sur cathéters essentiellement chez des patients immunodéprimés (Stiakaki et al., 2002 ; Mahmood et al., 2000 ; Deliere et al., 2000 ; Saavedra et al., 1999 ; Gill et al., 1997 ; Cieslak et al., 1992). Le pouvoir pathogène de ces bactéries est considéré comme faible, néanmoins, certains cas cliniques suggèrent une virulence particulière de *O. anthropi*

et de *O. intermedium*. En effet, des infections sévères chez des patients immunocompétents causées par ces deux espèces ont été décrites et ressemblent étroitement aux infections causées par *Brucella* (Cieslak et al., 1996 ; Brivet et al., 1993). Par ailleurs, l'unique souche d'*O. gallinifaecis*, isolée à partir des fientes d'un poulet est la seule à présenter un intérêt en médecine vétérinaire (Kämpfer et al., 2003).

2. Relation entre *Brucella* et *Ochrobactrum*

L'espèce *O. anthropi* a été présentée comme l'espèce bactérienne la plus proche de *Brucella* (De Ley et al., 1987 ; Moreno, 1997; Velasco et al., 1998), puis, une nouvelle espèce d'*Ochrobactrum* s'est révélée plus proche encore du genre *Brucella* et a été nommée: *O. intermedium*. (Velasco et al., 1998). En effet, le pourcentage d'identité observé entre *O. intermedium* et *Brucella* spp. est de 98,6% pour le gène d'ARNr 16S, et seuls 2 acides aminés diffèrent entre les deux types de bactéries au niveau de la séquence protéique de la recombinase A (RecA).

Sur le plan protéique, une étude a montré que les OMPs, Omp10, Omp16 et Omp19, sont responsables de réactions sérologiques croisées entre *Brucella* spp. et *O. anthropi*, (Cloackaert et al., 1999). Barquero-Calvo et collaborateurs, ont démontré que *O. anthropi* n'était pas capable de pénétrer dans une cellule eucaryote, ni de se répliquer à l'intérieur des macrophages. De plus, une injection de *O. anthropi* chez la souris montre une endotoxicité plus modérée qu'une injection de *B. abortus* (Barquero-Calvo et al., 2009). Cependant, Seleem et collaborateurs ont montré de leur côté que *O. anthropi* était au contraire capable de pénétrer dans les macrophages (Seleem et al., 2008). Cette différence de résultats avec Barquero-Calvo et collaborateurs est probablement due à l'utilisation de 2 souches de *O. anthropi* différentes.

Contrairement à *Brucella* qui a évolué vers un mode de vie spécialisé en tant que pathogène strict et intracellulaire des mammifères, *Ochrobactrum* présente des modes de vie très variés : libre dans l'environnement, pathogène opportuniste de l'homme, symbionte des insectes, des nématodes et des oiseaux. Des études génomiques approfondies sur ces deux genres bactériens, différents sur leur mode de vie mais très proche génétiquement, permettront sûrement de mieux comprendre leur évolution (Teyssier et al., 2004).

C. Diagnostic des Brucelloses animales

1. Généralités

Le diagnostic est un ensemble de moyens permettant de confirmer l'origine d'une infection. Ces moyens sont variés et se traduisent soit par un diagnostic direct, soit par un diagnostic indirect.

Le diagnostic direct met en évidence la bactérie ou ses constituants.

La recherche directe de la bactérie est basée sur la culture et l'isolement, parfois sur milieu sélectif, permettant l'identification du pathogène. La durée d'incubation, la culture en aérobie ou en anaérobie, l'aspect des colonies, la présence d'hémolyse et l'antibiogramme sont ainsi pris en compte pour cette identification.

Les méthodes de biologie moléculaire font partie des techniques de diagnostic direct. L'amplification génique ou le séquençage de gène (celui codant pour l'ARNr 16S par exemple), sont de plus en plus utilisés dans les laboratoires. Des technologies plus récentes comme les puces à ADN, permettant de caractériser simultanément différentes bactéries dans un même échantillon présentent également un grand intérêt.

Le diagnostic indirect évalue la réponse de l'organisme à l'infection par la mise en évidence d'anticorps spécifiques.

Les anticorps sont recherchés, le plus souvent, dans le sang circulant après prise de sang. Parmi les techniques sérologiques on peut citer : les réactions d'agglutinations rapides sur lames ou en tubes avec des dilutions du sérum, les réactions de fixation du complément, la recherche d'anticorps par ELISA ou par immunofluorescence. La spécificité de ces tests est relative du fait de l'existence de réactions croisées avec d'autres bactéries ; la sensibilité varie selon le type de technique utilisée. Le sérodiagnostic est souvent un diagnostic de suspicion.

2. Diagnostic bactériologique

L'isolement de la bactérie vivante à partir de tissus ou de fluides biologiques reste la méthode de référence pour mettre en évidence avec certitude *Brucella*.

En brucellose humaine, divers prélèvements correspondant à des sites de localisation de *Brucella* peuvent être mis en culture, tels que des prélèvements de la moelle osseuse, du

liquide cérobrospinal ou encore de pus ; mais la recherche de *Brucella* se fait essentiellement à partir du sang du patient (hémoculture).

En brucellose animale, les sécrétions vaginales, l'enveloppe fœtale lors d'avortement, le sperme, l'urine ou le lait représentent un bon matériel biologique de départ pour la recherche de *Brucella* sur des milieux de culture sélectifs. L'addition d'antibiotiques appropriés aux milieux de culture permet d'éliminer d'éventuels contaminants présents dans les prélèvements biologiques. L'incubation est faite à 37°C en absence ou en présence de 5% de CO₂.

L'identification de l'espèce et du biovar des souches de *Brucella* mises en évidence est réalisée dans le laboratoire de référence. Cette étape d'identification est importante pour comprendre l'épidémiologie de la brucellose.

L'isolement et la caractérisation de l'agent pathogène présentent des inconvénients : la réalisation des manipulations est longue ; le pathogène doit être manipulé dans une zone confinée de type 3, par du personnel de laboratoire hautement qualifié ; de plus, la bactérie représente un risque pour le personnel de laboratoire de par le caractère zoonotique de la brucellose.

En 2001, une épidémie a provoqué une forte mortalité chez des campagnols en République Tchèque. Des coccobacilles à Gram négatif ont été mis en évidence. Deux souches isolées de ces animaux ont été identifiées comme des souches d'*O. intermedium* après étude bactériologique. De plus, l'utilisation d'une galerie API-20-NE, test biochimique miniaturisé basé sur le profil métabolique et permettant d'identifier des bacilles à Gram négatif a conduit à une identification d'*O. anthropi*. Cependant, ces 2 souches ont été identifiées comme étant des *Brucella* après des études taxonomiques basées sur les séquences des gènes d'ARNr 16S, de la protéine RecA, et des protéines membranaires Omp2a et Omp2b, ainsi que sur des hybridations ADN-ADN. (Hubálek et al., 2007; Scholz et al., 2008b).

En 2003, une autre erreur d'identification due à l'utilisation de galeries API-20-NE a été publiée : dans ce cas de brucellose humaine à *B. melitensis*, la première identification obtenue avec ces galeries était *O. anthropi* (Elsaghir et al., 2003).

Bien que le diagnostic de certitude reste le diagnostic bactériologique, les difficultés propres de sa mise en œuvre par un laboratoire de routine font de la sérologie, le recours le plus utilisé.

3. Diagnostic sérologique de *Brucella*

Le diagnostic indirect de la brucellose peut faire appel à plusieurs techniques sérologiques et peut être réalisé à partir du sérum et du lait essentiellement. Ces tests font intervenir des suspensions antigéniques de cellules entières inactivées de *B. abortus* biovar 1 en phase S. Les anticorps détectés sont alors pour la plupart, spécifiques d'épitopes portés par le LPS-S, et en partie par le LPS-R et certaines protéines membranaires.

- Le test de Wright détecte les anticorps du sérum (IgG2 et IgM) qui permettent l'agglutination des cellules de *Brucella*. Dans la majeure partie des cas, ce test ne permet pas de dépister l'infection chronique.

- Le test de fixation du complément met en évidence, une fois liés à leur antigène, les anticorps (IgG1 et IgM) fixant le complément. Ce test quantitatif est très sensible.

- Le test au Rose Bengale est un test qualitatif rapide d'agglutination sur lame. Il met en évidence les anticorps sériques agglutinants (IgG1 et IgM). Ce test est plus sensible et plus spécifique que le test de Wright. Le test au Rose Bengale est surtout utilisé comme test de dépistage de masse et confirmé par un test de fixation du complément ou un ELISA individuel.

- L'ELISA utilise comme antigène le LPS-S. Ce test est équivalent au test de fixation du complément en terme de sensibilité et de spécificité. Il peut être réalisé sur des sérums ou sur des laits dans les cheptels laitiers. Son grand avantage est d'être automatisable et d'être facilement et rapidement utilisable comme outil de confirmation. Cependant, ce test très sensible, présente une spécificité plus faible que l'épreuve du Rose Bengale ou que le test de fixation du complément.

- L'épreuve de l'anneau (ou ring-test) permet de mettre en évidence les anticorps (IgA principalement) présents dans le lait de l'animal: l'ajout de bactéries colorées provoque un anneau coloré en présence d'anticorps. L'épreuve de l'anneau peut être utilisée pour le dépistage des troupeaux laitiers infectés car elle est pratique, rapide et peu coûteuse. Son désavantage est le nombre élevé de réactions douteuses dues à une faible sensibilité et nécessitant alors une confirmation par ELISA.

Les défauts de sensibilité ou de spécificité de ces méthodes nécessitent souvent l'association de plusieurs d'entre elles. Aucun de ces tests ne permet à lui seul de détecter à la fois les patients ou les animaux récemment infectés et ceux qui sont porteurs latents ou chroniques.

De plus, ces tests permettent la détection des anticorps issus aussi bien de sujets infectés que de sujets vaccinés.

Les tests au Rose Bengale et l'ELISA, complétés si besoin par la fixation du complément restent les épreuves standardisées les plus fiables et les plus utilisées aujourd'hui pour le dépistage de la brucellose.

L'antigène majeur de *Brucella* est le LPS-S ; aussi, la majorité des anticorps produits chez l'hôte infecté sont spécifiques d'épitopes portés par cette molécule, mais certains de ces épitopes présentent des réactions croisées principalement avec d'autres bactéries à Gram négatif incluant *E. coli* O116 et O157, *F. tularensis*, *S. urbana* O:30, *V. cholerae*, *Xanthomonas maltophilia*, *Afipia clevelandensis*, et essentiellement avec *Y. enterocolitica* O:9 (Young, 1991; Wrathall et al., 1993; Garin-Bastuji et al., 1999; Nielsen et al., 2004). Ces réactions croisées sont causées par la chaîne O du LPS-S (Díaz-Aparicio et al., 1993). En effet, les résidus de 4-formamido-4,6-didéoxy-D-mannopyranosyl et leur type de liaisons qui composent la chaîne O du LPS sont très similaires chez *Brucella* spp. et *Y. enterocolitica* O:9. Ces réactions sont d'autant plus contraignantes que *Y. enterocolitica* O:9 est fréquemment retrouvée chez l'homme, le porc et les bovins (Garin-Bastuji, 1993a; Stenstad et al., 2007; Fredriksson-Ahomaa et al., 2007).

4. Diagnostic moléculaire

Le diagnostic moléculaire le plus utilisé est la PCR. Depuis quelques années, l'utilisation de la technique de PCR en temps réel dans le diagnostic de la brucellose se multiplie (Newby et al., 2003 ; Al Dahouk et al., 2004 ; Probert et al., 2004).

En 1990, Fekete et collaborateurs mettent au point le premier diagnostic direct par PCR pour la détection du genre *Brucella*, basé sur le gène *omp43* de *B. abortus* S19 (Fekete et al., 1990). Les auteurs démontrent que le test est spécifique de toutes les espèces et biovars de *Brucella* testés, et sensible en détectant moins de cent bactéries. Cependant, les séquences de la cible et des amorces n'ont pas été publiées.

Par conséquent, les chercheurs se sont intéressés au gène de l'ARNr 16S. En 1992 Herman et De Ridder mettent au point une PCR basée sur ce gène (Herman et De Ridder, 1992). Sur 17 bactéries non *Brucella* utilisées, le test révèle une réaction croisée avec *O. anthropi*. Des résultats identiques sont obtenus en 1995 par Romero et collaborateurs, qui analysent neuf combinaisons d'amorces différentes basées sur le même gène (Romero et al., 1995). Cette fois

ci, trois souches différentes d' *O. anthropi* sont testées. Une des trois souches croise avec *Brucella* lors de cette étude. Une région plus variable est utilisée par Rijpens et collaborateurs (Rijpens et al., 1996), la région ITS ("Intergenic Transcribed Spacer") située entre les gènes des ARNr 16S et 23S. Un total de 47 bactéries non *brucella* sont utilisées pour tester la spécificité de la PCR, dont neuf souches différentes d'*O. anthropi*. Les réactions croisées constatées avec les souches d'*O. anthropi* sont éliminées par augmentation de la température d'hybridation.

En 1992, une nouvelle PCR basée sur le gène *bcs31* codant une protéine de surface de 31 kDa (BCSP31 pour *Brucella* Cell Surface Protein) est testée par Baily et collaborateurs (Baily et al., 1992). Les auteurs montrent que la PCR est spécifique de *B. melitensis* et de *B. abortus*. Basée sur *bcs31*, Da Costa et collaborateurs mettent au point une PCR spécifique de toutes les espèces et biovars de *Brucella* et constatent que sur un panel de 98 bactéries non *Brucella*, seule *O. anthropi* présente une réaction croisée (Da Costa et al., 1996). Résultats confirmés par Casañas et collaborateurs (Casañas et al., 2001).

Depuis, de nombreux auteurs ont continué à utiliser le gène *bcs31* comme cible pour la détection de *Brucella*, (Matar et al., 1996 ; Queipo-Ortuño et al., 1997 ; Morata 2003 ; Debeaumont et al., 2005).

En 2004, une PCR en temps réel basée sur un autre gène conservé, le gène *per* codant la pérosamine synthétase impliquée dans la biosynthèse du LPS (CloECKaert et al., 2000b), est testée. Le test se révèle spécifique sur le panel de 174 bactéries non *Brucella* testé (Bogdanovich et al., 2004). Parmi les bactéries testées, se trouvaient des bactéries possédant le gène *per* telles que *E. hermanni*, *E. coli* O:157, *Stenotrophomonas maltophilia*, *V. cholerae* O:1, et *Y. enterocolitica* O:9.

La PCR en temps réel, qui a l'avantage de présenter une meilleure spécificité qu'une PCR conventionnelle grâce à l'utilisation d'une sonde, est maintenant très utilisée pour la détection du genre *Brucella* (Bogdanovich et al., 2004). La plupart des analyses par PCR sont encore basées sur le gène *bcs31* malgré son manque de spécificité, considérant que les infections à *O. anthropi* sont rares et facilement distinguables de la brucellose (Bricker, 2002 ; Debeaumont et al., 2005; Queipo-Ortuño et al., 2005; Probert et al., 2004).

En brucellose humaine, chez les patients atteints de brucellose focalisée, divers supports peuvent être utilisés pour la détection de *Brucella* : urine, liquide synovial, pus d'abcès, liquide cérébro-spinal, tissu osseux, etc. (Queipo-Ortuño et al., 2006 ; Morata et al., 1998).

Mais, les deux principales matrices utilisées en PCR sont le sang et le sérum (Zerva et al., 2001 ; Vrioni et al., 2004; Queipo-Ortuño et al., 1997 ; Navarro et al., 2002). Néanmoins, il semblerait que le sang total soit un support moins approprié, du fait des effets inhibiteurs des molécules d'hème et des fortes concentrations en ADN de leucocytes (Zerva et al., 2001; Morata et al., 1998).

Lors du diagnostic de la brucellose animale, le choix des tissus pour l'utilisation de la PCR est plus varié. Ainsi, des PCR ont été décrites à partir de différents échantillons : de sang (Guarino et al., 2000 ; Leal-Klevezas et al., 1995), de lait (Romero et al., 1995 ; Hamdy et al., 2002), de sécrétion nasale (Sreevatsan et al., 2000), de rate (Gallien et al., 1998), de sperme (Manterola et al., 2003 ; Amin et al., 2001), de ganglions lymphatiques (O'Leary et al., 2006) et de fœtus avorté (Fekete et al., 1992 ; Leyla et al., 2003). La difficulté majeure provient de la présence possible d'inhibiteurs de PCR et/ou d'une quantité trop importante d'ADN pouvant interférer sur la PCR selon l'origine des échantillons.

D. Gènes et protéines d'intérêt de l'étude

1. Gène *bcs*31

En 1979, quatre protéines périplasmiques sont identifiées et appelées « *Brucella* cell surface protein », parmi lesquelles, une protéine de 31 kDa codée par le gène *bcs*31 qui a été cloné et séquencé par la suite (Tabatabai et al., 1979 ; Mayfield et al., 1988). BCSP31 est une protéine immunogène, très conservée au sein du genre *Brucella*, mais cependant absente chez *B. ovis* : la présence d'une séquence d'insertion d'environ 0,9 kb, identifiée plus tard comme l'IS711 et située en aval du gène *bcs*31 empêche l'expression de la protéine (Bricker et al., 1988 ; Halling et Zehr, 1990). Cette protéine périplasmique de 31 kDa n'a pas de lien avec l'Omp 31, une protéine membranaire décrite chez les *Brucella*, exceptée chez *B. abortus* (Vizcaino et al., 1996, 1999). BCSP31 ne semble pas être essentielle pour le développement des *Brucella* car elle n'est pas exprimée chez *B. ovis* et la délétion du gène de cette protéine n'a pas d'incidence sur l'invasion, la croissance ou la réplication de *B. abortus* dans les macrophages (Halling et al., 1991). Le locus de *bcs*31 est le premier à avoir été cloné et séquencé (Mayfield et al., 1988), ce qui a conduit de nombreux auteurs à l'utiliser comme gène de référence dans le diagnostic moléculaire (Queipo-Ortuno et al., 1997, 2009 ; Matar et al., 1996 ; Morata et al., 1998, 2001 ; Baily et al., 1992).

2. Séquence d'insertion IS711 et séquence répétées BRU-RS1, BRU-RS2

Les séquences d'insertion sont largement représentées au sein du monde bactérien. Elles ne contiennent que les informations nécessaires à leur transposition (Mahillon et Chandler, 1998). Bien que muettes au niveau phénotypique, elles sont souvent associées à des acquisitions ou des pertes de fonctions (Merlin et Toussaint, 1999). Les IS ont récemment été cataloguées en 17 familles et sont bordées par des séquences répétées inversées (IR) qui sont reconnues par la machinerie de transposition.

C'est en 1990 qu'une séquence d'insertion est découverte dans le génome de *Brucella ovis*, en remarquant une insertion en aval de la séquence du gène *bcs31*, empêchant l'expression de la protéine (Halling et Zehr, 1990). En 1993, elle est caractérisée et séquencée à partir de *Brucella ovis*, et on lui donne l'appellation de IS711 (Halling et al., 1993) ou de IS6501 (Ouahrani et al., 1993). Il est également constaté que la séquence est présente en plusieurs copies, mais en nombre variable d'une espèce à l'autre. Puis, 4 nouvelles IS sont identifiées par Godfroid et collaborateurs : ISBm1, ISBm2, ISBm3 et ISBm4 (Godfroid et al., 2000), ainsi que l'IS2020 par Halling et Zuerner (Halling et Zuerner, 2002). Ces IS présentent de fortes similitudes avec les IS d'autres bactéries comme *A. tumefaciens*, *Caulobacter crescentus* ou encore *Paracoccus denitrificans* (Godfroid et al., 2000 ; Halling et Zuerner, 2002). Son nombre de copies, sa distribution au sein du génome des *Brucella* et sa spécificité font de l'IS711 la séquence d'insertion la plus étudiée (Halling et al., 1993 ; Ouahrani et al., 1993 ; Bricker et al., 2000 ; Cloeckert et al., 2000a).

L'IS711 appartient à la famille des IS5 composée de 47 membres, elle même appartenant au groupe des IS427. La séquence est bordée par 2 séquences IR, l'une de 20 pb et l'autre de 25 pb et possède une longueur de 842 pb avec un pourcentage en GC égal à 54%. L'IS6501 possède les mêmes caractéristiques mais présente une séquence de 844 pb et un pourcentage d'identité de 99% avec l'IS711 (Figure 10).

```

B. ovisIS711-M94960      --GGGCTTGTCTGCATTCAAGGATTCCCTTTTGTACGAAATTCTGATTCAAGGTGTGTTA 57
B. ovisIS6501-X71024    CTAGAGCTTGTCTGCATTCAAGGATTCCCTTTTGTACGAAATTCTGATTCAAGGTGTGTTA 60
      * *****

B. ovisIS711-M94960      AAGGAGAACAGCCGTGAGCAGACGAAGCCTTACAGATGAGCAATGGAACCGGATCGAAGC 117
B. ovisIS6501-X71024    AAGGAGAACAGCCGTGAGCAGACGAAGCCTTACAGATGAGCAATGGAACCGGATCGAAGC 120
      *****

B. ovisIS711-M94960      ATATCTTCCGGGGCGAGTTGGTACGCCCGCCGCGAGTGGCGTTGATAACCGATTATTTGT 177
B. ovisIS6501-X71024    ATATCTTCCGGGGCGAGTTGGTACGCCCGCCGCGAGTGGCGTTGATAACCGATTATTTGT 179
      *****

B. ovisIS711-M94960      CGACGCCATCTTGTGGATGGCTGCCAATGCAGCGCACTGGCGCGATCTGCCTGCGACCTT 237
B. ovisIS6501-X71024    CGACGCCATCTTGTGGATGGCTGCCAATGCAG-GCACTGGCG--ATCTGCCTGCGACCTT 236
      *****

B. ovisIS711-M94960      CGGCAAATGGACAGCGGTTTCATGCCCGCTTTCGGCGCTGGTCGCACGCCGGTGTATGGGA 297
B. ovisIS6501-X71024    CGGCAAATGGACAGCGGTTTCATGCCCGCTTTCGGCGCTGGTCGCACGCCGGTGTATGGGA 296
      *****

B. ovisIS711-M94960      AAGGCTTTTCCATGCCCTGGCTGATACGCCGACTTTGAATATGTCTCATTGATAGCAC 357
B. ovisIS6501-X71024    AAGGCTTTTCCATGCCCTGGCTGATACGCCGACTTTGAATATGTCTCATTGATAGCAC 356
      *****

B. ovisIS711-M94960      CATATCGAAAGTCCACGCAGATGCGCGGGCGCAAAGGGGGGCTGAAGTGCCTGCATC 417
B. ovisIS6501-X71024    CATATCGAAAGTCCACGCAGATGCGCGGGCGCAAAGGGGGGCTGAAGTGCCTGCATC 416
      *****

B. ovisIS711-M94960      GGTTCGCTCGCGCGGTGGATTGACGACCAAGCTGCATGCTGTTGTCGATGCTATCGGCCTA 477
B. ovisIS6501-X71024    GGTTC--TCGCGCGGTGGATTGACGACCAAGCTGCATGCTGTTGTCGATGCTATCGGCCTA 474
      ****

B. ovisIS711-M94960      CCGCTGCGAATAAAGCCAACACCCGGCCATTATGGTGACTGTCCGCAAGCTTCAAGCCTT 537
B. ovisIS6501-X71024    CCGCTGCGAATAAAGCCAACACCCGGCCATTATGGTGACTGTCCGCAAGCTTCAAGCCTT 534
      *****

B. ovisIS711-M94960      CTATCCGGCTTGAAGGGTGTGGGCATGTCATTGCTGATGCAGCCTATGATGCCGATCAC 597
B. ovisIS6501-X71024    CTATCCGGCTTGAAGGGTGTGGGCATGTCATTGCTGATGCAGCCTATGATGCCGATCAC 594
      *****

B. ovisIS711-M94960      TTAAGGGCCTTCATTGCCAGCAATCTCAAGGCAACGGCTCAGATCAAGGTCAATCCAACA 657
B. ovisIS6501-X71024    TTAAGGGCCTTCATTGCCAGCAATCTCAAGGCAACGGCTCAGATCAAGGTCAATCCAACA 654
      *****

B. ovisIS711-M94960      CGTTCCAGTGTCCCAACAATCGACTGGAGGCTGTACAAGGAACGCCATCAGATTGAATGC 717
B. ovisIS6501-X71024    CGTTCCAGTGTCCCAACAATCGACTGGAGGATGTACAAGGAACGCCATCAGATTGAATGC 714
      *****

B. ovisIS711-M94960      TTTTFTAACAAGTTGAAACGCTATCGTCGTATTGCGCTGCGATGCGAGAAAACATTGACC 777
B. ovisIS6501-X71024    TTTTFTAACAAGTTGAAACGCTATCGTCGTATTGCGCTGCGATGCGAGAAAACATTGACC 774
      *****

B. ovisIS711-M94960      GCATTCATGGGCTTCGCTCCATCTCGCATGCGCTATGATCTGGTTACGTTGAATGCAGA 835
B. ovisIS6501-X71024    GCATTCATGGGCTTCGCTCCATCTCGCATGCGCTATGATCTGGTTACGTTGAATGCAGA 834
      *****

B. ovisIS711-M94960      CACGCC-- 842
B. ovisIS6501-X71024    CACGCTCTAG 844
      *****

```

Figure 10 : Alignement des séquences IS711 et IS6501 de *B. ovis*. Les substitutions sont surlignées en gris.

Deux ORFs, ORFA et ORFB, codent chacune une transposase. La synthèse de la transposase (ORFB) résulte d'un déphasage programmé en -1 de la traduction entre deux cadres ouverts de lecture avec la présence de la séquence 5'-CAAAGGGGGGC-3' comme site de décalage du cadre de lecture entre les 2 ORFs (D'après <http://www-is.biotoul.fr/is.html>, Figure 11).

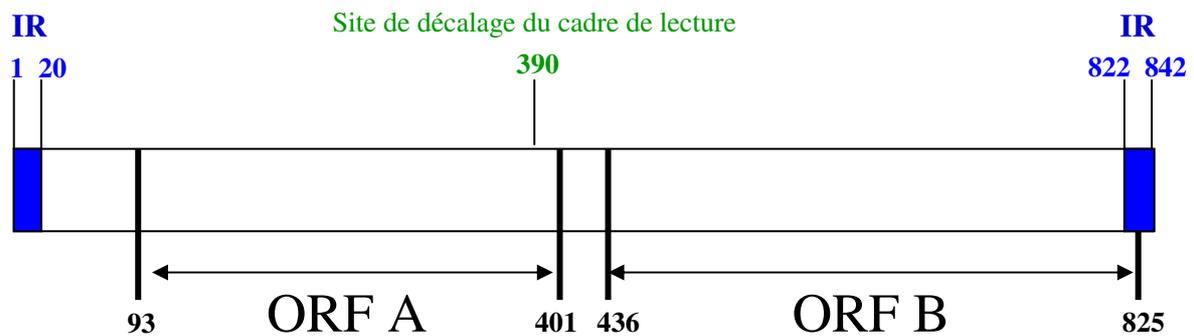


Figure 11 : Représentation schématique d'organisation de l'IS711.

Les positions indiquées sur le schéma ont été obtenues après un alignement de la séquence d'insertion IS711 de *B. ovis* (Numéro accession : NC_009505 ; région 545562-546403), de l'ORF A (Numéro accession : NC_009505 ; région 545654-545965 et de l'ORF B (Numéro accession : NC_009505 ; région 545997-546389).

A ce jour, l'IS711 n'a été identifié que dans le génome de *Brucella* spp. avec un nombre de copies allant de 6 copies pour *B. canis* par exemple, à 38 copies pour *B. ovis* (Halling et al., 1993 ; Ouahrani et al., 1993), ce qui la rend spécifique du genre *Brucella*. Sa spécificité et sa stabilité en font un marqueur intéressant de genre, d'espèces et de biovars de *Brucella*.

Différents profils basés sur la distribution de l'IS711 ont par exemple été obtenus à partir de différentes espèces et biovars de *Brucella* par hybridation (Ouahrani et al., 1993; Bricker et al., 2000) ou par PCR (Bricker et Halling, 1994, 1995; Ouahrani-Bettache et al., 1996; Cloeckaert et al., 2000a).

Par ailleurs, la distribution de l'IS711 chez plusieurs isolats de mammifères marins, a permis de révéler plus de 25 copies de cette séquence d'insertion. Suite à ces résultats, l'existence de nouvelles espèces de *Brucella* isolées à partir de mammifères marins a été proposée (Bricker et al., 2000), ce qui a conduit à l'identification des 2 nouvelles espèces : *B. pinnipedialis* et *B. ceti*. L'IS711 est spécifique et stable vis à vis du genre *Brucella* mais la transposition de l'IS711 a été montrée chez *B. ovis* et *B. pinnipedialis*, et non chez *B. melitensis* 16M et

B. abortus RB51 testées pour leur faible nombre de copies d'IS711 dans leur génome, ce qui suggère l'activité et la capacité de l'IS à transposer, notamment chez les espèces de *Brucella* possédant un nombre important de copies (Ocampo-Sosa and García-Lobo, 2008).

BRU-RS1 et BRU-RS2 sont des séquences d'ADN répétées de 103 et 105 pb respectivement. Ces 2 éléments palindromiques ont 65% d'identité et sont présents en plus de 35 copies chez *Brucella* spp. BRU-RS1 et BRU-RS2 sont fortement conservés au sein du génome des *Brucella* et sont considérés comme des sites préférentiels d'insertion de l'IS711 (Halling et Bricker, 1994 ; Halling et Zehr, 1990). Des études d'hybridation montrent une faible variabilité dans la distribution des éléments BRU-RS au sein des *Brucella* (Halling et Bricker, 1994).

Cependant, il semble que l'IS711 et les BRU-RS n'ont pas été acquis en même temps puisque le nombre de BRU-RS est approximativement identique entre les différentes espèces de *Brucella* alors qu'une variation importante de distribution de l'IS711 est observée.

Enfin, après analyse de la séquence de BRU-RS1 de *B. abortus* (numéro d'accension : L24473) en utilisant le logiciel BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) nous constatons qu'il n'existe de similitude (96%) qu'avec le génome d'*O. anthropi* seulement (numéro accession : CP000758.1).

3. Protéines membranaires : Omp10, Omp16 et Omp19

Les protéines Omp10, Omp16 et Omp19 (Omp = Outer membrane protein) de taille 10, 16,5 et 19 kDA respectivement, sont des lipoprotéines de la membrane externe et qualifiées de protéines mineures car elles sont peu abondantes (Cloeckert et al., 1990, 1992 ; Tibor et al., 1994, 1996, 1999).

Les gènes des lipoprotéines *omp19*, *omp16* et *omp10* présents chez *B. abortus* et *O. anthropi* sont orthologues, c'est à dire que la séquence de chaque gène est très similaire entre les deux espèces et proviendrait d'un ancêtre commun (Barquero-Calvo et al., 2009).

Il a été montré que *Brucella* était capable de stimuler une inflammation médiée par les cytokines *via* les lipoprotéines Omp16 et Omp19 (Giambartolomei et al., 2004), et qu'une délétion de l'*omp19* avait une influence sur les propriétés de la membrane externe et la virulence chez la souris (Tibor et al., 2002).

Les gènes codant pour les OMPs : *Omp10*, *Omp16* et *Omp19*, ont été utilisés pour l'étude du polymorphisme de *Brucella* par la technique de Southern Blot (Vergier et al., 1998).

Vergier et collaborateurs ont montré que la protéine Omp19 de *Brucella ovis* présentait une taille plus importante que celles des autres espèces de *Brucella* (Tibor et al., 1996), mais aucun polymorphisme significatif n'a été constaté entre les différentes espèces de *Brucella*, ni pour l'*omp19* ni pour l'*omp10*. En revanche, *B. suis* biovar 2 présente un profil spécifique après étude de l'*omp16* (Vergier et al., 1998).

4. Protéine périplasmique : BP26

Le gène *bp26* code pour une protéine périplasmique immunogénique de 26kDa. Le gène a été cloné et séquencé en 1996 à partir des espèces *B. abortus* et *B. melitensis* (Rossetti et al., 1996 ; Cloeckert et al., 1996a). La même année, la protéine avait été identifiée par microscopie électronique et cytométrie de flux de façon erronée comme étant une protéine de la membrane externe et avait été nommée Omp28 (Lindler et al., 1996). Il a été montré que BP26 est fortement reconnue par des anticorps de sérums issus d'animaux infectés, contrairement aux anticorps issus de sérums d'animaux vaccinés (Rossetti et al., 1996; Cloeckert et al., 1996a; Lindler et al. 1996). Cette protéine représente donc un antigène de diagnostic intéressant pour la distinction entre des animaux infectés et des animaux vaccinés (Salih-Alj Debbarh et al., 1996 ; Cloeckert et al., 1996b).

Le polymorphisme du gène *bp26* a permis de distinguer par PCR les isolats issus de mammifères marins des *Brucella* isolées de mammifères terrestres (Cloeckert et al., 2000a), ce qui suggère son utilisation comme marqueur spécifique des *Brucella* issues de mammifères marins. D'ailleurs, deux cas de neurobrucellose humaine ont pu être identifiés et attribués à des *Brucella* issues de mammifères marins de cette façon (Sohn et al., 2003).

5. Gène pérosamine synthétase (*per*)

Un cluster de 14 kb contenant des gènes essentiels à la biosynthèse de la chaîne-O du LPS a été identifié chez *B. melitensis* 16M par Cloeckert et collaborateurs (Cloeckert, 2000b) sous l'appellation de *wbk*. Ce cluster existe également chez d'autres bactéries comme *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* et *Vibrio cholerae* sous le nom de *rfb* (Wang et al., 1992 ; Zhang et al., 1993, 1996; Godfroid et al., 1998 ; Zhao et al., 2007). Ces gènes sont regroupés sur un cluster nommé *wbk* et correspondent aux gènes : *wbkA*, *gmd*, *per*,

wzm, *wzt*, *wbkB*, et *wbkC*, codant respectivement pour des protéines homologues à la mannosyltransferase, la GDP-mannose 4,6 déshydratase, la périrosamine synthétase, au domaine transmembranaire des protéines de transport de type ABC, au domaine ATPase des protéines de transport de type ABC, à une protéine hypothétique à fonction inconnue et à une formyl transférase (Figure 12).

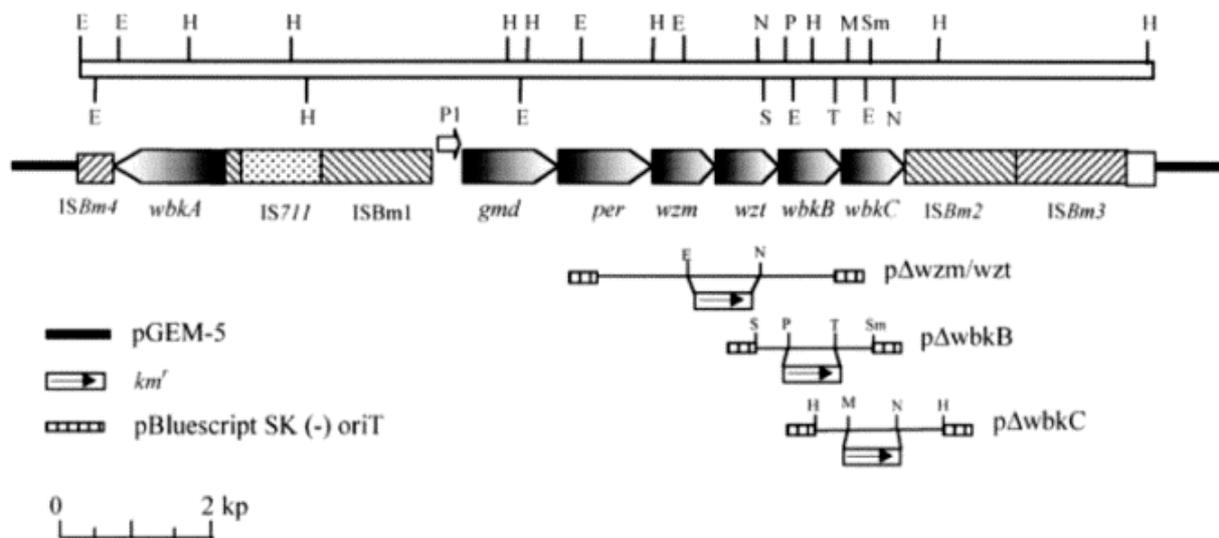


Figure 12 : Organisation génétique du cluster *wbk* chez *B. melitensis* 16M.

Le cluster est composé de 7 gènes essentiels à la biosynthèse de la chaîne-O du LPS et de 5 séquences d'insertion : l'IS711, l'ISBm1, l'ISBm2, l'ISBm3 et l'ISBm4 tronquée. (D'après Godfroid et al., 2000).

Le gène *per* appelé également *rfbE* a été découvert en 1998 et code pour la périrosamine synthétase (Godfroid et al., 1998). Ce gène *per* a été séquencé et se trouve très conservé au sein du genre *Brucella* (Godfroid et al., 1998 ; Cloeckart et al., 2000b). Il est également présent avec des degrés de similarité variés chez *E. hermanni*, *E. coli* O:157, *S.* groupe N O:30, *S. maltophilia*, *V. cholerae* O:1, et *Y. enterocolitica* O:9 (Perry et Bundle, 1990 ; Moreno et al., 2002). La périrosamine est convertie en GDP-périrosamine par la périrosamine synthétase. Cette GDP-périrosamine devient alors un constituant de l'antigène O (Cardoso et al., 2006).

Le pourcentage en GC du cluster *wbk* (entre 44% et 49%) est inférieur à celui du reste du génome de *Brucella* (56-58% d'après Godfroid et al., 2000), tout comme le pourcentage en

GC des clusters *rfb* par rapport au reste du génome des espèces *S. enterica*, *Y. enterocolitica* et *E. coli* O157:H7, ce qui suggère une acquisition du cluster par transfert horizontal à partir d'un micro-organisme différent (Wang et al., 1992 ; Zhang et al., 1993, 1996; Zhao et al., 2007).

Les réactions croisées observées en sérologie entre *Brucella* et *Y. enterocolitica* O:9 et la présence du gène *per* chez les deux bactéries ont conduit Lübeck et collaborateurs à mettre en œuvre une PCR multiplexe basée sur ce gène afin de faire la distinction entre ces deux bactéries (Lübeck et al., 2003).

E. But de l'étude

Comme nous venons de le voir, les méthodes d'identification des *Brucella* sont encore confrontées à des défauts de sensibilité et de spécificité. La bactériologie est la méthode de référence qui permet de diagnostiquer une brucellose. Cependant, la méthode est longue et présente un risque pour le personnel de laboratoire. D'autres techniques de diagnostic comme les tests sérologiques sont communément utilisées pour la détection des infections à *Brucella* mais des réactions croisées sont observées avec d'autres bactéries, notamment avec *Y. enterocolitica* O :9. La PCR est une autre méthode, rapide et qui peut être réalisée à partir de plusieurs types d'échantillons biologiques. Cependant des défauts de spécificité ont régulièrement été observés vis à vis d'*O. anthropi*. Les PCRs en temps réel, permettent quand à elle d'améliorer la spécificité des techniques moléculaires et d'accélérer le diagnostic du genre *Brucella*.

L'objectif principal de cette thèse est le développement d'un test diagnostique moléculaire rapide, sensible et spécifique pour la détection du genre *Brucella* dans des prélèvements biologiques, basé sur la PCR en temps réel. Pour ce faire, une analyse des données disponibles dans la littérature nous a permis d'identifier trois gènes utilisés pour la détection de *Brucella* : les gènes IS711, *bcp31* et *per*. Dans un premier temps nous nous sommes attachés à mettre au point des PCR en temps réel basées sur la technologie TaqMan à partir de ces gènes puis à les mettre en oeuvre sur des prélèvements biologiques.

Afin d'évaluer les avantages de cette technique dans un but diagnostique, nous l'avons confrontée à la bactériologie, utilisée jusqu'alors comme la méthode de référence pour l'identification de *Brucella*.

La littérature décrit le genre *Ochrobactrum* comme le plus proche voisin phylogénétique du genre *Brucella*. Par ailleurs, l'existence de réactions croisées observées en PCR et les difficultés d'identification d'*O. anthropi* et de *B. microti* citées dans la littérature nous ont amené à étudier les relations entre ces deux genres au niveau moléculaire.

Ainsi, la séquence d'insertion IS711, spécifique de *Brucella* et la séquence BRU-RS ont été recherchées chez *Ochrobactrum*. Puis, des travaux ont été menés sur les protéines Omp10, Omp16, Omp19 et BP26 afin de rechercher sur ces 4 protéines des épitopes communs entre *Brucella* et *Ochrobactrum*.

RESULTATS

II. RESULTATS

A. Résultats de la 1^{ère} partie : Développement d'un outil de diagnostic du genre *Brucella* basé sur la PCR temps réel

1. Détection des *Brucella* par la technique de PCR conventionnelle et en temps réel
 - a) *Choix des cibles*

Cette étude nous a permis de comparer les performances de la PCR conventionnelle (PCR-conv) avec celle de la PCR en temps réel (PCR-TR). En PCR-conv nous avons décidé de travailler avec des amorces déjà publiées ciblant les gènes :

- *bcs31* avec les amorces B4/B5 et Bruc887/Bruc1457 en simple amplification, et les amorces Bruc968/Bruc1404 en double amplification (Baily et al., 1992 ; Da Costa et al., 1996)
- *per* avec les amorces bruc1/bruc5 en simple amplification (Bogdanovich et al., 2004)
- IS711 avec les amorces IS313/IS639 en simple amplification, et en double amplification avec les amorces IS340/IS576 déjà utilisées en routine pour la détection de *Brucella* au Centre National de Référence (CNR) des *Brucella* à l'AFSSA de Maisons-Alfort (Hénault et al., 2000).

Seules les amorces ciblant le gène *per* en double amplification ont été définies lors de cette étude (annexe 11a).

En PCR-TR, notre travail a dans un premier temps porté sur la comparaison des amorces et sondes utilisées par Baily et collaborateurs (amorces B4/B5 et sonde Pro), Bogdanovich et collaborateurs (amorces bruc1/bruc5 et sonde Bruc1) et le CNR des *Brucella* à l'AFSSA (amorces IS96/IS180 et sonde Bru1) pour la détection des gènes *bcs31*, *per* et IS711 respectivement, avec de nouvelles amorces et sondes définies à l'occasion de cette étude : *bcs31*, amorces bcs31163/bcs31199 et sonde bcs31q ; *per*, amorces per525/per575 et sonde per31q ; IS711, amorces ISFd/ISRv et sonde Bru2 (annexe 11 a et b).

Après détermination des séquences des amorces et des sondes (logiciel Primer Express 2.0, Applied Biosystem) à partir des gènes *bcs31*, *per* et IS711, gènes conservés chez *Brucella*, nous avons vérifié la spécificité *in silico* des oligonucléotides choisis en soumettant leurs séquences à la base de données Genbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Les séquences des oligonucléotides choisies étaient théoriquement spécifiques au genre *Brucella* et complémentaires d'un grand nombre de souches d'espèces et de biovars différents.

La figure 13 présente la comparaison entre les deux combinaisons amorces-sonde étudiées pour la détection des gènes *bcp31*, *per* et *IS711*, les valeurs de Ct (threshold cycle qui correspond au cycle de PCR à partir duquel la fluorescence associée au produit amplifié devient significative) sont représentées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Comparaison de différents couples d’amorces et de différentes sondes ciblant les gènes *bcp31*, *per* et *IS711* pour la détection de *B. ovis* en PCR-TR.

Quantité d’ADN (fg)	Ct ^b					
	<i>bcp31</i>		<i>per</i>		<i>IS711</i>	
	couple A	couple B	couple C	couple D	couple E	couple F
2000	26,21	28,46	27,60	32,54	27,46	21,78
200	30,29	32,40	32,21	36,35	30,44	25,88
20	33,55	36,68	34,02	38,24	34,29	28,86
2	nt ^a	nt	nt	nt	36,26	33,05

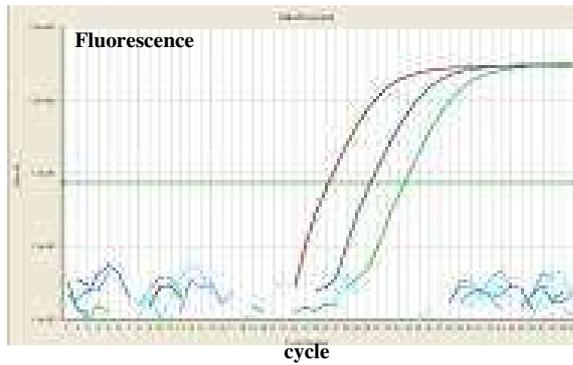
^a non testé ; ^b A : *bcp1163/bcp1199*, sonde *bcsptq* ; B : B4/B5, sonde Pro, C : *per525/per575*, sonde *pertq* ; D: *bruc1/bruc5*, sonde *Bru1* ; E : IS 96/IS180, sonde *Bru1* ; F : *ISFd/ISRv*, sonde *Bru2* (annexe 11 a et b).

A l’issue de ces comparaisons, les combinaisons *bcp1163/bcp1199-bcsptq* (Tableau 4, couple A) amplifiant le gène *bcp31*, *per525/per575-pertq* (Tableau 4, couple C) amplifiant le gène *per* et *ISFd/ISRv-Bru2* (Tableau 4, couple F) amplifiant l’*IS711* ont été retenues, car elles permettent d’obtenir les Ct les plus précoces, et les plateaux les plus élevés.

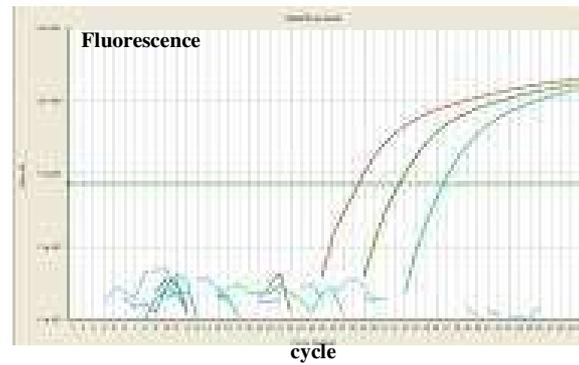
L’efficacité de l’amplification avec ces combinaisons a été étudiée à l’aide d’une gamme de dilutions de 10 en 10 de notre standard constitué d’ADN de *B. ovis* (de 20 ng à 20 fg). Les résultats sont présentés dans la figure 14.

Gène *bcs*31

A

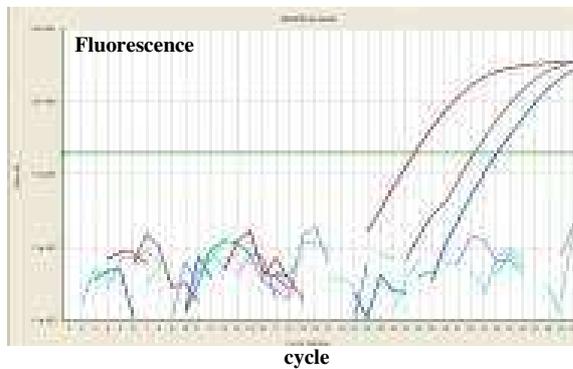


B

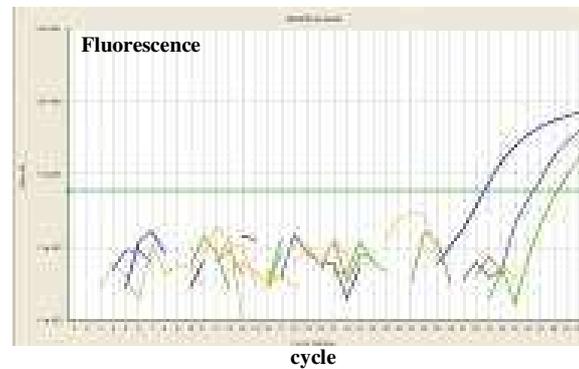


Gène *per*

C

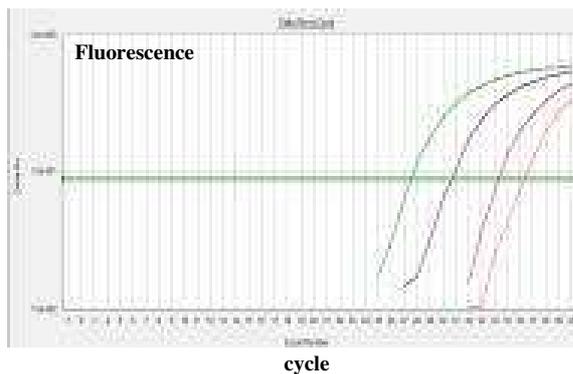


D



Gène IS711

E



F

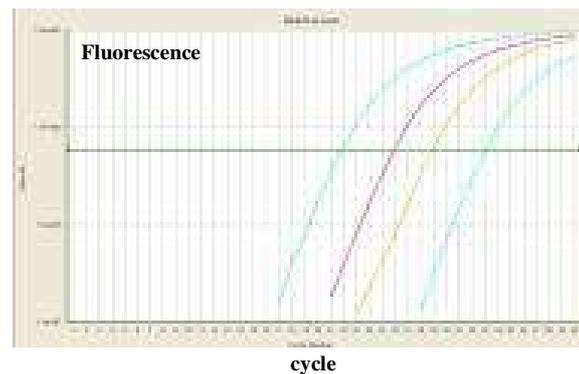


Figure 13 : Comparaison de différentes combinaisons de couples d'amorces et de sondes ciblant les gènes *bcs*31, *per* et IS711 pour la détection de *B. ovis* (gamme de dilution de : $2 \cdot 10^3$, $2 \cdot 10^2$, $2 \cdot 10^1$ fg pour A, B, C et D ; $2 \cdot 10^3$, $2 \cdot 10^2$, $2 \cdot 10^1$ et 2 fg pour E et F). A : bcs1163/bcs1199, sonde bcsptq ; B : B4/B5, sonde Pro, C : per525/per575, sonde pertq ; D: bruc1/bruc5, sonde Bru1 ; E : IS 96/IS180, sonde Bru1 ; F : ISFd/ISRV, sonde Bru2. L'axe de fluorescence est logarithmique et le bruit de fond a été préalablement soustrait des données par le logiciel.

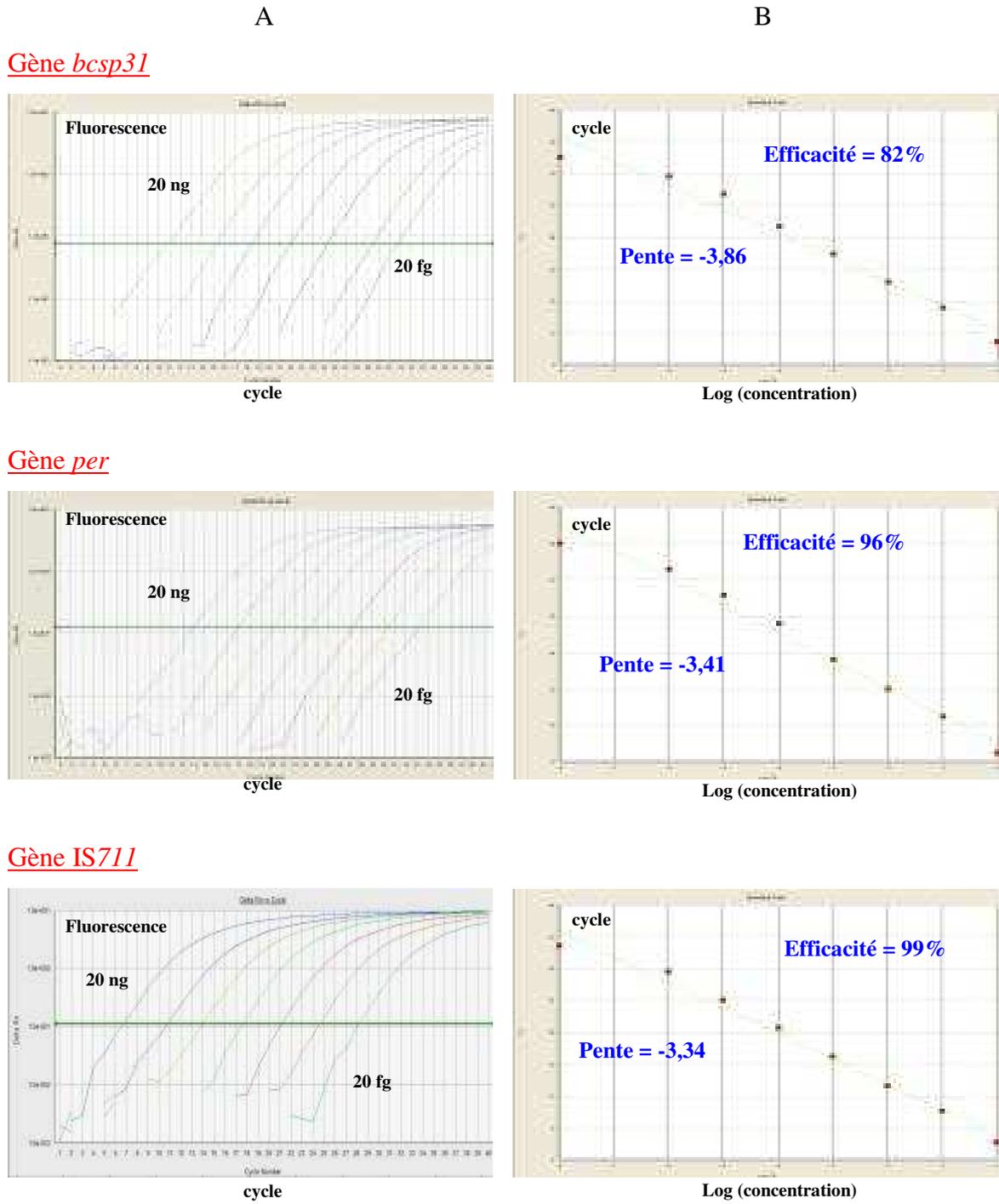


Figure 14 : Réalisation d'une courbe standard pour le calcul de l'efficacité des PCR-TR ciblant les gènes *bosp31*, *per* et *IS711* pour la détection de *B. ovis*. A : Courbes de fluorescence pour la gamme d'ADN génomique de *B. ovis*. Des dilutions de 10 en 10 du standard ont été réalisées (de 20 ng à 20 fg). B : les données sont utilisées pour tracer une droite standard représentant le nombre de cycles à partir duquel la fluorescence commence à être détectée en fonction du log (nombre de copies). Efficacité = $10^{(-1/\text{pente})} - 1$

b) *Etude d'exclusivité*

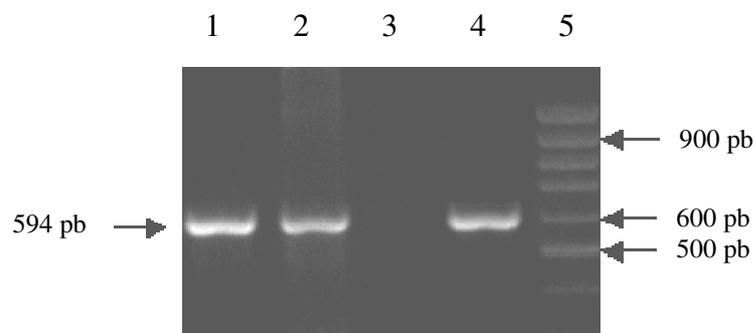
La spécificité des différentes PCR a été testée sur un ensemble de 68 souches non-*Brucella* choisies en fonction des critères présentés dans le tableau 5 (La liste détaillée des 68 souches avec indication de leur provenance est donnée en annexe 3).

Tableau 5 Bactéries non-*Brucella* utilisées pour l'étude de spécificité

Type de lien avec <i>Brucella</i>	Espèce bactérienne	Nombre de souches
Antigénique	<i>Escherichia coli</i> , <i>Francisella tularensis</i> , <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Xanthomonas maltophilia</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> O: 9	6
Phylogénétique	<i>Agrobacterium</i> spp. (n = 4), <i>Ochrobactrum</i> spp. (n = 3), <i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> , <i>Rhizobium tropici</i> , <i>Sinorhizobium meliloti</i>	10
Responsable d'avortement	<i>Campylobacter fetus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Coxiella</i> spp. (n = 4), <i>Listeria</i> spp. (n = 2), <i>Salmonella enterica</i> , <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	10
Aucun lien de parenté	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Afipia broomeae</i> , <i>Bacillus</i> spp. (n = 2), <i>Bordetella bronchiseptica</i> , <i>Brevibacillus</i> sp, <i>Campylobacter</i> spp. (n = 2), <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Corynebacterium</i> spp. (n = 2), <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Lactobacillus saerimneri</i> , <i>Listeria</i> spp. (n = 3), <i>Mycobacterium</i> spp. (n = 4), <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Rhodococcus equi</i> , <i>Salmonella</i> spp. (n = 2), <i>Serratia marcescens</i> , <i>Staphylococcus</i> spp. (n = 3), <i>Streptococcus</i> spp. (n = 9), <i>Yersinia enterocolitica</i>	42

Les couples d'amorces destinés à la PCR-conv, en simple et double amplification ont été testés sur l'ensemble des souches non-*Brucella*. Aucun produit d'amplification spécifique n'a été mis en évidence à partir des PCR-conv IS711 et *per*. Par contre, les ADN des souches *O. intermedium* LMG 3301 et *O. intermedium* LMG 3306 sont amplifiés par les amorces B4/B5 et Bruc887/Bruc1457 ciblant le gène *bcsp31*. Ces réactions croisées disparaissent cependant en PCR nichée avec les amorces bruc968/bruc1404 (Figure 15). Les résultats obtenus à partir des amorces Bruc887/Bruc1457 et avec la souche *O. intermedium* LMG 3301 vont dans le sens des résultats obtenus par Da Costa et collaborateurs (Da Costa et al., 1996).

A



B

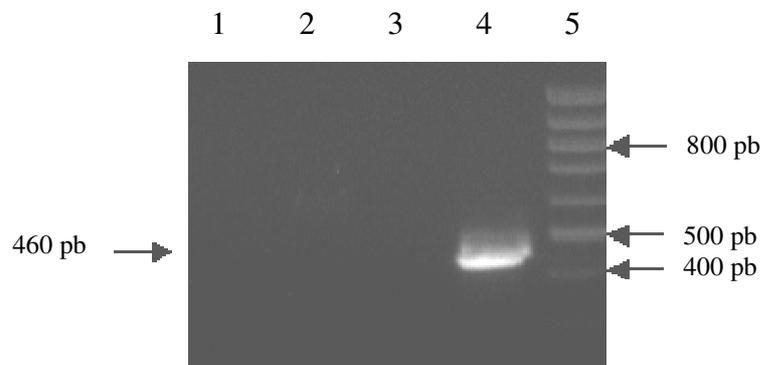


Figure 15. Amplification obtenue à partir des amorces ciblant *bcsp31* (Da Costa et al., 1996) révélée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%.

A : simple amplification, B : double amplification. Puits 1 : *O. intermedium* LMG 3301; puits 2 : *O. intermedium* LMG 3306; puits 3 : control négatif; puits 4 : *B. ovis* 63/290; puits 5 : marqueur de poids moléculaire 100 bp.

L'étude de spécificité en PCR-TR, sur les 68 souches bactériennes non-*Brucella* testées ne montre pas de réaction croisée avec les gènes *bcsp31* et *per*.

Par contre, sur la séquence d'insertion IS711 la combinaison ISFd/ISRv-Bru2 génère des réactions croisées avec des Ct allant de 36,66 à 37,86 (Tableau 6), ce qui nous a conduits à définir de nouvelles combinaisons amorces-sonde. Quatre nouvelles combinaisons ont donc été testées en parallèle de la combinaison initiale ISFd/ISRv-Bru2 (Figure 16 et 17), les résultats sont présentés dans le tableau 6.

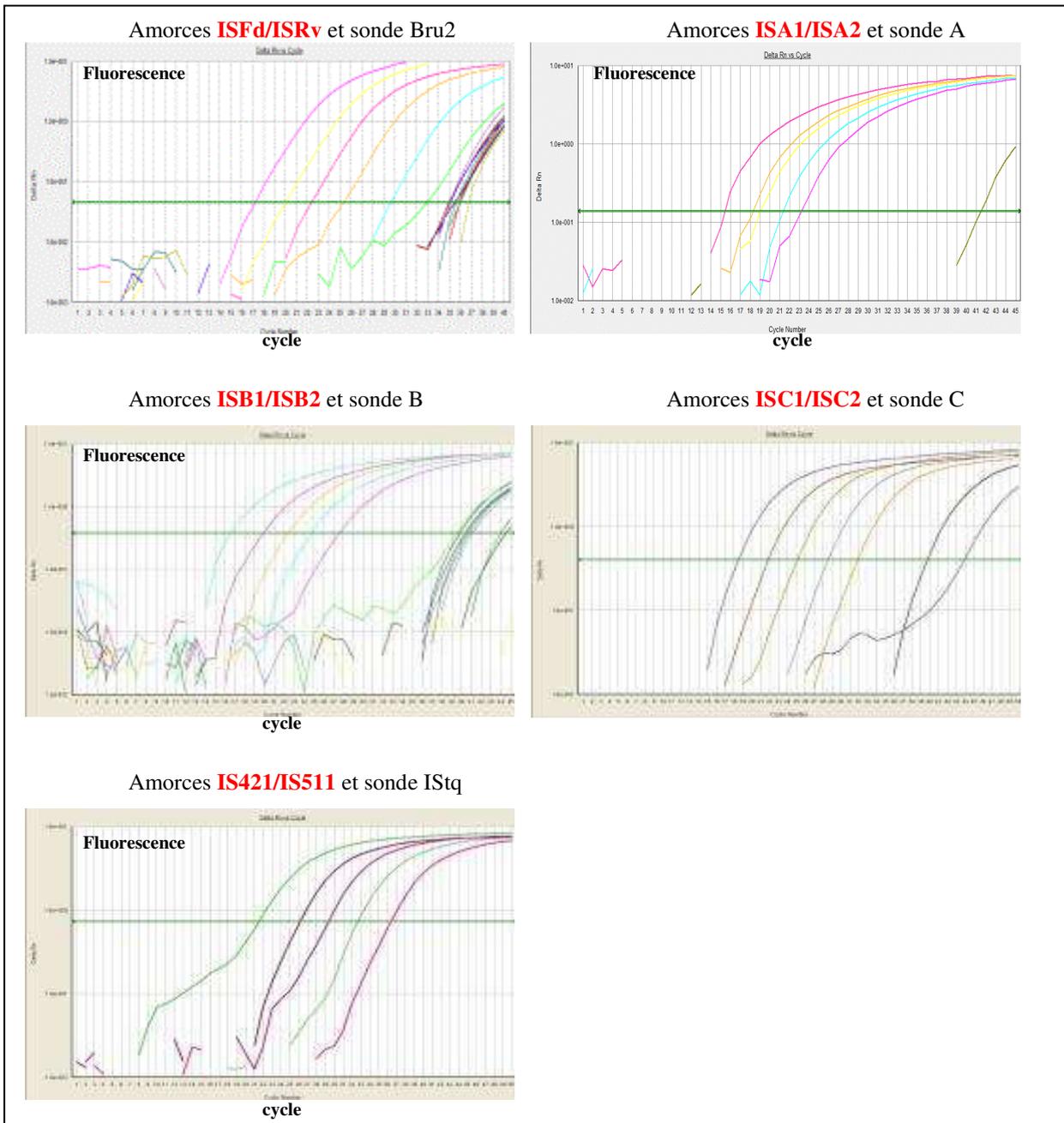


Figure 16 : Etude de spécificité des nouvelles combinaisons amorces-sondes ciblant l'IS711. Les 5 courbes les plus précoces correspondent à la gamme standard *B. ovis*, les courbes plus tardives correspondent aux amplifications non spécifiques.

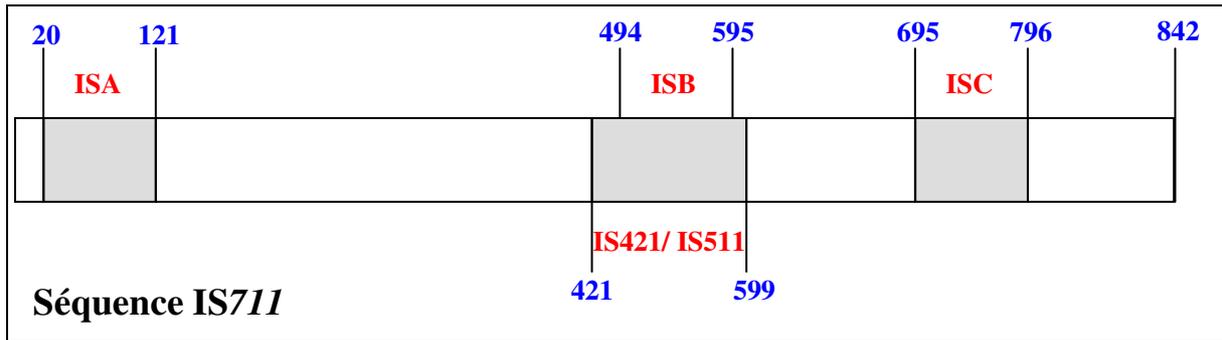


Figure 17 : Position des nouvelles combinaisons amorces-sondes ciblant la séquence d’insertion IS711.

Pour essayer de s’affranchir des problèmes de spécificité rencontrés, nous avons décidé de définir de nouvelles amorces et de nouvelles sondes. Les caractéristiques des oligonucléotides choisis, présentées dans l’annexe 11b, ciblent les régions 5’, 3’ et centrale de l’IS afin de rechercher une zone conservée et de comparer leurs performances avec le couple Fd/Rv commençant à 422 et terminant à 477. Ces nouvelles amorces ont été testées in silico et se sont révélées spécifiques.

Tableau 6 : Etude de spécificité avec différents couples d'amorces et différentes sondes ciblant l'IS711 pour la détection de *B. ovis*.

ADN <i>Brucella</i>	Ct				
	ISfd/ISrv	ISA1/ISA2	ISB1/ISB2	ISC1/ISC2	IS421/IS511
	sonde Bru2	Sonde A	Sonde B	Sonde C	Sonde IStq
<i>B. ovis</i> : 2000 fg	22,32	22,67	22,33	27,38	21,49
<i>B. ovis</i> : 200 fg	25,36	25,93	24,67	30,72	26,14
Efficacité	99%	136%	118%	99%	95%
ADN non- <i>Brucella</i> (2 ng)	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	43,97	-	-
<i>Brevibacillus</i>	-	-	40,54	-	-
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis (ovis)</i>	34,97	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	39,82	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	35,50	-	-	-	-
<i>O. anthropi</i> LMG 3331	35,98	-	-	-	-
<i>O. intermedium</i> LMG 3306	-	41,20	41,11	-	-
<i>O. intermedium</i> LMG 3301	35,41	-	-	-	-
<i>Pasteurella multocida</i>	-	-	40,82	-	-
<i>Salmonella arbotusovis</i>	35,04	-	-	39,67	-
<i>Salmonella bodjonegoro</i>	34,91	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Typhimurium	32,95	40,92	-	-	-
<i>Salmonella urbana</i> N	-	41,48	-	-	-
<i>Streptococcus bovis</i>	36,62	41,11	40,33	-	-
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>Equi</i>	-	-	44,49	43,86	-
<i>Streptococcus faecium</i>	-	-	39,43	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	35,85	-	-	-	-

(- : pas d'amplification)

Le tableau 6 présente l'étude de spécificité en PCR-TR des nouvelles combinaisons amorces-sonde. La combinaison ISA1/ISA2-Sonde A présente une efficacité de 135%, cette valeur est en dehors du domaine acceptable (75% - 125%) contrairement aux 4 autres combinaisons.

Les résultats nous ont conduits à retenir pour la détection de l'IS711 la combinaison IS421/IS511-sonde IS_{tq}, en remplacement de la combinaison initiale car elle ne génère aucune amplification non spécifique. Cette nouvelle combinaison nous permet d'obtenir une efficacité d'amplification de 95%, donc dans le domaine acceptable, avec une pente de 3,44.

Nous avons donc réussi à obtenir des PCR-TR spécifiques de *Brucella* basées sur la technologie Taqman en travaillant sur les gènes *bcp31*, *per* et IS711.

Dans la littérature, certaines équipes utilisent le système SYBR Green (connu pour sa spécificité moindre face à la technologie Taqman) pour la détection du genre *Brucella*, avec les amorces de Bailly B4/B5 qui ciblent le gène *bcp31* (Queipo-Ortuño et al., 2005, 2006; Colmenero et al., 2005).

L'étude de spécificité des couples d'amorces ciblant les gènes *bcp31*, *per* et IS711 a donc été réalisée en utilisant une détection par SYBR Green (Tableau 7 et Figure 18) en parallèle à la détection par sonde Taqman décrite précédemment.

Le T_m (température de fusion) et le nombre d'amplicons obtenus après détection par SYBR Green sont vérifiés par analyse des courbes de dissociation (Tableau 7 et Figure 18).

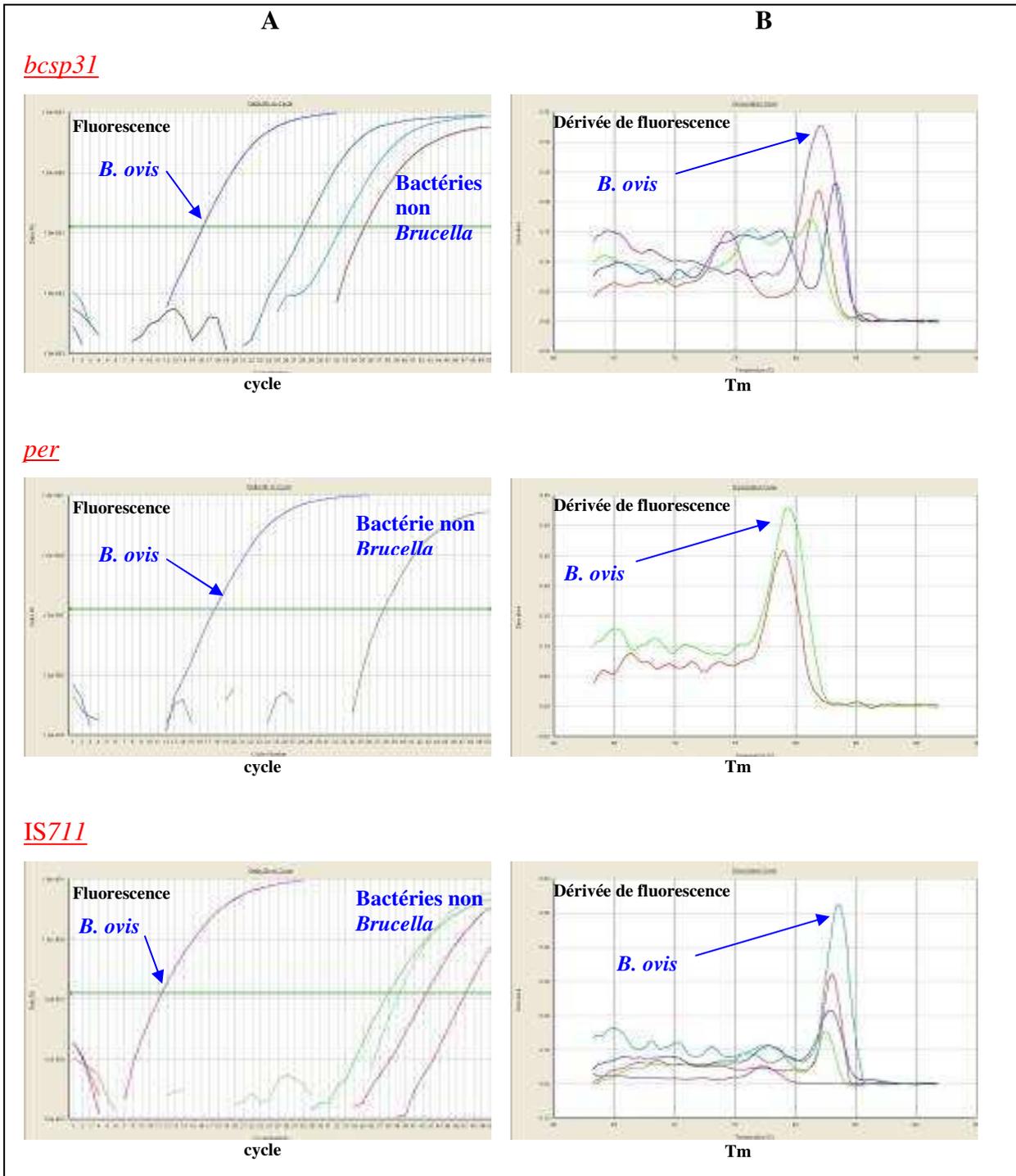


Figure 18. Etude de spécificité utilisant le SYBR Green basée sur les gènes IS711, *bcp31* et *per* à partir de 68 souches non-*Brucella*. **A** : Courbes d'amplification obtenues par PCR-TR : mise en évidence de réactions croisées de plusieurs micro-organismes non-*Brucella* par amplification non spécifique. **B** : Courbe de fusion obtenue par PCR-TR utilisant le SYBR Green : mise en évidence de réactions croisées de plusieurs micro-organismes non-*Brucella* en fonction de leur Tm.

La courbe de fusion permet de distinguer différents amplicons en fonction de leur température de fusion T_m . Les contrôles positifs *B. ovis* fournissent des pics sur la courbe de fusion à un T_m de, 82,2°C, 79,4°C et 83,7°C pour la détection des gènes *bcbp31*, *per* et *IS711* respectivement (Tableau 7). Aucun pic n'a été observé avec les contrôles négatifs (correspondant au mélange réactionnel de PCR-TR sans ADN).

Sur l'ensemble des 68 souches testées pour l'étude de spécificité, quelques souches présentent une amplification non spécifique.

Avec les amorces *bcbp1163/bcbp1199* ciblant le gène *bcbp31*, un produit d'amplification est observé pour les souches *A. radiobacter*, *Listeria monocytogenes* et *O. intermedium* LMG 3306. Avec les amorces *per525/per575* ciblant le gène *per*, un produit d'amplification est observé pour la souche *A. radiobacter*. Enfin avec les amorces *IS421/IS511* ciblant le gène *IS711* on obtient un produit d'amplification pour les souches *A. radiobacter*, *A. vitis*, *Brevibacillus* et *Streptococcus bovis* (Figure 18 et Tableau 7).

On constate que la PCR-TR *bcbp31* amplifie au moins 2 amplicons à partir des souches *A. radiobacter*, *L. monocytogenes* et *O. intermedium* LMG 3306, car au moins 2 pics de fusion sont observés chez chacune de ces souches (Figure 18). Nous avons à ce sujet présenté dans le tableau 7 les T_m majoritaires présentant les pics les plus élevés. Les écarts de T_m entre les amplicons obtenus à partir de *B. ovis* et des souches *A. radiobacter*, *L. monocytogenes* et *O. intermedium* LMG 3306 sont égaux à 0,2°C, 1,1°C et 1,2°C respectivement.

En PCR-TR *per*, on observe un écart de T_m de 0,5°C entre *B. ovis* et la souche *A. radiobacter*. Concernant la PCR-TR *IS711*, on observe un écart de T_m de 0,9°C, 6,3°C, 1,2°C et 0,6°C avec *B. ovis* pour les souches, *A. radiobacter*, *A. vitis*, *Brevibacillus* et *S. bovis* respectivement.

En conséquence, la technique PCR-TR avec détection au SYBR green a été abandonnée dans notre étude au vue des réactions croisées et des faibles différences de T_m obtenues entre *B. ovis* et certaines souches non-*Brucella*. D'ailleurs, Newby et collaborateurs ont également mis en évidence des réactions croisées avec les souches *A. radiobacter*, *Bordetella bronchiseptica*, *O. anthropi* LMG 3331, *R. leguminosarum*, *R. rhizogenes* et *S. meliloti* en utilisant des amorces ciblant partiellement l'*IS711* et avec une détection basée sur le SYBR Green (Newby et al., 2003).

Tableau 7. Détection non spécifique à partir de 68 souches non-*Brucella* par utilisation du SYBR Green

ADN bactérien (2 ng)	IS711		<i>bcp31</i>		<i>per</i>	
	Ct	Tm (°C)	Ct	Tm (°C)	Ct	Tm (°C)
<i>Brucella ovis</i>	11,32	83,7	16,22	82,2	17,73	79,4
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	39,24	82,8	35,25	82,0	37,69	78,9
<i>Agrobacterium vitis</i>	47,08	77,4	-	-	-	-
<i>Brevibacillus</i>	42,43	82,5	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	28,26	81,1	-	-
<i>O. intermedium</i> LMG 3306	-	-	32,52	83,4	-	-
<i>Streptococcus bovis</i>	38,04	83,1	-	-	-	-

(- : pas d'amplification)

c) *Etude d'inclusivité*

De nombreux travaux ont été publiés sur l'amplification en PCR-conv et PCR-TR ciblant les trois gènes *IS711*, *bcs31* et *per* à partir de souches de référence. Notre étude d'inclusivité a été effectuée uniquement en PCR-TR, à l'aide des combinaisons amorces-sonde précédemment choisies : *bcs1163/bcs1199-bcsqtq* pour le gène *bcs31*, *per525/per575-pertq* pour le gène *per* et *IS421/IS511-ISTq* pour le gène *IS711*.

Tableau 8. Comparaison des valeurs de C_T obtenus en PCR-TR à partir des amplifications des gènes *bcs31*, *per* et *IS711* au sein de souches de référence de *Brucella*.

Souches <i>Brucella</i>	biovar	<i>IS711</i> C_T	<i>bcs31</i> C_T^d	<i>per</i> C_T^d	ΔC_T^c	Copies d' <i>IS711</i>	Reference
<i>B. melitensis</i> 16M ^a	1	17.16	17.57	18.30	0.41	7	AE008917 / AE008918 ^d
<i>B. melitensis</i> 63/9 ^a	2	14.12	16.62	17.08	2.50	10	Ouahrani et al., 1993
<i>B. melitensis</i> Ether ^a	3	16.11	17.54	18.08	1.43	9	Ouahrani et al., 1993
<i>B. melitensis</i> Rev.1 ^a	1	15.87	17.31	17.96	1.44	n.d. ^e	n.d.
<i>B. melitensis</i> 53H38 ^a	1	13.93	15.87	16.66	1.94	n.d.	n.d.
<i>B. melitensis</i> 115 ^a	3	13.01	14.85	15.48	1.84	n.d.	n.d.
<i>B. abortus</i> 544 ^a	1	15	16.69	17.26	1.69	7	Ouahrani et al., 1993
<i>B. abortus</i> 86/8/59 ^a	2	13.19	15.22	15.78	2.02	7	Ouahrani et al., 1993
<i>B. abortus</i> Tulya ^a	3	13.66	14.87	15.84	1.20	6	Ouahrani et al., 1993
<i>B. abortus</i> AFSSA ^a	3	12.79	15.11	15.92	2.32	6	Ouahrani et al., 1993
<i>B. abortus</i> 292 ^a	4	14.04	15.14	15.95	1.10	7	Ouahrani et al., 1993
<i>B. abortus</i> B3196 ^a	5	14.19	15.13	15.97	0.95	7	Ouahrani et al., 1993
<i>B. abortus</i> 870 ^a	6	14.88	15.06	15.87	0.18	8	Ouahrani et al., 1993
<i>B. abortus</i> C68 ^a	9	12.59	14.73	15.71	2.14	6	Ouahrani et al., 1993
<i>B. abortus</i> B19 ^a	1	15.97	17.24	17.77	1.27	n.d.	n.d.
<i>B. abortus</i> S99 ^a	1	12.79	15.14	16.03	2.35	n.d.	n.d.
<i>B. suis</i> 1330 ^b	1	18.47	19.23	19.49	0.76	7	AE014291 / AE014292 ^d
<i>B. suis</i> Thomsen ^a	2	12.24	15.14	16.36	2.90	13	CP000911 / CP000912 ^d
<i>B. suis</i> 686 ^a	3	12.44	14.49	16.72	2.04	6	Ouahrani et al., 1993
<i>B. suis</i> 40 ^a	4	12.60	14.74	15.47	2.14	6	Ouahrani et al., 1993
<i>B. suis</i> 513 ^a	5	13.43	16.95	17.54	3.52	n.d.	n.d.
<i>B. neotomae</i> ^a		14.04	17.35	17.01	3.30	8	Bricker et al., 2000
<i>B. ovis</i> 63/290 ^a		12.28	17.09	18.39	4.81	38	CP000708 / CP000709 ^d
<i>B. canis</i> RM6/66 ^a		16.02	17.06	17.63	1.04	6	CP000872 / CP000873 ^d
<i>B. pinnipedialis</i> ^a		12.06	16.50	17.46	4.44	> 25	Bricker et al., 2000
<i>B. ceti</i> ^b		13.25	18.96	19.21	5.71	> 25	Bricker et al., 2000

^a les valeurs de C_T sont obtenues à partir de 20 ng d'ADN *Brucella*. ^b les valeurs de C_T sont obtenues à partir de 2 ng d'ADN *Brucella*. ^c ΔC_T correspond à la différence entre les C_T de l'*IS711* et de *bcs31*. ^d Numéro d'accèsion (GeneBank). ^e n.d. : non défini.

Les souches de *Brucella* utilisées et les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 8. Entre les différentes espèces et biovars de *Brucella* on constate une faible variation de Ct pour les gènes *bcbp31* et *per* alors que la même quantité d'ADN est utilisée. Les Ct maximum et minimum sont de 17,57 (*B. melitensis* 16M) et de 14,49 (*B. suis* 686) pour le gène *bcbp31* et de 15,47 (*B. suis* 40) et de 19,49 (*B. suis* 1330) pour le gène *per* (Tableau 8).

Les Ct varient d'une manière plus importante pour le gène de l'IS711 avec un minimum de 12,28 (*B. ovis* 63/290) et un maximum de 18,47 (*B. suis* 1330). Cette différence est liée à la distribution de la séquence d'insertion au sein des différentes souches ou espèces de *Brucella* (voir nombre de copies d'IS711 dans Tableau 8). Afin de comparer les valeurs de Ct obtenues sur chaque gène indépendamment de l'effet lié à la concentration d'ADN utilisée, nous avons calculé le ΔC_T IS/*bcbp* qui correspond à la différence de Ct entre les valeurs de l'IS711 et celles du gène *bcbp31*. Les résultats obtenus à partir des ADN de *B. abortus* 870 et *B. ceti* montrent un ΔC_T IS/*bcbp* minimum de 0,18 et un maximum de 5,71, respectivement.

En contrepartie, le ΔC_T *bcbp*/*per* correspondant à la différence de Ct entre les gènes *bcbp31* et *per* est toujours positif en faveur du gène *bcbp31*, à l'exception de l'espèce *B. neotomae* où le ΔC_T *bcbp*/*per* est égal à 0,34 en faveur du gène *per*.

d) Limite de détectabilité

A la suite de l'étude d'inclusivité, les limites de détection des PCR-conv et des PCR-TR ont été comparées (Tableau 9). Les ADN des espèces *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* et *B. canis* utilisées ont été dilués de 10 en 10. La PCR-TR se montre à chaque fois plus sensible que la PCR-conv. En PCR-conv quelque soit l'espèce analysée, les seuils de détection des cibles *bcbp31* et *per* sont identiques, avec une valeur de 1000 fg. Par contre, la détection de ces cibles en PCR-TR montre une sensibilité supérieure à celle de la PCR-conv : 50 fois supérieure pour les ADN *B. canis* RM6/66 et *B. melitensis* 16M avec une valeur de 20 fg et 500 fois supérieure pour les ADN *B. abortus* 544 et *B. ovis* 63/290 avec une valeur de 2 fg. Concernant la cible IS711, un facteur 50 est constaté pour les espèces *B. canis* RM6/66 et *B. abortus* 544 et un facteur 500 est constaté pour les espèces *B. melitensis* 16M et *B. ovis* 63/290 en faveur de la PCR-TR.

La limite de détection varie de 100 fg pour *B. canis* RM6/66, *B. abortus* 544 et *B. ovis* 63/290 à 1000 fg pour *B. melitensis* 16M en PCR-conv, alors qu'en PCR-TR, elle varie de 0,2 fg pour *B. ovis* 63/290 à 2 fg pour *B. canis* RM6/66, *B. abortus* 544 et *B. melitensis* 16M. D'une

manière générale, la sensibilité de l'IS711 est soit identique soit 10 fois supérieure à celle des deux autres gènes, aussi bien en PCR-conv qu'en PCR-TR (Tableau 9).

Tableau 9 : Comparaison du seuil de détection des PCR-conv et PCR-TR.

<i>Brucella</i>	Copies d'IS711	PCR-conv (fg)			PCR-TR. (fg)		
		IS711	<i>bcp31</i>	<i>per</i>	IS711	<i>bcp31</i>	<i>per</i>
<i>B. canis</i> RM6/66	6	100	1000	1000	2	20	20
<i>B. abortus</i> 544	7	100	1000	1000	2	2	2
<i>B. melitensis</i> 16M	7	1000	1000	1000	2	20	20
<i>B. ovis</i> 63/290	38	100	1000	1000	0.2	2	2

e) *Répétabilité et reproductibilité*

L'IS711 apparaît être le meilleur candidat pour la détection du genre *Brucella* de par sa spécificité et surtout sa sensibilité. Nous avons donc décidé d'évaluer la répétabilité intra-plaque et la reproductibilité inter-plaque de ce système à partir de 0,02 ng d'ADN de *B. ovis* 63/290. Les courbes d'amplification obtenues sont très peu dispersées (Figure 19) et les coefficients de variation de la répétabilité intra-plaque et de la reproductibilité inter-plaque sont de 1,06% et 4,17% respectivement.

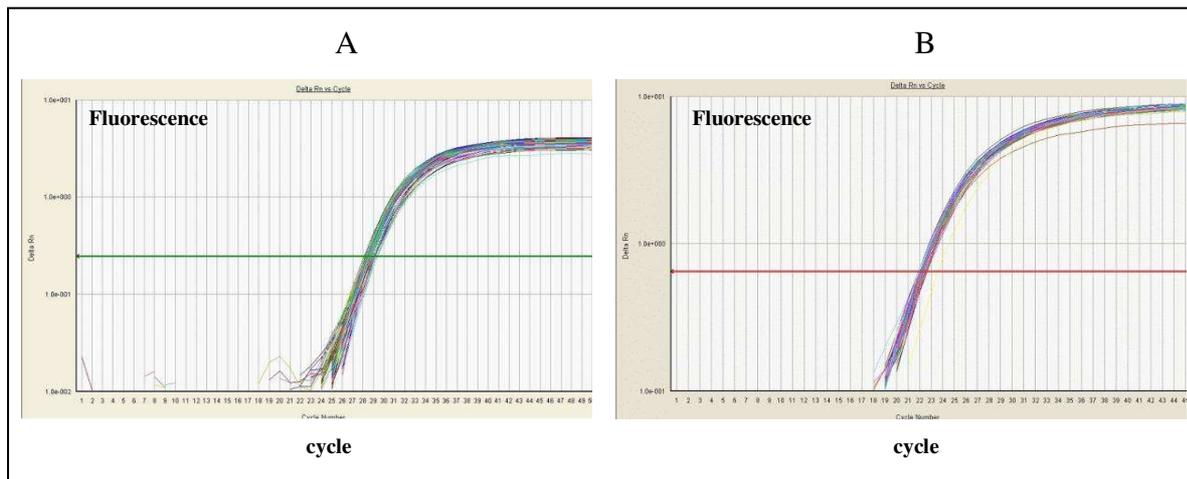


Figure 19. Répétabilité intra-plaque (A) et reproductibilité inter-plaque (B) de la PCR-TR IS711 (amplifié avec les amorces IS421/IS511 et détecté par la sonde IS7q).

2. Choix et validation de la PCR en temps réel sur des échantillons biologiques

a) *Etude préliminaire : échantillons de rates de sangliers et d'animaux expérimentalement infectés*

Les prélèvements obtenus à partir de 100 rates de sangliers nous ont été fournis par le CNR des *Brucella* (AFSSA) et avaient été récoltés pour une recherche épidémiologique de la tularémie (zoonose provoquée par le pathogène *Francisella tularensis*) par le CNR de la tularémie (AFSSA, Maisons-Alfort).

Les prélèvements d'animaux expérimentalement infectés ont été préparés par le CNR des *Brucella* (AFSSA) dans le cadre d'une production de sérums de référence européen ovin et caprin. Cette expérimentation était conduite sur 5 chèvres et 5 moutons qui ont été infectés par les souches vaccinales *B. melitensis* Rev1 et *B. melitensis* H38 respectivement. La rate, le foie et 5 ganglions différents ont été récoltés chez ces animaux.

Chaque animal infecté a fait l'objet d'un diagnostic sérologique par fixation du complément et par l'épreuve à l'antigène tamponné (test au rose bengale) qui se sont révélés positifs. Aucun test sérologique n'a été réalisé sur les sangliers.

Les échantillons ont été testés en bactériologie et en PCR-TR sur les 3 cibles IS711, *bcs31* et *per*. Une PCR-conv nichée a aussi été réalisée sur la cible IS711.

Afin de s'assurer de la qualité des extraits obtenus à partir des échantillons, pour la PCR-TR IS711, les échantillons ont été testés en duplicat, un des 2 puits étant dopé avec de l'ADN de

B. ovis (0,02 ng) afin de mettre en évidence une éventuelle inhibition, ce qui n'est pas rare lorsque l'on travaille à partir de prélèvements biologiques (Bricker, 2002).

En PCR-TR IS711, les échantillons dopés provenant d'animaux infectés révèlent des Ct allant de 22,01 à 23 avec une moyenne de 22,51, et ceux provenant de rates de sangliers révèlent des Ct allant de 22,56 à 23,96 avec une moyenne de 22,63 (Tableau 10).

D'après le test de comparaison de moyenne, les différences de moyennes de Ct observées entre les rates de sangliers dopées et *B. ovis* et entre les organes d'animaux infectés et *B. ovis* à partir de la PCR-TR IS711, ne sont pas significatives au risque 5%. En effet, les valeurs correspondantes sont $M = 0,84$ et $M = 0,48$ respectivement, sachant que la valeur seuil au risque 5% est 1,96.

La cohérence de ces valeurs de Ct permet de considérer que les types d'échantillon clinique étudiés n'interfèrent pas avec les performances de la PCR-TR. Néanmoins, 2 échantillons de rates de sanglier, négatifs en PCR-TR pour les 3 cibles, présentent lorsqu'ils sont dopés avec *B. ovis* un Ct tardif (26,85 et 35,13), en relation probable avec la présence d'un facteur inhibiteur non éliminé au cours de l'extraction des ADN.

Tableau 10 : Valeur moyenne des Ct obtenus à partir de *B. ovis*, de rates de sangliers dopés et des organes d'animaux infectés dopés.

ADN	Moyenne de Ct
0,02 ng de <i>B. ovis</i> ^a	22,43
Rates sangliers dopées ^b	22,63
Organes d'animaux infectés dopés ^b	22,51

^a (n = 10), ^b les moyennes sont calculées à partir des Ct obtenues dans les différentes PCR-TR réalisées.

Nous constatons également que les échantillons positifs en PCR-TR IS711 (Tableau 11) ne présentent pas de Ct plus précoce que le Ct moyen calculé sur l'ensemble des échantillons lorsqu'ils sont dopés (Tableau 10), alors que l'on pouvait s'attendre à un décalage de Ct dû à l'ADN de *Brucella* présent dans l'échantillon. La quantité de *Brucella* dans ces échantillons n'est probablement pas assez importante pour visualiser cet effet.

Les résultats bactériologiques et moléculaires de cette étude préliminaire sont présentés dans le tableau 11.

La positivité bactériologique correspond à l'apparition de colonies sur des boîtes de milieu Farrell (milieu sélectif).

Dans l'étude, une seule rate de sanglier est positive en bactériologie alors qu'aucune ne l'est en PCR nichée IS711. Par contre en PCR-TR, deux rates présentent une amplification pour les gènes *bcbp31* et *per*, et pour l'IS711 douze rates sont positives. De plus cette rate positive en bactériologie n'a pas été retrouvée positive dans les autres essais (Tableau 11).

Tableau 11 : Résultats bactériologiques et PCR-TR sur les 3 cibles étudiées, à partir d'échantillons de rates de sangliers et d'organes d'animaux infectés.

Echantillons	Bactériologie	PCR-conv IS711 ^a	PCR-TR		
			IS711	<i>bcbp31</i>	<i>per</i>
Rates de sangliers (n=100)	1/100	0/100	12/100	2/100	2/100
Animaux infectés (n=10)	37/70	4/70	13/70	7/70	8/70
Chèvres (n=5)	24/35	3/35	7/35	0/35	0/35
rate	4/5	0/5	1/5	0/5	0/5
foie	1/5	0/5	1/5	0/5	0/5
ganglions	19/25	3/25	5/25	0/25	0/25
Moutons (n=5)	13/35	1/35	6/35	7/35	8/35
rate	3/5	1/5	1/5	1/5	1/5
foie	0/5	0/5	1/5	0/5	1/5
ganglions	10/25	0/25	4/25	6/25	6/25

^a PCR nichée : simple et double amplification.

Pour les animaux infectés, quelque soit l'espèce animale, la bactériologie détecte 9 fois plus d'animaux positifs que la PCR nichée IS711, 3 fois plus que la PCR-TR IS711 et 5 fois plus que la PCR-TR sur les 2 autres gènes.

La technique bactériologique utilise un volume de 200 µl du broyat de l'échantillon qui est déposé sur les boîtes de pétri. Pour tous ces animaux, le nombre de colonies obtenu est très faible : il varie de 1 à 80 colonies pour 200 µl déposés. L'extraction de l'ADN bactérien pour les techniques moléculaires part du même volume de broyat à partir duquel seulement 2 µl d'éluat sont utilisés pour la PCR, soit une réduction de la prise d'essai de 1/100ème. Par extrapolation, on peut considérer que 1/100ème de la quantité de bactéries initiale est présente dans le volume final réservé à la PCR, soit de 0,01 à 0,8 bactéries et si l'on prend en compte les pertes de rendement liées à l'extraction d'ADN, la probabilité de prélever de l'ADN de *Brucella* dans la prise d'essai devient aléatoire. Ces différences de prise d'essai entre technique bactériologique et technique moléculaire peuvent expliquer les différences de résultats.

Cette étude préliminaire un peu décevante sur les performances diagnostiques des PCR-TR nous a tout de même permis d'avoir une idée sur le comportement du système et de vérifier l'absence d'inhibiteur dans les matrices utilisées. Notre cible IS711, candidat potentiel pour un test de détection en routine par PCR-TR du fait de sa présence en multi copies s'est montrée décevante même si ses performances sont meilleures que celles des 2 autres cibles.

Comme le nombre de colonies maximum obtenu à partir des organes précédents était de 80, leur richesse en ADN de *Brucella* était faible et nous avons décidé d'analyser des matrices fournies par le CNR des *Brucella* (AFSSA), que l'on a artificiellement contaminées.

A partir de 5 matrices différentes négatives en bactériologie et en PCR-conv (simple et double amplification) spécifique de l'IS711 (Tableau 12) auxquelles nous avons inoculé une quantité croissante de *B. melitensis* 16M avant l'extraction de l'ADN total. Le mélange se composait de 3/4 de volume de broyat de matrice et de 1/4 de suspension de *B. melitensis* de 4 concentrations différentes : 10^2 UFC/ml, 10^3 UFC/ml, 10^4 UFC/ml, 10^5 UFC/ml.

Tableau 12 : Nature des matrices artificiellement contaminées

Nature du prélèvement	Animal
Rate	Marsouin
Poumon	Mouflon
Placenta	Canidé
Ecouvillon vaginal	Bovin
Ganglion retromammaire	Porc

Nous avons analysé les extraits obtenus par PCR-TR IS711. Les résultats montrent une amplification de l'IS711 soit inexistante soit très faible, traduite par des Ct tardifs sans corrélation avec la gamme de dilution effectuée. Si on calcule les quantités de *Brucella* ajoutées aux broyats de matrices, elles correspondent à une gamme allant de 50 à 0,05 bactérie par prise d'essai. Si on prend en compte l'influence du rendement d'extraction, les niveaux de contaminations réalisés sont trop faibles pour obtenir des amplifications cohérentes.

Entre temps, un foyer de brucellose a été déclaré dans le département de la Manche, en Normandie. Le CNR des *Brucella* (AFSSA) a récolté 160 ganglions rétropharyngiens provenant de 82 porcs différents. L'étude de sensibilité diagnostique sera finalement basée sur ces échantillons.

b) Echantillons biologiques d'animaux négatifs

Un ensemble de 172 prélèvements biologiques provenant de 87 porcs et de 85 bovins issus de territoires indemnes en brucellose, ont été collectés entre mars et décembre 2008 par le Laboratoire Départemental de la Sarthe (LVD 72). Les prélèvements sont composés de 87 ganglions rétropharyngiens de porcs et de 31 ganglions rétropharyngiens de bovins prélevés à l'abattoir, 26 écouvillons vaginaux et 28 laits de bovins, initialement réalisés suite à des avortements pour la recherche du pathogène *Coxiella burnetii* et d'agents responsables de mammite respectivement. Le statut négatif des échantillons est déduit du statut indemne de brucellose du cheptel d'origine des animaux.

Les échantillons issus d'animaux appartenant à des cheptels qualifiés indemnes de brucellose n'ont été testés qu'en PCR-TR. Ils ont été extraits à partir d'un kit manuel (Roche pour les ganglions ou Qiagen pour les écouvillons génitaux et les laits) et constituent la population de référence pour l'évaluation de la spécificité diagnostique.

Les résultats de leur analyse sont présentés dans l'évaluation de la spécificité au point d).

c) Echantillons biologiques d'animaux positifs

Au cours de l'abattage des animaux du foyer de brucellose découvert dans le département de la Manche en 2008, 160 ganglions ont été prélevés sur 82 porcs. L'agent pathogène en cause a été identifié par le CNR des *Brucella* (AFSSA) comme étant *B. suis* biovar 2.

Deux procédures d'extraction ont été comparées dans un premier essai : 22 échantillons provenant du foyer et positifs en bactériologie ont été extraits soit par un kit manuel (Roche) soit par un robot automatique (Qiagen). L'objectif était de vérifier si la méthode de PCR-TR présentait les mêmes résultats quelque soit le type d'extraction d'ADN réalisé.

Les résultats de PCR-TR IS711 obtenus sont présentés dans le (Tableau 13).

Tableau 13 : Comparaison entre une extraction manuelle et robotisée à partir de 22 prélèvements issus d'un foyer de brucellose : 16 prélèvements ont présenté une amplification.

Echantillon	Nombre de colonies	Ct extraction kit Roche	Ct extraction robot Qiagen	Moyenne des différences
Ganglions rétropharyngiens de porcs	15	38,65	37,26	-1,39
	20	39,49	35,79	-3,70
	20	39,36	40,75	1,39
	30	37,68	37,21	-0,47
	40	36,43	36,93	0,49
	50	39,46	36,23	-3,23
	50	37,77	38,00	0,22
	100	38,09	36,53	-1,56
	100	36,00	36,01	0,01
	100	34,59	35,77	1,18
	200	35,07	34,07	-1,01
	200	36,89	35,41	-1,48
	200	35,19	36,31	1,13
	+++ ^a	32,06	32,32	0,27
	+++	32,37	32,96	0,59
	+++	31,89	32,07	0,18

^a +++ : boîte à confluence.

D'après le Tableau 13, on constate que les valeurs de Ct obtenues après les 2 types d'extraction sont proches.

Afin de vérifier si la différence entre les valeurs de Ct obtenus est significative, l'hypothèse d'égalité des moyennes est émise et sera soit affirmée soit infirmée par le test t de student.

La différence de moyenne de chaque couple est calculée et présentée dans le tableau 13. La moyenne et l'écart-type des différences sont égales à -0,46 et 1,50 respectivement. Pour 15 degré de liberté, au risque 5%, la valeur seuil t est égale à 2,145 et au risque 2%, elle est égale à 2,624. La variable de décision t observée est égale à 1,228, ce qui est inférieur à la valeur seuil calculée au risque 5% et au risque 2%.

En conclusion, une différence non significative est observée à 5% et à 2% de risque. L'hypothèse d'égalité des moyennes est donc acceptée et il est possible de conclure que les résultats de Ct obtenus avec les 2 types d'extractions ne diffèrent pas de façon significative.

Cet essai nous permet d'estimer que les résultats qualitatifs obtenus pour la recherche de *Brucella* dans des prélèvements biologiques sont équivalents quelque soit le choix de la méthode d'extraction (manuelle ou automatisée).

Nous avons choisi l'extraction automatisée sur l'ensemble des échantillons issus du foyer de Brucellose. L'ensemble de ces échantillons a été analysé en parallèle en bactériologie et en PCR-TR.

Les prélèvements positifs en bactériologie constituent la population de référence pour l'évaluation de la sensibilité diagnostique.

Le Tableau 14 ci-dessous présente les résultats qualitatifs des essais de PCR-TR effectués sur l'ensemble des 160 échantillons issus des 82 animaux provenant du foyer de brucellose déclaré dans le département de la Manche. Les échantillons ont été testés vis-à-vis des 3 cibles à l'aide des combinaisons amorces-sondes préalablement sélectionnées : *bbsp1163/bbsp1199-bcsqtq* pour le gène *bbsp31*, *per525/per575-pertq* pour le gène *per* et *IS421/IS511-ISqtq* pour le gène *IS711*.

Tableau 14 : Concordance entre les résultats bactériologiques et les résultats de PCR-TR

PCR-TR <i>IS711</i>	Bactériologie		Total
	Positifs	Négatifs	
Positifs	71	6	77
Négatifs	24	59	83
Total	95	65	160

PCR-TR <i>bcp31</i>	Bactériologie		Total
	Positifs	Négatifs	
Positifs	38	4	42
Négatifs	57	61	118
Total	95	65	160

PCR-TR <i>per</i>	Bactériologie		Total
	Positifs	Négatifs	
Positifs	35	1	36
Négatifs	60	64	124
Total	95	65	160

Les résultats bactériologiques présentent de meilleurs résultats que la PCR-TR, quelque soit le gène : on retrouve 95 échantillons sur 160 en bactériologie contre 77, 42 et 36 pour l'*IS711*, *bcp31* et *per* respectivement. On constate également que le nombre de positifs en PCR-TR *IS711* est supérieur à celui obtenu en PCR-TR *bcp31* et PCR-TR *per*.

Les résultats présentés sont ceux obtenus au bout de 45 cycles d'amplification. La distribution des PCR-TR positives basée sur les gènes *IS711*, *bcp31* et *per* est représentée en fonction du Ct obtenu sur les 160 échantillons positifs en bactériologie (Figure 20).

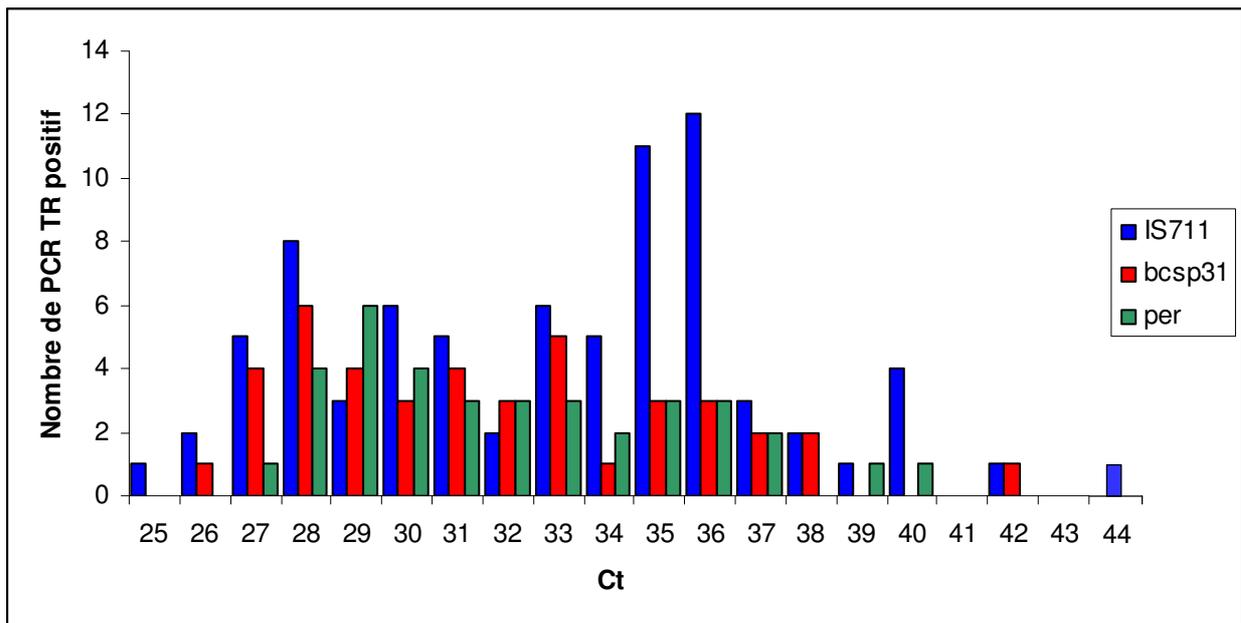


Figure 20 : Distribution des PCR-TR positives après 45 cycles d’amplification basée sur les gènes *IS711*, *bcsp31* et *per* en fonction du Ct pour 160 échantillons positifs en bactériologie.

La détection par PCR-TR à partir de l’ensemble des échantillons est comprise entre Ct = 25 et Ct = 44 sur les 3 gènes. La distribution des PCR-TR *bcsp31* et *per* est répartie entre Ct = 26 et Ct = 42 pour *bcsp31*, et entre Ct = 27 et Ct = 40 pour *per*. Celle de la PCR-TR *IS711* est répartie entre Ct = 25 et Ct = 44 et présente un pic à Ct = 35 et Ct = 36.

Nous avons ensuite observé les résultats des PCR-TR en fonction du nombre de colonies observés en bactériologie (Tableau 15). On constate que sur les 95 échantillons positifs en bactériologie, 17 présentent un nombre de colonies qui est strictement inférieur à 10 colonies (Tableau 15). Le volume de broyat utilisé pour l’extraction d’ADN était de 200 µl, supposons donc que 10 colonies théoriques se retrouvent dans les 100 µl d’éluat. Sachant que 5 µl d’éluat ont été déposés pour la PCR-TR, cela revient théoriquement à avoir 0,5 bactérie dans la prise d’essai à disposition pour l’amplification des gènes, sans prendre en compte la perte d’ADN durant l’extraction.

Tableau 15 : Corrélation entre le nombre de colonies observés en bactériologie et les résultats en PCR-TR à partir des 160 échantillons issus d'animaux provenant d'un foyer de brucellose

Colonies observées	0	1 à 5	10 à 200	> 200
Nombre d'échantillons	65	17	47	31
PCR-TR <i>IS711</i>	6	0	42	29
PCR-TR <i>bcbp31</i>	4	0	10	28
PCR-TR <i>per</i>	1	0	7	28

d) *Analyse de la sensibilité et de la spécificité diagnostique*

Le Tableau 16 ci-dessous présente les résultats qualitatifs des essais de PCR-TR effectués sur les 172 échantillons négatifs, issus de 172 animaux sains, et sur l'ensemble des 95 échantillons issus du foyer de brucellose trouvés positifs en bactériologie. Ces 95 échantillons bactériologiquement positifs correspondent à 54 animaux. Tous les échantillons ont été testés vis-à-vis des 3 cibles à l'aide des combinaisons amorces-sondes préalablement sélectionnées : *bcbp1163/bcbp1199-bcsqtq* pour le gène *bcbp31*, *per525/per575-pertq* pour le gène *per* et *IS421/IS511-ISTq* pour le gène *IS711*.

Au bout de 45 cycles d'amplification, la concordance entre les résultats bactériologiques et les résultats en PCR-TR *IS711* est meilleure que pour les deux autres cibles : on retrouve 71 échantillons sur 95 contre 38 et 35 pour *bcbp31* et *per* respectivement. Mais en parallèle le nombre de positifs en PCR-TR *IS711* dans la catégorie des échantillons négatifs est légèrement supérieur à celui des deux autres cibles.

Tableau 16 : Résultats obtenus par PCR-TR après 45 cycles d'amplification à partir des échantillons positifs et négatifs.

Cible IS711	Echantillons positifs	Echantillons négatifs	Total
Positifs	71	7	78
Négatifs	24	165	189
Total	95	172	267

Cible <i>bosp31</i>	Echantillons positifs	Echantillons négatifs	Total
Positifs	38	4	42
Négatifs	57	168	225
Total	95	172	267

Cible <i>per</i>	Echantillons positifs	Echantillons négatifs	Total
Positifs	35	6	41
Négatifs	60	166	226
Total	95	172	267

L'estimation de la sensibilité et de la spécificité diagnostique des PCR-TR sur 45 cycles d'amplification, vis-à-vis du statut de l'échantillon est faite à partir des résultats du tableau 16.

Les pourcentages de sensibilité calculés sont présentés dans le tableau 17. Les 3 cibles ont des performances de sensibilité différentes : 74,7% [66 ; 83,5], 40% [30,1 ; 49,9] et 36,8% [27,1 ; 46,5] pour les gènes IS711, *bosp31* et *per* respectivement.

Si l'on compare le pourcentage de sensibilité de la cible IS711 avec les cibles *bosp31* et *per*, on constate que les pourcentages diffèrent significativement. En effet, les valeurs de différences de pourcentages P correspondantes sont P = 5,10 entre l'IS711 et *bosp31* et P = 6,55 entre l'IS711 et *per*, sachant que la valeur seuil au risque 5% est 1,96.

Ainsi, la PCR-TR *IS711* est 2 fois plus sensible que celle ciblée sur les deux autres gènes (Tableau 17).

Tableau 17. Sensibilité et spécificité diagnostique de la PCR-TR sur l'ensemble des échantillons positifs en bactériologie : statut établi au niveau de l'échantillon

Cible	% de sensibilité	IC 95%	Cible	% de spécificité	IC 95%
<i>IS711</i>	74,7	[66 ; 83,5]	<i>IS711</i>	95,9	[93,0 ; 98,9]
<i>bcp31</i>	40,0	[30,1 ; 49,9]	<i>bcp31</i>	97,7	[95,4 ; 99,9]
<i>per</i>	36,8	[27,1 ; 46,5]	<i>per</i>	96,5	[93,8 ; 99,3]

Les pourcentages de spécificité calculés sont présentés dans le tableau 17. Les 3 cibles ont des performances de spécificité comparables : 95,9 [93,0 ; 98,9], 97,7% [95,4 ; 99,9] et 96,5% [93,8 ; 99,3] pour les gènes *IS711*, *bcp31* et *per* respectivement

Si l'on compare de la même manière que pour la sensibilité, le pourcentage de spécificité de la cible *IS711* avec les cibles *bcp31* et *per*, on constate que les différences de pourcentage P ne sont pas significatives. En effet, les valeurs correspondantes sont $P = 1,13$ et $P = 0,30$ respectivement, elles sont inférieures à la valeur seuil qui est 1,96 au risque 5%.

En raisonnant vis-à-vis du statut de l'animal, la sensibilité diagnostique obtenue sur 45 cycles d'amplification est calculée à partir des résultats présentés dans le tableau 18, l'objectif de l'analyse étant de diagnostiquer la maladie chez un animal.

Tableau 18: Résultats obtenus par PCR-TR au niveau du statut de l'animal : évaluation à 45 cycles

Cible <i>IS711</i>	animaux positifs	animaux négatifs	Total
Positifs	47	7	54
Négatifs	7	165	172
Total	54*	172	226

Cible <i>bcp31</i>	animaux positifs	animaux négatifs	Total
Positifs	29	4	33
Négatifs	25	168	193
Total	54*	172	226

Cible <i>per</i>	animaux positifs	animaux négatifs	Total
Positifs	29	6	35
Négatifs	25	166	191
Total	54*	172	226

* 2 de ces 54 animaux ont été analysés à partir d'un seul ganglion

La sensibilité est nettement améliorée lorsque l'on raisonne en terme de détection de *Brucella* au niveau de l'animal. On passe d'un pourcentage de 74,7 % [66 ; 83,5] à 87 % [78,1 ; 96,0] pour l'*IS711*, de 40% [30,1 ; 49,9] à 53,7% [40,4 ; 67,0] pour le gène *bcp31* et de 36,8 [27,1 ; 46,5] à 53,7% [40,4 ; 67,0] pour le gène *per* (Tableau 17 et 19). Nous constatons que la même sensibilité est obtenue à partir des PCR-TR *bcp31* et *per* lorsque l'on raisonne au niveau du statut de l'animal.

En comparant le pourcentage de sensibilité de la cible *IS711* avec les cibles *bcp31* et *per*, on constate que les différences de pourcentage P sont significatives. En effet, les valeurs correspondantes sont P = 3,14 et P = 5 respectivement, sachant que la valeur seuil au risque 5% est 1,96.

Tableau 19. Sensibilité diagnostique de la PCR-TR sur l'ensemble des échantillons positifs en bactériologie : statut établi au niveau de l'animal

Cible	% de sensibilité	IC 95%
<i>IS711</i>	87	[78,1 ; 96,0]
<i>bcp31</i>	53,7	[40,4 ; 67,0]
<i>per</i>	53,7	[40,4 ; 67,0]

L'augmentation de sensibilité diagnostique calculée au niveau de l'animal résulte du fait que pour une paire de ganglions analysée, les 2 ganglions sont trouvés positifs en bactériologie, avec un nombre d'UFC variable, alors qu'en PCR-TR on constate que près de la moitié des animaux déclarés positifs en PCR-TR *bcp31* et PCR-TR *per* et près d'un tiers pour l'*IS711* le sont seulement par un seul des deux ganglions testés (Tableau 20).

Tableau 20. Détection des paires de ganglions d'animaux issus de foyer de brucellose par PCR-TR sur les cibles *IS711*, *bcp31* et *per*

Ct = 45	<i>IS711</i>	<i>bcp31</i>	<i>per</i>
Animaux positifs	47 sur 54	30 sur 54	23 sur 54
Paires de ganglions positifs	30 sur 47 ^{**}	13 sur 30 [*]	13 sur 23 [*]

^{**} Trois des animaux positifs ont été étudiés à partir d'un seul ganglion

^{*} Un des animaux positifs a été étudié à partir d'un seul ganglion

e) *Détermination du seuil de positivité en PCR temps réel*

Suivant la valeur maximale du Ct considéré comme seuil de positivité de l'échantillon, les valeurs de spécificité et de sensibilité diagnostiques varient (Tableau 21). Il convient donc de choisir un Ct seuil de détection en PCR-TR qui permette d'obtenir des valeurs pour ces deux paramètres les plus élevées possible, sachant qu'ils varient en sens inverse.

On s'aide pour ce choix d'un outil graphique, la courbe ROC (*Receiver Operating Characteristics*) qui trace en fonction du seuil de positivité choisi les valeurs de la sensibilité

(Se) correspondant aux vrais positifs en fonction de (1-Sp) correspondant aux faux positifs (Figure 21).

Tableau 21 : Calcul des valeurs Se, Sp, (100-Sp) et J, au niveau du statut échantillon, en fonction du Ct seuil choisi.

Ct seuil	IS711				bcsp31				per			
	Sp	Se	100-Sp	J	Sp	Se	100-Sp	J	Sp	Se	100-Sp	J
27	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
28	100,0	1,1	0,0	0,0	100,0	1,1	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
29	100,0	7,4	0,0	0,1	100,0	1,1	0,0	0,0	100,0	1,1	0,0	0,0
30	100,0	12,6	0,0	0,1	100,0	8,4	0,0	0,1	100,0	1,1	0,0	0,0
31	100,0	17,9	0,0	0,2	100,0	15,8	0,0	0,2	100,0	9,5	0,0	0,1
32	100,0	24,2	0,0	0,2	100,0	16,8	0,0	0,2	100,0	14,7	0,0	0,1
33	100,0	28,4	0,0	0,3	100,0	20,0	0,0	0,2	100,0	16,8	0,0	0,2
34	100,0	32,6	0,0	0,3	100,0	24,2	0,0	0,2	100,0	20,0	0,0	0,2
35	100,0	37,9	0,0	0,4	100,0	28,4	0,0	0,3	100,0	24,2	0,0	0,2
36	100,0	43,2	0,0	0,4	100,0	30,5	0,0	0,3	100,0	26,3	0,0	0,3
37	100,0	51,6	0,0	0,5	100,0	32,6	0,0	0,3	100,0	28,4	0,0	0,3
38	100,0	61,1	0,0	0,6	98,8	37,9	1,2	0,4	99,4	31,6	0,6	0,3
39	100,0	68,4	0,0	0,7	97,7	38,9	2,3	0,4	99,4	33,7	0,6	0,3
40	99,4	72,6	0,6	0,7	97,7	38,9	2,3	0,4	98,3	34,7	1,7	0,3
41	97,1	73,7	2,9	0,7	97,7	40,0	2,3	0,4	97,1	35,8	2,9	0,3
42	96,5	73,7	3,5	0,7	97,7	40,0	2,3	0,4	96,5	36,8	3,5	0,3
43	96,5	74,7	3,5	0,7	97,7	40,0	2,3	0,4	96,5	36,8	3,5	0,3
44	95,9	74,7	4,1	0,7	97,7	40,0	2,3	0,4	96,5	36,8	3,5	0,3
45	95,9	74,7	4,1	0,7	97,7	40,0	2,3	0,4	96,5	36,8	3,5	0,3

L'analyse de la Figure 21, montre qu'un plateau apparaît assez brutalement à partir d'un Ct seuil de 39 pour l'IS711, qui est le point de la courbe le plus proche du coin supérieur gauche. Ce point correspond à une sensibilité diagnostique de 68,4% [61,2 – 75,6] et une spécificité diagnostique de 100%. Si on fixe le seuil de Ct à 40, la sensibilité diagnostique passe de 68,4% [61,2 – 75,6] à 72,6% [65,7 – 79,5], ce qui permet une augmentation de la sensibilité diagnostique de 4,2%, avec une dégradation modérée de la spécificité diagnostique qui passe de 100% à 99,4% [98,3 – 100] (Tableau 21, Figure 21).

Par contre pour les deux autres cibles, il est beaucoup plus difficile de choisir une valeur seuil car les pourcentages de sensibilité sont faibles dès les premiers points de la courbe et la

spécificité chute brutalement pour chaque augmentation d'un cycle de la valeur seuil sans que le gain en sensibilité soit notable.

De la même manière que pour la PCR-TR IS711, les PCR-TR *bcsp31* et *per* montrent qu'un plateau apparaît assez brutalement à partir d'un Ct seuil de 37, ce point est le point de la courbe le plus proche du coin supérieur gauche. Ce point correspond à une sensibilité diagnostique de 32,6% [25,3 - 39,9] pour *bcsp31* et de 28,4% [21,4 - 35,8] pour *per* et une spécificité diagnostique de 100% pour les 2 cibles.

Si on fixe le seuil de Ct à 38, la sensibilité diagnostique passe de 32,6% [25,3 - 39,9] à 37,9% [30,4 - 45,4], pour *bcsp31* et de 28,4% [21,4 - 35,8] à 31,6% [24,4 - 38,8] pour *per*, ce qui permet une augmentation de la sensibilité diagnostique de 5,3% et de 3,2% respectivement, avec une dégradation modérée de la spécificité diagnostique qui passe de 100% à 98,8% [97,2 - 100] pour *bcsp31* et de 100% à 99,4% [98,3 - 100] pour *per* (Tableau 21, Figure 21).

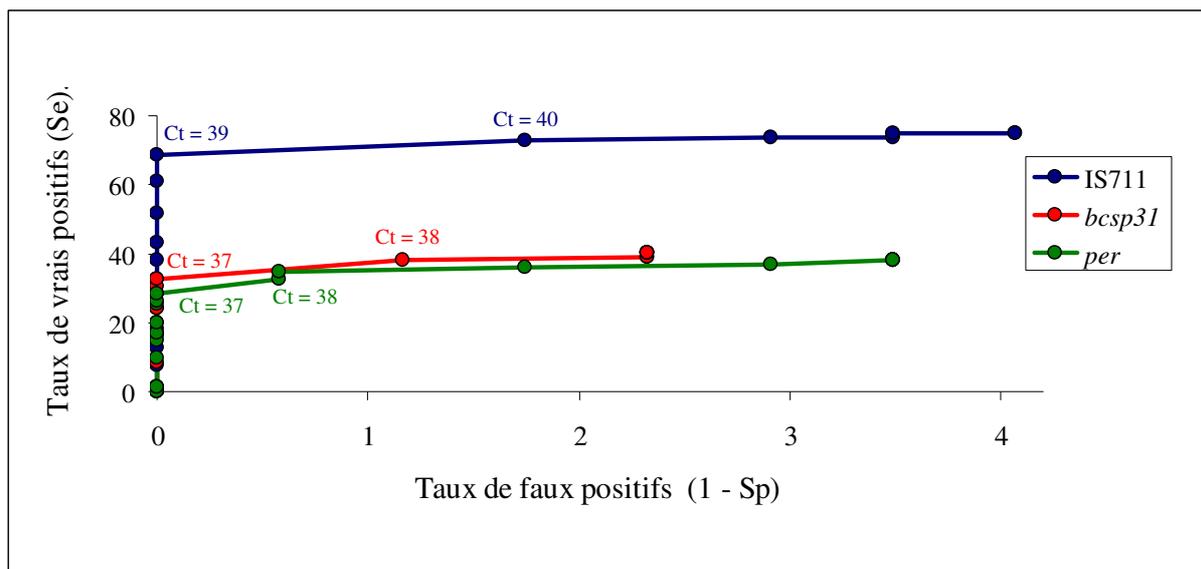


Figure 21. Courbes de ROC pour les 3 tests de détection de *Brucella* à partir de prélèvements biologiques par PCR-TR : détermination du Ct seuil de positivité pour le diagnostic de *Brucella*.

Les valeurs de la sensibilité (Se) sont représentées en ordonnées et les valeurs correspondant à la valeur de (100 - la spécificité (100-Sp)) sont présentées en abscisses.

L'indice de Youden (J) est un outil complémentaire associant sensibilité et spécificité pour la détermination d'un seuil. On constate d'après le tableau 21 que J est maximum pour la détection de l'IS711 à partir de Ct = 39 (J = 0,7), alors que les PCR-TR *bosp31* et PCR-TR *per* présentent des valeurs de J maximales à partir de Ct = 38 (J = 0,4) et Ct = 36 (J = 0,3) respectivement (Tableau 21, Figure 22).

Les seuils de Ct définis par les différentes courbes ROC sont cohérents avec les indices J obtenus pour chacune des PCR-TR car ces seuils de Ct correspondent aux valeurs maximum de l'indice de Youden pour chacune des PCR-TR (Tableau 21, Figure 22)

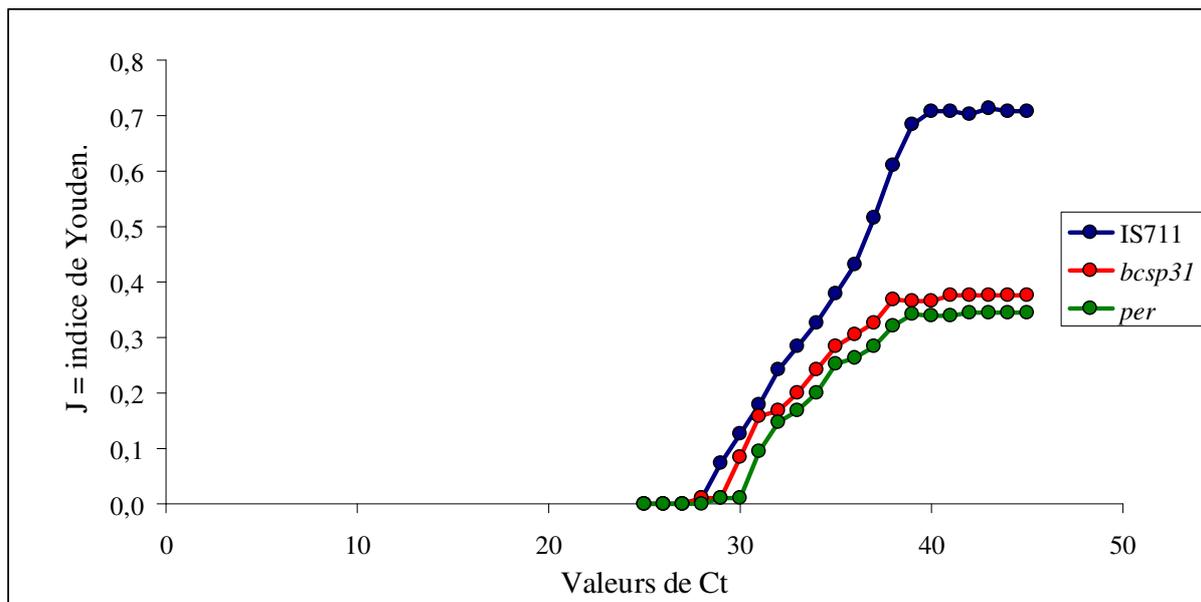


Figure 22 : Calcul de l'indice de Youden pour les 3 tests de détection de *Brucella* à partir de prélèvements biologiques par PCR-TR : détermination du Ct seuil de positivité pour le diagnostic de *Brucella*. L'indice de Youden J est représenté en ordonnées et les valeurs de Ct sont présentées en abscisses.

Outre des échantillons trouvés positifs en PCR-TR parmi les échantillons issus d'animaux indemnes de brucellose, parmi les 65 échantillons trouvés négatifs en bactériologie dans les 160 ganglions prélevés sur des animaux issus du foyer de brucellose, 6 ont donné un résultat positif en PCR-TR *IS711*, 4 en PCR-TR *bcp31* et 1 en PCR-TR *per* à l'issue des 45 cycles d'amplification. Nous avons analysés ces résultats en fonction des Ct seuil de positivité fixés précédemment (Tableau 22).

Tableau 22: Nombre de faux positif théorique et observé sur l'ensemble des échantillons négatifs en bactériologie (n=65)

Cible	% de spécificité	Faux positif théorique	Faux positif observé
Ct seuil <i>IS711</i> = 40	99,4	0,4	1
Ct seuil <i>bcp31</i> = 38	98,8	0,8	1
Ct seuil <i>per</i> = 38	99,4	0,4	1

Il arrive que des échantillons contenant des *Brucella* soient négatifs en bactériologie mais positifs en PCR-TR car la PCR-TR ne dépend pas de la viabilité de la bactérie pour permettre sa détection. Nous avons donc appliqué à ces échantillons négatifs en bactériologie (n = 65) le pourcentage de spécificité déterminé précédemment (Tableau 22). Ces échantillons négatifs en bactériologie et positifs en PCR-TR suivant les Ct seuil déterminés auparavant par les courbes ROC et l'indice de Youden, semblent correspondre à des faux positifs (Tableau 22), puisque le nombre de faux positifs théoriques et celui observé sont proches. Le nombre de faux positif théorique est de 0,4 pour l'*IS711* et *per* et de 0,8 pour *bcp31* et le nombre de faux positif observé est égal à 1 pour les 3 cibles.

Synthèse des résultats de la première partie

Nous avons donc mis au point une PCR-TR spécifique basée sur la séquence d'insertion IS711 permettant la détection des différentes espèces et biovars de *Brucella*. Après évaluation de cet outil sur une série de prélèvements positifs issus d'un foyer de brucellose et négatifs issus d'animaux indemnes, il s'avère que la PCR-TR reste moins sensible que la bactériologie en particulier lorsque la quantité de *Brucella* est faible dans les échantillons positifs.

La PCR-TR IS711 est dépendante de la quantité d'ADN de *Brucella* présente dans l'échantillon. Néanmoins, elle reste une méthode prometteuse de par sa rapidité, sa facilité et sa marge d'amélioration. En effet, nous espérons améliorer les performances de la PCR-TR IS711, en travaillant maintenant sur l'optimisation du protocole d'extraction d'ADN de *Brucella*.

B. Résultats de la 2ème partie : Etude phylogénétique entre le genre *Brucella* et le genre *Ochrobactrum*

1. Recherche de la séquence répétée BRU-RS et de la séquence d'insertion IS711 chez *Ochrobactrum*

Si *Brucella* et *Ochrobactrum* sont considérés actuellement comme 2 genres distincts, la forte similitude génétique et l'existence de réactions croisées décrites dans la littérature (Baily et al., 1992 ; Herman et De Ridder, 1992 ; Romero et al., 1995 ; Rijpens et al., 1996 ; Da Costa et al., 1996 ; Casañas et al., 2001) suggèrent un reclassement de ces bactéries en un seul genre.

En théorie aucune définition universelle concluant à l'appartenance à un genre n'a été formulée jusqu'à présent et les critères utilisés restent subjectifs (<http://www.bacterio.cict.fr/>). Les critères génétiques utilisés varient selon les auteurs. Pour certains, le regroupement d'espèces dans un même genre est déterminé par un pourcentage d'identité globale de 30 à 60 % entre les ADN, pour d'autres il se fait sur la base des séquences des ADNr ou ARNr 16S (pourcentage d'identité supérieure à 90% ou 94%). D'autres encore se basent sur le pourcentage en GC et rassemblent dans un même genre des espèces dont les différences en % GC sont inférieures à 10.

Des études phylogénétiques récentes basées sur l'ARNr 16S, réalisées par Scholz et collaborateurs (2008), montrent que les espèces d'*Ochrobactrum* présentent plus de 95% d'identité avec *Brucella* spp. (Tableau 23).

La ressemblance entre les 2 genres va jusqu'aux symptômes de la maladie, en effet, les espèces *O. anthropi* et *O. intermedium* peuvent causer des infections systémiques ressemblant fortement aux infections à *Brucella* (Scholz et al., 2008).

Des hybridations ADN-ADN entre *B. melitensis* 16M et *Ochrobactrum* ont montré une identité de 55,5% pour *O. intermedium* (Scholz et al., 2008b) et pouvant aller jusqu'à 30% pour *O. anthropi* (Holmes et al., 1988).

De plus, le pourcentage en GC des espèces d'*Ochrobactrum* est compris entre 56% et 59%, un pourcentage quasi identique avec celui des *Brucella* spp. qui se situe entre 56% et 58% selon les espèces (Don et al., 2005).

Tableau 23 : Pourcentage d'identité basé sur la séquence ARNr 16S entre le genre *Brucella* et différentes espèces d'*Ochrobactrum* (selon Scholz et al., 2008).

Espèces	% d'identité basé sur le 16SRNA
	<i>Brucella</i> spp
<i>O. grignonense</i>	97,1
<i>O. gallinifaecis</i>	95,5
<i>O. oryzae</i>	97,3
<i>O. tritici</i>	98,4
<i>O. anthropi</i>	98,7
<i>O. intermedium</i>	98,1
<i>Pseudochrobactrum saccharolyticum</i>	95,9

Nous avons choisi de travailler sur les séquences IS711 et BRU-RS ainsi que sur les protéines membranaires Omp 10, Omp 16 et Omp 19 et la protéine périplasmique BP26 afin d'obtenir des arguments qui permettraient de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse que les espèces de *Brucella* et les espèces d'*Ochrobactrum* font partie d'un même genre.

La séquence IS711 est spécifique du genre *Brucella* (Ouahrani et al., 1993). C'est d'ailleurs pour cela que nous nous sommes basés sur ce gène afin de mettre au point un outil de détection par la PCR-TR. Cette séquence possède un site préférentiel d'insertion correspondant à la séquence répétée BRU-RS (BRU-RS1 et BRU-RS2). Après recherche *in silico* avec la séquence de BRU-RS1, nous avons constaté la présence de cette séquence chez *O. anthropi*, qui est le premier génome d'*Ochrobactrum* à avoir été entièrement séquencé et le seul (avec *O. intermedium* depuis peu) à être accessible.

Cette recherche faite avec le logiciel BLAST nous a permis d'observer la présence de 34 séquences homologues chez *O. anthropi* (27 sur le chromosome I et 7 sur le chromosome II) ; cette recherche réalisée sur *B. melitensis* 16M permet d'obtenir 38 séquences de BRU-RS1 (24 sur le chromosome I et 14 sur le chromosome II).

La similitude des résultats obtenus in silico en terme de présence et de nombre de copies de la séquence BRU-RS1, nous a amené à confirmer sa présence chez *O. anthropi* par la technique de Southern Blot, et à la rechercher chez les autres espèces d'*Ochrobactrum* (Figure 23). Le tableau 24 présente les souches d'*Ochrobactrum* qui ont été utilisées pour ce Southern Blot BRU-RS. La souche *Brucella* de référence utilisée pour ces recherches a été *B. melitensis* 16M et une souche de *Salmonella* Typhimurium a servi de témoin négatif. La sonde BRU-RS utilisée dans l'étude a été choisie en se basant sur la sonde BB703 utilisée par Halling et Bricker (1994) ciblant la séquence BRU-RS.

Tableau 24. Souches des différentes espèces d'*Ochrobactrum* utilisées

Souches	Puits
<i>O. anthropi</i> DSM 14396	1
<i>O. anthropi</i> 7b2c	2
<i>O. anthropi</i> CCUG 12303	3
<i>O. anthropi</i> DSM 20150	4
<i>O. anthropi</i> LMG 3331 (T)	5
<i>O. anthropi</i> LMG 35	6
<i>O. anthropi</i> LMG 7991	7
<i>O. gallinifaecis</i> DSM 15295 (T)	8
<i>O. gallinifaecis</i> iso 1965	9
<i>O. grignonense</i> oga9a	10
<i>O. haematophilium</i> CCUG 38531	11
<i>O. intermedium</i> CCM 7036	12
<i>O. intermedium</i> CCUG 39736	13
<i>O. intermedium</i> LMG 3301 (T)	14
<i>O. intermedium</i> LMG 3306	15
<i>O. intermedium</i> LMG 5425	16
<i>O. intermedium</i> LMG 5446	17
<i>O. intermedium</i> RR	18
<i>O. intermedium</i> TM 73	19
<i>O. lupini</i> LUP21	20
<i>O. oryzae</i> DSM 17471	21
<i>O. pseudintermedium</i> CCUG 34735	22
<i>O. pseudintermedium</i> CCUG 43465	23
<i>O. pseudogrignonense</i> CCUG 30717 (T)	24
<i>O. rhizosphaerae</i> PR17(T)	25
<i>O. sp.</i> CCUG 50899	26
<i>O. thiophenivorans</i> DSM 7216 (T)	27
<i>O. tritici</i> LMG 18957	28
<i>O. tritici</i> TA 93	29
<i>O. tritici</i> WS 1830	30

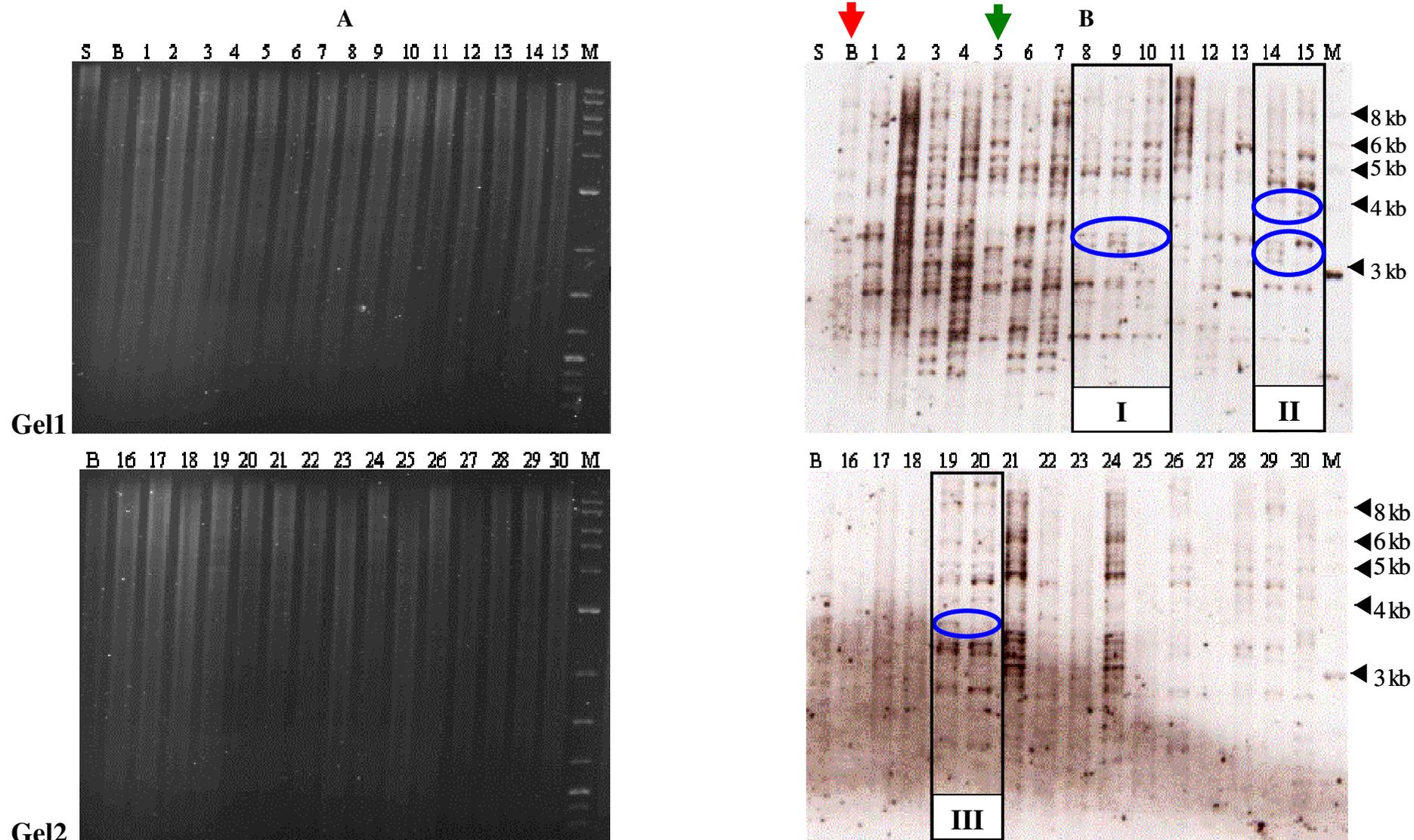


Figure 23. Recherche de la séquence de BRU-RS sur un panel de souches d'*Ochrobactrum* par Southern Blot. Les ADN génomiques ont été digérés par *EcoRI* et ont été hybridés avec une sonde BRU-RS maquée à la biotine. **A** : gel d'électrophorèse à 0,8% d'agarose, **B** : Southern Blot. **S** : *Salmonella* Typhimurium, **B** : *B. melitensis* 16M, **M** : marqueurs de poids moléculaire. La flèche rouge montre le puits contenant *B. melitensis* 16M et la flèche verte montre le puits contenant *O. anthropi* LMG 3331.

Le profil Southern Blot de *B. melitensis* 16M (Flèche rouge) présenté en figure 23 (Puits B, Gel 1) est composé d'une dizaine de bandes d'hybridation d'une faible intensité, d'ailleurs d'autres bandes d'hybridation semblent être présentes mais sont difficiles à percevoir. En effet, l'analyse in silico de la séquence BRU-RS révèle 38 copies sur l'ensemble des 2 chromosomes. Le Southern Blot nous indique également l'absence d'hybridation à partir du témoin négatif *Salmonella* Typhimurium et la présence de la séquence BRU-RS chez la plupart des souches d'*Ochrobactrum* testées.

Le profil observé à partir du génome *O. anthropi* LMG 3331 (Figure 23B, puits 5, flèche verte) présente, comme les autres espèces d'*Ochrobactrum* hybridant avec la sonde BRU-RS, une dizaine de bandes d'hybridation. Ce résultat est également un peu différent de l'analyse in silico de la séquence BRU-RS réalisée sur le génome *O. anthropi* car 34 copies sont présentes sur l'ensemble des 2 chromosomes.

La répartition théorique de la séquence de notre sonde BRU-RS est différente chez *B. melitensis* et *O. anthropi*. Ces différences sont visualisées par les profils en Southern-Blot. Le profil *B. melitensis* et celui *O. anthropi* sont différents : peu de bandes sont communes.

De même le profil de *O. anthropi* et celui des autres espèces d'*Ochrobactrum* diffèrent et aucune de ces autres espèces ne présente un profil proche de celui de *B. melitensis*.

On peut distinguer parmi les autres espèces *Ochrobactrum* 3 profils qui semblent se détacher (Tableau 25). Seules les souches *O. gallinifaecis* DSM 15295 (Figure 23B, puits 8) et *O. gallinifaecis* iso 1965 (Figure 23B, puits 9) appartenant à l'espèce *O. gallinifaecis* présentent un profil spécifique d'espèce correspondant au profil I du tableau 25. La souche *O. grignonense* oga9a (puits 10) présente le même profil que les 2 souches précédentes, mais une bande d'hybridation d'environ 3,5 kb y est absente (Figure 23B, encerclement bleu).

Tableau 25 : Profils majeurs obtenus après Southern Blot BRU-RS sur l'ensemble des espèces d'*Ochrobactrum*.

Profil	Espèce	Souches	Puits
I	<i>O. gallinifaecis</i>	DSM 15295	8
	<i>O. gallinifaecis</i>	iso 1965	9
	<i>O. grignonense</i>	oga9a	10
II	<i>O. intermedium</i>	LMG 3301	14
		LMG 3306	15
III	<i>O. intermedium</i>	TM 73	19
	<i>O. lupini</i>	LUP21	20

Les souches *O. intermedium* LMG 3301 (Figure 23B, puits 14) et *O. intermedium* LMG 3306 (Figure 23B, puits 15) présentent un profil très similaire (Tableau 25, profil II) malgré 3 bandes d'hybridation différentes entre les 2 souches (entourées en bleu, Figure 23B), 1 d'environ 4 kb en faveur d'*O. intermedium* LMG 3306, et 2 d'environ 3,3 kb en faveur d'*O. intermedium* LMG 3301. Le profil III du tableau 25 regroupe les 2 profils proches d'*O. intermedium* TM 73 (Figure 23B, puits 19) et *O. lupini* LUP21 (Figure 23B, puits 20) avec une bande supplémentaire en faveur d'*O. intermedium* TM 73 à environ 3,5 kb. En dehors de ces 3 profils il n'est pas possible de regrouper les autres espèces : la séquence BRU-RS ne semble pas permettre de caractériser les différentes espèces du genre *Ochrobactrum*.

On constate également que certaines souches d'*Ochrobactrum* présentent des bandes d'hybridation plus intenses que les autres. Cela peut être dû aux variations des quantités d'ADN distribuées dans chaque piste.

Les espèces *O. rhizosphaerae* (Figure 23B, puits 25) et *O. thiophenivorans* (Figure 23B, puits 27) ne présentent pas de bandes d'hybridation, ce qui peut correspondre à l'absence de séquence homologue à BRU-RS. On constate que ces 2 espèces sont 2 espèces très proches d'après les études phylogénétiques de Scholz et collaborateurs basées sur l'ARNr 16S (2008). Il est possible que ces 2 espèces aient évolué à l'écart avant même la séparation entre le genre *Ochrobactrum* et *Brucella* car les autres espèces d'*Ochrobactrum* et les *Brucella* possèdent la séquence BRU-RS. Mais il est aussi tout simplement possible que ce résultat soit dû à une

quantité trop faible d'ADN. Par comparaison, la quantité d'ADN de *B. melitensis* 16M est très faible dans le Gel 2 (Figure 23A, puit B), ce qui explique l'absence apparente de bandes d'hybridation dans le Southern Blot du gel 2 (Figure 23B).

Toutes les autres souches d'*Ochrobactrum* présentent des bandes d'hybridation uniques. Les 2 souches appartenant à l'espèce *O. pseudintermedium* (Figure 23B, puits 22 et 23) semblent présenter des bandes d'hybridations mais elles sont peu distinguables.

Au vu de ces résultats, nous nous sommes demandé si la présence de BRU-RS était accompagnée de celle de la séquence d'insertion IS711. Cependant l'analyse in silico du génome d' *O. anthropi* montre l'absence de l'IS711.

Pour vérifier cette absence d' IS711 dans les autres espèces d'*Ochrobactrum*, nous avons testé la totalité des souches d'*Ochrobactrum* (annexe 2) par Southern Blot avec une sonde IS711 de 729 pb et les 30 souches d'*Ochrobactrum* présentées dans le tableau 24 par PCR-conv et PCR-TR IS711. Les amorces utilisées pour la PCR-conv sont celles utilisées pour la détection de *Brucella* en simple amplification dans la première partie ; pour la PCR-TR IS711, les amorces et la sonde utilisées sont celles mises au point au cours de cette thèse. En PCR-conv comme en PCR-TR, les essais ne mettent pas en évidence la présence de l'IS711 chez *Ochrobactrum*. De plus, en Southern blot, on n'obtient aucune hybridation sur l'ensemble des souches d'*Ochrobactrum* testées. Ces résultats confirment donc l'analyse in silico du génome d' *O. anthropi* et l'absence d'IS711 dans les souches d'*Ochrobactrum*.

2. Détection de séquences homologues à celles des gènes *omp10*, *omp16*, *omp19* et *bp26* de *Brucella* spp. dans un panel d'espèces d'*Ochrobactrum*

Des protéines de membrane ont déjà été utilisées pour des études taxonomiques, par exemple les gènes *Omp2a* et *Omp2b* ont été utilisés pour des études de polymorphisme entre les différentes espèces du genre *Brucella* (Cloeckeaert et al., 2002).

L'approche taxonomique par les OMPs nous a semblé intéressante car les 3 gènes codant pour ces 3 lipoprotéines (*omp19*, *omp16* et *omp10*) sont orthologues et présents chez *B. abortus* et chez *O. anthropi*. De plus, des épitopes communs de ces protéines ont été mis en évidence chez *Brucella* et chez *O. anthropi* par Cloeckeaert et collaborateurs (1999).

L'immunogénicité de ces 3 protéines a été mise en évidence chez *Brucella* (Cloeckeaert et al., 1999) et la présence d'épitopes communs entre *Brucella* et les 2 espèces *O. anthropi* et

O. intermedium pourrait expliquer des réactions sérologiques croisées constatées entre *Brucella* et *Ochrobactrum* (Cloekaert et al., 1999).

La protéine BP26 nous a également intéressé car le gène de cette protéine immunogénique est utilisé comme marqueur moléculaire chez *Brucella* (Cloekaert et al., 2000a). Par ailleurs aucune publication ne met en évidence la présence du gène et l'expression de la protéine chez *Ochrobactrum* alors qu'une analyse in silico montre une similitude de séquence de 84% entre les séquences protéiques de BP26 chez *Brucella* et chez *O. anthropi*.

La comparaison in silico des séquences protéiques des Omp10, Omp16 et Omp19 révèle une similitude entre *Brucella* et *O. anthropi* de 85%, 98,2% et 89,4% respectivement (Figure 24).

Nous nous sommes attachés à caractériser par PCR la présence ou non de ces 4 gènes chez les différentes espèces d'*Ochrobactrum* (Tableau 24), et à vérifier leur expression par un test sérologique ELISA.

Omp10

```
b.suis1330 MKRFRIVAPLALMSLALAACETTGPVSGNAPIIAHTPAGIEGWSWVDPNGIASSFNGGIFE 60
O.anthropi MKRFRIIAPLAVMSLALAACETTGPVGGNVPTVSRAPAGIEGWSWVDPNGIVSSFNGGIFE 60
*****:*****:*****:***** .**.* ::::*****:*****:*****

b.suis1330 TRTDTNEKLAEGNYLYLSPQLVEINMRSIVRGTTSKVNCALVSPQLNCTSSAGSRFSL 120
O.anthropi TRSTDTNEKLAEGNYRYQSPQLVEIDMRSIVRGTTSSKVNALVSPQLNCTSSAGSRFSL 120
**:*:***** * *****:*****:*****:*****:*****:*****

b.suis1330 TRRNAG 126
O.anthropi TRRAAA 126
*** * .
```

Omp16

```
b.suis1330 MRRIQSIARSP IAIALFMSLAVAGCASKKNLPNNAGDLGLGAGAAATPGSSQDFTVNVGDR 60
O.anthropi MRRIQSIARSP IAIALFMSLAVAGCASKKNLPNNAGDLGLGAGAAATPGSSQDFTVNVGDR 60
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

b.suis1330 IFFDLSSSLIRADAQQTLSKQAQWLQRYQPQYSITIEGHADERGTREYNLALGQRRAAATR 120
O.anthropi IFFDLSSSLIRADAQQTLSKQAQWLQRYQPQYSITVEGHADERGTREYNLALGQRRAAATR 120
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

b.suis1330 DFLASRGVPTNRMRTISYGNERPVAVCDADTCWSQNRRRAVTVLNGAGR 168
O.anthropi DFLASRGVPTNRMRTISYGNERPVAVCDADSCWSQNRRRAVTVLNGAGS 168
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
```

Omp19

```
b.suis1330 MGISKASLLSLAAAGIVLAGCQSSRLGNLDNVSPPPPPAPVNAVPAQTVQKGNLDSP--T 58
O.anthropi MGISKASLLSLAAAGIVLAGCQSSRFGNLDTVSPPPPPVNAAPAGSVQKGNLNSPNAS 60
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

b.suis1330 QFPNAPSTDMAQSGTQVASLPPASAPDLTPGAVAGVWNASLGGQSKKIATPQTKYQGQY 118
O.anthropi QFPTAPTDPNAQPGTQVASLPPASAPDLTPGSVAGVWNASLGGQSKKIATPQTKYQGQY 120
**.*:***:*.**.*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

b.suis1330 RAGPLRCPGELGNLASWAVNGKQLVLYDANGGTVASLYSSGQGRFDGQTTGGQAVTLRS 177
O.anthropi RAGPLRCPGELGNLASWAVNGKQLVLYDANGGTVASLYSSGQSRFDGQTTGGQAVSLRS 179
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
```

BP26

```
b.suis1330 MNTRASNFLAASFSTIMLVGAFSLPFAQENQMTTQPARIAVTGEEMMTASPDMAILNLS 60
O.anthropi MNNRATLLLATSFSAIMLAGALTLPALAQENQMTKQPARIAVTGEGTMTASPDMAILNLS 60
**.*:.*:***:***:***:***:***:***:*****:*****:*****:*****:*****

b.suis1330 VLRQAKTAREAMTANNEAMTKVLDAMKKAGIEDRDLQTGGINIQPIYVYPDDKNNLKEPT 120
O.anthropi VLREAKTAREAMTANNEAMAKVLEAMKKAGIEDRDLQTGGINIQPRYVYPDDKKNLKEPS 120
***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

b.suis1330 ITGYSVSTSLTVRVRELAVNGKILDESVTLGVNQGGDLNLDNPN SAVINEARKRAVANA 180
O.anthropi ITGYTVSNLTVRVRDLAKVGNVLDVSVTLGVNQGDLNLDNPN AATINEARKRAVADA 180
****:***:*****:***:***:*****:*****:*****:*****:***:*****:***

b.suis1330 IAKAKTLADAAGVGLGRVVEISELSRPPMPMPIARGQFRITMLAAAPDNSVPIAAGENSYN 240
O.anthropi IAKAKTLADAAGVIGRVVEINEQSRPPMPMPIARAQYKMAAAAPEDAVPVAAGENSYN 240
*****:*****:*****.* *****:*****.*:*** *****:***:*****

b.suis1330 VSVNVVFEIK- 250
O.anthropi VSVNVVFEIKE 251
*****
```

Figure 24 : Alignement des séquences protéiques des protéines Omp10, Omp16, Omp19 et BP26 entre *Brucella* et *Ochrobactrum anthropi*.

Les PCR-conv effectuées sur le panel de souches d'*Ochrobactrum* (Tableau 24) ciblant les séquences des gènes *bp26*, *omp10*, *omp16* et *omp19* sont présentées dans les figures 25 à 28.

On constate la production d'amplicons à la taille attendue pour les gènes *bp26*, *omp10*, *omp16* et *omp19* (Figures 25 à 28) en comparaison aux amplicons obtenus pour ces gènes à partir du témoin positif *B. abortus* 544.

BP26

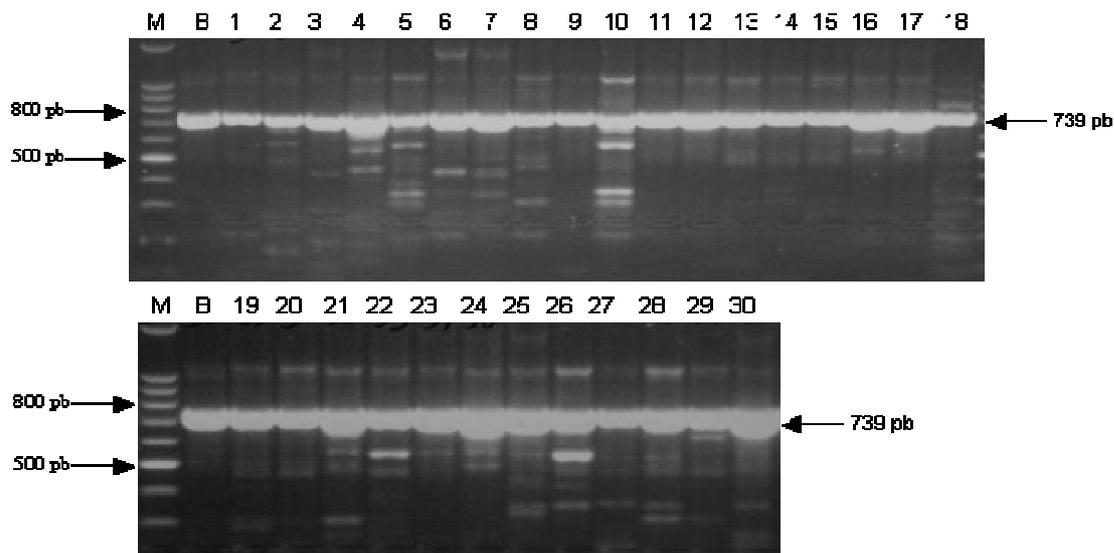


Figure 25 . Recherche de la séquence *bp26* sur un panel de souches d'*Ochrobactrum* par PCR. Le numéro de chaque puits correspond aux souches présentées dans le tableau 24. Le produit d'amplification de 739 pb obtenu à partir des amorces BP26A/BP26B est indiqué sur la figure. M : marqueurs de poids moléculaire, 100 pb ;B : *B. abortus* 544.

Omp10

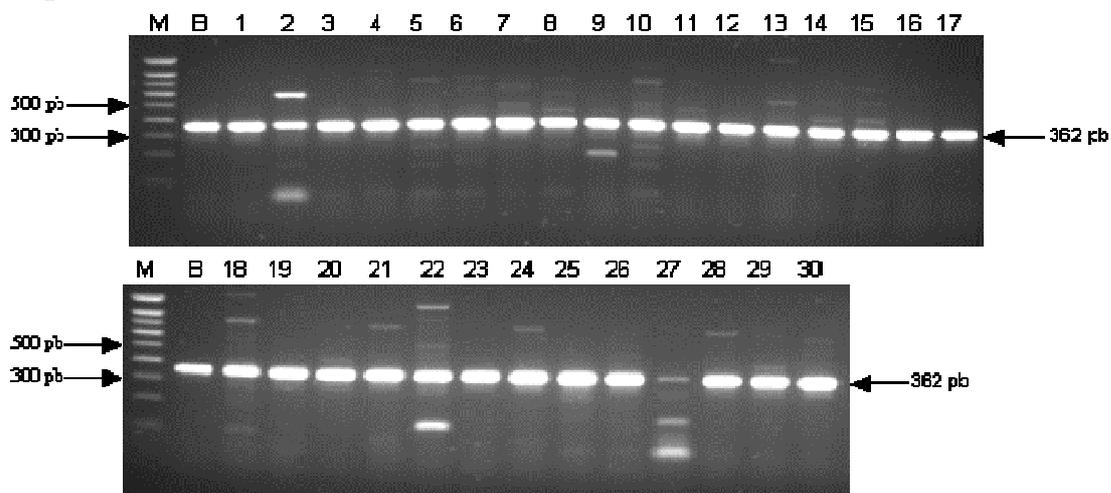


Figure 26 . Recherche de la séquence *omp10* sur un panel de souches d'*Ochrobactrum* par PCR. Le numéro de chaque puits correspond aux souches présentées dans le tableau 24. Le produit d'amplification de 362 pb obtenu à partir des amorces omp10A/omp10B est indiqué sur la figure. M : marqueurs de poids moléculaire, 100 pb ;B : *B. abortus* 544.

Omp16

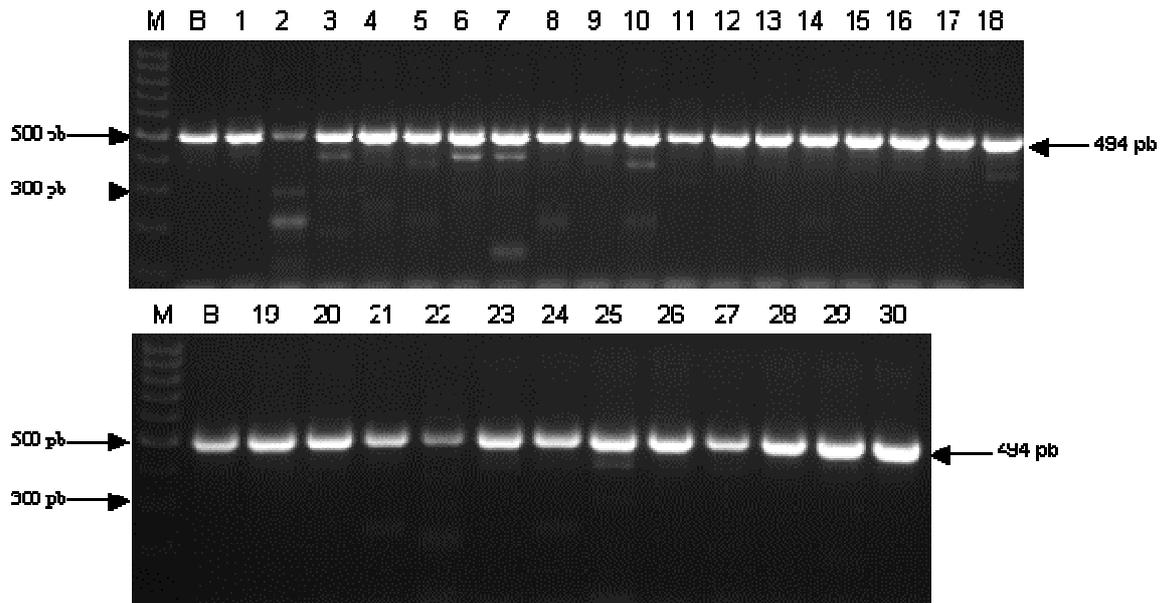


Figure 27. Recherche de la séquence *omp16* sur un panel de souches d'*Ochrobactrum* par PCR. Le numéro de chaque puits correspond aux souches présentées dans le tableau 24. Le produit d'amplification de 494 pb obtenu à partir des amorces *omp16A/omp16B* est indiqué sur la figure. M : marqueurs de poids moléculaire, 100 pb ; B : *B. abortus* 544.

Omp19

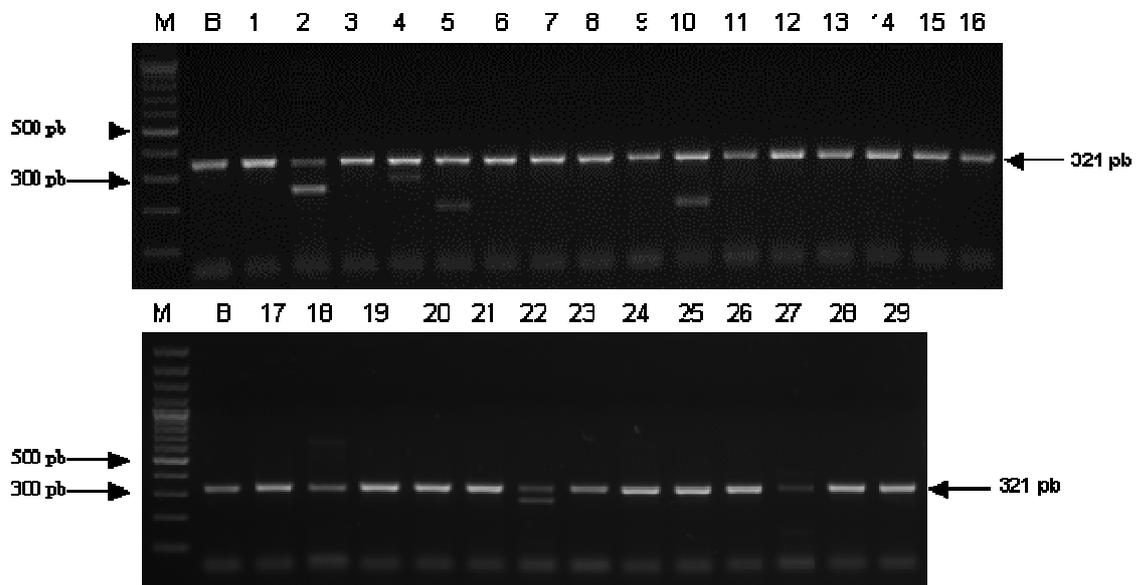


Figure 28. Recherche de la séquence *omp19* sur un panel de souches d'*Ochrobactrum* par PCR. Le numéro de chaque puits correspond aux souches présentées dans le tableau 24. Le produit d'amplification de 321 pb obtenu à partir des amorces internes *omp19Fd/omp19Rv* est indiqué sur la figure. M : marqueurs de poids moléculaire, 100 pb ; B : *B. abortus* 544

On constate néanmoins une bande moins intense à partir de la souche *O. thiophenivorans* pour les PCR utilisant les couples d'amorces ciblant les gènes *omp10* et *omp19* (Figures 26 et 28, puits 27). Ce résultat s'explique probablement par un polymorphisme à l'endroit où les amorces ont été sélectionnées.

La présence des gènes de ces protéines chez l'ensemble des espèces d'*Ochrobactrum* est confirmée par PCR. Les résultats sont en accord avec les analyses *in silico* des séquences nucléotidiques de ces gènes révélant leur présence chez *O. anthropi*.

Les résultats obtenus par Cloeckert et collaborateurs (1999) montrent l'expression des protéines Omp10, Omp16 et Omp19 chez *O. anthropi* et *O. intermedium* avec mise en évidence par ELISA d'épitopes communs. On peut donc s'attendre à ce que toutes les espèces d'*Ochrobactrum* présentent et expriment ces 3 protéines, et à ce que celles-ci possèdent des épitopes communs au même titre que *O. anthropi* et *O. intermedium*.

Pour la protéine BP26, le gène étant mis en évidence chez toutes les espèces d'*Ochrobactrum*, nous avons supposé qu'elle s'y exprimait et présenterait des épitopes communs avec *Brucella*.

3. Recherche d'épitopes communs sur un panel d'espèces *Ochrobactrum* par utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre *Omp10*, *Omp16*, *Omp19* et BP26 de *Brucella* spp

Afin de vérifier l'expression de ces 4 protéines nous avons travaillé sur 29 souches listées dans le tableau 24 qui représentent l'ensemble des espèces d'*Ochrobactrum* (L'espèce *O. rhizosphaerae* n'a pas été analysée).

Des tests ELISA ont été effectués et les résultats sont présentés dans le tableau 26. Nous avons utilisé des anticorps (Ac) monoclonaux fournis par l'équipe brucellose de l'INRA de Nouzilly (Tableau 26). Ces Ac sont issus de surnageant de culture d'hybridome ou de liquide d'ascite de souris (Tableau 28).

Les témoins mis en œuvre au cours de ces essais ELISA étaient :

- un témoin positif avec une souche de *B. melitensis* H38
- un témoin négatif constitué de PBS
- un anticorps anti-peptidoglycane pour évaluer l'efficacité de la sonication.

Les résultats (en densité optique normalisée ou indexée sur l'Ac témoin anti-peptidoglycane : DOc) obtenus avec les différentes espèces d'*Ochrobactrum* testées sont décrits dans le tableau 26.

Tableau 26. Densité optique normalisée (DOc) révélant la liaison des anticorps monoclonaux anti-*Brucella* testés sur différentes espèces d'*Ochrobactrum* en ELISA

Souches bactériennes	anti-Omp10		anti-Omp16		anti-Omp19			anti-BP26
	A	B	C	D	E	F	G	H
<i>B. melitensis</i> H38	2,3	2,1	2	4	1,6	2,1	2,8	1,3
<i>O. anthropi</i> 7b2c	1,8	2,1	0,8	3,4	0,1	0,6	3	0,5
<i>O. anthropi</i> CCUG 12303	1,9	1,9	0,5	3,3	0,7	0,9	2,5	0,7
<i>O. anthropi</i> DSM 14396	0,9	0,9	0,5	1,1	0,3	0,4	1,1	0,2
<i>O. anthropi</i> DSM 20150	1,1	1	2,2	3,5	0,9	1,7	2,2	0,8
<i>O. anthropi</i> LMG 3331	1,2	1,3	1,1	1,8	0,3	0,5	1,8	0,2
<i>O. anthropi</i> LMG 35	1,2	1,4	0,4	4,4	1	1,7	4	1,9
<i>O. anthropi</i> LMG 7991	1,3	1,5	1	1,4	0,4	0,6	1,5	0,4
<i>O. gallinifacis</i> DSM 15295	1,4	1,5	0,9	2,4	0,4	0,6	1,9	0,4
<i>O. gallinifacis</i> iso 1965	1,5	1,6	0,8	2,3	0,4	0,6	1,8	0,4
<i>O. grignonense</i> oga9a	0,6	0,6	1,5	2,3	0,4	0,6	1,2	0,4
<i>O. haematophilum</i> CCUG 38531	0,7	0,7	1,1	2,2	0,5	0,7	1,7	0,5
<i>O. intermedium</i> CCM 7036	1,4	1,7	1,8	2	0,5	0,9	1,6	0,5
<i>O. intermedium</i> CCUG 39736	1,5	1,6	1,5	2	0,6	0,9	2	0,6
<i>O. intermedium</i> LMG 3301	1,2	1,2	1	1,1	0,5	0,7	1,5	0,4
<i>O. intermedium</i> LMG 3306	1,4	1,3	1,7	3,6	0,9	1,2	1,9	1
<i>O. intermedium</i> LMG 5425	1,2	1,2	3,2	3,2	1,5	1,9	1	1,1
<i>O. intermedium</i> LMG 5446	1,5	1,4	0,8	2	0,4	0,7	1,5	0,5
<i>O. intermedium</i> RR	1,2	1,1	2,7	3,3	1,3	1,6	1,8	1,1
<i>O. intermedium</i> TM 73	0,7	0,9	1,7	2,3	0,6	1,1	1,6	0,6
<i>O. lupini</i> LUP21	1,7	1,7	1,8	3,2	0,7	1	2,7	0,5
<i>O. oryzae</i> DSM 17471	0,6	0,7	1,7	2,3	0,4	0,9	1,5	0,5
<i>O. pseudintermedium</i> CCUG 34735	1,5	1,5	2	2,5	1	1,2	2	0,4
<i>O. pseudintermedium</i> CCUG 43465	1,5	1,7	1,2	2,1	0,5	0,7	2,1	0,4
<i>O. pseudogrignonense</i> CCUG 30717	1,5	1,6	1,1	2,3	0,4	0,6	1,7	0,4
<i>O. sp.</i> CCUG 50899	1,7	1,8	0,9	2,4	0,4	0,6	2,2	0,4
<i>O. thiophenivorans</i> DSM 7216	0,7	0,8	1,7	3,2	0,8	1,6	1,9	0,8
<i>O. tritici</i> LMG 18957	1,2	1,2	1,6	2,8	0,8	1	1,4	0,8
<i>O. tritici</i> TA 93	0,7	0,8	1,9	3,2	0,7	1,6	1,9	0,8
<i>O. tritici</i> WS 1830	1,7	1,5	2,3	4	1,2	1,5	2,4	1,2

Ces données sont dites normalisées ou indexées sur l'Ac témoin anti-peptidoglycane. La DO normalisée est notée DOc.

En rose : DOc ≤ 0,5 ; en bleu : 0,5 < DOc < 1 ; en vert : DOc < 1. **A** : A68 7G11C10, **B** : A68 8E7B11, **C** : A68 4G1C6, **D** : A76 8C3G3, **E** : 5C10A8, **F** : 10D3H2, **G** : A76 18B2D6, **H** : 5B4E2.

Dans le tableau 26, la couleur rose correspond aux DOc jugées non significatives, la couleur bleue aux résultats faiblement positifs et la couleur verte aux résultats positifs (Cloeckert et al., 1999).

La bactérie témoin positif *B. melitensis* H38 réagit avec tous les Ac monoclonaux dirigés contre Omp10 (A et B), Omp 16 (C et D), Omp 19 (E, F et G) et BP26 (H) avec des DOc supérieures à 1,3. Des différences de DOc plus ou moins importantes entre les souches d'*Ochrobactrum* testées et *Brucella* sont observées (Tableau 26).

Les souches d'*Ochrobactrum* utilisées sont toutes reconnues par les Ac monoclonaux A et B (anti-Omp10), D (anti-Omp16) et G (anti-Omp19) (Tableau 26, en vert). L'ensemble des DOc obtenues étant toutes supérieures à 0,5, on peut supposer la présence des 3 lipoprotéines Omp10, Omp16 et Omp19 chez toutes les souches testées, et donc chez toutes les espèces.

Les résultats faiblement positifs ($\leq 0,7$, en bleu) constatés avec les Ac anti-Omp10 (A et B) impliquant les souches *O. grignonense* oga9a, *O. haematophilum* CCUG 38531, *O. oryzae* DSM 17471 et *O. thiophenivorans* DSM 7216 pourraient être expliqués par une faible expression de cette lipoprotéine chez ces 3 espèces ou par la présence d'un épitope qui ne serait que partiellement reconnu.

Les résultats obtenus à partir des Ac anti-Omp16 (D) et anti-Omp19 (G) sont élevés quelque soit l'espèce d'*Ochrobactrum* testée. Ces résultats nous suggèrent une forte parenté antigénique pour ces 2 lipoprotéines dans toutes les espèces d'*Ochrobactrum* et le partage de ces 2 épitopes cibles des Ac monoclonaux A76 8C3G3 sur Omp16 et A76 18B2D6 sur Omp19 avec le genre *Brucella*.

Concernant l'Ac monoclonal C (anti-Omp16), à l'exception des souches appartenant à l'espèce *O. anthropi*, et *O. intermedium*, toutes les autres espèces présentent des résultats assez homogènes. Les valeurs de DOc vont de 0,8 pour *O. gallinifacis* iso 1965 à 2,3 pour *O. tritici* WS 1830.

Les résultats obtenus à partir des souches appartenant à l'espèce *O. anthropi* et *O. intermedium* sont hétérogènes : pour *O. anthropi*, les DOc vont de 0,4 pour *O. anthropi* LMG 35 à 2,2 pour *O. anthropi* DSM 20150, et pour *O. intermedium* de 0,8 pour *O. intermedium* LMG 5446 à 3,2 pour *O. intermedium* LMG 5425.

La confrontation des résultats de détection par ELISA de la lipoprotéine Omp16 suggère que cette lipoprotéine est bien exprimée par toutes les espèces du genre *Ochrobactrum* et que

l'épitope cible de l'anticorps monoclonal C présente des variations antigéniques plus ou moins importantes d'une espèce à une autre, voir même d'une souche à une autre au sein d'une même espèce.

Concernant les Ac monoclonaux anti-Omp19 (E et F) et anti-BP26, globalement une grande partie des souches testées présentent des DOc inférieures à 1 et les réponses obtenues varient d'une souche à une autre quelque soit l'espèce.

Pour la lipoprotéine Omp19, on peut faire le même constat que pour la lipoprotéine Omp16.

Les résultats obtenus à partir de la protéine BP26 suggèrent une variabilité antigénique ou une faible expression chez les souches d'*Ochrobactrum* testées.

Synthèse des résultats de la deuxième partie

Au vu des résultats obtenus, la séquence BRU-RS a été mise en évidence chez pratiquement toutes les espèces d'*Ochrobactrum*, mais sa présence n'est pas accompagnée de celle de la séquence d'insertion IS711. La spécificité de cette séquence d'insertion chez *Brucella* est donc confirmée, par son absence au sein d'*Ochrobactrum*, son plus proche voisin phylogénétique.

L'étude d'expression de protéines membranaires et périplasmiques chez les espèces du genre *Ochrobactrum* en utilisant des anticorps dirigés contre des protéines homologues du genre *Brucella* nous a permis de constater :

- la présence des gènes au sein de toutes les espèces d'*Ochrobactrum*
- l'expression des 3 lipoprotéines OMPs au sein du genre *Ochrobactrum*
- une variabilité antigénique intra- et inter-espèces des OMPs chez *Ochrobactrum*
- un faible niveau d'expression probable de la protéine BP26 ou la présence d'un épitope non reconnu chez la plupart des espèces *Ochrobactrum*

Ces résultats démontrent un polymorphisme important au sein du genre *Ochrobactrum* et donc à fortiori entre ces deux genres.

En conclusion, ces résultats et les données disponibles à ce sujet dans la littérature ne nous permettent pas de conclure sur un regroupement ou non des 2 genres. Dans le but d'apporter plus d'éléments, il serait intéressant de séquencer les génomes des différentes espèces d'*Ochrobactrum* et de réaliser des expériences d'hybridation ADN-ADN entre ces espèces et *Brucella* car à ce jour, ce genre d'hybridation n'a été réalisée qu'avec les espèces *O. intermedium* et *O. anthropi*. L'expérience d'hybridation ADN-ADN reste une méthode moléculaire de référence fiable et universelle pour l'étude phylogénétique.

DISCUSSION

III. DISCUSSION

La détection du genre *Brucella* nécessite un outil de diagnostic sensible et fiable.

Les outils diagnostics les plus répandus dans les laboratoires sont les techniques sérologiques car elles sont simples à mettre en place et parce que les kits commerciaux correspondants sont disponibles. Ces méthodes restent des outils de premier choix par leur faible coût et leur capacité à traiter de grands volumes d'échantillons en même temps. Toutefois ces tests, basés essentiellement sur le LPS, sont très sensibles mais présentent l'inconvénient de manquer de spécificité, notamment en fournissant des réactions croisées avec *Y. enterocolitica* O :9 (Nielsen et al., 2004).

L'isolement en culture des *Brucella* reste la technique de référence pour l'établissement d'un diagnostic de certitude. Suite à un résultat sérologique permettant de suspecter la présence de la maladie chez les animaux étudiés, la confirmation d'un foyer de brucellose est faite par l'isolement en culture de *Brucella*. Cependant cette technique présente des risques de contamination du personnel et nécessite un travail en laboratoire de sécurité biologique de niveau 3 (P3). De plus la bactériologie reste une méthode lourde et longue.

La détection de *Brucella* par PCR représente donc une alternative prometteuse, notamment la PCR-TR. Cette dernière se fait en enceinte fermée et aucune manipulation post-amplification n'est nécessaire, ainsi, les problèmes de contamination post-PCR à partir d'ADN amplifié d'échantillons positifs sont significativement réduits.

Pour la détection en PCR-TR de bactéries pathogènes au niveau du genre, on utilise classiquement le polymorphisme du gène de l'ARN ribosomique 16S, du gène *rpoB* (codant la sous-unité bêta de l'ARN polymérase) ou encore du gène *groEL* (codant une protéine HSP).

Dans cette étude, nous avons comparé 3 gènes, *IS711*, *bcs31* et *per*, connus pour être conservés au sein du genre *Brucella* (Halling et al., 1993 ; Ouahrani et al., 1993 ; Bricker et al., 1988 ; Morata et al., 2003 ; Godfroid et al., 1998 ; Cloeckert et al., 2000b).

La séquence d'insertion *IS711*, ou *IS6501* a été utilisée en PCR pour la distinction d'espèces chez *Brucella* (Ouahrani-Bettache, 1996 ; Redkar et al., 2001 ; Newby et al., 2003 ; Probert et al., 2004). Ces PCR ciblant l'*IS711* sont basées sur le choix d'une première amorce au sein de la séquence d'insertion et d'une seconde en amont ou en aval de l'*IS711*, sur une séquence spécifique de l'espèce à détecter, bénéficiant ainsi de la localisation spécifique de l'*IS711*.

Très peu d'équipes se sont intéressées à la séquence d'insertion IS711 pour la détection du genre *Brucella* en utilisant des amorces exclusivement internes (Hinic et al., 2008). Le nombre multiple de copies de la séquence d'insertion au sein du génome de *Brucella* constitue théoriquement un avantage par rapport aux 2 autres cibles utilisées (*bcbp31* et *per*) qui sont présentes dans le génome de *Brucella* en un seul exemplaire.

Lors de l'étude d'optimisation des PCR-TR que nous avons mis en œuvre, la spécificité des couples d'amorces a été testée sur l'ADN de 68 micro-organismes non-*Brucella* parmi lesquels certains sont proches de *Brucella* sur un plan antigénique ou génétique et d'autres sont responsables d'avortement. Les essais se sont montrés spécifiques pour les 3 cibles et aucune réaction croisée n'a été observée avec les amorces spécifiques des gènes IS711, *bcbp31* et *per* (Tableau 4 et 6).

Les PCR-TR ont permis la détection de toutes les espèces et biovars de *Brucella* testés, quelque soit la cible. Mais la précocité des Ct obtenus en PCR-TR à partir des amplifications de l'IS711 au sein des souches de référence de *Brucella* a montré son intérêt par rapport aux 2 autres cibles, et ce quelque soit l'espèce concernée. De plus, les limites de détection les plus faibles ont été obtenues par la PCR-TR IS711 (Tableau 9) :

- limite de détection à 2 fg d'ADN à partir des ADN de *B. canis* RM6/66, *B. melitensis* 16M et *B. abortus* 544 ; ces souches possèdent 6 à 7 copies d'IS711
- limite de détection à 0,2 fg d'ADN à partir des ADN de *B. ovis* 63/290 qui possède 38 copies d'IS711.

Ces résultats sont en accord avec les résultats présentés dans la littérature. Des PCR-TR basées sur la détection de l'IS711 ont été évaluées par Al Dahouk et collaborateurs (2007) en utilisant les amorces mises au point par Probert et collaborateurs (2004) et Redkar et collaborateurs (2001) dont les objectifs étaient la différenciation d'espèces, une seule des deux amorces ciblant l'IS711. Les limites de détectabilité obtenues vont de 16 fg pour la détection de *B. melitensis* à 100 fg pour la détection de *B. suis*. La PCR-TR mise au point par Newby et collaborateurs (2003), dont le choix des amorces est basé sur le même principe que précédemment, permet de détecter jusqu'à 7,5 fg d'ADN de *B. abortus*. En utilisant des amorces internes, localisées dans la séquence d'insertion, la PCR-TR mise au point par Hinic et collaborateurs (2008) est capable de détecter jusqu'à 10 copies d'IS711. Toutefois ce dernier travail utilise comme ADN un plasmide dans lequel l'IS711 a été cloné et non pas l'ADN génomique de bactéries.

Sachant qu'une copie d'ADN de *Brucella* correspond à environ 5 fg (Queipo-Ortuño et al., 2005), notre PCR-TR IS711 présente donc un seuil de détection plus intéressant, qui résulte du choix des amorces à l'intérieur de la séquence IS711 et permet de bénéficier du nombre élevé de copies dans le génome.

Dans notre étude, plusieurs couples d'amorces ciblant l'IS711 ont été testés, certains présentant des défauts de spécificité. Le couple que nous avons sélectionné : IS421/IS511 permet d'amplifier une séquence qui se trouve au centre de l'IS711 et qui commence en position 421 et se termine en position 599 de la séquence d'insertion (Figure 17). La séquence ciblée est donc proche, mais plus étendue, que celle retenue par Hinic et collaborateurs (2008) qui va des nucléotides 472 à 533. La partie centrale de la séquence IS711 semble donc conservée et spécifique au genre *Brucella*.

Le couple d'amorces IS421/IS511 que nous avons sélectionné a malgré tout engendré des résultats non spécifiques dans notre étude lors de son utilisation dans un système SYBR Green. Ces résultats ont mis en évidence la nécessité de travailler avec une sonde et nous avons choisi de travailler avec une sonde Taqman, afin d'éviter des problèmes de spécificité. La comparaison des PCR-TR et PCR-conv. a montré que les deux types de PCR étaient spécifiques mais que la PCR-TR était 50 à 500 fois plus sensible (Tableau 9).

Les performances des PCR ayant été établies, nous avons validé leur utilisation sur des échantillons biologiques. Une nouvelle méthode de détection est souvent validée par comparaison avec une méthode en place, dite de référence ou « Gold standard ». Pour la détection de *Brucella*, la méthode de référence reste la méthode bactériologique et le recrutement des échantillons positifs étudiés s'est fait avec cette technique. Les échantillons négatifs utilisés ont été prélevés sur des animaux issus d'élevage qualifiés indemne de brucellose.

Après analyse des résultats obtenus par PCR-TR sur l'ensemble des échantillons mis à notre disposition, il est apparu que l'IS711 présente les meilleures performances diagnostiques par rapport aux gènes *bcsp31* et *per*.

Ces résultats obtenus nous ont conduits à déterminer une valeur de Ct seuil de positivité. Fixer le seuil de positivité est toujours un compromis entre la sensibilité et la spécificité diagnostique du test. En fonction du Ct seuil de positivité choisi, nous améliorons soit la sensibilité soit la

spécificité diagnostique. Ce seuil pourra varier en fonction de la situation épidémiologique du pays. En zone endémique, il sera préférable de privilégier la sensibilité par rapport à la spécificité afin d'optimiser la détection des animaux malades. Dans les pays indemnes de brucellose, comme la France, le Ct seuil de positivité sera fixé de façon à améliorer au maximum la spécificité par rapport à la sensibilité pour éviter les résultats faussement positifs.

Dans notre étude, un Ct seuil de positivité fixé à 40 pour la PCR-TR IS711 correspond à une sensibilité diagnostique de 72,6% [65,7-79,5], et une spécificité de 99,4% [98,3-100] (Tableau 21); cette valeur semble être un bon compromis entre la sensibilité et la spécificité diagnostique.

Cependant, la sensibilité diagnostique reste tout de même assez faible. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que sur les 95 échantillons positifs en bactériologie, 17 donnent moins de 10 colonies pour les 200 µl de volume de broyatensemencés. Après extraction de l'ADN de *Brucella* à partir de ce même volume de broyat, nous obtenons 100 µl d'éluat, à partir duquel 5 µl sont utilisés pour la PCR. Cela revient par extrapolation à une quantité de 0,5 bactéries dans le volume analysé en PCR, et cela sans prendre en compte les pertes de rendement liées à l'extraction d'ADN. Ce rapport de 1 à 20 entre les prises d'essais montre la limite de la PCR lorsque la quantité de *Brucella* dans l'échantillon est très faible, par rapport à la bactériologie.

En ne prenant en compte que les échantillons contenant au minimum 10 colonies pour 200 µl de broyat, les valeurs de sensibilité diagnostique sont significativement améliorées et passent de 72,6% [65,7-79,5] à 88,5% [83,5-93,5] pour un Ct seuil égal à 40 et de 74,7% [67,7-81,4] à 98,7% [97-100] si l'on choisit un Ct seuil de 45.

Les échantillons que nous avons analysés provenaient de porcs abattus dans le cadre d'un abattage total de foyer de brucellose et une partie de ces animaux se trouvaient probablement à un stade précoce de l'infection avec une faible quantité de *Brucella* dans leurs ganglions.

L'évaluation de l'outil de PCR-TR IS711 a été réalisée sur des animaux atteints de brucellose porcine car un foyer de brucellose s'est déclaré au cours de notre travail, pourtant le test de diagnostic est plutôt destiné au dépistage de la brucellose bovine éradiquée depuis 2005 en France et à celui de la brucellose ovine chez une population d'animaux susceptible d'être contaminés par *B. abortus* ou *B. melitensis*.

Par conséquent, il serait primordial d'évaluer l'outil à partir d'animaux infectés par l'une de ces 2 espèces.

Nos résultats restent néanmoins intéressants car les sangliers, ainsi que les lièvres représentent des réservoirs sauvages de *B. suis* biovar 2. L'intrusion du sanglier dans les élevages porcins en plein air contribue à l'émergence de la brucellose porcine à *B. suis* 2 en France (Garin-Bastuji et Hars, 2000).

Les résultats que nous avons obtenus en PCR-TR montrent une limite de détection (0,2 fg ou 2 fg d'ADN en fonction de l'espèce de *Brucella*) de l'ordre de la bactérie (5 fg d'ADN). L'étape limitante des performances diagnostiques est donc l'extraction d'ADN qui conditionne étroitement les résultats obtenus par PCR-TR

Dans le but d'améliorer ces performances diagnostiques, il est donc nécessaire d'optimiser le protocole d'extraction d'ADN. D'autre part, la recherche de *Brucella* se fait à partir d'échantillons biologiques qui peuvent présenter des effets inhibiteurs dépendant de l'échantillon choisi. La présence d'inhibiteurs devra être recherchée systématiquement par l'utilisation d'un contrôle interne (amplification d'une cible présente naturellement dans l'échantillon) ou d'un contrôle externe (ajout d'un acide nucléique avant l'extraction de l'échantillon) afin d'éviter des résultats faussement négatifs.

Nous avons travaillé avec des ganglions lymphatiques. Il a été rapporté que ces organes étaient, en comparaison avec le lait et le sang, les plus appropriés pour la détection de *Brucella* (O'Leary et al., 2006). Mais ces organes présentent le désavantage de contenir une forte concentration en ADN de l'animal ce qui dilue l'ADN de *Brucella* éventuellement présent. Une optimisation de l'extraction d'ADN de *Brucella* permettrait certainement une amélioration des performances diagnostiques.

De plus, pour une validation de test diagnostic, l'OIE recommande de tester au moins 300 animaux infectés et au moins 1000 animaux non infectés afin d'obtenir une estimation la plus significative possible de la sensibilité et de la spécificité diagnostique (OIE, 2008). En effet, la signification statistique des performances nécessite un nombre suffisant d'échantillons, pour minimiser les erreurs d'estimation, qui diminuent à mesure que le nombre d'échantillons analysés est grand. Néanmoins, il n'est pas toujours facile de réunir autant d'échantillons biologiques issus d'animaux infectés, notamment quand ceux-ci dépendent de l'apparition de nouveaux foyers de brucellose.

Nous avons testé au total 95 échantillons de ganglions rétropharyngiens positifs en bactériologie provenant d'un cheptel de porcs infecté, et 172 échantillons négatifs issus d'animaux sains.

L'étude réalisée est une étude préliminaire et nécessitera donc de récolter plus d'échantillons positifs et négatifs afin d'atteindre les recommandations de l'OIE. Les résultats que nous avons obtenus en PCR-TR IS711 sont encourageants malgré une sensibilité plus faible que celle de la bactériologie.

L'existence de réactions croisées décrites dans la littérature entre le genre *Ochrobactrum* et le genre *Brucella*, nous a conduit à nous interroger sur les relations taxonomiques existantes.

Dans le but de confirmer la proximité des ces 2 genres, nous avons recherché la présence de la séquence d'insertion IS711 ainsi que celle de son site préférentiel d'insertion, la séquence répétée BRU-RS, chez les différentes espèces d'*Ochrobactrum*.

Concernant *Ochrobactrum*, au vu des résultats obtenus par Southern Blot, la séquence BRU-RS a bien été mise en évidence chez pratiquement toutes les espèces (exception faite pour *O. rhizosphaerae* et *O. thiophenivorans*), cependant nous n'avons pas pu mettre en évidence de profil caractéristique d'espèce (Figure 23). Par contre la séquence d'insertion IS711 est absente, qu'elle soit recherchée par Southern Blot, par PCR-conv ou par PCR-TR.

L'exclusivité de la présence de cette séquence d'insertion au genre *Brucella* est donc confirmée bien qu'*Ochrobactrum* soit son plus proche voisin phylogénétique. Les 2 espèces de *Brucella* récemment identifiées, *B. microti* et *B. inopinata* n'ont pas été testées car elles n'étaient pas en notre possession. Cependant, l'IS711 a été identifié chez ces espèces (Scholz et al., 2008b, 2009b).

Ainsi, ces résultats suggèrent une acquisition de l'IS711 par *Brucella* après sa séparation évolutive d'avec *Ochrobactrum*. Cela indique également que le genre *Ochrobactrum* est donc susceptible d'intégrer un jour la séquence d'insertion IS711. En effet, Ocampo-Sosa et collaborateurs (2008) ont montré que l'IS711 était capable d'être transposée du génome d'espèces possédant un nombre important de copies, *B. ovis* et *B. pinnipedialis*, vers un plasmide détecteur de transposon après transformation de la bactérie par celui-ci. Il serait donc intéressant de réaliser le même genre d'expérience en transformant cette fois-ci *Ochrobactrum* avec un plasmide contenant l'IS711 en plusieurs copies et de vérifier si une transposition a effectivement eu lieu, notamment en association avec une séquence BRU-RS.

D'autre part, l'homologie entre les 2 genres a été étudiée par la recherche d'épitopes communs entre *Brucella* et *Ochrobactrum*, sur 4 protéines Omp10, Omp16, Omp19 et BP26. En effet, non

seulement des épitopes communs de ces protéines ont été mis en évidence chez *Brucella* et chez *O. anthropi* et *O. intermedium* (Cloeckert et al., 1999), mais aussi, les 3 gènes codant pour les 3 lipoprotéines (Omp10, Omp16 et Omp19) ont été montrés comme étant orthologues chez *Brucella* et chez *O. anthropi* (Barquero-Calvo et al., 2009). Bien que la protéine BP26 n'ait jamais été identifiée chez *Ochrobactrum*, une recherche *in silico* de la séquence dans le génome d'*O. anthropi* a révélé l'existence d'une protéine hypothétique à fonction inconnue dont la séquence présente une similitude significative (Figure 24).

Aussi, les résultats des PCR que nous avons effectuées confirment la présence de ces gènes, y compris *bp26*, chez toutes les espèces d'*Ochrobactrum*. L'expression des gènes OMP a été analysée par ELISA à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-OMPs et les résultats obtenus confirment la présence des OMPs chez toutes les souches d'*Ochrobactrum* testées. Toutefois il existe une variabilité antigénique intra-espèce et inter espèce qui ne permet pas l'identification des espèces par un profil antigénique. De même le niveau de parenté antigénique de ces lipoprotéines entre *Ochrobactrum* et *Brucella* varie en fonction de l'espèce d'*Ochrobactrum* et de l'épitope ciblé.

En ce qui concerne BP26, les résultats obtenus ne nous permettent pas de conclure définitivement sur la présence de la protéine, ni sur une variabilité de l'épitope. En effet, l'anticorps monoclonal peut ne pas réagir avec toutes les espèces d'*Ochrobactrum*, du fait d'une faible expression de la protéine ou par suite d'une variation antigénique au niveau de la protéine BP26. Il aurait fallu comme pour les OMPs, disposer de plusieurs anticorps anti-BP26 pour confirmer la présence de la protéine chez toutes les espèces ou encore utiliser des anticorps polyclonaux pour cibler plusieurs épitopes simultanément.

Dans leur ensemble, les résultats obtenus par ELISA à partir d'anticorps monoclonaux décrits précédemment comme spécifiques de *Brucella* (Cloeckert et al., 1990, 1991, 1996, 1999) mettent en évidence l'existence d'épitopes des OMPs communs chez *Brucella* et chez les souches d'*Ochrobactrum* testées, mais suggèrent une variabilité antigénique au sein du genre *Ochrobactrum* qui ne semble pas être liée à l'espèce. Ces résultats tendent à confirmer l'expression des gènes *omp10*, *omp16*, *omp19* et *bp26* présents dans le génome des différentes espèces du genre *Ochrobactrum* et la proximité des genres *Ochrobactrum* et *Brucella*.

Le comité taxonomique de *Brucella* considère le genre *Brucella* distinct du genre *Ochrobactrum*, cependant certains arguments existent en faveur du regroupement de ces deux genres en un seul.

En effet, l'espèce *B. microti* possédant des caractéristiques propres à *Ochrobactrum* (germe du sol, croissance en 24 heures) a été identifiée au départ comme faisant partie de l'espèce *O. intermedium* (Scholz et al., 2008c ; Hubálek et al., 2007). D'autre part, l'étude de phylogénie menée par Scholz et collaborateurs (Scholz et al., 2007) confirme cette forte proximité entre l'espèce *O. intermedium* et *Brucella* : les arbres phylogénétiques basés sur les séquences d'ARNr du 16S et de RecA regroupent les *Brucella* au sein du genre *Ochrobactrum* et ce quelque soit la séquence étudiée, avec une similarité de séquence importante entre les 2 genres. Certaines espèces d'*Ochrobactrum* sont plus proches de *Brucella* que d'autres espèces d'*Ochrobactrum*. Ainsi, *B. microti* et *O. intermedium* sont 2 espèces à l'interface des genres *Brucella* et *Ochrobactrum*.

Mais, aucune conclusion sur le regroupement de *Brucella* et d'*Ochrobactrum* n'est possible puisque aucune définition universelle n'est reconnue pour la définition d'un genre bactérien. En effet, sur la base de la séquence ARNr 16S, *O. intermedium* présente 98.6% d'identité de séquence avec *Brucella*, les différences en % GC sont inférieures à 10% entre les 2 genres et les hybridations ADN-ADN réalisées entre *B. melitensis* et *Ochrobactrum* présente un pourcentage d'identité de 55,5% pour *O. intermedium* (Scholz et al., 2008b) et pouvant aller jusqu'à 30% pour *O. anthropi* (Holmes et al., 1988). Cependant, des différences importantes entre les 2 genres sont constatées : il a été montré que contrairement à *B. abortus*, *O. anthropi* présentait une très faible capacité d'invasion et n'était pas capable de se répliquer dans des cellules phagocytaires (Barquero-Calvo et al., 2009). D'ailleurs les auteurs suggèrent que malgré une forte homologie génétique, les différences phénotypiques, biologiques et pathogéniques tendent à garder les deux genres séparés. De plus, d'après notre étude, l'IS711, spécifique de *Brucella*, peut être utilisé comme marqueur de distinction efficace entre les genres *Brucella* et *Ochrobactrum*.

Si un éventuel regroupement des genres *Brucella* et *Ochrobactrum* devait se faire, il serait judicieux de regrouper d'abord les différentes espèces de *Brucella* en une espèce unique. En effet, sur le plan taxonomique, le genre *Brucella* est monospécifique, c'est à dire que toutes les espèces actuelles devraient être ramenées au rang de sous-espèce et ainsi, appartenir à une espèce unique dont le nom serait *B. melitensis*. Pourtant, par soucis de clarté et de facilité pour le corps médical et les épidémiologistes, la classification actuelle rejette l'idée d'une espèce unique.

Enfin, le regroupement taxonomique des genres *Brucella* et *Ochrobactrum* semble délicat du fait des arguments pratiques cités précédemment et car s'il existe une proximité réelle au moins au niveau génétique, il existe aussi des différences génétiques, comme la présence spécifique d'IS711 chez *Brucella*.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

IV. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Dans un premier temps, notre étude montre que la PCR-TR IS711 développée est un outil intéressant pour la détection de *Brucella* dans les échantillons biologiques car elle permet d'éviter les faux positifs liés aux souches apparentées génétiquement, plus précisément aux souches du genre *Ochrobactrum*, susceptibles de se retrouver dans l'environnement, notamment en médecine humaine, puisque nous avons vu que l'IS711 n'était pas présent au sein de ce genre. Cette technique permet également la détection de toutes les espèces et biovars de *Brucella* testées.

Disposer d'une telle technique de PCR-TR suffisamment sensible pouvant être utilisée comme outil de diagnostic de la brucellose dans les conditions du terrain est une avancée technologique décisive puisque la sérologie basée principalement sur l'antigène LPS présente un défaut principal de spécificité, majoritairement avec *Y. enterocolitica* O :9 et que la bactériologie, bien que nécessaire pour l'isolement de la souche impliquée dans l'infection est une méthode longue et lourde.

Cependant, la PCR-TR IS711 peut être prise en défaut. Si celle-ci est réalisée trop tôt au cours de l'infection ou sur des animaux porteurs asymptomatiques, la charge bactérienne trop faible peut entraîner des faux négatifs. La sensibilité de la PCR-TR est donc très influencée par la quantité de bactéries présentes dans les échantillons, mais elle l'est également par la présence éventuelle d'inhibiteurs de PCR dans les échantillons. Pour évaluer la présence d'inhibiteurs, il conviendrait d'introduire des contrôles internes détectant par exemple des gènes de référence détectés en parallèle du génome de *Brucella*.

De plus, les résultats nous indiquent que la PCR-TR IS711 peut être améliorée au niveau de sa sensibilité diagnostique en augmentant la quantité d'ADN de *Brucella* obtenue à partir des échantillons analysés qui doit être suffisante pour pouvoir être détectée. Cela nécessite d'améliorer le rendement d'extraction des ADN de *Brucella* à partir des échantillons de départ. Cet axe de travail sur l'optimisation de la technique d'extraction d'ADN de *Brucella* est en cours au CNR des *Brucella*.

Dans le but de compléter les résultats de validation obtenus, il sera également nécessaire de réaliser les essais sur un plus grand nombre d'échantillons biologiques, de diversifier les espèces de *Brucella* recherchées et de diversifier les échantillons analysés (lait, rate, foie, ...) afin de les comparer.

Ainsi, la PCR-TR IS711 permettrait après validation la mise au point d'une trousse de diagnostic moléculaire pour l'identification de *Brucella*.

Dans un second temps, notre travail montre que la séquence BRU-RS de *Brucella* est présente chez toutes les espèces d'*Ochrobactrum* contrairement à l'IS711. Cependant, la sonde IS711 utilisée lors du Southern Blot a une taille de 729 pb alors que la taille de la séquence IS711 est de 842 pb. Dans le but de confirmer l'absence de l'IS711 chez *Ochrobactrum* il serait intéressant de tester les différentes espèces d'*Ochrobactrum* par Southern Blot, en utilisant 3 sondes différentes par exemple afin de vérifier si les régions 5', centrale ou 3' de l'IS711 sont présentes chez *Ochrobactrum*.

De plus, les gènes de *Brucella*: *omp10*, *omp16* et *omp19* et le gène codant pour la protéine BP26, sont présents chez toutes les espèces d'*Ochrobactrum*. Néanmoins, un séquençage des amplicons reste nécessaire pour confirmer définitivement la présence de ces gènes au sein d'*Ochrobactrum*.

Les résultats obtenus avec les anticorps monoclonaux utilisés pour détecter l'expression des protéines OMP10, OMP16 et OMP19 chez *Ochrobactrum* laissent bien supposer la présence de ces protéines chez toutes ces espèces ainsi qu'une variabilité antigénique indépendante de l'espèce. Mais, afin de conforter ces résultats des « western blots » doivent être effectués en vérifiant la correspondance de taille entre les protéines reconnues par les anticorps monoclonaux et les protéines effectivement détectées.

Ainsi, bien qu'il existe des homologies entre *Brucella* et *Ochrobactrum* (constatées au niveau des OMPs et de la séquence BRU-RS), il apparaît que le choix de la séquence d'insertion IS711, et particulièrement sa partie centrale, reste judicieux : étant spécifique des bactéries du genre *Brucella*, présente en multi-copies, elle représente donc une cible de choix pour le diagnostic de la brucellose.

MATERIELS ET METHODES

V. MATERIELS ET METHODES

A. Matériel biologique utilisé

1. Souches *Brucella*

Les souches de *Brucella* utilisées pour l'étude d'inclusivité sont regroupées dans l'annexe 1. Toutes les espèces et biovars du genre *Brucella* sont représentés : *B. melitensis* : 6, *B. abortus* : 11, *B. suis* : 5, *B. ovis* : 1, *B. canis* : 1, *B. neotomae* : 1, *B. pinnipedialis* : 1 et *B. cetii* : 1. Cette liste comprend des souches de référence utilisées pour la production de vaccins, souches B19, Rev.1 et RB51, et pour la production d'antigènes de diagnostic des *Brucella* en phase lisse, souches S99.

Toutes les souches de *Brucella* proviennent de la collection entretenue au CNR des *Brucella*, à l'AFSSA de Maisons-Alfort et ont été fournies par le Dr. Bruno Garin-Bastuji responsable du laboratoire. Ces souches sont conservées en milieu conservateur, bouillon tryptose-glycérol et stockées à -20°C.

2. Souches *Ochrobactrum*

Un total de 109 souches d'*Ochrobactrum* a été utilisé lors de l'étude de la deuxième partie réalisée à l'INRA (annexe 2). Toutes les espèces du genre sont représentées : *O. anthropi*: 64, *O. intermedium*: 19, *O. tritici*: 10, *O. pseudintermedium* : 4, *O. oryzae*: 2, *O. grignonense*: 2, *O. gallinifaecis*: 2, *O. lupini*: 2, *O. haematophilum* : 1, *O. rhizosphaerae* : 1, *O. thiophenivorans* : 1, ainsi que la souche *Ochrobactrum*. sp. CCUG 50899, identifiée initialement comme faisant partie de l'espèce *O. anthropi* mais qui appartiendrait peut-être à une nouvelle espèce selon Scholz et al., 2008a.

Toutes les souches d'*Ochrobactrum* nous ont été fournies par le professeur Holger C. Scholz (Munich, Germany).

3. Bactéries ayant un lien avec *Brucella*

Un panel de 26 souches de bactéries liées à *Brucella* a été utilisé pour l'étude de spécificité (annexe 3). Cette liste est composée de 6 souches liées sérologiquement, 10 souches

potentiellement responsables d'avortement et 10 souches liées au niveau phylogénétique dont les souches *O. intermedium* LMG 3301, *O. anthropi* LMG 3306 et *O. anthropi* LMG 3331.

4. Autres bactéries

Les autres micro-organismes utilisés dans l'étude sont présentés dans l'annexe 3. Nombre de ces bactéries peuvent être considérées comme des contaminants de par leur présence dans des prélèvements biologiques utilisés pour la détection des *Brucella*.

5. Echantillons biologiques

Un total de 172 prélèvements biologiques issus d'animaux sains a été récolté par le Laboratoire Départemental de la Sarthe (LVD 72). Ces prélèvements biologiques proviennent de 87 porcs et de 85 bovins issus de territoires indemnes en brucellose et sont composés de 87 ganglions rétropharyngiens de porcs et 31 ganglions rétropharyngiens de bovins prélevés à l'abattoir, 26 écouvillons génitaux et 28 laits de bovins. Tous les prélèvements de ganglions ont été effectués dans des abattoirs du département de la Sarthe.

Des prélèvements de rates de sangliers nous ont été fournis par le CNR des *Brucella* (AFSSA) et avaient été récoltés au départ pour une recherche épidémiologique de la tularémie par le CNR de la tularémie (AFSSA). Ces prélèvements proviennent du laboratoire vétérinaire départemental du Bas-Rhin (LVD 67).

Des animaux expérimentalement infectés, 5 chèvres et 5 moutons, ont été préparés par le CNR des *Brucella* (AFSSA) dans le cadre de la production de sérums de référence européens ovin et caprin. La rate, le foie et 5 ganglions différents : nœuds lymphatiques préscapulaires, rétropharyngiens (médiants), scrotaux, iliaques (internes) et gastrohépatiques ont été récoltés chez ces animaux et nous ont été fournis par le CNR des *Brucella* (AFSSA). Cette expérimentation consistait à infecter les 5 chèvres par la souche vaccinale *B. melitensis* Rev1 et les 5 moutons par la souche vaccinale *B. melitensis* H38.

Le CNR des *Brucella* (AFSSA) nous a fourni 5 matrices biologiques qui ont ensuite été contaminées artificiellement. Ces matrices correspondent aux organes suivants : 1 rate de marsouin, 1 poumon de mouflon, 1 placenta d'un canidé, 1 écouvillon vaginal de bovin et 1 ganglion retromammaire de porc.

Un foyer de Brucellose s'est déclaré dans le département de la Manche, en Normandie, en 2008. L'élevage mis en cause fut déclaré positif en sérologie et la souche *B. suis* biovar 2 y a été isolée. Le CNR des *Brucella* (AFSSA) a récolté 160 ganglions rétropharyngiens provenant de 82 porcs différents au moment de leur abattage.

B. Techniques bactériologiques

1. Souches *Brucella*

Les souches de *Brucella* ont été mises en culture pendant 48h à 72h à 37°C en atmosphère enrichie à 5% de CO₂ sur boîtes de Blood Agar Base n°2 (Oxoid, France) supplémentées avec 5% de sérum de cheval (BioMérieux, France).

2. Souches *Ochrobactrum*

Toutes les souches d'*Ochrobactrum*, hormis *O. rhizosphaerae*, ont été mises en culture sur gélose Mueller Hinton pendant 24 h à 37°C, dans des conditions aérobies. *O. rhizosphaerae* a été mis en culture dans un bouillon nutritif cœur-cerveille (Oxoid, France).

3. Autres bactéries

Les souches obtenues à partir de la collection de bactérie LMG (Laboratory of Microbiology Gent Bacteria Collection, Université de Gent, Belgique) du centre de référence de BCCM (Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms, Université de Gent, Belgique) ont été cultivées selon les recommandations du fournisseur (<http://bccm.belspo.be>) : Les *Campylobacter* spp. ont été préparés par culture de 24h à 37°C dans des conditions de microaérobiose, sur gélose Mueller Hinton supplémentée avec 5% de sang de cheval (Oxoid,

France) ; *Phyllobacterium myrsinacearum* a été préparé par culture de 24h à 25°C sur gélose nutritif agar (Oxoid, France) ; les souches *Agrobacterium vitis*, *radiobacter*, *rhizogenes* et *tumefaciens* ont été cultivées 24h à 28°C sur le milieu gélosé n°16 (annexe 4). Les souches *Sinorhizobium meliloti* et *Rhizobium tropici* ont été mises en culture sur milieu gélosé YMA (annexe 4) pendant 24h à 28°C et à 30°C respectivement. *Afipia broomeae* a été cultivée sur milieu gélosé n°115 (annexe 4) pendant 24h à 28°C, et la souche *Lactobacillus saerimneri* a été préparée par culture de 24h à 37°C sur milieu MRS gélosé (Oxoid, France) sous atmosphère anaérobie.

Les autres micro-organismes ont été cultivés pendant 24h à 48h à 37°C en atmosphère enrichie à 5% de CO₂ sur boîtes de Blood Agar Base n°2 supplémentées avec 5% de sérum de cheval (BioMérieux, France).

4. Echantillons biologiques

Les tissus d'animaux utilisés dans l'étude (ganglions, foies, rates) ont été dégraissés puis broyés à l'aide d'un broyeur-homogénéiseur de type Stomacher en présence de tampon PBS (Phosphate Buffered Saline). Des recherches bactériologiques de *Brucella* ont été réalisées à partir d'un volume de 200 µl étalé sur milieu sélectif Farrell (Alton et al., 1988).

C. Préparation de l'ADN

Les échantillons broyés provenant d'animaux du foyer déclaré dans la manche et la totalité des bactéries ont subi une incubation à 65°C pendant 1 h sous agitation dans le but d'inactiver les bactéries et de diminuer les risques de contaminations du personnel.

Les cultures de micro-organismes ont été récoltées et resuspendues dans 3 ml de PBS puis séparées en 2 aliquots de 1,5 ml. Un aliquot est centrifugé à 7000 g pendant 1 min. Les culots sont lavés avec 200 µl de PBS. Les culots sont ensuite remis en suspension soit dans 587 µl de tampon TE pour les souches de *Brucella* (annexe 5), soit dans 180 µl de tampon de lyse pour les souches d'*Ochrobactrum* (annexe 6), soit dans 200 µl de PBS pour les autres bactéries Gram négatif (annexe 7) soit dans 200 µl de tampon Instagene matrix (annexe 8) pour les bactéries Gram positifs. Les ADN de *Brucella* ont été extraits par la méthode phénol-chloroforme

(annexe 5), les ADN d'*Ochrobactrum* par un kit Macherey-Nagel (Genomic DNA from tissue, annexe 6), les autres bactéries Gram négatif par un kit Roche (High Pure PCR Template Preparation Kit, annexe 7) et les bactéries Gram positifs par un kit BIO-RAD (InstaGene Matrix, annexe 8).

Différents kit d'extractions ont été utilisés pour l'extraction d'ADN à partir des prélèvements biologiques. Les prélèvements de lait et les écouvillons génitaux issus d'animaux sains ont subi une extraction d'ADN par un kit manuel Roche (annexe 7) et les ganglion issus d'autres animaux sains ont subi une extraction d'ADN par un kit manuel Qiagen (annexe 9). En revanche, les ADN des prélèvements issus du foyer de brucellose ont été extraits à partir d'un kit automatisable Qiagen sur un robot de la marque (BioRobot 9604R, annexe 10).

L'ADN de tous les autres tissus a été obtenu après extraction par le kit Roche (annexe 7)

Pour mesurer la concentration d'ADN extrait obtenue, l'ADN est dosé par spectrophotométrie à une absorbance de 260 nm et par visualisation sur gel d'agarose à 1%.

D. Amorces et sondes

Les amorces et les sondes définies au cours de cette étude à l'aide du programme Primer Express (Version 2.0, Applied Biosystems, France) ont été choisies à partir de l'alignement des séquences des gènes étudiés dans l'étude disponibles sur GeneBank en utilisant un logiciel d'alignement (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) afin de cibler une région conservée. Une analyse de spécificité *in silico* a été effectuée sur les amorces et les sondes en utilisant l'outil « Basic Local Alignment Search Tool » (BLAST) à partir des bases de données de GeneBank. Les caractéristiques des oligonucléotides sont regroupées dans l'annexe 11. Toutes les amorces utilisées au cours de ce travail proviennent de la société MWG (Eurofins, MWG, Operon, Allemagne).

En PCR conventionnelle, les amorces B4/B5 (gène *bcs31*) ont été décrites par Baily et collaborateurs, les amorces Bruc887/Bruc1457/Bruc968/Bruc1404 (gène *bcs31*) par Da Costa et collaborateurs, les amorces bruc1/ bruc5 (gène *per*) par Bogdanovich et collaborateurs (Baily et al., 1992; Da Costa et al., 1996, Bogdanovich et al., 2004). Les amorces IS313/ IS639/ IS340/ IS576 (gène *IS711*) ont été décrites par Hénault et collaborateurs (Hénault et al., 2000).

Les sondes ciblant les gènes *bosp31* et *per* sont des sondes de type Taqman MGB™ (Applied Biosystems, France) marquées en 5' par un fluorochrome FAM (Carboxyfluorescein) et un groupement MGB (Minor Groove Binder) et en 3' par un fluorochrome suppresseur non fluorescent NFQ (non-fluorescent quencher). La sonde IS711 est une sonde de type Taqman (MWG biotech, Germany) mais ne possédant pas de groupement MGB, elle est marquée en 5' par un fluorochrome FAM et en 3' par un fluorochrome suppresseur TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine). Les caractéristiques de ces sondes sont présentées dans l'annexe 11.

E. Technique de PCR conventionnelle simple et double amplification

La PCR ou Réaction de Polymérisation en Chaîne est une technique qui permet l'amplification exponentielle d'un fragment d'ADN spécifique, appelé également amplicon, à partir de deux amorces situées de part et d'autre de ce fragment. Un cycle d'amplification est composé de 3 étapes : la dénaturation de l'ADN double brin, l'hybridation des amorces et une étape d'élongation.

Les réactions sont réalisées dans un volume final de 50µL, dont 38.4 µL d'eau ne contenant pas de RNase, 5 µl de tampon de PCR 10x (Promega, France), 200 µM de dNTP, 2 mM de MgCl₂, 1 µM de chaque amorce, 1 Unité de Taq polymérase (Promega, France) et 1 ng d'ADN. La PCR IS711 simple amplification comporte une étape d'activation de la Taq polymérase à 94°C pendant 5 minutes. Cette étape est suivie de 5 cycles d'amplification composés d'une étape de dénaturation à 94°C pendant 1 min et d'une étape d'hybridation à 60°C pendant 15 sec. Les 30 cycles suivants sont composés d'une étape de dénaturation à 94°C pendant 1 min et d'une étape d'hybridation à 55°C pendant 15 sec. Enfin, une étape d'élongation à 72°C pendant 7 min est réalisée. La PCR IS711 double amplification est composée d'une étape d'activation de la Taq polymérase à 94°C pendant 5 minutes, puis de 15 cycles constitués d'une étape de dénaturation à 94°C pendant 1 min et d'une étape d'hybridation à 55°C pendant 15 sec.

Les amorces B4/B5 ciblant *bosp31* ont été utilisées en PCR simple amplification selon les conditions décrites par les auteurs (Baily et al., 1992). Les amorces ciblant le gène *bosp31* en PCR double amplification ont été employées selon les conditions décrites par Da Costa et collaborateurs (Da Costa et al., 1996). Les amorces bruc1/bruc5 ciblant le gène *per* en PCR simple amplification ont été utilisées selon les conditions décrites par Bogdanovich et

collaborateurs (Bogdanovich et al., 2004). La PCR *per* double amplification a été réalisée en respectant les mêmes conditions d'amplification que la PCR *per* simple amplification, à l'exception du nombre de cycle ramené à 15 cycles.

Tous les produits d'amplification ont été visualisés sur une électrophorèse en gel d'agarose à 1,5 % contenant du Bromure d'Ethidium (Bet 0,5 µg/mL).

Les contrôles positifs contenaient 1 ng d'ADN de *Brucella*.

F. Technique PCR en temps réel

1. Technique PCR en temps réel

Le principe de la PCR en temps réel est le même que celui de la PCR conventionnelle à la différence que l'amplification est mesurée tout au long de la réaction. La PCR en temps réel repose sur la détection et la quantification d'un fluorochrome pendant l'amplification de la séquence cible. La fluorescence est donc proportionnelle à la quantité de produits d'amplification.

Il existe 2 systèmes de détection : détection par des agents intercalant et détection par des sondes.

Un agent intercalant est une molécule capable de s'insérer entre les bases appariées d'un acide nucléique. A l'image du bromure d'éthidium en PCR conventionnelle, l'intercalant le plus utilisé en PCR en temps réel est le SYBR Green. Son émission de fluorescence augmente lorsque qu'il est lié à l'ADN double brin (Figure 29).

La spécificité de ce système repose exclusivement sur ses amorces. En fin de PCR, une courbe de fusion est réalisée afin de vérifier le nombre de produits amplifiés. La courbe de fusion est réalisée en soumettant les produits d'amplification à une température progressant par palier tout en mesurant l'intensité de fluorescence. La courbe correspond à la variation de la fluorescence en fonction de la température. La température de dissociation correspondant à la température à laquelle 50% des doubles brins d'ADN sont dissociés, est déterminée par calcul de la dérivée première négative ($-dF/dT$) de la courbe de fusion. Chaque fragment amplifié est représenté par un pic correspondant à la température d'hybridation nommée T_m (Figure 30).

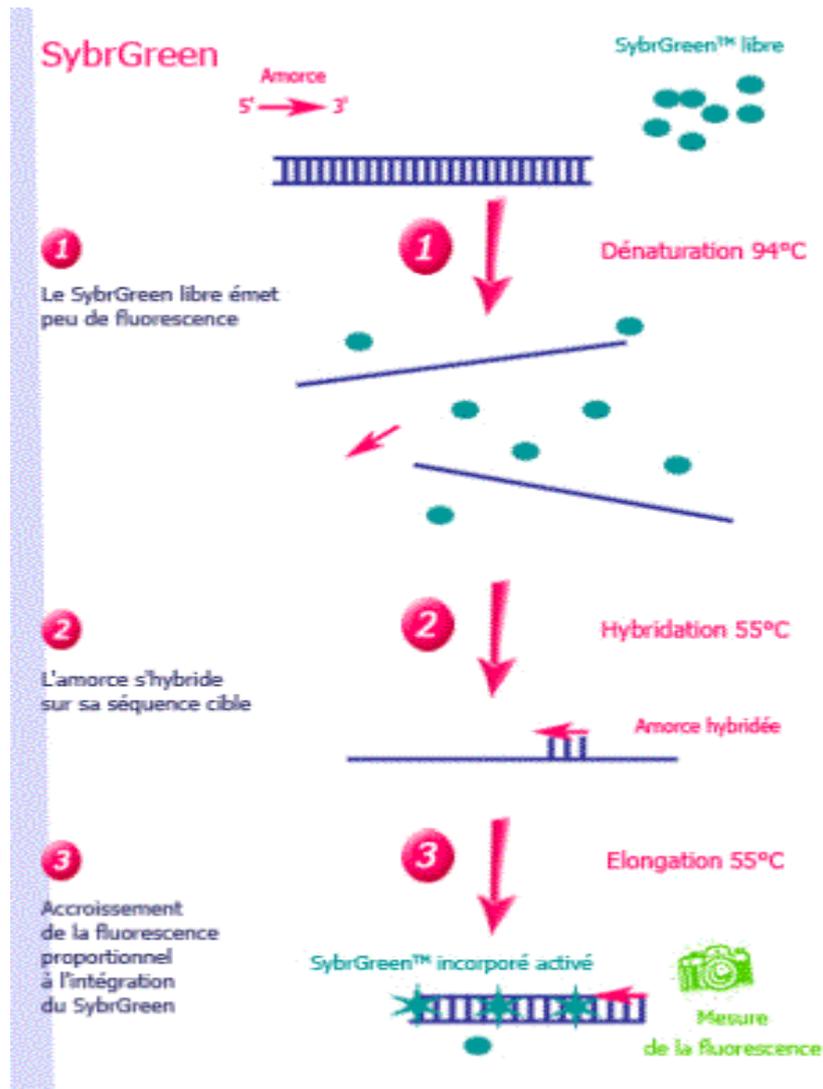


Figure 29: Système de détection de l'amplicon par le SYBR Green. 1) Durant l'étape de dénaturation, le SYBR Green libre émet peu de fluorescence ; 2) À la température d'appariement, les amorces s'hybrident sur la séquence cible ; 3) Lors de l'élongation, les molécules de SYBR Green se lient au nouveau double brin d'ADN ce qui produit une émission de fluorescence.

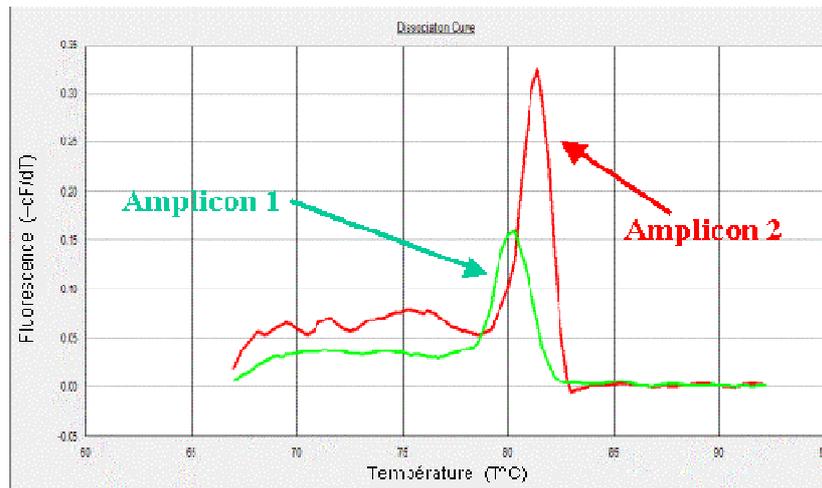


Figure 30 : Illustration d'analyse de la courbe de fusion. Dérivée de la fluorescence en fonction de la température mettant en évidence 2 pics de température correspondant au T_m de 2 amplicons différents.

La détection basée sur des sondes s'appuie sur 4 technologies sondes : hydrolyse de sondes (Taqman), hybridation de 2 sondes avec émission de fluorescence par transfert d'énergie (FRET : fluorescence resonance energy transfer), balises moléculaires (Molecular Beacons) et amorces scorpion. Nous avons choisi de travailler avec la technologie Taqman car le coût de la mise en place des autres systèmes de détection est assez important et leur conception peut être délicate (Poitras et Houde, 2002).

La technologie Taqman est basée sur l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase qui permet d'hydrolyser la sonde lorsqu'elle est hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR. Les sondes Taqman sont des oligonucléotides marqués en extrémité 5' par un fluorochrome émetteur (reporter) et en extrémité 3' par fluorochrome suppresseur (quencher) qui inhibe l'émission du fluorochrome émetteur lorsqu'ils sont à proximité l'un de l'autre. Lorsque la sonde est hybridée sur sa cible elle est hydrolysée par l'ADN polymérase lors de l'élongation, le fluorochrome émetteur est alors séparé du fluorochrome suppresseur et émet une fluorescence proportionnelle à la quantité d'ADN double brin néosynthétisé (Figure 31). Il existe 2 types de sondes Taqman : la sonde Taqman « classique » et la sonde Taqman MGB. La différence entre les 2 se trouve en extrémité 3', la première étant marquée par un fluorophore suppresseur lui même fluorescent (TAMRA), la seconde par un fluorophore suppresseur non fluorescent (NFQ : non fluorescent quencher). Une molécule appelée MGB (minor groove binder) est liée au fluorophore suppresseur NFQ. Cette molécule a la particularité de stabiliser la liaison entre la sonde et la séquence cible en s'insérant dans les petits sillons de la double hélice.

Contrairement au système de détection par SYBR Green, la spécificité de la réaction est liée à la fois à celle des amorces et à celle de la sonde réduisant significativement l'émission de fluorescence non spécifique due à des mésappariements ou des dimères d'amorce. Cette technique présente par ailleurs l'avantage de pouvoir détecter plusieurs cibles en même temps en utilisant différentes sondes marquées avec des fluorochromes ayant des spectres d'émission différents.

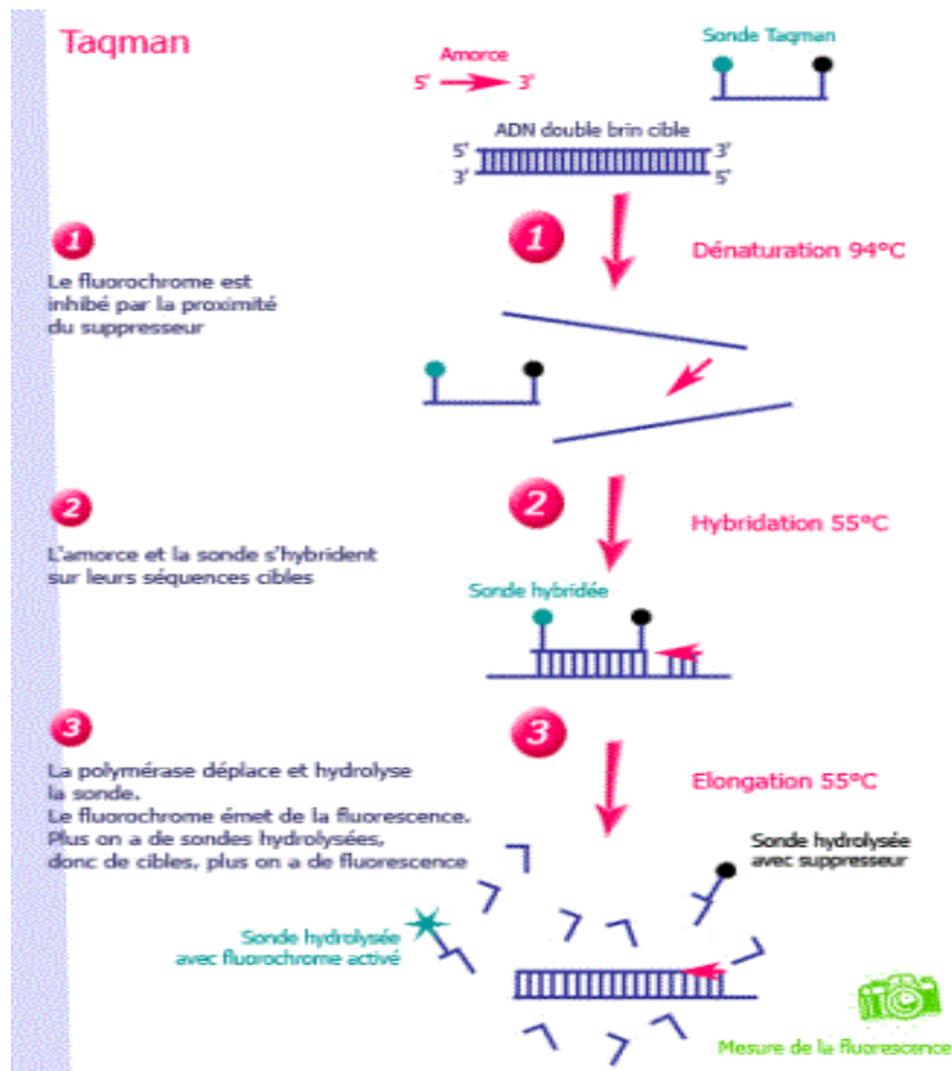


Figure 31: Système de détection par sonde Taqman. 1) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution, la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence; 2) À la température d'appariement, les amorces et la sonde s'hybrident sur leurs séquences cibles respectives ; 3) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est donc libéré de l'inhibition du suppresseur, ce qui permet l'émission de la fluorescence. (source : <http://www.ilm.pf/PCRtempsreel>)

En suivant la fluorescence au cours du temps de la PCR en temps réel émise par le SYBR Green ou par la sonde Taqman, on observe 3 phases : i) la phase de bruit de fond où la fluorescence proportionnelle au fragment amplifié est insuffisante ; ii) la phase exponentielle où le nombre d'amplicon double à chaque cycle ; iii) la phase de plateau où les différents composants de la PCR deviennent limitant (Figure 32).

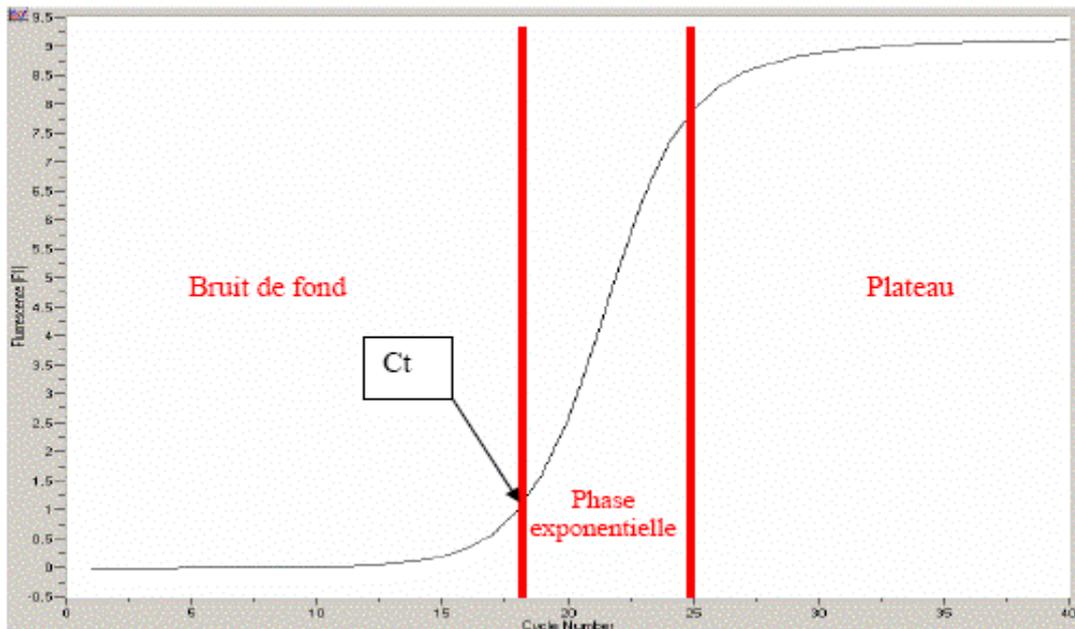


Figure 32 : Différentes étapes de l'augmentation de la fluorescence au cours du temps d'une PCR en temps réel. (Source : <http://institut.cochin.inserm.fr/research/technical-services/genome-sequencing-studies/pcr-quantitative>)

La valeur de cycle correspondant au signal seuil est appelée Ct (Cycle Threshold). Elle représente le cycle de PCR à partir duquel une augmentation notable de la fluorescence par rapport au bruit de fond est détectée. Le Ct est inversement proportionnel à la quantité d'ADN cible présente dans l'échantillon avant la PCR. Un Ct précoce correspond à un échantillon contenant beaucoup d'ADN cible, un Ct tardif à un échantillon peu contaminé.

Les valeurs de Ct obtenues en fonction du log des concentrations en molécules d'ADN cible issues de séries de dilutions d'un échantillon standard permettent la réalisation d'une droite standard. Il est ainsi possible d'obtenir la concentration en molécules d'ADN cible d'un échantillon à partir du Ct obtenu après amplification, grâce à la droite standard (Figure 33).

L'efficacité est calculée à partir de la pente de la droite standard par la formule suivante : $E=10^{1/pente}$. On considère que le domaine acceptable de l'efficacité est compris entre 75% et 125% (<http://www.afnor-validation.com/download/Protocole%20Validation%20Legionella%20PCR%20-%20Rev%200.pdf>).

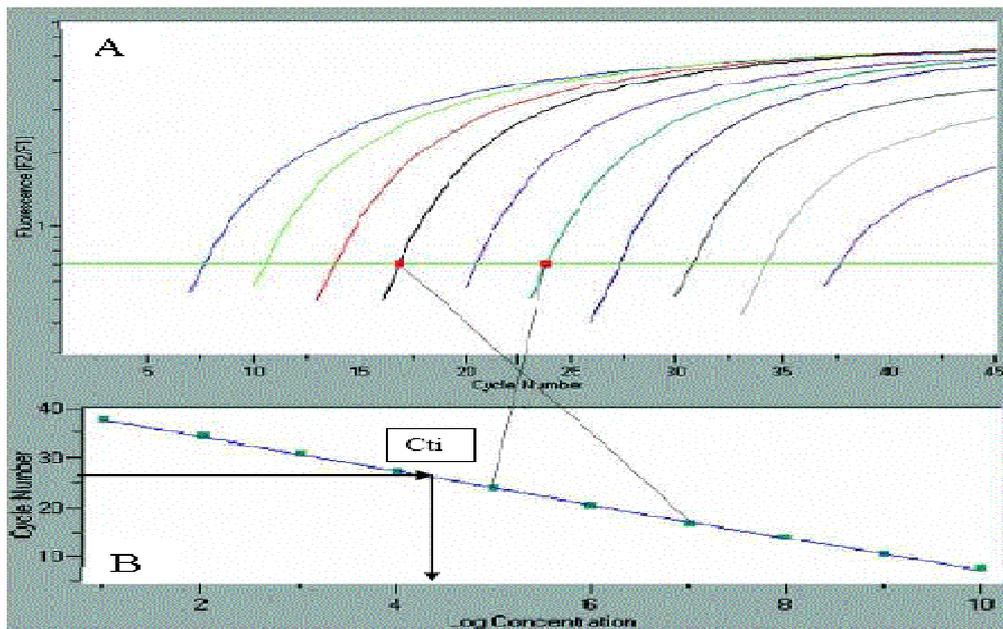


Figure 33 : Illustration d'une droite standard obtenue après dilution en série d'un échantillon standard. Les Ct obtenus (points rouges) par les courbes standard d'amplification (A) sont reportés en fonction des log des concentrations relatives du standard (B) afin d'établir ainsi une droite standard (points verts). (Source : <http://institut.cochin.inserm.fr/research/technical-services/genome-sequencing-studies/pcr-quantitative>)

L'appareil utilisé est le modèle AB-prism 7300 (Applied Biosystems, France). Lors de l'utilisation du système de détection par sonde Taqman, le mélange réactionnel de 25 μ L est composé de 9,65 μ l d'eau ne contenant pas de RNase, de 12,5 μ l de tampon de réaction TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, France), de 0,3 μ M de chaque amorce et de 0,2 μ M de sonde Taqman. Il est déposé dans les puits de la plaque (Applied Biosystems, France) un volume de 2 μ l (correspondant à 2 ng) d'ADN extrait à partir des différentes bactéries et un volume de 5 μ l d'ADN extrait à partir des différents prélèvements. La

plaque est recouverte d'un adhésif spécial résistant aux fortes températures et centrifugée rapidement à 2000 g.

Après une étape de dénaturation de 10 min à 95°C, le mélange réactionnel est soumis à 45 cycles d'amplification qui comprennent une étape de dénaturation de 15 sec à 95°C et une étape d'hybridation et d'élongation de 1 min à 60°C. Les échantillons sont distribués en double.

Lors de l'utilisation du système de détection par Sybr Green, le mélange réactionnel de 25 µL est composé de 6.75 µl d'eau ne contenant pas de RNase, de 12.5 µl de tampon de réaction SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, France), de 0.3 µM de chaque amorce et de 2 µl (correspondant à 2 ng) d'ADN. La PCR basée sur le SYBR Green comporte les mêmes étapes d'amplification que celle basée sur la sonde Taqman, systématiquement suivie d'une étape de réalisation d'une courbe de fusion permettant de vérifier la spécificité de la PCR réalisée. Cette étape consiste en un chauffage à 95°C pendant 10 sec, puis hybridation des amplicons à 55°C pendant 1 min et enfin une étape d'augmentation lente de la température de 60°C à 95°C.

Les contrôles positifs consistent en des séries de dilutions de 10 en 10 de *B. ovis*. Les contrôles négatifs sont également inclus et contiennent tous les éléments du mélange réactionnel sans l'ADN. Des contrôles d'inhibition (mélange réactionnel contenant l'ADN à tester et 0,2 ng de celui de *B. ovis*) sont réalisés simultanément pour chaque micro-organisme de l'étude d'exclusivité.

2. Répétabilité et reproductibilité

Le coefficient de variation (CV) généralement exprimé en pourcentage est le rapport de l'écart-type à la moyenne. Plus la valeur du coefficient de variation est élevée, plus la dispersion autour de la moyenne est grande. Par contre, Plus la valeur du coefficient de variation est faible, plus l'estimation est précise.

La variabilité intra-essai, correspondant à la répétabilité, a été déterminée à partir de 72 réplicats d'une solution de 0,02 ng d'ADN de *B. ovis* 63/290 Les valeurs de Ct obtenues sur 4 jours différents, à partir de 15 réplicats de cette même solution ont été utilisées pour la détermination de la variabilité inter-essai correspondant à la reproductibilité.

G. Sensibilité et spécificité analytique

Pour établir la limite inférieure de détectabilité des PCR (sensibilité analytique), nous avons utilisé des dilutions croissantes de 10 en 10 d'une suspension de *B. ovis* 63/290, *B. melitensis* 16M, *B. abortus* 544 et *B. canis* RM6/66 dans de l'eau stérile. Ces souches ont été choisies pour leur quantité élevée (*B. ovis*) et faible (*B. melitensis*, *B. abortus* and *B. canis*) d'IS711 (Ouahrani et al., 1993).

Dans le but d'évaluer la spécificité analytique des différentes amorces et sondes, 68 micro-organismes non-*Brucella* et les 27 souches de *Brucella* collectées lors de cette étude ont été testés (annexe 1 et 3).

H. Choix du seuil de détection en PCR temps réel

1. Estimation de la sensibilité et de la spécificité diagnostique

L'analyse de prélèvements d'animaux de statut connu vis à vis de la brucellose va nous permettre d'évaluer la spécificité et la sensibilité diagnostique de la PCR-TR. Pour cela nous avons testé ces prélèvements en PCR-TR ciblant les gènes IS711, *bcs31* et *per* mis au point dans notre étude.

Un tableau de contingence permet de présenter simultanément 2 caractères observés sur une même population (Tableau 27). La réalisation d'un tableau de contingence confrontant le nombre de PCR-TR positives et négatives vis à vis du nombre de résultats positifs en bactériologie (malade) et du nombre d'animaux indemnes de brucellose (non malade) permet le calcul des sensibilités (Se) et spécificités (Sp) diagnostiques.

Tableau 27 : Tableau de contingence

	Malade	Non malade
PCR-TR positif	A : Vrais positifs	B : Faux positifs
PCR-TR négatif	C : Faux négatifs	D : Vrais négatifs

Sensibilité diagnostique : $Se = A/(A+C)$

Spécificité diagnostique : $Sp = D/(D+B)$

2. Courbe ROC

Le choix de la valeur de Ct seuil de positivité d'une amplification résulte de la recherche d'un équilibre entre sensibilité et spécificité diagnostique. La courbe ROC (Receiver Operating Characteristic) apparaît comme un outil de choix pour évaluer l'impact du choix de cette valeur sur la sensibilité et la spécificité d'un test diagnostique.

La courbe R.O.C. est le graphe obtenu en portant en abscisse le taux de faux positifs (1-Sp) et en ordonnée le taux de vrais positifs (Se) pour différentes valeurs de Ct seuil de détection. Elle a en général une forme concave. Le point de la courbe le plus proche du coin supérieur gauche de l'aire supérieure à la courbe est celui qui permet d'obtenir un bon compromis entre sensibilité et spécificité, le coin supérieur gauche correspondant à une sensibilité et une spécificité de 100%. Pour que le test soit fiable, la sensibilité et la spécificité doivent être élevées toutes les deux or leurs valeurs varient en sens inverse en fonction de la valeur de Ct seuil de détection choisie.

La figure 34 illustre trois scénarios possibles d'une courbe ROC. Un test diagnostique idéal donne une bonne séparation entre les sujets atteints et non atteints. La courbe ROC passe dans ce cas par le coin supérieur gauche (courbe A). Par contre, aucune discrimination entre les individus n'est possible lorsque la courbe ROC se confond avec la diagonale (courbe C). Dans la très grande majorité des cas, la courbe se situe entre ces deux extrêmes (courbe B).

Trouver le meilleur compromis entre sensibilité et spécificité du test, c'est définir la meilleure valeur du seuil de positivité du test. L'analyse de la courbe peut se faire suivant deux modes. Dans le cas d'une décision de diagnostic on privilégiera la spécificité (tous les malades ne seront pas détectés mais il n'y aura pas d'animaux sains diagnostiqués malades); et dans le cas d'un dépistage, la sensibilité sera privilégiée (tous les malades seront dépistés au risque de déclarer des animaux sains malades).

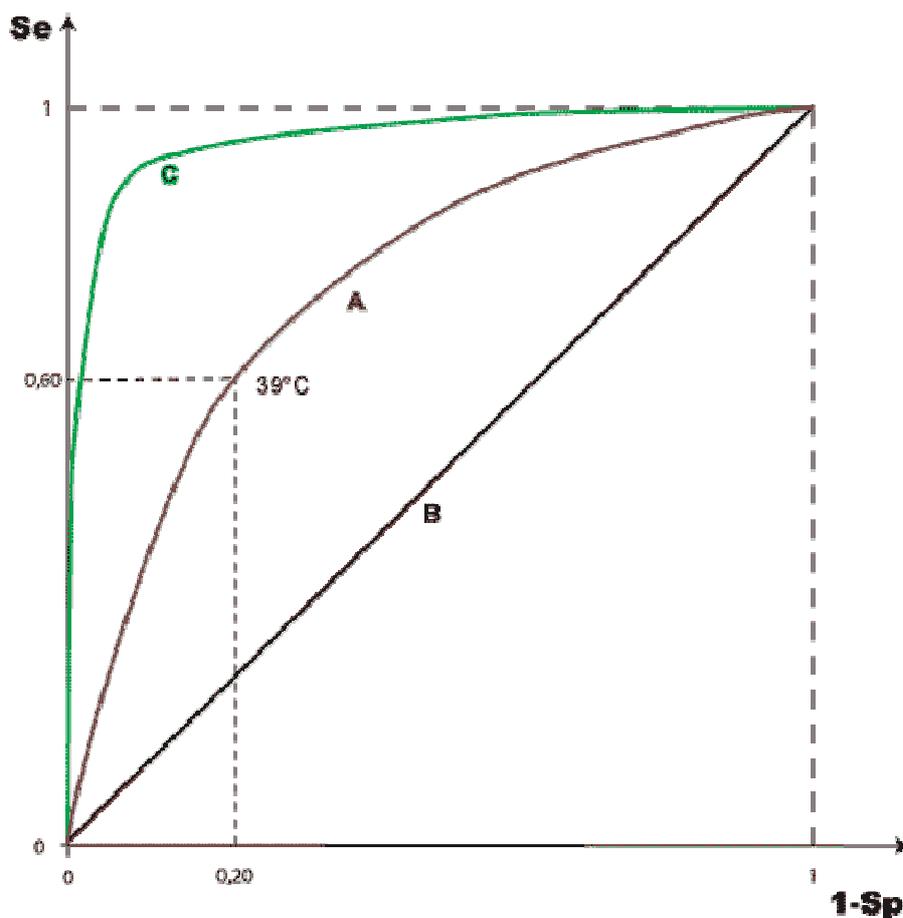


Figure 34 : Exemple de 3 courbes ROC différentes

3. Indice de Youden

Le deuxième outil que nous utilisons est l'indice de Youden. Comme mesure de l'efficacité d'un test, Youden (Youden, 1950) a suggéré un indice combinant la sensibilité et la spécificité en un nombre compris entre 0 et 1. Cet indice est défini par :

$$J = [(sensibilité + spécificité) - 1]$$

Lorsque l'indice prend la valeur de 0, un test diagnostic est considéré comme inefficace, en revanche plus l'indice se rapproche de 1 plus il est efficace.

A la valeur maximale de l'indice de Youden est associée le seuil de décision le plus discriminant fournie par la courbe de ROC.

4. Comparaison de la moyenne des différences : "le test de t apparié"

Ce test repose sur des comparaisons de moyennes. Le test de Student est utilisé pour comparer deux séries d'échantillons.

Pour comparer les moyennes de deux séries appariées, on calcule pour chaque paire la différence entre 2 mesures. On compare alors la moyenne des différences en calculant la variable de décision t observé qui est :

$$t = \text{Md} * \text{RACINE}(N)/\text{Sd}$$

Md = Moyenne des différences

Sd = Ecart-type des différences

N = Nombre d'échantillons

Si t est inférieur à la valeur lue dans la table de t correspondant au nombre de degré de liberté (N-1) et au risque correspondant, les moyennes ne diffèrent pas significativement, sinon, dans le cas contraire, la différence de moyenne constatée est significative.

5. Comparaison de 2 moyennes observées

La comparaison entre 2 moyennes m_A et m_B observées sur n_A et n_B cas est basée sur le calcul suivant :

$$M = m_A - m_B / (\text{RACINE}(S_A^2/n_A) + (S_B^2/n_B))$$

S_A et S_B désignent les variances

Si $|M| < 1,96$, la différence n'est pas significative au risque 5%

Si $|M| \geq 1,96$, la différence est alors significative au risque 5%

6. Comparaison de pourcentages de réponses positives de 2 séries appariées

La comparaison entre 2 pourcentages p_A et p_B observées sur 2 séries appariées est basée sur le calcul suivant :

$$P = p_A - p_B / (\text{RACINE}(p_A + p_B))$$

Si $|P| < 1,96$, la différence n'est pas significative au risque 5%

Si $|P| \geq 1,96$, la différence est alors significative au risque 5%

I. Technique du Southern Blot

Les Southern blots ont été réalisés avec l'utilisation de 2 sondes : une sonde IS711 et une sonde BRU-RS1. La sonde IS711 non marquée est obtenue par PCR à partir de l'ADN génomique de la souche de référence *B. ovis* 63/290, en utilisant les amorces ISA et ISB présentées dans l'annexe 11 et décrites par Maquart et collaborateurs (Maquart et al., 2009). Le volume final de mix de 25 µl est constitué de 200 mM de dNTP, de 1 mM de chaque amorce, de tampon de PCR à 1x (Promega, Madison, WI), de 5 U d'ADN polymérase GoTaq (Promega) et de 1 µl d'ADN génomique correspondant à une quantité de 100 ng.

Les amplifications ont été réalisées sur un thermocycleur Gene Amp PCR system, 9700 (Applied Biosystem) avec les conditions d'amplifications suivantes : 5 min à 94°C pour la dénaturation du premier cycle ; pour les 30 cycles suivants, 30 sec à 59°C pour l'hybridation, 1 min à 70°C pour l'élongation et 30 sec à 94°C pour la dénaturation. Le produit d'amplification de 729 pb a ensuite été purifié en utilisant le kit QIAquick PCR purification Kit (Qiagen). La sonde IS711 a été marquée à la biotine par utilisation du kit NE Blot-Phototope kit (Biolabs) selon le protocole préconisé par le fabricant (annexe 12).

La sonde BRU-RS a été synthétisée et marquée en 5' à la biotine par le fournisseur (Eurofins, MWG, Operon, Allemagne) : 5'-AAA CCG TTT CAC ACT TTT CGG GAT GCG-3'.

Une quantité de 1 µg d'ADN génomique des souches testées a été digérée par 10 U d'enzyme de restriction EcoRI dans du tampon de digestion 1x (Promega), dans un volume final de 20 µl pendant 4h à 37°C. Les produits de digestion ont ensuite été séparés par une électrophorèse en gel d'agarose à 0,8% (Seakem GTG-agarose, Invitrogen) contenant du Bromure d'Ethidium (Bet 0,5 µg/mL), pendant 12 h à 57 volt, en utilisant des plaques de dimension 21x23 cm. Le tampon de migration utilisé est du Tris-Borate-EDTA, TBE 1X (Interchim). La coloration du gel en BET permet de contrôler la séparation des fragments avec une lampe UV.

Après séparation des acides nucléiques, le gel est démoulé et placé sur une membrane de nylon chargée positivement de dimension 22x25 cm (Qbiogene, Illkirch, France). Les bains suivant sont alors effectués afin de dénaturer les acides nucléiques : 30 min dans une solution de dénaturation et 2 fois 15 min dans une solution de neutralisation (annexe 13).

Les acides nucléiques sont transférés sur la membrane de nitrocellulose pendant 2 h 30 min dans du SSC 10X (Saline-Sodium Citrate). La membrane est ensuite séchée à 37°C pendant 35 min et

fixée aux UV pendant 13 secondes. La membrane est rincée pendant 5 min dans du SSC 6X puis préhybridée pendant 1 h à la température d'hybridation correspondant à la sonde utilisée (voir ci-dessous) dans du tampon d'hybridation contenant de l'ADN de sperme de hareng dénaturé à 100 °C pendant 15 min. La solution de préhybridation est ensuite remplacée par la solution d'hybridation contenant la sonde IS711 préalablement dénaturée ou la sonde BRU-RS1. Les hybridations sont alors réalisées toute la nuit à 67°C avec la sonde IS711 ou à 55°C avec la sonde BRU-RS1.

Le lendemain, la membrane subit 2 séries de lavages : 2 fois 5 min à température ambiante dans le tampon 1 (SSC 2X, 0,1 % SDS) et 2 fois 15 min. dans le tampon de lavage 2 (SSC 0,1 X et 0,1 % SDS) à la température d'hybridation de la sonde correspondante. Puis la révélation est réalisée en utilisant le kit Phototope- Star Detection (Biolabs), (annexe 14).

Les résultats d'hybridations sont visualisés par utilisation d'un appareil à chimioluminescence (Chemi-Capt 5000).

Un contrôle positif et un contrôle négatif sont utilisés et correspondent respectivement à de l'ADN de *Brucella melitensis* 16Met de *Salmonella* Typhimurium.

J. ELISA

1. Inactivation des bactéries

Les bactéries ont subi une incubation à 95°C pendant 1 h sous agitation dans le but d'être inactivées.

2. Choix des anticorps

Plusieurs Ac monoclonaux ont été utilisés pour la recherche d'épitopes communs sur les protéines Omp10, Omp16, Omp19 et BP26 entre *Brucella* et *Ochrobactrum*. Les Ac monoclonaux nous ont été fournis par Dr le Michel Zygmunt et le Dr Axel Cloeckaert de l'équipe Brucellose de l'unité Infectiologie Animale et Santé Publique de l'INRA de TOURS-Nouzilly (Cloeckaert et al., 1990, 1991, 1996) (Tableau 28).

Tableau 28 : Anticorps dirigés contre les protéines Omp10, Omp16, Omp19 et BP26 utilisés dans l'étude

Protéines	Anticorps monoclonaux	
	Surnageant de culture d'hybridome	ascite
Omp10	aucun	A : A68 7G11C10 B : A68 8E7B11
Omp16	C : A68 4G1C6	D : A76 8C3G3
Omp19	E : 5C10A8 F : 10D3H2	G : A76 18B2D6
BP26	H : 5B4E2	aucun

3. Technique ELISA

Les souches utilisées ont été diluées dans du PBS afin d'obtenir une suspension dont la DO à 600 nm est égale à 1. Les bactéries sont ensuite soniquées pendant 5 minutes (Sonics and Materials, USA) dans le but d'avoir accès aux protéines OMPs et BP26. Une plaque de type Maxisorb (Nunc, Danemark) est sensibilisée avec 100 µL de ces dilutions et incubée toute la nuit à température ambiante. Le lendemain, les puits sont lavés 5 fois avec le tampon de lavage : PBS contenant 0,05% de tween. Les Ac monoclonaux provenant de surnageant de culture d'hybridomes et d'ascites sont dilués dans le tampon de lavage au 1/2 et au 1/400 respectivement et 100 µl sont ajoutés aux puits. La plaque est alors incubée à 37°C pendant 1 heure. Après 5 lavages avec du tampon de lavage, l'Ac secondaire anti-souris couplé à la peroxydase et dilué au 1/3000 dans du tampon de lavage est ajouté aux puits sous un volume de 100 µl. La plaque est incubée 1 heure à température ambiante puis lavée 5 fois avec le tampon de lavage. Un volume de 100 µl de solution substrat est rajouté aux puits (TMB, Interchim) et la plaque est maintenue à température ambiante pendant 35 minutes. La réaction est arrêtée par ajout de 50 µl de solution stop (Interchim) et les valeurs de DO sont mesurées à 450 nm avec un lecteur ELISA (Multiskan titertek flow MCC340, Flow laboratories, Rickmanswork, UK).

Le témoin négatif est constitué de PBS contenant 0,05% de tween et le témoin positif est un Ac dirigé contre le peptidoglycane (PG) : 3D6.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abalos Pineda P, Blank Hidber O, Torres Navarro D, Torres Castillo D, Valdenegro Vega V, Retamal Merino P. (2009) Brucella infection in marine mammals in Antarctica. *Vet. Rec.* 164, 250. Erratum in: *Vet Rec.* 164, 346.
2. Al Dahouk S, Tomaso H, Nöckler K, Neubauer H. (2004) The detection of Brucella spp. using PCR-ELISA and real-time PCR assays. *Clin. Lab.* 50, 387-94.
3. Al Dahouk S, Nöckler K, Scholz HC, Pfeffer M, Neubauer H, Tomaso H. (2007) Evaluation of genus-specific and species-specific real-time PCR assays for the identification of Brucella spp. *Clin Chem Lab Med.* 45, 1464-1470.
4. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM, Editors, (1988) *Techniques for the Brucellosis Laboratory*, INRA, Paris, p. 190.
5. Amin AS, Hamdy ME, Ibrahim AK. (2001) Detection of Brucella melitensis in semen using the polymerase chain reaction assay. *Vet. Microbiol.* 22, 37-44.
6. Audic S, Lescot M, Claverie JM, Scholz HC. (2009) Brucella microti: the genome sequence of an emerging pathogen. *BMC Genomics.* 10, 352.
7. Bachrach G, Banai M, Bardenstein S, Hoida G, Genizi A, Bercovier H. (1994) Brucella ribosomal protein L7/L12 is a major component in the antigenicity of brucellin INRA for delayed-type hypersensitivity in brucella-sensitized guinea pigs. *Infect. Immun.* 62, 5361-5366.
8. Baily GG, Krahn JB, Drasar BS, Soker NG. (1992) Detection of Brucella melitensis and Brucella abortus by DNA amplification. *J. Trop. Med. Hyg.* 95, 271-275.
9. Barquero-Calvo E, Conde-Alvarez R, Chacón-Díaz C, Quesada-Lobo L, Martirosyan A, Guzmán-Verri C, Iriarte M, Mancek-Keber M, Jerala R, Gorvel JP, Moriyón I, Moreno E, Chaves-Olarte E. (2009) The differential interaction of Brucella and Ochrobactrum with innate immunity reveals traits related to the evolution of stealthy pathogens. *PLoS One* 4, e5893.
10. Bizet C, Bizet J. (1995) Comparative susceptibility of Ochrobactrum anthropi, Agrobacterium tumefaciens, Alcaligenes faecalis, Alcaligenes denitrificans subsp. denitrificans, Alcaligenes denitrificans subsp. xylosoxidans and Bordetella bronchiseptica against 35 antibiotics including 17 beta-lactams. *Pathol. Biol.* 43, 258-263
11. Bogdanovich T, Skurnik M, Lübeck PS, Ahrens P, Hoorfar J. (2004) Validated 5' nuclease PCR assay for rapid identification of the genus Brucella. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2261-2263.

12. Bricker BJ, Tabatabai LB, Deyoe BL, Mayfield JE. (1988) Conservation of antigenicity in a 31-kDa *Brucella* protein. *Vet. Microbiol.* 18, 313-325.
13. Bricker BJ, Halling SM. (1994) Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32(11), 2660-2666.
14. Bricker BJ, Halling SM. (1995) Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. *J. Clin. Microbiol.* 3(6), 1640-1642.
15. Bricker BJ, Ewalt DR, MacMillan AP, Foster G, Brew S. (2000) Molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1258–1262
16. Bricker BJ. (2002) PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet. Microbiol.* 90(1-4), 435-446. Review.
17. Brivet F, Guibert M, Kiredjian M, Dormont J. (1993) Necrotizing fasciitis, bacteremia, and multiorgan failure caused by *Ochrobactrum anthropi*. *Clin. Infect. Dis.* 17, 516–518.
18. Cardoso PG, Macedo GC, Azevedo V, Oliveira SC. (2006) *Brucella spp* noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microbial Cell Factories.* 5, 13.
19. Casañas MC, Queipo-Ortuño MI, Rodríguez-Torres A, Orduña A, Colmenero JD, Morata P. (2001) Specificity of a polymerase chain reaction assay of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA used to diagnose human brucellosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20(2), 127-131.
20. Chain PS, Commerci DJ, Tolmasky ME, Larimer FW, Malfatti SA, Vergez LM, Agüero F, Land ML, Ugalde RA, Garcia E. (2005) Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *Brucellae*. *Infect. Immun.* 73(12), 8353-8361.
21. Cieslak TJ, Robb ML, Drabick CJ, Fischer GW. (1992) Catheter-associated sepsis caused by *Ochrobactrum anthropi*: report of a case and review of related non-fermentative bacteria. *Clin. Infect. Dis.* 14, 902–907.
22. Cieslak TJ, Drabick CJ, Robb ML. (1996) Pyogenic infections due to *Ochrobactrum anthropi*. *Clin. Infect. Dis.* 22, 845–847.
23. Clavareau C, Wellemans V, Walravens K, Tryland M, Verger JM, Grayon M, Cloeckaert A, Letesson JJ and Godfroid J. (1998) Phenotypic and molecular characterization of a

- Brucella* strain isolated from a minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). Microbiology. 144, 3267–3273.
24. Cloeckaert A, De Wergifosse P, Dubray G, Limet JN. (1990) Identification of seven surface-exposed *Brucella* outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies: immunogold labeling for electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay. Infect. Immun. 58(12), 3980-3987.
 25. Cloeckaert A, Jacques I, Bosseray N, Limet JN, Bowden R, Dubray G, Plommet M. (1991) Protection conferred on mice by monoclonal antibodies directed against outer-membrane-protein antigens of *Brucella*. J. Med. Microbiol. 34(3), 175-180.
 26. Cloeckaert A, Zygmunt MS, de Wergifosse P, Dubray G, Limet JN. (1992) Demonstration of peptidoglycan-associated *Brucella* outer-membrane proteins by use of monoclonal antibodies. J. Gen. Microbiol. 138(7), 1543-1550.
 27. Cloeckaert A, Debbarh HS, Vizcaíno N, Saman E, Dubray G, Zygmunt MS. (1996a) Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis* bp26 gene coding for a protein immunogenic in infected sheep. FEMS Microbiol. Lett. 140(2-3), 139-144.
 28. Cloeckaert A, Debbarh HS, Zygmunt MS, Dubray G. (1996b) Production and characterisation of monoclonal antibodies to *Brucella melitensis* cytosoluble proteins that are able to differentiate antibody responses of infected sheep from Rev. 1 vaccinated sheep. J. Med. Microbiol. 45(3), 206-213.
 29. Cloeckaert A, Tibor A, Zygmunt MS. (1999) *Brucella* outer membrane lipoproteins share antigenic determinants with bacteria of the family Rhizobiaceae. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 6, 627–629.
 30. Cloeckaert A, Grayon M, Grepinet O. (2000a) An IS711 element downstream of the bp26 gene is a specific marker of *Brucella* spp. isolated from marine mammals. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7(5), 835-839.
 31. Cloeckaert A, Grayon M, Verger JM, Letesson JJ, Godfroid F. (2000b) Conservation of seven genes involved in the biosynthesis of the lipopolysaccharide O-side chain in *Brucella* spp. Res. Microbiol. 151(3), 209-216.
 32. Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Paquet JY, Garin-Bastuji B, Foster G and Godfroid J. (2001a) Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals: polymorphism at the *omp2* locus. Microbes Infect. 3, 729–738.

33. Cloeckaert A, Baucheron S, Vizcaino N, Zygmunt MS. (2001b) Use of recombinant BP26 protein in serological diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8(4), 772-775.
34. Cloeckaert A, Vizcaíno N, Paquet JY, Bowden RA, Elzer PH. (2002) Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. *Vet. Microbiol.* 90(1-4), 229-247.
35. Cloeckaert A, Grayon M, Grepinet O, Boumedine KS. (2003) Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals: infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests. *Microbes Infect.* 5, 593–602.
36. Colmenero JD, Queipo-Ortuño MI, Reguera JM, Baeza G, Salazar JA, Morata P. (2005) Real time polymerase chain reaction: a new powerful tool for the diagnosis of neurobrucellosis. *J. Neurol Neurosurg. Psychiatry.* 76(7), 1025-1027.
37. Corbel MJ. (1997) Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.* 3(2), 213-221. Review
38. Crasta OR, Folkerts O, Fei Z, Mane SP, Evans C, Martino-Catt S, Bricker B, Yu G, Du L, Sobral BW. (2008) Genome sequence of *Brucella abortus* vaccine strain S19 compared to virulent strains yields candidate virulence genes. *PLoS One.* 3(5), e2193.
39. Da Costa M, Guillou JP, Garin-Bastuji B, Thiébaud M, Dubray G. (1996) Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. *J. Appl. Bacteriol.* 81(3), 267-275.
40. Dagleish MP, Barley J, Finlayson J, Reid RJ, Foster G. (2008) *Brucella ceti* associated pathology in the testicle of a harbour porpoise (*Phocoena phocoena*). *J. Comp. Pathol.* 139(1), 54-59.
41. Dawson CE, Perrett LL, Davison NJ, Quinney S, Simpson V. (2004) *Brucella* species infection in marine mammals off the Cornish coast. *Vet. Rec.* 155(1), 32.
42. Dawson CE, Stubberfield EJ, Perrett LL, King AC, Whatmore AM, Bashiruddin JB, Stack JA, Macmillan AP. (2008) Phenotypic and molecular characterisation of *Brucella* isolates from marine mammals. *BMC Microbiol.* 8, 224.
43. Debeaumont C, Falconnet PA, Maurin M. (2005) Real-time PCR for detection of *Brucella* spp. DNA in human serum samples. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 24(12), 842-845.
44. De Ley J, Mannheim W, Segers P, Lievens A, Denijn M, Vanhoucke M, Gillis M (1987) Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and taxonomic neighborhood of *Brucella* and CDC Group Vd, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 35–42.

45. Deliere E, Vu-Thien H, Levy V, Barquins S, Schlegel L, Bouvet A. (2000) Epidemiological investigation of *Ochrobactrum anthropi* strains isolated from a haematology unit. *J. Hosp. Infect.* 44, 173–178.
46. DelVecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, Patra G, Mujer C, Los T, Ivanova N, Anderson I, Bhattacharyya A, Lykidis A, Reznik G, Jablonski L, Larsen N, D'Souza M, Bernal A, Mazur M, Goltsman E, Selkov E, Elzer PH, Hagius S, O'Callaghan D, Letesson JJ, Haselkorn R, Kyrpides N, Overbeek R (2002) The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99(1), 443-448.
47. Detilleux PG, Deyoe BL, Cheville NF. (1990) Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro. *Infect. Immun.* 58(7), 2320-2328.
48. Díaz-Aparicio E, Aragón V, Marín C, Alonso B, Font M, Moreno E, Pérez-Ortiz S, Blasco JM, Diaz R, Moriyón I. (1993) Comparative analysis of *Brucella* serotypes A and M and *Yersinia enterocolitica* O:9 polysaccharides for serological diagnosis of brucellosis in cattle, sheep, and goats. *J. Clin. Microbiol.* 31, 3136-3141.
49. Don JB, George MG, Noel RK, James TS. (2005) *Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume two, the proteobacteria. Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria.* pp. 1363.
50. Durr U, Valenciano M, Vaillant V. (2003) La brucellose humaine en France de 1998 à 2000. Surveillance Nationale des maladies infectieuses. Institut de Veille Sanitaire. Rapport 1998-2000.
51. Elsaghir AA and James EA. (2003) Misidentification of *Brucella melitensis* as *Ochrobactrum anthropi* by API 20NE. *J. Med. Microbiol.* 52(Pt 5), 441-442.
52. Ewalt DR, Payeur JB, Martin BM, Cummins DR and Miller WG. (1994) Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J. Vet. Diagn. Invest.* 6(4), 448-452.
53. Fekete A, Bantle JA, Halling SM and Sanborn MR. (1990) Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *J. Appl. Bacteriol.* 69(2), 216-227.
54. Fekete A, Bantle JA, Halling SM. (1992) Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4(1), 79-83.
55. Foster G, Jahans KL, Reid RJ and Ross HM. (1996) Isolation of *Brucella* species from cetaceans, seals and an otter. *Vet. Rec.* 138, 583–586.
56. Foster G, MacMillan AP, Godfroid J, Howie F, Ross HM, Cloeckaert A, Reid RJ, Brew S, Patterson IA. (2002) A review of *Brucella* sp. infection of sea mammals with

- particular emphasis on isolates from Scotland. *Vet. Microbiol.* 90(1-4), 563-580. Review.
57. Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I, Cloeckaert A. (2007) *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57(Pt 11), 2688-2693.
 58. Fredriksson-Ahomaa M, Stolle A, Stephan R. (2007) Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pigs slaughtered at a Swiss abattoir. *Int J Food Microbiol.* 119(3), 207-212.
 59. Freer E, Rojas N, Weintraub A, Lindberg AA, Moreno E. (1995) Heterogeneity of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Res Microbiol.* 146, 569–578.
 60. Freer E, Moreno E, Moriyón I, Pizarro-Cerdá J, Weintraub A, Gorvel JP. (1996) *Brucella*-*Salmonella* lipopolysaccharide chimeras are less permeable to hydrophobic probes and more sensitive to cationic peptides and EDTA than are their native *Brucella* sp. counterparts. *J. Bacteriol.* 178(20), 5867-5876.
 61. Fukushima M, Kakinuma K, and Kawaguchi R. (2002) Phylogenetic Analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* Strains on the Basis of the *gyrB* Gene Sequence. *J. Clin. Microbiol.* 40(8), 2779–2785.
 62. Gallien P, Dorn C, Alban G, Staak C, Protz D. (1998) Detection of *Brucella* species in organs of naturally infected cattle by polymerase chain reaction. *Vet. Rec.* 142(19), 512-514.
 63. Gándara B, Lopez Merino A, Antonio Rogel M, Martinez-Romero E. (2001) Limited genetic diversity of *Brucella* spp. *J. Clin. Microbiol.* 39, 235–40.
 64. Garin-Bastuji B. (1993a) Le dépistage de la brucellose des ruminants et ses difficultés. *Le point Vêt.* 25, 115-124.
 65. Garin-Bastuji B. (1993b) Le lipopolyoside S des *Brucella* en phase S : approche immunochimique – intérêt dans le diagnostique des brucelloses. Thèse Dr. Univ. Tours. pp 281.
 66. Garin-Bastuji B, Hummel N, Gerbier G, Cau C, Pouillot R, Da Costa M, Fontaine JJ. (1999) Non specific serological reactions in the diagnosis of bovine brucellosis: experimental oral infection of cattle with repeated doses of *Yersinia enterocolitica* O:9. *Vet. Microbiol.* 66, 223–233.
 67. Garin-Bastuji B, Hars J, Calvez D, Thiébaud M et Artois M. (2000) Brucellose du porc domestique et du sanglier sauvage due à *Brucella suis* biovar 2 en France. *Epidémiol. et santé anim.* 38, 1-5.

68. Garin-Bastuji B et Delcueille F. (2001) Les brucelloses humaine et animales en France en l'an 2000. Situation épidémiologique – Programmes de contrôle et d'éradication. Méd. Mal. Infect. Volume 31, Suppl 2, 202-216.
69. Garin-Bastuji B et Hars J. Situation épidémiologique de la brucellose à *Brucella suis* biovar 2 en France. (2001) BULLETIN EPIDEMIOLOGIQUE N°2/2001.
70. Giambartolomei GH, Zwerdling A, Cassataro J, Bruno L, Fossati CA, Philipp MT. (2004) Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*. J. Immunol. 173(7), 4635-4642.
71. Gill MV, Ly H, Mueenuddin M, Schoch PE, Cunha BA. (1997) Intravenous line infection due to *Ochrobactrum anthropi* (CDC Group Vd) in a normal host. Heart Lung. 26, 335–6.
72. Godfroid F, Taminau B, Danese I, Denoel P, Tibor A, Weynants V, Cloeckaert A, Godfroid J, Letesson JJ. (1998) Identification of the perosamine synthetase gene of *Brucella melitensis* 16M and involvement of lipopolysaccharide O side chain in *Brucella* survival in mice and in macrophages. Infect. Immun. 66(11), 5485-5493.
73. Godfroid F, Cloeckaert A, Taminau B, Danese I, Tibor A, De Bolle X, Mertens P, Letesson JJ. (2000) Genetic organisation of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis region of *brucella melitensis* 16M (wbk). Res. Microbiol. 151(8), 655-668.
74. Goldbaum FA, Leoni J, Wallach JC, Fossati CA. (1993) Characterization of an 18-kilodalton *Brucella* cytoplasmic protein which appears to be a serological marker of active infection of both human and bovine brucellosis. J. Clin. Microbiol. 31(8), 2141-2145.
75. Gomes Cardoso P, Costa Macedo G, Azevedo V and Costa Oliveira S. (2006) *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. Microbial Cell Factories. 5, 13.
76. Gorvel JP and Moreno E. (2002) *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. Vet. Microbiol. 90(1-4), 281-297.
77. Ficht TA. (2003) Intracellular survival of *Brucella*: defining the link with persistence. Vet. Microbiol. 92, 213-223.
78. Groussaud P, Shankster SJ, Koylass MS and Whatmore AM. (2007) Molecular typing divides marine mammal strains of *Brucella* into at least three groups with distinct host preferences. J. Med. Microbiol. 56, 1512-1518.

79. Guarino A, Serpe L, Fusco G, Scaramuzza A, Gallo P. (2000) Detection of *Brucella* species in buffalo whole blood by gene-specific PCR. *Vet. Rec.* 147(22), 634-636.
80. Halling SM and Zehr ES. (1990) Polymorphism in *Brucella* spp. due to highly repeated DNA. *J. Bacteriol.* 172(12), 6637-6640.
81. Halling SM, Detilleux PG, Tatum FM, Judge BA, Mayfield JE. (1991) Deletion of the BCSP31 gene of *Brucella abortus* by replacement. *Infect. Immun.* 59(11), 3863-3868.
82. Halling SM, Tatum FM, Bricker BJ. (1993) Sequence and characterization of an insertion sequence, IS711, from *Brucella ovis*. *Gene.* 133(1), 123-127.
83. Halling SM and Bricker BJ. (1994) Characterization and occurrence of two repeated palindromic DNA elements of *Brucella* spp.: Bru-RS1 and Bru-RS2. *Mol Microbiol.* 14(4), 681-689.
84. Halling SM, Peterson-Burch BD, Bricker BJ, Zuerner RL, Qing Z, Li LL, Kapur V, Alt DP, Olsen SC. (2005) Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J. Bacteriol.* 187(8), 2715-2726.
85. Hamdy ME and Amin AS. (2002) Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. *Vet. J.* 163(3), 299-305.
86. Hénault S, Calvez D, Thiébaud M, Boulière M and Garin-Bastuji B, (2000) Validation of a nested-PCR based on the IS6501/711 sequence for the detection of *Brucella* in animal samples, *Proceedings of the Brucellosis 2000 International Research Conference (including the 53rd Brucellosis Research Conference)* Nîmes, France, p. 45.
87. Herman L, De Ridder H. (1992) Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(6), 2099-2101.
88. Higgins CS, Murtough SM, Williamson E, Hiom SJ, Payne DJ, Russell AD and Walsh TR. (2001) Resistance to antibiotics and biocides among nonfermenting Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 7, 308-315.
89. Holmes B., Popoff M., Kiredjian M. and Kersters K. (1988) *Ochrobactrum anthropi* gen. nov., sp. nov. from human clinical specimens and previously known as group Vd. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38, 406-416.
90. Hubálek Z, Scholz HC, Sedláček I, Melzer F, Sanogo YO, Nesvadbová J. (2007) Brucellosis of the common vole (*Microtus arvalis*). *Vector Borne Zoonotic Dis.* Winter. 7(4), 679-687.
91. Institut de Veille Sanitaire, France. Brucellose. <http://www.invs.sante.fr/surveillance/brucellose/default.htm> (accessed Dec 24,2005).

92. Jumas-Bilak E, Michaux-Charachon S, Bourg G, Ócallaghan D and Ramuz M. (1998) Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. *Mol. Microbiol.* 27, 99–106.
93. Kämpfer P., Buczolits S., Albrecht A., Busse H.J., Stackebrandt E. (2003) Towards a standardized format for the description of a novel species (of an established genus): *Ochrobactrum gallinifaecis* sp. Nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 893–896.
94. Kämpfer P, Rosselló-Mora R, Scholz HC, Welinder-Olsson C, Falsen E, Busse HJ. (2006) Description of *Pseudochrobactrum* gen. nov., with the two species *Pseudochrobactrum asaccharolyticum* sp. nov. and *Pseudochrobactrum saccharolyticum* sp. Nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56(Pt 8), 1823-1829.
95. Kämpfer P, Scholz HC, Falsen E, Busse HJ. (2007) *Ochrobactrum haematophilum* sp. nov. and *Ochrobactrum pseudogrignonense* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2513–2518.
96. Ko J and Splitter GA. (2003) Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 65–78.
97. Kumar S, Tuteja U, Batra HV. (2007) Generation and Characterization of Murine Monoclonal Antibodies to Recombinant 26-kDa Periplasmic Protein of *Brucella abortus*. *Hybridoma.* 26(5), 322-327.
98. Kumar S, Tuteja U, Kumar A, Batra HV. (2008) Expression and purification of the 26 kDa periplasmic protein of *Brucella abortus*: a reagent for the diagnosis of bovine brucellosis. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 49(Pt 3), 213-218.
99. Lapaque N, Moriyon I, Moreno E, Gorvel JP. (2005) *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 60-66.
100. Leal-Klevezas DS, Martínez-Vázquez IO, López-Merino A, Martínez-Soriano JP. (1995) Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *J. Clin. Microbiol.* 33(12), 3087-3090.
101. Lebuhn M, Achouak W, Schloter M, Berge O, Meier H, Barakat M, Hartmann A, Heulin T. (2000) Taxonomic characterization of *Ochrobactrum* sp. isolates from soil samples and wheat roots, and description of *Ochrobactrum tritici* sp. nov. and *Ochrobactrum grignonense* sp. Nov. *Int. J. Syst. Evo. Microbiol.* 50, 2207–2223.

102. Letesson JJ, Tibor A, van Eynde G, Wansard V, Weynants V, Denoel P, Saman E. (1997) Humoral immune responses of *Brucella*-infected cattle, sheep, and goats to eight purified recombinant *Brucella* proteins in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn. Lab. Immunol.* 4(5), 556-564.
103. Leyla G, Kadri G, Umran O. (2003) Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. *Vet. Microbiol.* 93(1), 53-61.
104. Liautard JP, Gross A, Dornand J, Köhler S. (1996) Interactions between professional phagocytes and *Brucella* spp. *Microbiologia.* 12(2), 197-206. Review.
105. Lindler LE, Hadfield TL, Tall BD, Snellings NJ, Rubin FA, Van De Verg LL, Hoover D, Warren RL. (1996) Cloning of a *Brucella melitensis* group 3 antigen gene encoding Omp28, a protein recognized by the humoral immune response during human brucellosis. *Infect. Immun.* 64(7), 2490-2499 Erratum in: *Infect. Immun.* 64(10), 4414.
106. Lübeck PS, Skurnik M, Ahrens P, Hoorfar J. (2003) A multiplex PCR-detection assay for *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 and *Brucella* spp. based on the perosamine synthetase gene. Application to *Brucella* diagnostics. *Adv. Exp. Med. Biol.*;529, 451-453.
107. Mahillon J, Chandler M. (1998) Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(3), 725-774. Review.
108. Mahmood MS, Sarwari AR, Khan MA, Sophie Z, Khan E, Sami S. (2000) Infective endocarditis and septic embolization with *Ochrobactrum anthropi*: case report and review of literature. *J. Infect.* 40, 287-290.
109. Manterola L, Tejero-Garcés A, Ficapal A, Shopayeva G, Blasco JM, Marin CM, López-Goñi I. (2003) Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. *Vet. Microbiol.* 92(1-2), 65-72.
110. Maquart M, Zygmunt MS, Cloeckaert A. (2009) Marine mammal *Brucella* isolates with different genomic characteristics display a differential response when infecting human macrophages in culture. *Microbes Infect.* 11(3), 361-366.
111. Matar GM, Khneisser IA, Abdelnoor AM. (1996) Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA. *J. Clin. Microbiol.* 34, 477-478.
112. Maurin M. (2005) La brucellose à l'aube du 21e siècle. *Med. Mal. Infect.* 35, 6-16.

113. Mayfield JE, Bricker BJ, Godfrey H, Crosby RM, Knight DJ, Halling SM, Balinsky D, Tabatabai LB. (1988) The cloning, expression, and nucleotide sequence of a gene coding for an immunogenic *Brucella abortus* protein. *Gene*. 63(1), 1-9.
114. Merlin C and Toussaint A. (1999) Les éléments transposables bactériens, *Bulletin de la Société Française de Génétique. Médecine/sciences*. 15(8-9), 1-13.
115. Michaux S, Paillisson J, Carles-Nurit MJ, Bourg G, Allardet-Servent A, Ramuz M. (1993) Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* genome. *J. Bacteriol.* 175, 701-705.
116. Michaux-Charachon S, Bourg G, Jumas-Bilak E, Guigue-Talet P, Allardet-Servent A, O'Callaghan D, Ramuz M. (1997) Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. *J. Bacteriol.* 179, 3244–3249.
117. Michaux-Charachon S, Foulongne V, O'Callaghan D, Ramuz M. (2002) *Brucella* at the dawn of the third millennium: genomic organization and pathogenesis. *Pathol. Biol. (Paris)*. 50(6), 401-412. Review.
118. Morata P, Queipo-Ortuno MI, Colmenero JD. (1998) Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2443–2446.
119. Morata P, Queipo-Ortuno MI, Reguera JM, Miralles F, Lopez-Gonzales JJ, Colmenero JD. (2001) Diagnostic yield of a PCR assay in focal complications of brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3743–3746.
120. Morata P, Queipo-Ortuno MI, Reguera JM, Garcia-Ordóñez MA, Cardenas A, Colmenero JD. (2003) Development and evaluation of a PCR enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of human brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* 41, 144–148.
121. Moreno E, Stackebrandt E, Dorsch M, Wolters J, Busch M, Mayer H. (1990) *Brucella abortus* 16SrRNA and lipidA reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class *Proteobacteria*. *J. Bacteriol.* 172, 3569–3576.
122. Moreno E. (1997) In search of bacterial species definition. *Rev. Boil. Trop.* 45, 753–771.
123. Moreno E, Cloeckert A, Moriyon I. (2002) *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet. Microbiol.* 90, 209-227.
124. Mourez M, Jéhanno M, Hofnung M, Dassa E. (2000) Rôle, fonctionnement et structure des transporteurs à ATP binding cassette (ABC). *Médecine/sciences*. vol.16, 3, 386-394.

125. Navarro E, Escribano J, Fernández J, Solera J. (2002) Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella* spp in human blood samples. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 34(2), 147-151.
126. Newby DT, Hadfield TL, Roberto FF. (2003). Real-time PCR detection of *Brucella abortus*: a comparative study of SYBR green I, 5'-exonuclease, and hybridization probe assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4753–4759.
127. Nicoletti P. (2002) A short history of brucellosis. *Vet. Microbiol.* 90(1-4), 5-9.
128. Nielsen K, Smith P, Widdison J, Gall D, Kelly L, Kelly W, Nicoletti P. (2004) Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. *Vet. Microbiol.* 100, 25–30.
129. O'Callaghan D, Cazevielle C, Allardet-Servent A, Boschioli ML, Bourg G, Foulongne V, Frutos P, Kulakov Y, Ramuz M. (1999) A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol. Microbiol.* 33(6), 1210-1220.
130. Ocampo-Sosa AA, García-Lobo JM. (2008) Demonstration of IS711 transposition in *Brucella ovis* and *Brucella pinnipedialis*. *BMC Microbiol.* 8, 17.
131. O'Hara MJ, Collins DM, De Lisle GW. (1985) Restriction endonuclease analysis of *Brucella ovis* and other *Brucella* species. *Vet. Microbiol.* 10, 425–429.
132. Ohishi K, Zenitani R, Bando T, Goto Y, Uchida K, Maruyama T, Yamamoto S, Miyazaki N, Fujise Y. (2003) Pathological and serological evidence of *Brucella*-infection in baleen whales (Mysticeti) in the western North Pacific. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 26(2), 125-136.
133. Office International des Epizooties. Norme de qualité et lignes directrices de l'OIE applicables aux laboratoires vétérinaires: maladies infectieuses. Deuxième édition, 2008. p.72.
134. O'Leary S, Sheahan M, Sweeney T. (2006) *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. *Res. Vet. Sci.* 81(2), 170-176.
135. Ouahrani S, Michaux S, Sri idada J, Bourg G, Tournebize R, Ramuz M, Liautard JP. (1993) Identification and sequence analysis of IS6501, an insertion sequence in *Brucella* spp.: relationship between genomic structure and the number of IS6501 copies. *J. Gen. Microbiol.* 139(12), 3265-3273.

136. Ouahrani-Bettache S, Soubrier MP, Liautard JP. (1996) IS6501-anchored PCR for the detection and identification of *Brucella* species and strains. *J. Appl. Bacteriol.* 81(2), 154-160.
137. Palanduz A, Palanduz S, Guler K, Guler N. (2000) Brucellosis in a mother and her young infant: probable transmission by breast milk. *Int. J. Infect. Dis.* 4, 55-56.
138. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E. (2005) Brucellosis. *N. Engl. J. Med.* 352(22), 2325-2336. Review.
139. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. (2006) The new global map of human brucellosis. *Lancet. Infect. Dis.* 6(2), 91-99.
140. Pappas G, Panagopoulou P, Christou L, Akritidis N. (2006b) *Brucella* as a biological weapon. *Cell Mol. Life Sci.* 63(19-20), 2229-2236.
141. Paulsen IT, Seshadri R, Nelson KE, Eisen JA, Heidelberg JF, Read TD, Dodson RJ, Umayam L, Brinkac LM, Beanan MJ, Daugherty SC, Deboy RT, Durkin AS, Kolonay JF, Madupu R, Nelson WC, Ayodeji B, Kraul M, Shetty J, Malek J, Van Aken SE, Riedmuller S, Tettelin H, Gill SR, White O, Salzberg SL, Hoover DL, Lindler LE, Halling SM, Boyle SM, Fraser CM. (2002) The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99(20), 13148-13153.
142. Perry MB and Bundle DR. (1990) Lipopolysaccharide antigens and carbohydrates of *Brucella*. In : Adams L G, editor. *Advances in Brucellosis research*. Austin : Texas A&M University. p. 76–88.
143. Poitras E. et Houde A. (2002) La PCR en temps réel: principes et applications. 2(2), 2-11.
144. Probert WS, Schrader KN, Khuong NY, Bystrom SL, Graves MH. (2004) Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1290–1293.
145. Qi W, Nong G, Preston JF, Ben-Ami F, Ebert D. (2009) Comparative metagenomics of *Daphnia* symbionts. *BMC Genomics.* 10, 172.
146. Queipo-Ortuño MI, Morata P, Ocon P, Manchado P, Colmenero JD. (1997) Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2927–2930.

147. Queipo-Ortuño MI, Colmenero JD, Reguera JM, García-Ordoñez MA, Pachón ME, Gonzalez M, Morata P. (2005) Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR Green I-based real-time PCR assay and melting curve analysis in serum samples. *Clin. Microbiol. Infect.* 11(9), 713-718.
148. Queipo-Ortuño MI, Colmenero JD, Muñoz N, Baeza G, Clavijo E, Morata P. (2006) Rapid diagnosis of *Brucella* epididymo-orchitis by real-time polymerase chain reaction assay in urine samples. *J. Urol.* 176(5), 2290-3.
149. Queipo-Ortuño MI, Colmenero JD, Bermudez P, Bravo MJ, Morata P. (2009) Rapid differential diagnosis between extrapulmonary tuberculosis and focal complications of brucellosis using a multiplex real-time PCR assay. *PLoS One.* 4(2), e4526. Erratum in: *PLoS ONE.* 4(2).
150. Rabinovitch M. (1995) Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell. Biol.* 5(3), 85-87.
151. Rajashekara G, Glasner JD, Glover DA and Spitter GA. (2004) Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. *Journal of Bacteriology.* 186, 5040–5041.
152. Rajashekara G, Eskra L, Mathison A, Petersen E, Yu Q, Harms J, Splitter G. (2006) *Brucella*: functional genomics and host-pathogen interactions. *Anim. Health Res. Rev.* 7(1-2), 1-11. Review.
153. Rajashekara G, Covert J, Petersen E, Eskra L, Splitter G. (2008) Genomic island 2 of *Brucella melitensis* is a major virulence determinant: functional analyses of genomic islands. *J. Bacteriol.* 190(18), 6243-6252.
154. Rasool O, Freer E, Moreno E, Jarstrand C. (1992) Effect of *Brucella abortus* lipopolysaccharide on oxidative metabolism and lysozyme release by human neutrophils. *Infect. Immun.* 60(4), 1699-1702.
155. Redkar R, Rose S, Bricker B, DelVecchio V. (2001) Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Mol. Cell. Probes.* 15(1), 43-52.
156. Refai M. (2002) Incidence and control of brucellosis in the Near East region. *Vet. Microbiol.* 90(1-4), 81-110. Review.
157. Rijpens NP, Jannes G, Van Asbroeck M, Rossau R, Herman LM. (1996) Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(5), 1683-1688.
158. Romero C, Gamazo C, Pardo M, López-Goñi I. (1995) Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33(3), 615-617.

159. Ross HM, Foster G, Reid RJ, Jahans KL, MacMillan AP. (1994) *Brucella* species infection in sea-mammals. *Vet. Rec.* 134(14), 359.
160. Ross HM, Jahans KL, Macmillan AP, Reid RJ, Thompson PM, Foster G. (1996) *Brucella* species infection in North Sea seal and cetacean populations. *Vet. Rec.* 138, 647–648.
161. Rossetti OL, Arese AI, Boschiroli ML, Cravero SL. (1996) Cloning of *Brucella abortus* gene and characterization of expressed 26-kilodalton periplasmic protein: potential use for diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 34(1), 165-169.
162. Roux J. (1989) *Brucella* in LE MINOR L & VERON M. *Bactériologie Médicale*. Flammarion, Paris, édition 1989, p. 651-670.
163. Ruben B, Band JD, Wong P, Colville J. (1991) Person-to-person transmission of *Brucella melitensis*. *Lancet.* 1, 14–15.
164. Saavedra J, Garrido C, Folgueira D, Torres MJ, Ramos JT. (1999) *Ochrobactrum anthropi* bacteremia associated with a catheter in an immunocompromised child and review of the pediatric literature. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 18, 658–660.
165. Salih-Alj Debbarh H, Cloeckert A, Bézard G, Dubray G, Zygmunt MS. (1996) Enzyme-linked immunosorbent assay with partially purified cytosoluble 28-kilodalton protein for serological differentiation between *Brucella melitensis*-infected and *B. melitensis* Rev.1-vaccinated sheep. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 3(3), 305-308.
166. Scholz HC, Al Dahouk S, Herbert T, Neubauer H, Angela W, Schloter M, Kämpfer P, Falsen E, Pfeffer M, Enge M. (2008a) Genetic diversity and phylogenetic relationships of bacteria belonging to the *Ochrobactrum*–*Brucella* group by *recA* and 16S rRNA gene-based comparative sequence analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* 31(1), 1-16.
167. Scholz HC, Hubalek Z, Sedláček I, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Melzer F, Kämpfer P, Neubauer H, Cloeckert A, Marquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Falsen E, Bahn P, Göllner C, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ and Nöckler K. (2008b) *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 375-382.
168. Scholz HC, Hubalek Z, Nesvadbova J, Tomaso H, Vergnaud G, Le Flèche P, Whatmore AM, Al Dahouk S, Krüger M, Lodri C and Pfeffer M. (2008c) Isolation of *Brucella microti* from Soil. *Emerg. Infect. Dis.* 14(8), 1316-1317.

169. Scholz HC, Hofer E, Vergnaud G, Le Fleche P, Whatmore AM, Al Dahouk S, Pfeiffer M, Krüger M, Cloeckaert A, Tomaso H. (2009a) Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria.. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 9(2), 153-156.
170. Scholz HC, Nöckler K, Göllner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, Al-Dahouk S, Kämpfer P, Cloeckaert A, Marquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Pfeiffer M, Huber B, Busse HJ and De BK. (2009b) *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* [Epub ahead of print].
171. Schurig GG, Sriranganathan N, Corbel MJ. (2002) Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet. Microbiol.* 90(1-4), 479-496.
172. Seco-Mediavilla P, Verger JM, Grayon M, Cloeckaert A, Marín CM, Zygmunt MS, Fernández-Lago L, Vizcaíno N. (2003) Epitope mapping of the *Brucella melitensis* BP26 immunogenic protein: usefulness for diagnosis of sheep brucellosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10(4), 47-51.
173. Seimenis A, Morelli D, Mantovani A. (2006) Zoonoses in the Mediterranean region. *Ann. Ist. Super. Sanita.* 42(4), 437-445. Review.
174. Sohn AH, Probert WS, Glaser CA, Gupta N, Bollen AW, Wong JD, Grace EM, McDonald WC. (2003) Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerg. Infect. Dis.* 9(4), 485-488.
175. Sola-Landa A, Pizarro-Cerdá J, Grilló MJ, Moreno E, Moriyón I, Blasco JM, Gorvel JP, López-Goñi I. (1998) A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol Microbiol.* 29(1), 125-138.
176. Souk-Aloun P. (1989) Pathogénésie de *Brucella melitensis*. *Homéopathie française.* 2, 21-29.
177. Sreevatsan S, Bookout JB, Ringpis F, Perumaalla VS, Ficht TA, Adams LG, Hagius SD, Elzer PH, Bricker BJ, Kumar GK, Rajasekhar M, Isloor S, Barathur RR. (2000) A multiplex approach to molecular detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *J. Clin. Microbiol.* 38(7), 2602-2610.
178. Starr T, Ng TW, Wehrly TD, Knodler LA, Celli J. (2008) *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic.* 9(5), 678-694.

179. Stenstad T, Grahek-Ogden D, Nilsen M, Skaare D, Martinsen TA, Lassen J, Bruu AL. (2007) An outbreak of *Yersinia enterocolitica* O:9-infection. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 127(5), 586-589. Norwegian.
180. Stiakaki E, Galanakis E, Samonis G, Christidou A, Maraka S, Tselentis Y, Kalmanti M. (2002) *Ochrobactrum anthropi* bacteremia in pediatric oncology patients. *Pediatr. J. Infect. Dis.* 21, 72–74.
181. Tabatabai LB, Deyoe BL, Ritchie AE. (1979) Isolation and characterization of toxic fractions from *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 26(2), 668-679.
182. Teyssier C, Jumas-Bilak E, Marchandin H, Jean-Pierre H, Jeannot JL, Dusart G, Foulongne V, Siméon de Buochberg M. (2003) Identification d'espèce et épidémiologie moléculaire des bactéries du genre *Ochrobactrum* *Pathologie Biologie* 51, 5–12.
183. Teyssier C, Marchandin H et Jumas-Bilak E. (2004) Le génome des alpha-protéobactéries : complexité, réduction, diversité et fluidité. *Can. J. Microbiol.* 50, 383–396.
184. Teyssier C, Marchandin H, Jean-Pierre H, Masnou A, Dusart G, Jumas-Bilak E. (2007) *Ochrobactrum pseudintermedium* sp. nov., a novel member of the family Brucellaceae, isolated from man. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 1007–1013.
185. Tibor A, Weynants V, Denoel P, Lichtfouse B, De Bolle X, Saman E, Limet JN, Letesson JJ. (1994) Molecular cloning, nucleotide sequence, and occurrence of a 16.5-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus* with similarity to pal lipoproteins. *Infect. Immun.* 62(9), 3633-3639.
186. Tibor A, Saman E, de Wergifosse P, Cloeckert A, Limet JN, Letesson JJ. (1996) Molecular characterization, occurrence, and immunogenicity in infected sheep and cattle of two minor outer membrane proteins of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 64(1), 100-107.
187. Tibor A, Decelle B, Letesson JJ. (1999) Outer Membrane Proteins Omp10, Omp16, and Omp19 of *Brucella* spp. are Lipoproteins. *Infect. Immun.* 67(9), 4960-4962.
188. Tibor A, Wansard V, Bielartz V, Delrue RM, Danese I, Michel P, Walravens K, Godfroid J, Letesson JJ. (2002) Effect of omp10 or omp19 deletion on *Brucella abortus* outer membrane properties and virulence in mice. *Infect Immun.* 70(10), 5540-5546.
189. Tripathi AK, Verma SC, Chowdhury SP, Lebuhn M, Gattinger A, Schloter M. (2006) *Ochrobactrum oryzae* sp. nov., an endophytic bacterial species isolated from deep-water rice in India, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56 ,1677–1680.

190. Trujillo ME, Willems A, Abril A, Planchuelo AM, Rivas R, Ludena D, Mateos PF, Martínez-Molina E, Velazquez E. (2005) Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. Nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1318–1327.
191. Velasco J, Romero C, López-Goñi I, Leiva J, Díaz R, Moriyón I. (1998) Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 Pt 3, 759-768.
192. Velasco J, Bengoechea JA, Brandenburg K, Lindner B, Seydel U, González D, Zähringer U, Moreno E, Moriyón I. (2000) *Brucella abortus* and its closest phylogenetic relative, *Ochrobactrum* spp., differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance. *Infect. Immun.* 68(6), 3210-3218.
193. Vizcaino N, Cloeckert A; Zygmunt MS, Dubray G. (1996) Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis* omp31 gene coding for an immunogenic major outer membrane protein. *Infect. Immun.* 64, 3744–3751.
194. Vizcaino N, Cloeckert A, Zygmunt MS, Fernandez-Lago L. (1999) Molecular characterization of a *Brucella* species large DNA fragment deleted in *B. abortus* strains: evidence for a locus involved in the synthesis of a polysaccharide. *Infect. Immun.* 67, 2700–2712.
195. Vizcaíno N, Caro-Hernández P, Cloeckert A, Fernández-Lago L. (2004) DNA polymorphism in the omp25/omp31 family of *Brucella* spp.: identification of a 1.7-kb inversion in *Brucella cetaceae* and of a 15.1-kb genomic island, absent from *Brucella ovis*, related to the synthesis of smooth lipopolysaccharide. *Microbes Infect.* 6(9), 821-834.
196. Verger JM, Grimont F, Grimont PAD et Grayon M. (1985) *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35, 292-295.
197. Verger JM, Grayon M, Tibor A, Wanserd V, Letesson JJ, Cloeckert A. (1998) Differentiation of *Brucella melitensis*, *B. ovis* and *B. suis* biovar 2 strains by use of membrane protein- or cytoplasmic protein-specific gene probes, *Res. Microbiol.* 149, 509–517.
198. Verger JM, Grayon M, Cloeckert A, Lefèvre M, Ageron E, Grimont F. (2000) Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals using DNA-DNA hybridization and ribotyping. *Res. Microbiol.* 151(9), 797-799.

199. Vrioni G, Gartzonika C, Kostoula A, Boboyianni C, Papadopoulou C, Levidiotou S. (2004) Application of a polymerase chain reaction enzyme immunoassay in peripheral whole blood and serum specimens for diagnosis of acute human brucellosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23(3), 194-199.
200. Wang L, Romana LK. and Reeves PR. (1992) Molecular Analysis of a *Salmonella enterica* Group E1 *rfb* Gene Cluster: O Antigen and the Genetic Basis of the Major Polymorphism. *Genetics.*130, 429-443.
201. Woese CR, Stackebrandt E, Macke TJ, Fox GE. (1985) A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa.. *Syst. Appl. Microbiol.* 6, 143-151.
202. Wrathall AE, Broughton ES, Gill KP, Goldsmith GP. (1993). Serological reactions to *Brucella* species in British pigs. *Vet. Res.* 132, 449–454.
203. Yanagi M, Yamasato K. (1993) Phylogenetic analysis of the family *Rhizobiaceae* and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiol. Lett.* 107, 115–120.
204. Youden WJ. (1950) Index for rating diagnostic tests. *Cancer.* 3, 32-35.
205. Young EJ et Corbel MJ (1989) *Brucellosis: clinical and laboratory aspects.* pp. 192.
206. Young EJ. (1991) Serologic diagnosis of human brucellosis: analysis of 214 cases by agglutination tests and review of the literature. *Rev. Infect. Dis.* 13, 359–372.
207. Zhao G, Liu J, Liu X, Chen M, Zhang H. and Wang PG. (2007) Cloning and characterization of GDP-perosamine synthetase (Per) from *Escherichia coli* O157:H7 and synthesis of GDP-perosamine *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363(3), 525-530.
208. Zerva L, Bourantas K, Mitka S, Kansouzidou A, Legakis NJ. (2001) Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 39(4), 1661-1664.
209. Zhang L, Al-Hendy A, Toivanen P, Skurnik M. (1993) Genetic organization and sequence of the *rfb* gene cluster of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3: similarities to the dTDP-L-rhamnose biosynthesis pathway of *Salmonella* and to the bacterial polysaccharide transport systems. *Mol. Microbiol.* 9(2), 309-321.
210. Zhang L, Toivanen P and Skurnik M. (1996) The gene cluster directing O-antigen biosynthesis in *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 : identification of the genes for mannose and galactose biosynthesis and the gene for the O-antigen polymerase. *Microbiology.* 142, 277-288.

211. Zurdo-Piñeiro JL, Rivas R, Trujillo ME, Vizcaíno N, Carrasco JA, Chamber M, Palomares A, Mateos PF, Martínez-Molina E, Velázquez E. 2007) *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 784–788.

**COMMUNICATION AFFICHEE ET
PUBLICATION**

COMMUNICATION AFFICHEE

L. Bounaadja, D. Albert, B. Chénais, M.S. Zygmunt, S. Poliak B. Garin-Bastuji. Optimisation d'un Outil de Diagnostic des Bactéries du Genre *Brucella* responsable de la Brucellose. Journée des Doctorants de l'AFSSA, Maisons-Alfort (5/12/2007) ; Doctoriales 2007 des Pays de Loire , Nantes (9-14/12/2007) ; Congrès Gen2Bio 2008, les rencontres Biotech organisé par OUEST-genopole® (27/03/2008).

L. Bounaadja, D. Albert, B. Chénais, S. Hénault, M.S. Zygmunt, S. Poliak, B. Garin-Bastuji. Real-time PCR for identification of *Brucella* spp: a comparative study of IS711, *bcs*p31 and *per* target genes. **Brucellosis 2008 International Conference**, Royal Holloway College, University of London, United Kingdom (10-13/09/2008).

L. Bounaadja, D. Albert, B. Chénais, S. Hénault, M.S. Zygmunt, S. Poliak, B. Garin-Bastuji. Identification de *Brucella* spp. par PCR en temps réel: une étude comparative des gènes cibles IS711, *bcs*p31 et *per*. **RICAI 2008, 28ème réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse** , Palais des Congrès de Paris, Porte Maillot (4-5/12/08).

PUBLICATION

Bounaadja L, Albert D, Chénais B, Hénault S, Zygmunt MS, Poliak S, Garin-Bastuji B. Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: a comparative study of IS711, *bcs*p31 and *per* target genes. *Vet Microbiol.* 2009 May 28;137(1-2):156-64. Epub 2009 Jan 4.

Toussaint JF, Sailleau C, Mast J, Houdart P, Czaplicki G, Demeestere L, VandenBussche F, van Dessel W, Goris N, Bréard E, **Bounaadja L**, Etienne T, Zientara S, De Clercq K. Bluetongue in Belgium, 2006. *Emerg Infect Dis.* 2007 Apr;13(4):614-6

ARTICLE



Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: A comparative study of IS711, bcp31 and per target genes

Lotfi Bounaadja ^{a,b}, David Albert ^c, Benoit Chenais ^a, Sylvie Henault ^c,
Michel S. Zygmunt ^d, Sylvie Poliak ^d, Bruno Garin-Bastuji ^{*}

- ^a Université du Maine, Laboratoire de Biologie et Génétique Evolutive, EA2160 Mer Mole'cules Sante 72085 Le Mans, France
^b Laboratoire Départemental de la Sarthe, 72000 Le Mans, France
^c OIE/FAO and EU Community Reference Laboratory for Brucellosis, French Food Safety Agency (AFSSA), 23 avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort Cedex, France
^d UR1282, Infectiologie Animale et Santé Publique (IASP), Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), 37380 Nouzilly, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 July 2008
 Received in revised form 22 December 2008
 Accepted 29 December 2008

Keywords:

Brucella
 Real-time PCR
 bcp31
 per
 IS711
 Genus-specific identification

ABSTRACT

Culture is considered as the reference standard assay for diagnosis of *Brucella* spp. in humans and animals but it is time-consuming and hazardous. In this study, we evaluated the performances of newly designed real-time PCR assays using TaqMan₁ probes and targeting the 3 following specific genes: (i) the insertion sequence IS711, (ii) bcp31 and (iii) per genes for the detection of *Brucella* at genus level. The real-time PCR assays were compared to previously described conventional PCR assays targeting the same genes. The genus-specificity was evaluated on 26 *Brucella* strains, including all species and biovars. The analytical specificity was evaluated on a collection of 68 clinically relevant, phylogenetically related or serologically cross-reacting micro-organisms. The analytical sensitivity was assessed using decreasing DNA quantities of *Brucella ovis*, *B. melitensis* bv. 1, *B. abortus* bv. 1 and *B. canis* reference strains. Finally, intra-assay repeatability and inter-assay reproducibility were assessed. All *Brucella* species DNA were amplified in the three tests. However, the earliest signal was observed with the IS711 real-time PCR, where it varied according to the IS711 copy number. No cross-reactivity was observed in all three tests. Real-time PCR was always more sensitive than conventional PCR assays. The real-time PCR assay targeting IS711 presented an identical or a greater sensitivity than the two other tests. In all cases, the variability was very low. In conclusion, real-time PCR assays are easy-to-use, produce results faster than conventional PCR systems while reducing DNA contamination risks. The IS711-based real-time PCR assay is specific and highly sensitive and appears as an efficient and reproducible method for the rapid and safe detection of the genus *Brucella*.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Brucellosis is a bacterial zoonosis of worldwide importance, and of major public health and economic significance (Godfroid *et al.*, 2005; Pappas *et al.*, 2006). The genus *Brucella*

belongs to the α -proteobacteria group and consists of eight recognized species: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae* and the strains recently discovered in marine mammals and in common vole (*Microtus arvalis*) and published under the respective species names of *B. ceti*, *B. pinnipedialis* and *B. microti* (Foster *et al.*, 2007; Scholz *et al.*, 2008). Diagnosis is usually based on serological tests and/or cultivation. Serological assays are rapid, sensitive and easy to perform, but lack specificity due to cross-reactions with

* Corresponding author. Tel.: +33 1 49 77 13 00; fax: +33 1 49 77 13 44.
 E-mail address: b.garin-bastuji@afssa.fr (B. Garin-Bastuji).

Table 1

Brucella species and biovars and non-Brucella organisms included in this study.

Strains	Reference ^a	Source ^b
Brucella species^c		
<i>B. melitensis</i> biovar 1 16M	ATCC 23456	Afssa Lerpaz
<i>B. melitensis</i> biovar 1 Rev.1	EDQM reference strain	Afssa Lerpaz
<i>B. melitensis</i> biovar 1 53H38 _d	–	Afssa Lerpaz
<i>B. melitensis</i> biovar 2 63/9	ATCC 23457	Afssa Lerpaz
<i>B. melitensis</i> biovar 3 Ether	ATCC 23458	Afssa Lerpaz
<i>B. melitensis</i> B115 _d	–	Afssa Lerpaz
<i>B. abortus</i> biovar 1 544	ATCC 23448	Afssa Lerpaz
<i>B. abortus</i> biovar 1 B19 _e	–	Afssa Lerpaz
<i>B. abortus</i> biovar 1 S99 _f	–	Afssa Lerpaz
<i>B. abortus</i> biovar 1 RB51 _g	–	Afssa Lerpaz
<i>B. abortus</i> biovar 2 86/8/59	ATCC 23449	Afssa Lerpaz
<i>B. abortus</i> biovar 3 Tulya	ATCC 23450	Afssa Lerpaz
<i>B. abortus</i> biovar 3 AFSSA _h	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>B. abortus</i> biovar 4 292	ATCC 23451	Afssa Lerpaz
<i>B. abortus</i> biovar 5 B3196	ATCC 23452	Afssa Lerpaz
<i>B. abortus</i> biovar 6 870	ATCC 23453	Afssa Lerpaz
<i>B. abortus</i> biovar 9 C68	ATCC 23455	Afssa Lerpaz
<i>B. suis</i> biovar 1 1330	ATCC 23444	Afssa Lerpaz
<i>B. suis</i> biovar 2 Thomsen	ATCC 23445	Afssa Lerpaz
<i>B. suis</i> biovar 3 686	ATCC 23446	Afssa Lerpaz
<i>B. suis</i> biovar 4 40	ATCC 23447	Afssa Lerpaz
<i>B. suis</i> biovar 5 513	NCTC 11996	Afssa Lerpaz
<i>B. neotomae</i> 5K33	ATCC 23459	Afssa Lerpaz
<i>B. ovis</i> 63/290	ATCC 25840	Afssa Lerpaz
<i>B. canis</i> RM6/66	ATCC 23365	Afssa Lerpaz
<i>B. pinnipedialis</i>	NCTC 12890	Afssa Lerpaz
<i>B. ceti</i>	NCTC 12891	Afssa Lerpaz
Serologically cross-reacting bacteria		
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Francisella tularensis</i> subsp. holarctica	ATCC 6223	Afssa Lerpaz
<i>Pasteurella multocida</i>	NCTC 12177	Afssa Lerpaz
<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Urbana (group N)	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	NCTC 11174	Afssa Lerpaz
Phylogenetically related bacteria		
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	LMG 140	BCCM
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	LMG 150	BCCM
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	LMG 43.1	BCCM
<i>Agrobacterium vitis</i>	LMG 8750	BCCM
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	LMG3301	BCCM
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	LMG 3306	DM-UN
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	LMG3331	BCCM
<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>	LMG 1.1	BCCM
<i>Rhizobium tropici</i>	LMG 9503	BCCM
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	LMG 6133	BCCM
Non-Brucella organisms potentially abortifacient		
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. fetus	LMG 6442	BCCM
<i>Candida albicans</i>	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Coxiella burnetii</i>	Nine Mile	Afssa-Lerpra
<i>Coxiella burnetii</i>	Field strain 1	Afssa-Lerpra
<i>Coxiella burnetii</i>	Field strain 2	Afssa-Lerpra
<i>Coxiella burnetii</i>	Field strain 3	Afssa-Lerpra
<i>Listeria monocytogenes</i>	NCTC 7973	Afssa Lerpaz
<i>Listeria innocua</i>	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Abortusovis	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	ATCC 29833	Afssa Lerpaz
Other non-Brucella organisms		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Afiplia broomeae</i>	LMG 18885	BCCM
<i>Bacillus brevis</i>	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	Afssa Lerpaz
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	CIP A 34	Afssa Lerpaz
<i>Brevibacillus</i> sp.	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Campylobacter jejuni</i>	LMG 8841	BCCM
<i>Campylobacter sputorum</i> biovar faecalis	LMG 6617	BCCM

Table 1 (Continued)

Strains	Reference ^a	Source ^b
<i>Citrobacter freundii</i>	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Corynebacterium bovis</i>	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> (ovis)	CIP 102968 T	Afssa Lerpaz
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433	Afssa Lerpaz
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Lactobacillus saerimneri</i>	LMG 22087	BCCM
<i>Listeria ivanovii</i>	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Listeria seeligeri</i>	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Listeria welshimeri</i>	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Mycobacterium avium</i>	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Mycobacterium bovis</i>	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	ATCC 7912	Afssa Lerpaz
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ATCC H37Rv	Afssa Lerpaz
<i>Proteus mirabilis</i>	CIP 103181	Afssa Lerpaz
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Afssa Lerpaz
<i>Rhodococcus equi</i>	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Salmonella</i> bodjonogoro	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Salmonella typhimurium</i>	NCTC 12484	Afssa Lerpaz
<i>Serratia marcescens</i>	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Afssa Lerpaz
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Field strain	Afssa Lerqap
<i>Streptococcus bovis</i>	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Field strain	Afssa Lerqap
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>Equi</i>	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Streptococcus equisimilis</i>	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Streptococcus faecium</i>	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Field strain	Afssa Lerpaz
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:47	Field strain	Afssa Lerpaz

(-): no reference.

^a ATCC, American Type Culture Collection (USA); NCTC, National Collection of Type Cultures (UK); EDQM, European Directorate for the Quality of Medicines (Strasbourg, France); CIP, Collection de l'Institut Pasteur (Paris, France); LMG, Laboratory of Microbiology Gent Bacteria Collection (University of Gent, Belgium).

^b BCCM, Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (University of Gent, Belgium); Afssa Lerpaz, Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Pathologie Animale et Zoonoses (Unité Zoonoses/Bacteriennes) and Afssa Lerqap, Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur la Qualité des Aliments et sur les Procédés agroalimentaires (Maisons-Alfort, France); Afssa Lerpra, Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur les Petits ruminants et les Abeilles (Sophia-Antipolis, France); DM-UN, Departamento de Microbiología-Universidad de Navarra (Pamplona, Spain).

^c All *Brucella* strains were from the *Brucella* Afssa Culture collection, Maisons-Alfort, France.

^d Strains originally provided by INRA, Nouzilly, France.

^e Strains originally provided by USDA, NVSL, Ames, USA.

^f Strains originally provided by VLA, Weybridge UK.

^g Strains originally provided by CITA, Saragossa, Spain.

^h Used by Afssa as internal positive control in bacteriology.

ⁱ Pure DNA directly provided by Afssa-Lerppra, Sophia-Antipolis, France.

other bacteria, particularly with *Yersinia enterocolitica* O:9, that result from O chains antigenic similarity (Young, 1991; Wrathall et al., 1993; Garin-Bastuji et al., 1999; Godfroid et al., 2002; Nielsen et al., 2004). Therefore, culture remains the "gold standard" for definitive diagnosis, especially in free areas where the positive predictive value of serological tests is very low. However, the zoonotic nature of most *Brucella* species is a potential hazard for laboratory personnel and cultures must be performed in well-equipped laboratories with highly skilled personnel. Moreover, the process from clinical sample to final diagnosis remains long, and requires a minimum amount of viable *Brucella* in the specimen. Therefore, PCR-based methods that are simpler, faster, less hazardous and usually more sensitive have been developed (Bricker, 2002) for *Brucella* detection, especially those using as targets the 16S rRNA (Romero et al., 1995; Herman and De Ridder, 1992; O'Leary et al., 2006), and the

Brucella Cell Surface 31 kDa Protein (bcsp31) genes (Baily et al., 1992; Da Costa et al., 1996), which are highly conserved in the genus *Brucella*. However, with these targets, cross-reactivity has been observed with *Ochrobactrum anthropi* and *O. intermedium* (Da Costa et al., 1996; Herman and De Ridder, 1992; Romero et al., 1995; Navarro et al., 1999), which is genetically close to the genus *Brucella* (Velasco et al., 1998). The perosamine synthetase (*per*) gene, involved in O-chain biosynthesis, is another highly conserved gene (Cloeckert et al., 2000) recently used as a PCR target for *Brucella* identification (Lubeck et al., 2003; Bogdanovich et al., 2004). The insertion sequence IS711 (Halling et al., 1993), also called IS6501 (Ouahrani et al., 1993) is highly conserved in the genus *Brucella* but the insertion location as well as the copy number vary according to each species (Ouahrani et al., 1993; Halling et al., 1993). Besides conventional PCR assays, some authors have

developed real-time PCR targeting either the IS711, or *bcs*p31, or *per* genes to detect *Brucella* (Matar et al., 1996; Bogdanovich et al., 2004; Debeaumont et al., 2005; Queipo-Ortuno et al., 2005; Navarro et al., 2006; Al Dahouk et al., 2007). This method is more rapid, easier to perform, limits the DNA contamination and enables quantification of the specific PCR products. The aim of this study was to design, optimise and evaluate real-time PCR assays for *Brucella* spp. detection by targeting IS711, *bcs*p31, or *per* genes. Analytical sensitivity and specificity were compared to those of conventional PCR assays already published and targeting the same genes.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

The *Brucella* strains used in this study are listed in Table 1. They included the reference strains of all *Brucella* species and biovars, the B19, Rev.1 and RB51 vaccine strains, and the S99 strain used for the production of approved diagnostic antigens. Sixty-eight other micro-organisms, including strains either phylogenetically related to *Brucella* (i.e. belonging to the α -2 proteobacteria group), or sharing common antigens with *Brucella*, or potentially abortifacient, were used for specificity checking (Table 1).

Brucella strains were grown on blood agar base no. 2 (Oxoid, France) supplemented with equine serum (5%) (BABS) at 37 °C with 5% CO₂ for 48–72 h. Strains obtained from the BCCM-LMG bacteria collection were grown on LMG-recommended media (<http://bccm.belspo.be>). Other cultures were grown on 5% horse blood agar (bioMerieux,

France) at 37 °C for 24 h–48 h. All strains were stored at À20 °C in Tryptcase soy broth (bioMerieux, France) with 10% of glycerol.

2.2. DNA extraction and quantification

Micro-organisms were harvested, washed and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS). *Brucella* strains DNA was prepared by the phenol/chloroform method as described previously (Da Costa et al., 1996). The DNA of all other micro-organisms was extracted using either Insta-gen matrix DNA kit (BioRad, France) for Gram-positive bacteria, or High pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, France) for Gram-negative bacteria, according to the manufacturer's instructions. DNA concentration and purity were spectrophotometrically assessed by reading A₂₆₀ and A₂₈₀ and confirmed by visualization on 1% agarose gel. Then, DNA was diluted to 1 mg/ml in nuclease-free water and stored at À20 °C until required for analysis.

2.3. Primers and probes

The Primer Express software (Version 2.0, Applied Biosystems, France) was used for all the oligonucleotide primers and the fluorescent dye-labelled probes designed in this study on the basis of IS711/IS6501, *bcs*p31, or *per* sequences available in GeneBank by using multiple sequence alignment (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/cluster/talw2/>) to target a conserved region. All primers were purchased from MWG (MWG Biotech, Germany). The *in silico* specificity was analysed using the Basic Local Alignment Search Tool from the GeneBank database.

Table 2
Brucella primers and probes sequences used for amplification by conventional PCR and real-time PCR.

PCR	Primer sequence			PCR products size (bp)	Location	Reference
	Forward primer (5' ! 3')	Probe (5' ! 3')	Reverse primer (5' ! 3')			
IS711 Single PCR	IS313: ctggctgatacggcggactttgaa	n.p. ^a	IS639: ggaacgtgttgattgaccttgat	350	313/639	Henault et al. (2000)
IS711 Nested PCR	IS340: gtcctcattgatagcaccatcatcg	n.p.	IS576: taagtgtcggcatcataggctgc	260	340/576	
<i>bcs</i> p31 Single PCR	B4: tggctcgggtgccaatataca	n.p.	B5: cgcgcttgctttcaggctctg	224	788/991	Baily et al. (1992)
<i>bcs</i> p31 Single PCR	Bruc887: tttatgatggcaaggcaaggtgg	n.p.	Bruc1457: cactatcgagcttgatgagcttgc	594	887/1457	Da Costa et al. (1996)
<i>bcs</i> p31 Nested PCR	Bruc968: aggatgcaaacatcaaatcggtcg	n.p.	Bruc1404: cgtgtatcctcgttcagagaacc	460	968/1404	
<i>per</i> Single PCR	<i>bruc</i> 1: cggtttatgtgactctctcg	n.p.	<i>bruc</i> 5: cagtattctcgtgtaggccaagta	367	325/668	Bogdanovich et al. (2004)
<i>per</i> Nested PCR	Per51: gtgcgactggcgattacaga	n.p.	Per261: gccttcaccggtcgaattgt	231	51/261	This study
IS711 real-time PCR	IS421: cgctcgcgcggtgat	ISTq: FAM- acgaccaagctgcatgct- gttctgatg-TAMRA	IS511: cttgaagcttcgagacagtcacc	178	421/438/511	This study
<i>bcs</i> p31 real-time PCR	BCSP1163: tctttgtggcggctatcc	BCSPTq: FAM- acgggcaatct- MGB-NFQ	BCSP1199: ccgttcgagatgcccagtt	55	1163/1183/1199	This study
<i>per</i> real-time PCR	Per525: gtttatgttctttgggaacaagacaa	PerTq: FAM- tacgaccggtgaa- ggcgggatgMGB-NFQ	Per575: gaggattgcgcgtagca	68	525/552/575	This study

^a n.p.: no probe.

The characteristics of the primers used for conventional PCR (single and/or nested) targeting either IS711 or bcsp31 or per sequences are given in Table 2. The bcsp31 primers and single PCR per primers have been previously described (Baily et al., 1992; Bogdanovich et al., 2004). By contrast, primers used for per nested PCR and IS711 primers were newly designed and chosen according to the following criteria: minimum dimer formation, self-complementarity, and minimum homology with known prokaryotic gene sequences.

The bcsp31 and per probes were TaqMan MGBTM Probes (Applied Biosystems, France) incorporating a 50 FAM reporter and a minor groove binder group (MGB) with a non-fluorescent quencher (NFQ) at the 30 end. The IS711 probe was a TaqMan probe (MWG Biotech, Germany) labelled at the 50 end with FAM as fluorescent reporter and TAMRA as quenching molecule at the 30 end. The characteristics of primers and probes used for real-time PCR are given in Table 2.

2.4. Conventional PCR assay

Amplifications were carried out using 50 µl reaction volumes. The mixture contained 38.4 µl of RNase free water, 5 µl of 10x PCR buffer (Promega, France), 200 mM of dNTP mix, 2 mM of MgCl₂, 1 mM of each primer, 1 U of Taq polymerase (Promega, France) and 1 ng of DNA. The DNA quantities used for the analytical sensitivity corresponded to 10-fold dilutions from 10⁻⁶ to 10⁻¹⁵ g/ml. For

the IS711 single PCR, reaction mixtures were denatured 5 min at 94 °C. Then, the first 5 cycles (pre-cycles) were performed as follows: 1 min at 94 °C, 1 min primer annealing at 60 °C, and 1 min primer extension at 72 °C. Then, the last 35 cycles were performed with an annealing temperature of 55 °C. Then, the extension reaction was continued for another 7 min at 72 °C to ensure that the final extension step is complete.

The B4/B5 primers, and bruc1/bruc5 primers targeting bcsp31 and per gene respectively were used in the single PCR according to the authors (Baily et al., 1992; Bogdanovich et al., 2004). The bcsp31 nested PCR was carried out as described by Da Costa et al. (1996). The IS711 and per nested PCR were performed for 15 cycles with the same timing steps as described above for the single PCR without pre-cycles.

The reaction products were visualized on 1.5% agarose gels containing 1 mg ethidium bromide per milliliter. To avoid any contamination, reaction mixture preparation, DNA amplification and gel migration were done in separate rooms.

2.5. Real-time PCR assay

Real-time TaqMan1 PCR was set up in a final volume of 25 µl with 9.65 µl of RNase free water, 12.5 µl of TaqMan1 Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, France), each primer and TaqMan1 probe at concentrations of 0.3 mM and 0.2 mM, respectively, and 2 ng of DNA

Table 3

Comparison of C_T values in the real-time PCR assay.

Brucella strain	biovar	IS711 C _T	bcsp31 C _T	per C _T	DC _T IS/bcsp _c	DC _T bcsp/per _d	IS711 copy number	Reference
B. melitensis 16M _a	1	17.16	17.57	18.30	0.41	0.73	7	AE008917/AE008918 _r
B. melitensis 63/9 _a	2	14.12	16.62	17.08	2.50	0.46	10	Ouahrani et al. (1993)
B. melitensis Ether _a	3	16.11	17.54	18.08	1.43	0.54	9	Ouahrani et al. (1993)
B. melitensis Rev.1 _a	1	15.87	17.31	17.96	1.44	0.65	n.d. ^e	n.d.
B. melitensis 53H38 _a	1	13.93	15.87	16.66	1.94	0.79	n.d.	n.d.
B. melitensis 115 _a	3	13.01	14.85	15.48	1.84	0.63	n.d.	n.d.
B. abortus 544 _a	1	15	16.69	17.26	1.69	0.57	7	Ouahrani et al. (1993)
B. abortus 86/8/59 _a	2	13.19	15.22	15.78	2.02	0.56	7	Ouahrani et al. (1993)
B. abortus Tulya _a	3	13.66	14.87	15.84	1.20	0.97	6	Ouahrani et al. (1993)
B. abortus AFSSA _a	3	12.79	15.11	15.92	2.32	0.81	6	Ouahrani et al. (1993)
B. abortus 292 _a	4	14.04	15.14	15.95	1.10	0.81	7	Ouahrani et al. (1993)
B. abortus B3196 _a	5	14.19	15.13	15.97	0.95	0.84	7	Ouahrani et al. (1993)
B. abortus 870 _a	6	14.88	15.06	15.87	0.18	0.81	8	Ouahrani et al. (1993)
B. abortus C68 _a	9	12.59	14.73	15.71	2.14	0.98	6	Ouahrani et al. (1993)
B. abortus B19 _a	1	15.97	17.24	17.77	1.27	0.53	n.d.	n.d.
B. abortus S99 _a	1	12.79	15.14	16.03	2.35	0.89	n.d.	n.d.
B. suis 1330 _b	1	18.47	19.23	19.49	0.76	0.26	7	AE014291/AE014292 _r
B. suis Thomsen _a	2	12.24	15.14	16.36	2.90	1.22	13	CP000911/CP000912 _r
B. suis 686 _a	3	12.44	14.49	16.72	2.04	2.23	6	Ouahrani et al. (1993)
B. suis 40 _a	4	12.60	14.74	15.47	2.14	0.73	6	Ouahrani et al. (1993)
B. suis 513 _a	5	13.43	16.95	17.54	3.52	0.59	n.d.	n.d.
B. neotomae _a		14.04	17.35	17.01	3.30	À0.34	8	Bricker et al. (2000)
B. ovis 63/290 _a		12.28	17.09	18.39	4.81	1.3	38	CP000708/CP000709 _r
B. canis RM6/66 _a		16.02	17.06	17.63	1.04	0.57	6	CP000872/CP000873 _r
B. pinnipedialis _a		12.06	16.50	17.46	4.44	0.96	>25	Bricker et al. (2000)
B. ceti _b		13.25	18.96	19.21	5.71	0.25	>25	Bricker et al. (2000)

^a C_T values were obtained from amplification of 20 ng of Brucella DNA.

^b C_T values were obtained from amplification of 2 ng of Brucella DNA.

^c DC_T IS/bcsp is the difference between the IS711 C_T and the bcsp31 C_T.

^d DC_T bcsp/per is the difference between the bcsp31 C_T and the per C_T.

^f Accession number from GeneBank.

^e not

defined.

template. The reaction mixture was initially incubated for 10 min at 95 °C. Amplification was performed for 45 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, annealing and extension at 60 °C for 1 min. The PCR reaction was performed on an AB-prism 7300 (Applied Biosystems, France). Samples were processed in duplicates.

2.6. Analytical sensitivity

Sensitivity was determined by testing decreasing DNA quantities of *B. ovis* 63/290, *B. melitensis* 16 M, *B. abortus* 544 and *B. canis* RM6/66 (10-fold dilutions from 10⁶ to 10¹⁵ g/ml). These strains were chosen due to their high (*B. ovis*), and low (*B. melitensis*, *B. abortus* and *B. canis*) copy number of IS711: 38, 7, 7 and 6 respectively, as previously described (Ouahrani et al., 1993).

2.7. Analytical specificity

The specificity of the different primers and probes was first assayed *in silico* by using BLAST software in order to avoid non-specific amplification. Analytical specificity was then evaluated on the 68 non-Brucella micro-organisms listed in Table 1. In conventional PCR, 1 ng of *B. ovis* DNA was used as a positive control. In real-time PCR, an inhibition control (mixture containing both the pathogen DNA and 0.2 ng of *B. ovis* DNA) was simultaneously tested for each organism. Standard curves were generated using a 10-fold dilution series of DNA ranging from 0.2 ng to 0.2 fg for the TaqMan assay and were used to determine the

cycle threshold (C_T) values and the lower limit of detection of the respective assay. For all PCR assays, the negative control consisted in sterile water instead of DNA template.

2.8. Repeatability and reproducibility of the real-time PCR assay

Seventy-two samples were amplified in the same run for the intra-assay repeatability and 15 samples were amplified in a single run on 4 consecutive days for the inter-assay reproducibility. The respective coefficients of variation (CVs) were then calculated.

3. Results

3.1. Amplification of the IS711, *bcs*p31 and *per* genes in *Brucella* reference strains

DNA amplification of the three sequences was obtained with all the *Brucella* species and biovars listed in Table 1. In real-time PCR, for all *Brucella* strains tested, a low variation in C_T values was observed for *bcs*p31 and *per* gene targets when the same quantity of DNA was used as template in the assays (C_T: 14.49–17.57 with 20 ng of *Brucella* DNA). By contrast, in the real-time PCR targeting the IS711, the observed C_T varied according to the *Brucella* species and biovars (Table 3). Moreover, for the same DNA amount, the earliest detection was observed for *B. ovis* 63/290 and the latest for *B. melitensis* 16 M biovar 1 with a difference of C_T of 4.88 (Table 3). A maximum difference of C_T of 2.23 was

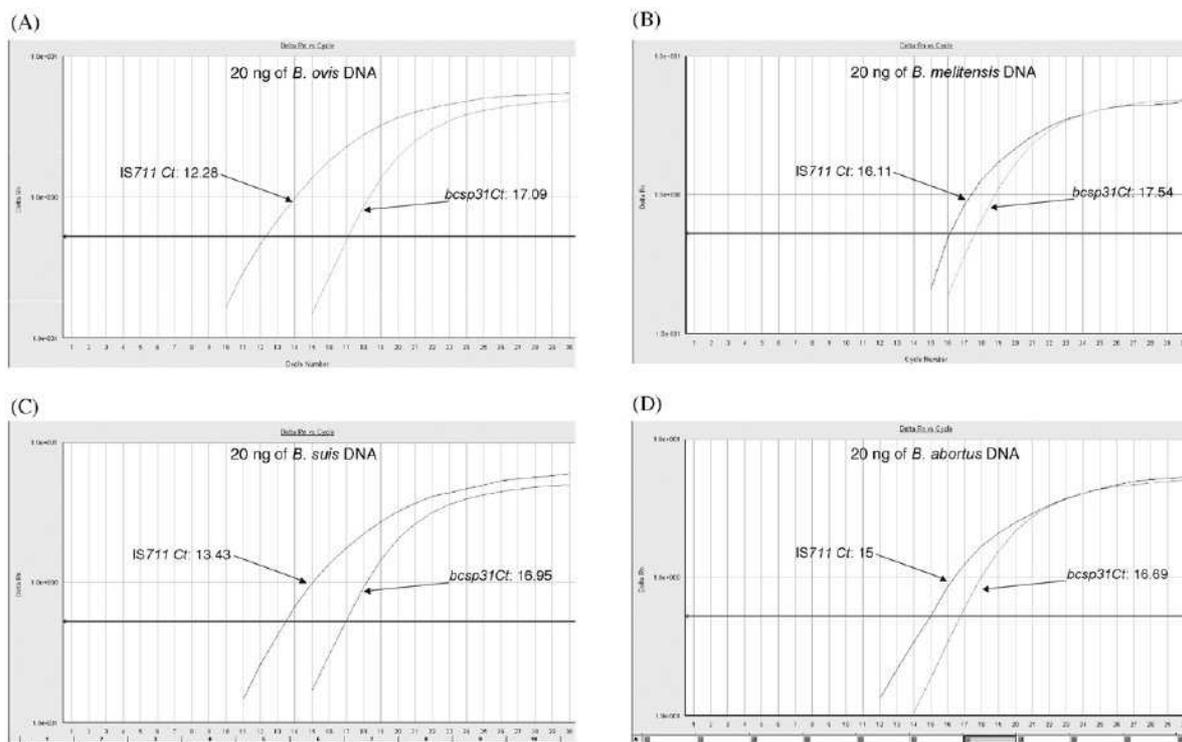


Fig. 1. IS711 real-time PCR amplification curves of *B. ovis* 63/290 (A); *B. melitensis* Ether (B); *B. suis* 513 (C); and *B. abortus* 544 (D) genomic DNA (20 ng). The fluorescence axis is in logarithmic scale and the data are baseline-subtracted.

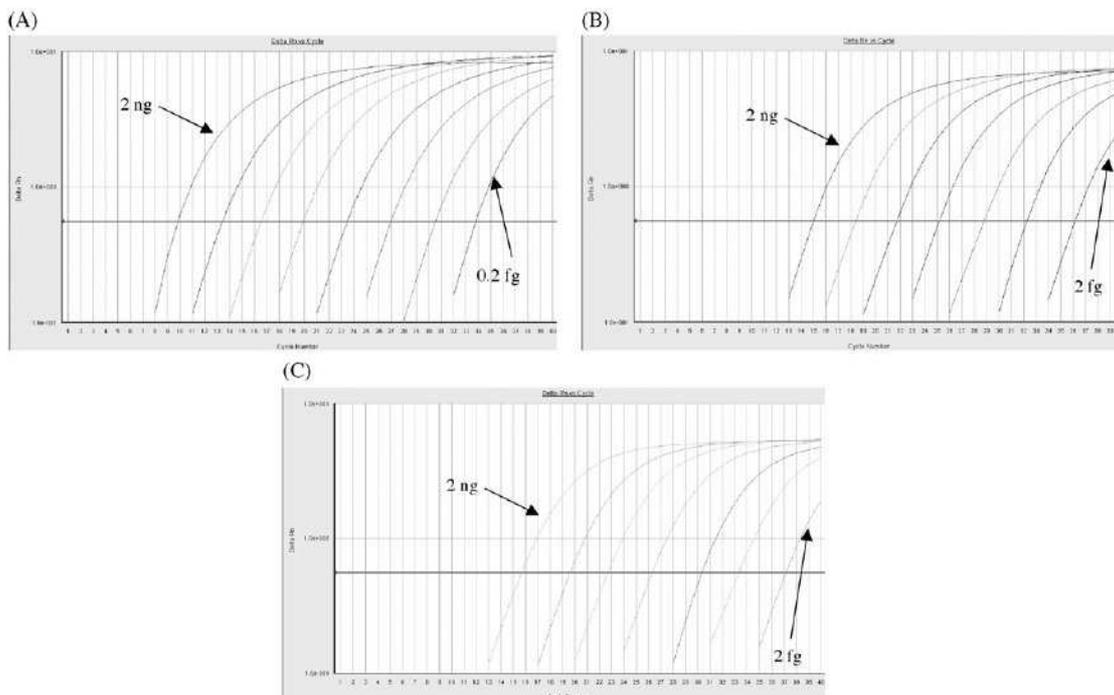


Fig. 2. IS711 (A), bcp31 (B) and per (C) amplification curves of *B. ovis* 63/290 genomic DNA. A 10-fold dilutions series (from 0.02 ng to 0.002 fg) was used as a template. The fluorescence axis is in logarithmic scale and the data are baseline-subtracted.

found between bcp31 and per genes (DCT bcp31/per, Table 3) with an earlier detection for the bcp31-based PCR. However, the CT observed with IS711 was equal or lower than the one observed with either bcp31 or per-based PCR, whatever the *Brucella* species. The difference of CT observed between IS711 and bcp31 (DCT IS/bcp31, Table 3) was 0.18–2.35, 0.41–2.50, 0.76–3.52, and 4.81 for *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* and *B. ovis* respectively (Fig. 1; Table 3). Results obtained with DNA from both *B. pinnipedialis* and *B. ceti* presented a DCT IS/bcp31 of 4.44 and 5.71 respectively (Table 3).

3.2. Specificity of conventional and real-time PCR assays

No amplification products were observed in real-time PCR, whatever the target, with any of the non-*Brucella* micro-organisms tested. In conventional PCR, none of the non-*Brucella* strains studied were detected when using the IS711 and per gene primers. However, DNA from *O. intermedium* LMG 3301 and LMG 3306 strains were amplified when using B4/B5 or Bruc887/Bruc1457 bcp31 primers in single PCR. Nevertheless these cross-

reactions were not confirmed in nested PCR (data not shown).

3.3. Sensitivity of conventional and real-time PCR assays

The respective lower limit of detections of conventional and real-time PCR assay observed with 10-fold serial dilutions of *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* and *B. canis* DNA are given in Table 4. In all cases, the real-time PCR was more sensitive than the conventional PCR. In conventional PCR assays, the lower limit of detection was identical for bcp31 and per targets. However, a 50-fold higher sensitivity for *B. canis* RM6/66 and *B. melitensis* 16 M DNA and a 500-fold higher sensitivity for *B. abortus* 544 and *B. ovis* 63/290 were observed for these targets in real-time PCR (Fig. 2). For the IS711 target, a 10-fold maximum variation was observed according to the species tested, with a 50–500 higher sensitivity for the real-time PCR. Finally, the sensitivity of the IS711 target was identical or 10 times higher than the sensitivity of the two other targets, in real-time as well as in conventional PCR (Table 4).

Table 4
Comparison of conventional and real-time PCR assays lower limit of detection (fg).

Brucella	IS711 copy number	Conventional PCR			Real-time PCR		
		IS711	bcp31	per	IS711	bcp31	per
<i>B. canis</i> RM6/66	6	100	1000	1000	2	20	20
<i>B. abortus</i> 544	7	100	1000	1000	2	2	2
<i>B. melitensis</i> 16M	7	1000	1000	1000	2	20	20
<i>B. ovis</i> 63/290	38	100	1000	1000	0.2	2	2

3.4. Repeatability and reproducibility of the real-time PCR assay

Since IS711 appeared as the best candidate for routine brucellosis diagnosis, evaluation of the repeatability and the reproducibility was only done for this target on samples consisting of 0.02 ng of *B. ovis* 63/290 DNA. The Ct values intra-assay and inter-assay CVs were 1.06% and 4.17% respectively (data shown).

4. Discussion

In the last years, several authors have evaluated the sensitivity and the specificity of real-time PCR assays for the detection of *Brucella* (Redkar et al., 2001; Newby et al., 2003; Probert et al., 2004).

In the present study, we compared the sensitivity and the specificity of three targets, i.e. *per*, *bcsp31* and IS711 genes in real-time PCR, in comparison with conventional PCR. To our knowledge, no previously published real-time PCR presented primers based exclusively on the IS711 gene, while this sequence is specific and its copy number could allow improving the sensitivity of the PCR.

Detection of the three targets from *Brucella* DNA confirms the presence of the IS711, *bcsp31* and *per* genes in all *Brucella* species and biovars. There was no detectable difference in sensitivity of PCR assays between *Brucella* species and biovars using *bcsp31* and *per* primers. By contrast, the IS711 detection depends on its copy number among *Brucella* species and biovars. Nevertheless, the DCT IS/*bcsp* of *Brucella* species is not really significant. To be relevant, DCT IS/*bcsp*-based *Brucella* species identifications should be investigated and validated on a more substantial number of strains of the same species and subspecies in a further work. Differences of CT values obtained between *bcsp31* and *per* real-time PCR assays are assumed to be related to primer performance, since each gene is theoretically present in equal quantities in the prepared DNA.

A greater sensitivity was observed for the IS711 detection by real-time PCR, the highest being observed with *B. ovis* 63/290 DNA, probably due to its high copy number in the genome (38 copies). *B. canis* RM6/66 DNA, *B. melitensis* 16M and *B. abortus* 544 DNA presented the same results while 6–7 IS711 copies are present in their respective genome (Table 4).

The real-time PCR assays were evaluated with a variety of other bacterial species and were highlighted as being specific; neither micro-organism phylogenetically related, nor pathogens known to share common epitopes with *Brucella* showed a cross-reaction. Interestingly, no amplification occurred with real-time *per* primers from *Y. enterocolitica* O:9 and *E. coli* O:157, two organisms that contain the *per* gene, thus indicating the specificity of the selected target sequence (Bogdanovich et al., 2004). The two sets of real-time PCR IS711 primers presented in this study were selected among many pairs after intensive testing. This careful design of the IS711 primers allowed a significant improvement of the specificity of the assay since no cross-reaction was observed, notably with *Ochrobactrum* species, the closest phylogenetically relative

of *Brucella* (Velasco et al., 1998; Yanagi and Yamasato, 1993).

The specificity of conventional (single and nested) PCR assays presented similar results to those reported by Da Costa et al. (1996).

A 50 -nuclease IS711 PCR assay was tested by Probert et al. (2004) and Redkar et al. (2001) who evaluated the detection limit of the assay. These authors reported a result approximately identical to ours, with respective detection limits of 150 fg for *B. abortus* and *B. melitensis* DNA and 250 fg for *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* and *B. suis*. Both PCR assays share an IS711-primer and a species-specific primer in order to differentiate *Brucella* species, which could explain these low results. Nevertheless, the IS711 real-time PCR assay described by Newby et al. (2003), based on the same principle, was able to detect 7.5 fg of *B. abortus* DNA. Bogdanovich et al. (2004) described a detection limit of 2000 fg for *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis* DNA and 200 fg for *B. neotomae* and *B. ovis* DNA with a *per* gene-based real-time PCR. Al Dahouk et al. (2007) evaluated a real-time PCR based on the B4/B5 primers described by Baily et al. (1992) and compared it to real-time PCRs established by Bogdanovich et al. (2004), Newby et al. (2003), Probert et al. (2004) and Redkar et al. (2001). As little as 18 fg of *B. abortus* DNA could be detected in this study using the primers described by these authors, Bogdanovich et al. (2004) excepted. The *B. melitensis* DNA tested presented a detection limit of 16 fg with the primers designed by Probert et al. (2004) and Redkar et al. (2001). The hybridization probes used in this last study allowed to avoid an amplification of the *O. anthropi* DNA tested, which confirms the great advantage of using a probe in real-time PCR (Newby et al., 2003).

The detection limit of the *per* real-time PCR assay in this work was markedly improved in comparison to the real-time PCR published by Bogdanovich et al. (2004). Moreover, the insertion sequence IS711-based sensitivity reached was higher than previous works for the detection of the genus *Brucella*. Combining these observations with our data, we could suggest the sensitive IS711 real-time PCR presented in this study for the detection of the genus *Brucella*.

In conclusion, real-time PCR appears to offer several advantages over conventional PCR: it is less labour-intensive, faster and it is a closed system with no need of post-PCR handling, preventing DNA contamination. Therefore, the use of the IS711-based TaqMan1 real-time PCR assay appears promising due to its high sensitivity for the safe, rapid and specific detection of the genus *Brucella* in clinical samples, while the two other targets could be used as confirmatory tools, in order to optimise the diagnostic specificity. However, protocols should be carefully validated on representative numbers of *Brucella*-infected and -free samples before being implemented in routine diagnosis in animal and human brucellosis.

Conflict of interest

The authors have declared that no conflict of interest exists.

Acknowledgements

Lotfi Bounaadja is the recipient of a Ph.D. grant from Conseil General de la Sarthe.

This work was supported by Conseil General de la Sarthe (L.B., S.P.), l'Universite du Maine (L.B., B.C.), and by the European Community's financial assistance to the Community Reference Laboratory for Brucellosis (L.B., D.A., B.G.B.). We are grateful to Maria-Laura Boschioli, Karine Laroucau, Nora Madani and Elodie Rousset (Afssa), and Ignacio Moriyon (University of Navarra, Spain) for providing non-Brucella materials and to Martine Thiebaud and Elisabeth Pradier for their expert technical assistance.

References

- Al Dahouk, S., Nockler, K., Scholz, H.C., Pfeffer, M., Neubauer, H., Tomaso, H., 2007. Evaluation of genus-specific and species-specific real-time PCR assays for the identification of *Brucella* spp. *Clin. Chem. Lab. Med.* 45, 1464–1470.
- Baily, G.G., Krahn, J.B., Drasar, B.S., Stoker, N.G., 1992. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J. Trop. Med. Hyg.* 95, 271–275.
- Bogdanovich, T., Skurnik, M., Lubeck, P.S., Ahrens, P., Hoorfar, J., 2004. Validated 5' Nuclease PCR Assay for rapid identification of the genus *Brucella*. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2261–2263.
- Bricker, B.J., Ewalt, D.R., MacMillan, A.P., Foster, G., Brew, S., 2000. Molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1258–1262.
- Bricker, B.J., 2002. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet. Microbiol.* 90, 435–446.
- Cloekaert, A., Grayon, M., Grepinet, O., 2000. An IS711 element downstream of the bp26 gene is a specific of *Brucella* spp. Isolated from marine mammals. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7, 835–839.
- Da Costa, M., Guillou, J.P., Garin-Bastuji, B., Thiebaud, M., Dubray, G., 1996. Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 267–275.
- Debeaumont, C., Falconnet, P.A., Maurin, M., 2005. Real-time PCR for detection of *Brucella* spp. DNA in human serum samples. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 24, 842–845.
- Foster, G., Osterman, B.S., Godfroid, J., Jacques, I., Cloekaert, A., 2007. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2688–2693.
- Garin-Bastuji, B., Hummel, N., Gerbier, G., Cau, C., Pouillot, R., Da Costa, M., Fontaine, J.J., 1999. Non specific serological reactions in the diagnosis of bovine brucellosis: experimental oral infection of cattle with repeated doses of *Yersinia enterocolitica* O:9. *Vet. Microbiol.* 66, 223–233.
- Godfroid, J., Saegerman, C., Wellemans, V., Walravens, K., Letesson, J.J., Tibor, A., Mc Millan, A., Spencer, S., Sanna, M., Bakker, D., 2002. How to substantiate eradication of bovine brucellosis when aspecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. *Vet. Microbiol.* 90, 461–477.
- Godfroid, J., Cloekaert, A., Liautard, J.P., Kohler, S., Fretin, D., Walravens, K., Garin-Bastuji, B., Letesson, J.J., 2005. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet. Res.* 36, 313–326.
- Halling, S.M., Tatum, F.M., Bricker, B.J., 1993. Sequence and characterization of an insertion sequence, IS711, from *Brucella ovis*. *Gene* 133, 123–127.
- Henault, S., Calvez, D., Thiebaud, M., Bouliere, M., Garin-Bastuji, B., 2000. Validation of a nested-PCR based on the IS6501/711 sequence for the detection of *Brucella* in animal samples. In: Proceedings of the Brucellosis 2000 International Research Conference (including the 53rd Brucellosis Research Conference), Nimes, France, p. 45.
- Herman, L., De Ridder, H., 1992. Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2099–2101.
- Lubeck, P.S., Skurnik, M., Ahrens, P., Hoorfar, J., 2003. A multiplex PCR-detection assay for *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 and *Brucella* spp. based on the perosamine synthetase gene. Application to *Brucella* diagnostics. *Adv. Exp. Med. Biol.* 529, 451–453.
- Matar, G., Khneisser, I.A., Abdelnoor, A.M., 1996. Rapid laboratory diagnosis of human brucellosis by PCR analysis of target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA. *J. Clin. Microbiol.* 34, 477–478.
- Navarro, E., Fernandez, J.A., Escribano, J., Solera, J., 1999. PCR assay for diagnosis of human Brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1654–1655.
- Navarro, E., Segura, J.C., Castano, M.J., Solera, J., 2006. Use of real-time quantitative polymerase chain reaction to monitor the evolution of *Brucella melitensis* DNA load during therapy and post-therapy follow-up in patients with brucellosis. *Clin. Infect. Dis.* 42, 1266–1273.
- Newby, D.T., Hadfield, T.L., Roberto, F.F., 2003. Real-time PCR detection of *Brucella abortus*: a comparative study of SYBR green I, 59-exonuclease, and hybridization probe assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4753–4759.
- Nielsen, K., Smith, P., Widdison, J., Gall, D., Kelly, L., Kelly, W., Nicoletti, P., 2004. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. *Vet. Microbiol.* 100, 25–30.
- O'Leary, S., Sheahan, M., Sweeney, T., 2006. *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. *Res. Vet. Sci.* 81, 170–176.
- Ouahrani, S., Michaux, S., Sri Widada, J., Bourg, G., Tournebize, R., Ramuz, M., Liautard, J.P., 1993. Identification and sequence analysis of IS6501, an insertion sequence in *Brucella* spp.: relationship between genomic structure and the number of IS6501 copies. *J. Gen. Microbiol.* 139, 3265–3273.
- Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L., Tsianos, E.V., 2006. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect. Dis.* 6, 91–99.
- Probert, W.S., Schrader, K.N., Khuong, N.Y., Bystrom, S.L., Graves, M.H., 2004. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1290–1293.
- Queipo-Ortuno, M.I., Colmenero, J.D., Reguera, J.M., Garcia-Ordenez, M.A., Pachon, M.E., Gonzalez, M., Morata, P., 2005. Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR Green I-based real-time PCR assay and melting curve analysis in serum samples. *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 713–718.
- Redkar, R., Rose, S., Bricker, B., DelVecchio, V., 2001. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Mol. Cell. Probes* 15, 43–52.
- Romero, C., Gamazo, C., Pardo, M., Lopez-Goni, I., 1995. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33, 615–617.
- Scholz, H.C., Hubalek, Z., Sedlacek, I., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Melzer, F., Kampfer, P., Neubauer, H., Cloekaert, A., Maquart, M., Zygmunt, M.S., Whatmore, A.M., Falsen, E., Bahn, P., Gollner, C., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H.J., Nockler, K., 2008. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 375–382.
- Velasco, J., Romero, C., Lopez-Goni, I., Leiva, J., Diaz, R., Moriyon, I., 1998. Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 759–768.
- Wrathall, A.E., Broughton, E.S., Gill, K.P., Goldsmith, G.P., 1993. Serological reactions to *Brucella* species in British pigs. *Vet. Res.* 132, 449–454.
- Yanagi, M., Yamasato, K., 1993. Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiol. Lett.* 107, 115–120.
- Young, E.J., 1991. Serologic diagnosis of human brucellosis: analysis of 214 cases by agglutination tests and review of the literature. *Rev. Infect. Dis.* 13, 359–372.

ANNEXES

VII.ANNEXES

ANNEXE 1 : Espèces et biovars de *Brucella* utilisés dans l'étude.

<i>Brucella</i>	Biovar	Souche ^b	Référence ^a
<i>melitensis</i>	1	16M	ATCC 23456
	1	Rev.1	EDQM souche de référence
	1	53H38 ^c	-
	2	63/9	ATCC 23457
	3	Ether	ATCC 23458
	3	115 ^c	-
<i>abortus</i>		544	ATCC 23448
	1	B19 ^d	-
		S99 ^e	-
		RB51 ^f	-
	2	86/8/59	ATCC 23449
	3	Tulya	ATCC 23450
	3	Afssa Lerpaz ^g	-
	4	292	ATCC 23451
	5	B3196	ATCC 23452
	6	870	ATCC 23453
9	C68	ATCC 23455	

<i>Brucella</i>	Biovar	Souche ^b	Référence ^a
	1	1330	ATCC 23444
	2	Thomsen	ATCC 23445
<i>suis</i>	3	686	ATCC 23446
	4	40	ATCC 23447
	5	513	NCTC 11996
<i>neotomae</i>		5K33	ATCC 23459
<i>ovis</i>		63/290	ATCC 25840
<i>canis</i>		RM6/66	ATCC 23365
<i>pinnipedialis</i>		Type strain ^h	NCTC 12890
<i>ceti</i>		Type strain ^h	NCTC 12891

^a ATCC, American Type Culture Collection (USA); NCTC, National Collection of Type Cultures (UK); EDQM, European Directorate for the Quality of Medicines (Strasbourg, France).

Les souches sont fournies par: ^b le CNR des *Brucella* de l'AFSSA, Maisons-Alfort, France; ^c l'INRA de Tours, Nouzilly, France; ^d USDA, NVSL, Ames, USA; ^e VLA (Veterinary Laboratories Agency), Weybridge Royaume-Uni et ^f CITA, Saragossa, Espagne. ^g cette souche est utilisée par l'AFSSA comme positive interne en bactériologie. ^h Foster et al., 2007.

ANNEXE 2 : Souches *Ochrobactrum* utilisées dans l'étude (D'après Scholz et al., 2008)

<i>Ochrobactrum</i>	Référence	<i>Ochrobactrum</i>	Référence	<i>Ochrobactrum</i>	Référence
	7b2c		LMG 371		CCUG 39736
	ALM 4		LMG 394		CCUG 44770
	CCM 4352		LMG 395		E 276
	CCUG 772		LMG 2136		LMG 379
	CCUG 1047		LMG 3298		LMG 3301 (T)
	CCUG 1076		LMG 3305		LMG 3306
	CCUG 7349		LMG 3307		LMG 5425
	CCUG 12303		LMG 3309	<i>intermedium</i>	LMG 5426
	CCUG 12415		LMG 3312		LMG 5446
	CCUG 12860		LMG 3313		OspIndien
	CCUG 13083		LMG 3329		RMA 16994
	CCUG 16508		LMG 3331 (T)		RR
	CCUG 17894		LMG 3333		TA 13
	CCUG 18525	<i>anthropi</i>	LMG 5140		TD30
	CCUG 18681		LMG 5438		TM 73
	CCUG 20020		LMG 5440	<i>lupini</i>	LUP21
	CCUG 20050		LMG 5441		LUP23
	CCUG 24566		LMG 5442	<i>oryzae</i>	DSM 17471
<i>anthropi</i>	CCUG 24695T		LMG 5444		WS 1846
	CCUG 25934A		LMG 7991	<i>pseudintermedium</i>	CCUG 34735
CCUG 28303		LMG 18952	CCUG 43465		
	CCUG 30656B		LMG 18953	<i>pseudogrignonense</i>	CCUG 30717 (T)
	CCUG 32009		QaI 13a		CCUG 43892
	CCUG 33786		SAI-12	<i>rhizosphaerae</i>	PR17(T)
	CCUG 34461		SAII 101		<i>Ochrobactrum sp.</i>
	CCUG 37643		WS 4290	<i>thiophenivorans</i>	CCUG 50899
	CCUG 50485		WS 4292		DSM 7216 (T)
	CLM 6		WS 4312		CCUG 1821
	CLM 7	<i>gallinifaecis</i>	DSM 15295 (T)		CCUG 29689
	CLM 26		iso 1965		LAIII-106
	DSM 2577	<i>grignonense</i>	oga9a	<i>tritici</i>	LMG 401
	DSM 14396		oga9c		LMG 2134
	DSM 20150	<i>haematophilium</i>	CCUG 38531		LMG 2320 t1
	LMG 33		OiC8-6		LMG 18957
	LMG 34	<i>intermedium</i>	CCM 7036		sp.Spik 14 (4915)
	LMG 35		CCUG 1838		TA 93
					WS 1830

ANNEXE 3 : Micro-organismes non-*Brucella* utilisés pour l'étude de spécificité.

Espèce bactérienne	Référence ^a	Source ^b
<i>Bactéries liées sérologiquement à <i>Brucella</i></i>		
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Souche de terrain	Afssa Lerqap
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>Holarctica</i>	ATCC 6223	Afssa Lerpaz
<i>Pasteurella multocida</i>	NCTC 12177	Afssa Lerpaz
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Urbana (group N)	Souche de terrain	Afssa Lerqap
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	Souche de terrain	Afssa Lerqap
<i>Yersinia enterocolitica</i> O: 9	NCTC 11174	Afssa Lerpaz
<i>Bactéries liées phylogenetiquement à <i>Brucella</i></i>		
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	LMG 140	BCCM
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	LMG 150	BCCM
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	LMG 43.1	BCCM
<i>Agrobacterium vitis</i>	LMG 8750	BCCM
<i>Ochrobactrum intermedium</i> LMG 3301	LMG3301	BCCM
<i>Ochrobactrum anthropi</i> LMG 3306	LMG 3306	DM-UN
<i>Ochrobactrum anthropi</i> LMG 3331	LMG3331	BCCM
<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>	LMG 1.1	BCCM
<i>Rhizobium tropici</i>	LMG 9503	BCCM
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	LMG 6133	BCCM

Micro-organismes non-*Brucella* potentiellement responsables
d'avortement

<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>Fetus</i>	LMG 6442	BCCM
<i>Candida albicans</i>	Souche de terrain	Afssa Lerpaz
<i>Coxiella burnetii</i> *	Nine Mile	Afssa-Lerpra
<i>Coxiella burnetii</i> *	Souche terrain 1	Afssa-Lerpra
<i>Coxiella burnetii</i> *	Souche terrain 2	Afssa-Lerpra
<i>Coxiella burnetii</i> *	Souche terrain 3	Afssa-Lerpra
<i>Listeria monocytogenes</i>	NCTC 7973	Afssa Lerpaz
<i>Listeria innocua</i>	Souche de terrain	Afssa Lerpaz
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Abortusovis	Souche de terrain	Afssa Lerpaz
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	ATCC 29833	Afssa Lerpaz

Autres micro-organisme non-*Brucella*

<i>Acinetobacter baumannii</i>	Souche de terrain	Afssa Lerpaz
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Souche de terrain	Afssa Lerpaz
<i>Afipia broomeae</i>	LMG 18885	BCCM
<i>Bacillus brevis</i>	Souche de terrain	Afssa Lerqap
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	Afssa Lerpaz
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	CIP A 34	Afssa Lerpaz
<i>Brevibacillus sp.</i>	Souche de terrain	Afssa Lerqap
<i>Campylobacter jejuni</i>	LMG 8841	BCCM

Autres micro-organisme non-*Brucella*

<i>Campylobacter sputorum</i> biovar faecalis	LMG 6617	BCCM
<i>Citrobacter freundii</i>	Souche de terrain	Afssa Lerpaz
<i>Corynebacterium bovis</i>	Souche de terrain	Afssa Lerpaz
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> (ovis)	CIP 102968 T	Afssa Lerpaz
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Souche de terrain	Afssa Lerpaz
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433	Afssa Lerpaz
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Souche de terrain	Afssa Lerpaz
<i>Lactobacillus saerimneri</i>	LMG 22087	BCCM
<i>Listeria ivanovii</i>	Souche de terrain	Afssa Lerpaz
<i>Listeria seeligeri</i>	Souche de terrain	Afssa Lerpaz
<i>Listeria welshimeri</i>	Souche de terrain	Afssa Lerpaz
<i>Mycobacterium avium</i>	Souche de terrain	Afssa Lerpaz
<i>Mycobacterium bovis</i>	Souche de terrain	Afssa Lerpaz
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	ATCC 7912	Afssa Lerpaz
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ATCC H37Rv	Afssa Lerpaz
<i>Proteus mirabilis</i>	CIP 103181	Afssa Lerpaz
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Afssa Lerpaz
<i>Rhodococcus equi</i>	Souche de terrain	Afssa Lerpaz
<i>Salmonella</i> Bodjonegoro	Souche de terrain	Afssa Lerpaz

Autres micro-organisme non-*Brucella*

<i>Salmonella</i> Typhimurium	NCTC 12484	Afssa Lerpaz
<i>Serratia marcescens</i>	Souche de terrain	Afssa Lerpaz
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Afssa Lerpaz
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Souche de terrain	Afssa Lerpaz
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Souche de terrain	Afssa Lerpaz
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Souche de terrain	Afssa Lerqap
<i>Streptococcus bovis</i>	Souche de terrain	Afssa Lerpaz
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Souche de terrain	Afssa Lerqap
<i>Streptococcus equi subsp. Equi</i>	Souche de terrain	Afssa Lerpaz
<i>Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus</i>	Souche de terrain	Afssa Lerpaz
<i>Streptococcus equisimilis</i>	Souche de terrain	Afssa Lerpaz
<i>Streptococcus faecium</i>	Souche de terrain	Afssa Lerpaz
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Souche de terrain	Afssa Lerpaz
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Souche de terrain	Afssa Lerpaz
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:47	Souche de terrain	Afssa Lerpaz

* ADN Pure fourni directement par L'AFSSA- Lerppra, Sophia-Antipolis, France.

^aCIP, Collection de l'Institut Pasteur (Paris, France) ; LMG, Collection de bactérie du laboratoire de Microbiologie de Gent (Université de Gent, Belgique). ^bBCCM, Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (Université de Gent, Belgique); AFSSA Lerpaz, Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Pathologie Animale et Zoonoses (Unité Zoonoses Bactériennes) et l'AFSSA Lerqap, Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur la Qualité des Aliments et sur les Procédés agroalimentaires (Maisons-Alfort, France); Afssa Lerpra, Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur les Petits ruminants et les Abeilles (Sophia-Antipolis, France); DM-UN, Departamento de Microbiología-Universidad de Navarra (Pamplona, Espagne).

ANNEXE 4 : Milieux de culture

Bouillon coeur-cervele

COMPOSITION	(grammes/litre)
Infusion de cervelle de veau	12,5
Infusion de coeur de boeuf	5,0
Protéose-peptone	10,0
Glucose	2,0
Chlorure de sodium	5,0
Phosphate disodique	2,5
pH 7,4	7,4

Gélose 115

COMPOSITION	(grammes/litre)
Extrait de levure	10
Activated charcoal (Norit SG)	2
Tampon ACES (Sigma)	10
Agar	17
Hydrater le ACES avec 500 ml H ₂ O. Ajouter un mélange de 40 ml de KOH (1 M) et 440 ml H ₂ O. Rajouter le reste des ingrédients et autoclaver pendant 15 °C et abaisser la température à 50 °C avant de rajouter les solutions filtrées suivantes :	
Cysteine hydrochloride	0,4 g
Fe(P ₂ O ₇) ₃	0,25 g
Eau distillée	20 ml
pH	6,9

Gélose YMA

COMPOSITION	(grammes/litre)
Mannitol	10
KH ₂ PO ₄	0,5
Sodium glutamate	0,5
NaCl	50 mg
Solution A: 1 g MgSO ₄ x 7H ₂ O + 100 ml H ₂ O	10 ml
Solution B : 5,28 g CaCl ₂ x 2H ₂ O + 100 ml H ₂ O	1 ml
Solution C: 666 mg FeCl ₃ x 6H ₂ O + 100 ml H ₂ O	1 ml
Extrait de levure	1
Agar	20
Eau distillée	Quantité suffisante pour 1 L
pH	6,8

Gélose 16

COMPOSITION	(grammes/litre)
Glucose	10
Extrait de levure	10
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
KH ₂ PO ₄	20,25
Agar	15
Eau	1 L

ANNEXE 5 : Préparation d'ADN génomique par la méthode phénol-chloroforme

Préparer 2 ml d'une culture de bactéries dans du PBS

1. Centrifuger 1,5 ml de cette culture pendant 2 min à 4500 g
2. Eliminer soigneusement le surnageant
3. Ajouter 567 µl de Tris-EDTA (10 mM : 1mM) et mettre en suspension par pipetage répété pour obtenir une suspension parfaitement homogène
4. Ajouter 30 µl de SDS 10 % et homogénéiser rapidement
5. Ajouter 30 µl de Pk à 20 mg/ml et homogénéiser
6. Incuber 1 h à 56 °C au bain-marie

A partir de cette étape, travailler à une température > 15 °C car en dessous le CTAB précipite

7. Ajouter 100 µl de NaCl 5 M et homogénéiser soigneusement
8. Ajouter 80 µl de CTAB/NaCl préchauffer à 65 °C et bien mélanger
9. Incuber 10 min à 65 °C
10. Laisser refroidir à température ambiante
11. Ajouter 600 µl d'un mélange de chloroforme/alcool isoamylique (24/1), à préparer extemporanément, puis émulsionner et centrifuger 5 min à 10 000 g
12. Transférer environ 750 µl de surnageant, sans toucher l'interface, dans un nouveau tube.
Si des difficultés se présentent, recentrifuger 1 min et prélever moins de surnageant
13. Ajouter 700 µl d'un mélange de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) puis émulsionner et centrifuger 5 min à 10 000 g
14. Transférer le maximum de surnageant, sans toucher l'interface, dans un nouveau tube
15. Recommencer l'étape 13 et 14 si nécessaire
16. Ajouter 450 µl d'isopropanol et mélanger vigoureusement
17. Centrifuger 10 min à 10 000 g et éliminer le surnageant
18. Ajouter 1 ml d'éthanol à 70 %. Retourner le tube plusieurs fois puis centrifuger 10 min à 10 000 g et éliminer le surnageant
19. Recommencer l'étape 13 et 14 pour éliminer le maximum de NaCl (sel peu soluble dans l'alcool)
20. Sécher sous vide 10 min
21. Resuspendre dans 100 µl d'eau et conserver à 4 °C

ANNEXE 6 : Protocole d'extraction : Kit Macherey Nagel (Genomic DNA from tissue)

1. Reprendre les bactéries dans 3 ml de PBS

2. Faire 2 aliquots de 1,5 ml

La suite des étapes ne se fait que sur un aliquot

3. Laver le culot avec 200 µl de PBS

4. Centrifuger 1 min à 7000 g

5. Resuspendre le culot dans 180 µl de tampon lyse, puis vortexer

6. Incuber 1 h à 37 °C

7. Ajouter 25 µl de Pk et incuber 3 h à 56 °C en vortexant de temps en temps

8. Ajouter 20 µl de RNase (20 mg/ml)

9. Laisser 5 min à température ambiante

10. Ajouter 200 µl de Buffer B₃ (B₂+B₁) et vortexer

11. Incuber 10 min à 70 °C

12. Centrifuger 10 min à 15 000 g (pour culoter l'ADN qui aurait agglutiné) et récupérer le surnageant

13. Ajouter 210 µl d'éthanol pur froid (-20 °C) et vortexer

14. Transvaser dans une colonne avec tube de collection

15. Centrifuger 3 min à 11 000 g et vider le tube

16. Ajouter 500 µl de Buffer BW et centrifuger 3 min à 11 000 g puis vider le tube

17. Ajouter 600 µl de Buffer B₅

18. Centrifuger 3 min à 11 000 g puis vider le tube

19. Centrifuger 3 min à 11 000 g pour enlever les traces d'éthanol

20. Placer la colonne sur un tube ependorff stérile et mettre 100 µl d'H₂O

21. Centrifuger 3 min à 11 000 g

22. Jeter la colonne et conserver le tube ependorff à -20°C

ANNEXE 7 : Protocole d'extraction : kit Roche (High Pure PCR Template Preparation)

1. Reprendre les bactéries dans 3 ml de PBS
2. Faire 2 aliquots de 1,5 ml

La suite des étapes ne se fait que sur un aliquot.

3. Laver le culot avec 200 µl de PBS
4. Centrifuger 1 min à 7000 g.
5. Resuspendre le culot dans 200 µl de PBS, puis vortexer
6. Reprendre les 200µl de bactéries ou les 200 µl de broyat de prélèvements biologiques avec 200µl de tampon de lyse et 40 µl de Protéinase K, puis vortexer
7. Incuber une nuit à 55°C
8. Ajouter 200 µl Tampon de liaison. Bien mélanger et incuber à 70°C pendant 10 min
9. Ajouter 100 µ d'isopropanol et bien mélanger
10. Transvaser dans une colonne avec tube de collection
11. Centrifuger 1 min à 8000 rpm puis vider le tube
12. Ajouter 500 µl de tampon d'élimination d'inhibiteurs
13. Centrifuger 1 min à 8000 rpm puis vider le tube
14. Ajouter 500 µl de tampon de lavage
15. Centrifuger 1 min à 8000 rpm puis vider le tube
16. Répéter l'opération 9 et 10
17. Centrifuger 10 sec à vitesse maximale (14000 rpm) pour éliminer les traces d'éthanol
18. Insérer la colonne dans un tube eppendorf stérile de 1,5 ml
19. Ajouter 200 µl de tampon d'élution (préalablement chauffé à 70°C)
20. Centrifuger 1 min à 8000 rpm
21. Jeter la colonne et conserver le tube eppendorff à -20°C

Annexe 8 : Protocole d'extraction : kit BioRad (InstaGene Matrix)

1. Reprendre les bactéries dans 3 ml de PBS

2. Faire 2 aliquots de 1,5 ml

La suite des étapes ne se fait que sur un aliquot.

3. Laver le culot avec 200 µl de PBS

4. Centrifuger 1 min à 7000 g

5. Resuspendre le culot dans 200 µl de tampon Instagene matrix, puis vortexer

6. incuber à 56°C pendant 30 minutes

7. Vortexer pendant 10 secondes et placer le tube à 100°C pendant 8 minutes

8. Vortexer pendant 10 secondes et centrifuger à 12 000 rpm pendant 3 minutes

9. Récupérer le surnageant dans un tube ependorff stérile et conserver à -20°C

ANNEXE 9 : Protocole d'extraction : kit manuel Qiagen (DNeasy Blood & Tissue)

1. Ajouter aux 200 µl de broyat, 20 µl de Protéinase K, mélanger en vortexant et incuber à 55°C jusqu'à la lyse complète du tissu. Vortexer de temps à autre au cours de l'incubation
2. Ajouter 200 µl de tampon AL et vortexer
3. Incuber 10 min à 70°C
4. Ajouter 200 µl d'éthanol (100%) et vortexer
5. Déposer le mélange dans la colonne placée dans un tube collecteur
6. Centrifuger 1 min à 8000 rpm puis vider le tube
7. Ajouter 500 µl de tampon AW1 et centrifuger 8000 rpm puis vider le tube
8. Ajouter 500 µl de tampon AW2 et centrifuger 3 min à vitesse maximale pour éliminer les traces d'éthanol puis vider le tube
9. Insérer la colonne dans un tube Eppendorf stérile de 1,5 ml
10. Ajouter 200 µl de tampon d'élution AE et incuber 1 min à température ambiante
11. Centrifuger 1 min à 8000 rpm
12. Jeter la colonne et conserver le tube eppendorff à -20°C

ANNEXE 10 : Protocole d'extraction : kit robot Qiagen
(MagAttract® DNA Mini M48, BioRobot® M48 workstation)

1. Ajouter 190 µl de tampon G2 et 10 µl de protéinase K à 200 µl de broyat, puis homogénéiser au vortex
2. Incubation toute une nuit à 56°C
3. Centrifuger 10 sec à vitesse maximale (14000 rpm)
4. Transférer le surnageant dans un tube sans bouchon fourni par le kit
5. Suivre la notice d'utilisation de l'appareil :
 - a. Fixation de l'ADN aux billes magnétiques
 - b. Lavage des billes magnétiques fixées à l'ADN, ce complexe est capté par un aimant lors de cette étape
 - c. Elution dans un volume de 100 µl

ANNEXE 11 a : Caractéristiques des amorces et sondes utilisées pour la détection de *Brucella* par PCR-con. et PCR-TR et pour l'étude de la relation entre *Brucella* et *Ochrobactrum*.

Gène	PCR	Amorce sens (5'→3')	Sonde (5'→3')	Amorce antisens (5'→3')	Taille amplicon (pb)	Position	Référence
IS711	Simple	IS313: ctggctgatacggcggactttgaa	- (:pas de sonde)	IS639: ggaacgtgttgattgacctgat	350	313/639	Hénault et al., 2000
	Double	IS340: gtcctcattgatgcacccatcgc	-	IS576: taagtgatcggcatcataggctgc	260	340/576	
	Simple	ISA : ggatcgaagcatatcttccg	-	ISB : tgtctgcattcaacgcaacc	730	108/818	Maquart et al., 2009
	Temps réel	IS421: cgctcgcgcggtggat	ISTq: FAM- acgaccaagctgcagctgtgtcagatg- TAMRA	IS511: cttgaagcttgcggacagtcacc	178	421/438/511	Cette étude
bcsp31	Simple	Bruc887: tttatgatggcaagggcaaggtgg	-	Bruc1457: cactatcgagcttgatgagcttgc	594	323/893	Da Costa et al., 1996
	Double	Bruc968: aggatgcaaacaatcaatcggctc	-	Bruc1404: cgtgtatcctcgttccagagaacc	460	404/840	
	Simple	B4: tggctcggttgccaatatcaa	-	B5: cgcgcttgccttcaggctctg	224	225/428	Baily et al., 1992
	Temps réel	BCSP1163: tctttgtggcggctatcc	BCSPTq: FAM-acgggcgcaatct-MGB-NFQ	BCSP1199: ccgttcgagatggccagtt	55	1163/1183/1199	Cette étude

Gène	PCR	Amorce sens (5'→3')	Sonde (5'→3')	Amorce antisens (5'→3')	Taille amplicon (pb)	Position	Référence
<i>per</i>	Simple	bruc1: cggtttatgtggactctctcg	-	bruc5: cagtattctcgtgtaggcgaagta	367	325/668	Bogdanovich et al., 2004
	Double	Per51: gtgcgactggcgattacaga	-	Per261: gccttcaccggtcgtaattgt	231	51/261	Cette étude
	Temps réel	Per525: gtttagtttctttgggaacaagacaa	PerTq: FAM- tacgaccggtgaaggcgggatg- MGB-NFQ	Per575: gaggattgcgcgctagca	68	525/552/575	Cette étude
<i>omp10</i>	Simple	omp10A: atgaaacgcttccgcatcnt	-	omp10B: gtnagnagaagcgcgaac	362	1/344	Cette étude
<i>omp16</i>	Simple	omp16A: atgcgccgatccagtcgat	-	omp16B: ccgttgagaacggtgacgg	494	1/476	Cette étude
<i>omp19</i>	Simple	omp19A : aagcaagtctgctcagcctcgc	-	omp19B : gcaagatcgcgacgccgcaga	321	14/314	Cette étude
<i>bp26</i>	Simple	bp26A: atgaacanncgcgctanca	-	bp26B: aaacgacattgaccganacgt	739	1/719	Cette étude

(-) : Pas de sonde.

ANNEXE 11 b. Caractéristiques des amorces et des sondes testées pour la détection de *Brucella* par PCR-TR.

Gène	Amorce sens (5'→3')	Sonde Taqman (5'→3')	Amorce antisens (5'→3')	Taille amplicon (pb)	Position
IS711	IS 96 : agctgcatgctgttgcgat	sonde Bru1 : FAM-aagccaacacccggc-MGB-NFQ	IS180 : gaagcttgcggacagtcacc	85	446/490/511
	ISFd : gctcgcgcggtggat	sonde Bru2 : FAM-acgaccaagctgcatg-MGB-NFQ	ISRv : aggccgatagcatcgacaac	55	422/439/457
	ISA1 : gattccctttgtacgaaattctgatt	sonde A : aaggttgtaaggagaacagccgtgagca	ISA2 : tatgcttcgatccggtcca	101	20/48/101
	ISB1 : caacacccggccattatggt	sonde B : actgtccgcaagcttcaagccttctatcc	ISB2 : atcggcatcataggtgcat	101	494/515/575
	ISC1 cacgttccagtgtccaaca	sonde C : cgactggaggctgtacaaggaacgc	ISC2 : cagcgcaatacgcgatagc	101	656/678/737
	<i>bosp31</i>	B4 : tgctcgggtgccaatatcaa	sonde Pro : FAM- tgatggcaagggaaggtggaagattt-MGB-NFQ	B5 : cgcgcttgccttcaggtctg	224
<i>per</i>	bruc1 : cggtttatgtggactctctcg	sonde Bruc1 : FAM-attgcagatagatccagaggggt-MGB-NFQ	bruc5 : cagtattctcgtgtaggcgaagta	367	325/353/668

Annexe 12 Marquage des sondes utilisées en Southern Blot et contrôle de leur qualité

Marquage sonde

1. Prélever 1µg d'ADN (vol max 34 µl) et compléter avec du « nucléase free H₂O »).
2. Dénaturer 10 min à l'eau bouillante.
3. Mettre dans la glace 5 min.
4. Centrifuger rapidement 4 °C (2 s à 200 t/min).
5. Ajouter dans l'ordre :
 - 10 µl « 5X labelling mix » (octamers biotinylés)
 - 5 µl dNTP mix (dNTP + dATP-biotinylés)
 - 1 µl (5U) ADN polymérase (fragment de klenow)Centrifuger brièvement.
6. Incuber à 37 °C pendant 1h au bain marie.
7. Ajouter 5 µl EDTA (0,2 M pH 8), 5 µl LiCl (4 M) puis 150 µl éthanol pur 30 min à -70°C.
8. Centrifuger pendant 10 min à 0°C et à 13500 rpm et vider l'éthanol.
9. Laver le culot avec 50 µl éthanol 70%.
10. Centrifuger pendant 10 min à 0°C et à 13500 rpm et vider l'éthanol.
11. Centrifuger 10 min au Speedvac (vitesse low).
12. Resuspendre dans 20 µl de tampon de resuspension, laisser reprendre un moment.
Conservation à -20°C.

Contrôle de la qualité et la quantité de marquage de la sonde

Pour cela il faut tester à la fois sur la membrane :

- Un ADN prébiotinylé (fourni par le Kit)
- Un ADN contrôle non biotinylé ainsi bien sûr que l'ADN ou l'oligonucléotide marqué.

- 1- Faire une série de dilutions pour chacun des ADN, jusqu'à 10⁻⁶
Ex : 1 µl + 9 µl de tampon TE (ou "resuspension buffer") en changeant de cône entre chaque dilution.
- 2- Faire des spots d'1 µl sur une membrane de nytrocellulose.
- 3- Sécher la membrane à l'étuve ¼ h, puis la fixer aux UV (254 nm) pendant 13 sept. 09 Faire la détection suivant la technique recommandée.

Remarque : Le Lambda prébiotinylé doit être visible à la dilution 10⁻⁶ (13 fg).

La (les) sonde(s) et le Lambda que l'on a biotinylés doivent être visible à partir de la dilution 10⁻³ (13 pg) pour être considérés comme suffisamment marqués.

Annexe 13 : Solutions utilisées pour le Southern Blot

Solution bloquante :

7,3 g NaCl

2,41 g Na₂HPO₄

0,91 g NaH₂PO₄

49,89 g SDS

Dissoudre dans 800 ml et ajuster à pH = 7,2. Compléter à 1 L.

20 SSC :

175,3 g NaCl

88,2 g Sodium citrate

Dissoudre dans 800 ml et ajuster à pH = 7. Compléter à 1 L.

Stérilisation par autoclave.

Solution de dénaturation :

20 g NaOH

87,7 g NaCl

Dissoudre dans 800 ml et Compléter à 1 L.

Solution de neutralisation :

121,1 g Tris

87,7 g NaCl

Dissoudre dans 800 ml et ajuster à pH = 7,5. Compléter à 1 L.

Solution de lavage I :

Diluer la solution bloquante au 1/10^e.

Solution de lavage II (10X) :

12,1 g Tris

5,85 g NaCl

2,03 g MgCl₂

Dissoudre dans 800 ml et ajuster à pH = 9,5. Compléter à 1 L.

Dilution au 1/10^e pour l'utilisation.

Solution d'hybridation :

90 ml de 20 SSC

30 ml Denhart's

15 ml SDS 10 %

Qsp 300 ml d'eau.

Réactif de Denhardt's :

0,3 g de Ficoll

0,3 g de PVP (PolyVinylPyrrolidone)

0,3 g de BSA (Bovine Serum Albumine)

Dans 30 ml d'eau.

Annexe 14 : Protocole de révélation du Southern Blot

Toutes les étapes sont réalisées pendant 5 minutes, la membrane est successivement baignée dans :

55ml I(2V) de solution bloquante

27,5ml de solution bloquante (1V) + 57,5 µl de Streptavidine

2 x 275 ml de solution de lavage I

27,5 ml de solution bloquante + 27,5 µl de phosphatase alcaline

275 ml de solution bloquante

2 x 275 ml de solution de lavage II

13,75 ml de CPP-star 1X + 27,5 µl de CDD (dans un nouveau sac plastique)

Titre : Développement d'une PCR en Temps Reel pour la Détection des *Brucella* et Relations avec le Genre *Ochrobactrum*

Auteur : Lotfi Bounaadja

RESUME

Le genre *Brucella* inclut 10 espèces infectant les animaux et accidentellement l'homme. Dans le but d'améliorer le diagnostic des brucelloses animales, les performances des techniques de PCR conventionnelle et PCR en temps réel (PCR-TR) ont été comparées en ciblant les gènes *bcp31*, *per* et *IS711* (séquence répétée du génome). La PCR-TR se révèle plus rapide et plus sensible, et la cible *IS711* offre une meilleure sensibilité. La PCR-TR évaluée sur des prélèvements biologiques d'animaux montre une sensibilité diagnostique supérieure en faveur de l'*IS711*.

Afin de confirmer la proximité génétique des genres *Brucella* et *Ochrobactrum*, nous avons mis en évidence la présence de la séquence BRU-RS (site préférentiel d'insertion d'*IS711*) chez *Ochrobactrum*, cependant la séquence *IS711* en est absente. De même les gènes de *Brucella* codant des protéines membranaires et une protéine périplasmique ont été révélés chez *Ochrobactrum*, avec toutefois une variabilité antigénique entre les espèces.

En conclusion, la présence de la séquence d'insertion *IS711* est bien spécifique du genre *Brucella* et représente une cible de choix pour l'identification de ces bactéries.

Mots clés : Microbiologie, Détection spécifique du genre *Brucella*, PCR en temps réel, *IS711*, *Ochrobactrum*, phylogénie

SUMMARY

The genus *Brucella* consists of 10 recognized species that infects animals and occasionally humans. In order to improve the direct diagnosis of animal brucellosis, the performances of real-time PCR (PCR-TR) assays using TaqMan® probes and conventional PCR assays were compared by targeting the 3 following specific genes: (i) *bcp31*, (ii) *per* and (iii) the *IS711* (repeated sequence of the genome). The PCR-TR is faster and more sensitive, and the *IS711* target offers the highest sensitivity. *IS711* offers the highest diagnostic sensitivity as evaluated using PCR-TR on biological samples from animals.

In order to confirm the genetic proximity between *Brucella* and *Ochrobactrum*, we showed the presence of BRU-RS (insertion site of *IS711*) in *Ochrobactrum*, however the *IS711* sequence was not found. Moreover, *Brucella* genes encoding outer membrane proteins and one periplasmic protein were present in both genus, but displayed antigenic variability among species.

In conclusion, the specificity of insertion sequence *IS711* in *Brucella* is confirmed, and the insertion sequence *IS711* is therefore a good target for the identification of this genus.

Keywords: Microbiology, *Brucella* Genus-specific identification, real-time PCR, *IS711*, *Ochrobactrum*, phylogeny