

13

Le diagnostic génomique de la BLAD (*Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency*) et ses applications

L. GROBET, C. CHARLIER, R. HANSET

Génétique Factorielle et Moléculaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, ULG, Liège, Belgique.

Résumé

La BLAD (Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency) est une maladie autosomale récessive qui affecte les descendants d'un taureau Holstein (Osbornedale Ivanhoe, grand-père paternel de Carlin M. Ivanhoe Bell). Une mutation dans le gène codant pour une glycoprotéine de membrane (CD18), à l'état homozygote, rend impossible le passage des leucocytes au départ des vaisseaux sanguins vers les tissus infectés. Les animaux atteints (homozygotes) souffrent donc d'infections multiples et meurent précocément. Le test de détection de cette mutation a été appliqué à des taureaux Holstein au statut BLAD connu. Par ailleurs, sur seize taureaux Holstein au statut inconnu, dont 5 de la lignée Bell, trois se sont révélés hétérozygotes. Une génisse Holstein de la même lignée s'est aussi révélée hétérozygote. Par contre, chez 49 taureaux Blanc-Bleu et 14 taureaux Pie-Rouge, on n'a trouvé aucun porteur de la mutation.

La BLAD (Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency) est une maladie autosomale récessive qui affecte les descendants d'une lignée de taureaux Holstein, la lignée Bell. Stöber *et al.* [18] ont donné une description détaillée des symptômes et lésions qui affectent les veaux atteints. En résumé, ils souffrent d'infections multiples et récidivantes (dermatite, gingivite, glossite, entérite et bronchopneumonies chroniques; adénites satellites, splénomégalie; leucocytose et stase leucocytaire...) qui ne répondent pas ou peu aux antibiotiques. Cette maladie a été décrite sous le nom de granulocytopathie par Hagemoser *et al* en 1983 [8], et Takahashi *et al* en 1987 [19].

Suite à des études immunologiques, Kehrl *et al.* [9] ont détecté une déficience sévère en sous-unité CD 18 des neutrophiles chez une génisse atteinte et une diminution substantielle chez son père, sa mère et 8 de ses 15 demi-frères et soeurs paternels étudiés. Cela confirmait l'étroite similitude existant entre la BLAD des bovins, la LAD (Leucocyte Adhesion Deficiency [1,2,3,12,17,20]) chez l'homme et la granulocytopathie canine chez le Setter Irlandais [5,15].

Ces trois maladies ont en commun une série d'anomalies dépendant de la perte de certains fonctions leucocytaires, en particulier leurs possibilités d'adhérence à la paroi d'autres cellules. Les individus atteints ont une déficience en plusieurs membres d'une famille de glycoprotéines (les β 2-intégrines) structurellement et fonctionnellement apparentées [16]. C'est la sous unité β (CD18) commune à ces glycoprotéines dont la fonction est compromise.

Plusieurs mutations dans le gène codant pour cette sous-unité ont été identifiées comme étant la cause de tous les cas humains décrits [4,12,13,14]. A l'inverse, une seule mutation du gène CD18 a été observée chez les bovins, mais elle a été retrouvée chez tous les animaux atteints ou porteurs analysés [9,10,11]. Tous les cas décrits à ce jour ont dans leur pedigree un ancêtre commun, Osbornedale Ivanhoe, grand père paternel de Carlin M. Ivanhoe Bell.

Après avoir séquencé le cDNA du CD18 de bovin normal et de bovin atteint de BLAD, Kehrl *et al.* [9,10,11] ont découvert deux mutations ponctuelles. L'une d'entre elles était silencieuse, mais l'autre (383 Adénosine--->Guanosine) entraînait la substitution 128 Aspartat--->Glycine (Figure 1) au sein d'une région hautement conservée de la portion extracellulaire de la glycoprotéine CD18. Un test diagnostique basé sur l'Amplification en Chaîne par Polymérase (ACP) de la région variable suivi de la digestion par un enzyme de restriction a été développé. La correspondance non démentie à ce jour entre la présence de la transition (appelée D128G) et l'allèle responsable de la maladie a amené Kehrl *et al.* [11] à la conclusion que la BLAD est bien causée par la mutation D128G.

Après avoir validé la méthode sur l'ADN de taureaux dont le statut BLAD était connu, des bovins de différentes races, et en particulier Blanc-Bleu Belge, ont été testés.

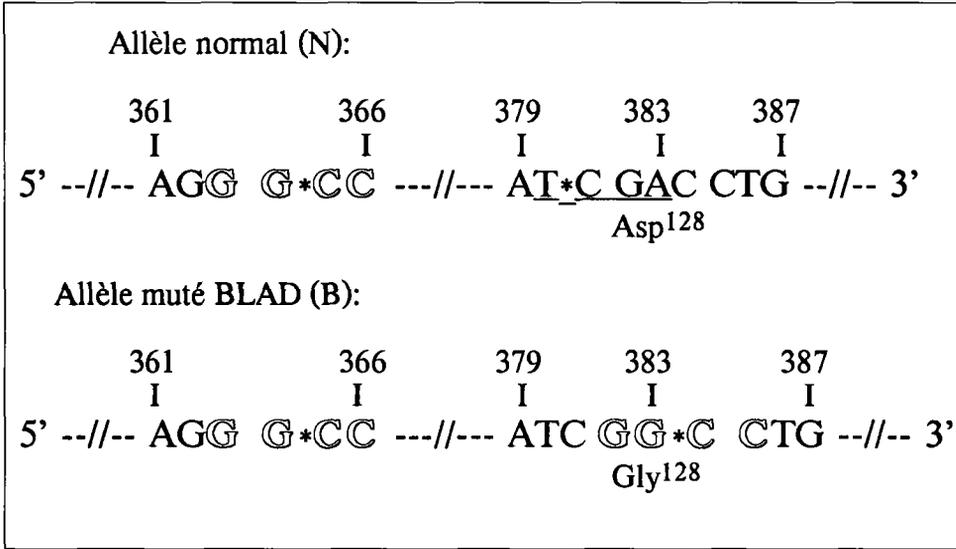


Figure 1. Séquences des sites de reconnaissance des enzymes de restriction *Hae* III (en relief) et *Taq* I (souligné) pour les allèles normal (N) et muté (B) au locus CD18 bovin. Le site de clivage est indiqué par une astérisque. Certains numéros attribués aux nucléotides dans la séquence du cDNA sont indiqués au dessus en regard des nucléotides correspondants. Le site *Hae* III constitué par les nucléotides 363 à 366 est présent dans les deux allèles. L'allèle muté se différencie du sauvage par une transition 383--->G, responsable de la mutation 128 Asp--->Gly. Cette Transition fait aussi disparaître le site *Taq* I 380-383 au profit d'un npuveau site *Hae* III (382-385).

Matériel et méthodes

Animaux

Afin de valider la méthode de typage génomique, 10 taureaux Holstein de la lignée Bell au statut BLAD connu (5 hétérozygotes et 5 homozygotes normaux) ont été typés. De plus, 16 taureaux Holstein d'I.A., dont 5 de la lignée Bell, une génisse Holstein de la lignée Bell, 14 taureaux d'I.A. de race Pie-Rouge et 49 taureaux de race Blanc-Bleu Belge ont été typés.

Détermination du génotype au locus CD18

L'ADN du sperme de la plupart des taureaux typés a été extrait et dosé comme décrit précédemment [7], et remis en suspension dans de l'eau en solution finale 5ng/μl. 50 ng de cet ADN sont soumis à l'ACP. Pour un des taureaux typés, le contenu de 2 paillettes d'in-sémination a été lavé 3 fois dans 1 ml de PBS. Le culot a ensuite été remis en suspension dans 100 μl de T₁₀E₁-8, NaCl 100mM, NaOH 0,1 M, et chauffé pendant 5 minutes à 95°C. Le surnageant est dilué 20 fois dans une réaction ACP. 100μl de sang complet de génisse a été soumis au procédé d'extraction rapide décrit précédemment [6], et le surnageant est dilué 10 fois dans la réaction ACP.

Un fragment de 58 paires de bases du gène codant pour la sous unité CD18 et contenant le site variable impliqué dans la BLAD [9,10,11] est amplifié au départ des dilutions d'ADN mentionnées ci-dessus dans un volume de 20 µl, en solution 10 mM Tris HCl pH 8,5; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,01% gélatine; 0,2 µM de chaque amorce; 20 U/ml Amplitaq® DNA Polymerase (Perkin Elmer Cetus). La réaction se déroule sur un Thermal Cycler TC 9600 (Perkin Elmer Cetus) selon les cycles : 3 minutes de dénaturation à 94°C suivies de 40 cycles thermiques composés de 15 secondes de dénaturation à 94°C, 20 secondes d'hybridation-polymérisation à 69°C.

10 µl du produit d'amplification sont digérés par addition de 4 U de *Taq* I et 10 µl de *Hae* III pendant 1,5 heures à 65°C et 37°C respectivement. Les produits de digestion sont analysés en gel d'agarose 7% (Bio Rad) après migration à 8V/cm pendant 30 minutes, coloration au bromure d'éthidium et transillumination aux UV à 365 nm.

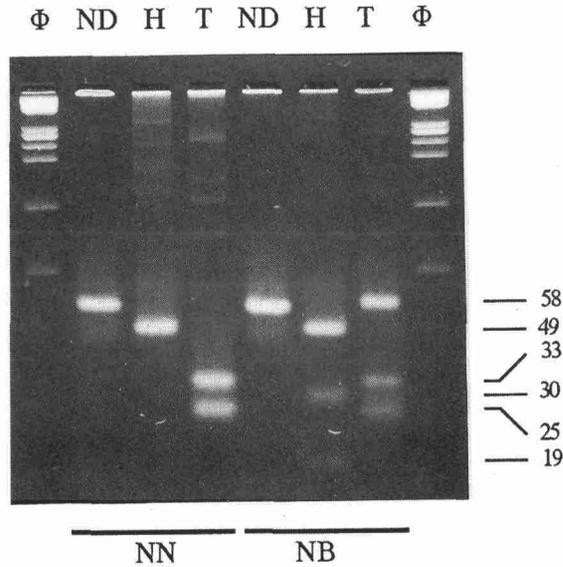


Figure 2. Electrophorèse du produit d'ACP d'un fragment contenant le site variable responsable de la BLAD [10,11]. Le phage FX174RF/*Hae* III a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire (F). La taille des fragments est donnée à droite en paires de bases. Au dessus, ND indique que l'amplifié est non digéré, H et T qu'il a été soumis à la digestion par *Hae* III ou *Taq* I respectivement. En dessous, les génotypes NN et NB indiquent que l'ADN de départ provient d'animaux homozygote pour l'allèle normal (NN) ou hétérozygote pour l'allèle responsable de la BLAD (NB). Au vu des génotypes et de la figure 50, la taille des fragments est bien celle attendue. Un fragment non digéré a une taille de 58 paires de bases. La digestion par *Taq* I clive l'allèle sauvage (N) en deux fragments de 33 et 25 pb, alors que l'allèle muté (B) n'est pas clivé. Les deux allèles subissent un clivage par *Hae* III à 9 paires de bases de l'extrémité du fragment. Ce clivage sert de contrôle interne pour la bonne digestion du fragment. Le fragment résultant de 49 paires de bases reste intègre pour l'allèle sauvage (N), ou est clivé en deux fragments de 30 et 19 paires de bases pour l'allèle muté (B).

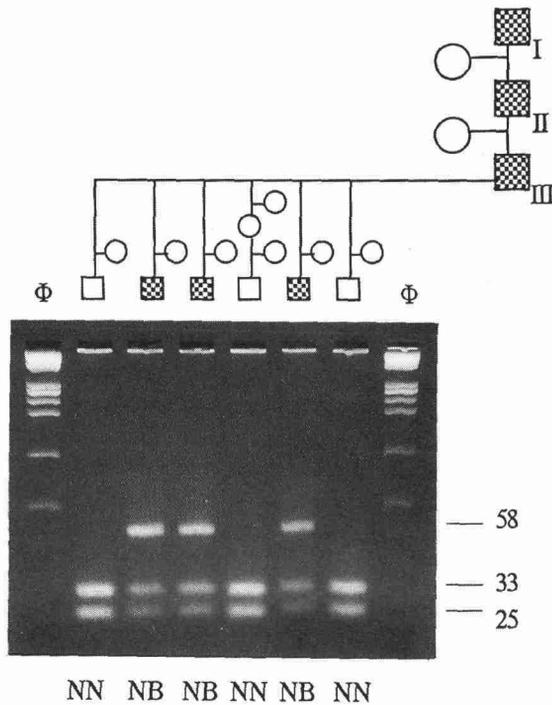


Figure 3. Electrophorèse du produit d'ACP digéré par *Taq I* d'un fragment contenant le site variable responsable de la BLAD [10,11] chez des descendants de la lignée Bell. Le phage ϕ X174RF/*Hae III* a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire (Φ). La taille des fragments est donnée à droite en paires de bases. En dessous, les génotypes NN et NB indiquent que les animaux sont diagnostiqués homozygote pour l'allèle normal (NN), ou hétérozygote pour l'allèle responsable de la BLAD (NB). Le pedigree est schématisé au dessus, en regard des pistes de migration des 6 taureaux soumis au diagnostic. Les carrés pointillés représentent les taureaux porteurs de la tare. Les carrés blancs désignent les indemnes. I = Osbornedale Ivanhoe; II = Penstate Ivanhoe Star; III = Carlin M. Ivanhoe Bell.

Résultats et discussion

La correspondance parfaite entre les résultats du typage des taureaux de génotype connu et leur génotype réel au locus CD18 valide la méthode utilisée ici (Figures. 2 et 3). Sur les six autres descendants de la lignée Bell, quatre se sont révélés porteurs de la mutation D128G. Par contre, aucun des 74 autres taureaux n'était porteur. La mutation D128G est déjà bien installée en race Holstein, où 14,1% des taureaux (N=2024) et 5,8% des génisses (N=1553) typés se sont révélés porteurs (hétérozygotes) de la mutation aux USA. Au niveau de la population Holstein, mais bien plus encore au niveau de l'exploitation particulière, la naissance de veaux atteints (homozygotes) risque de constituer une lourde perte en cas d'utilisation non contrôlée d'animaux porteurs. En effet, cette cause de mortalité précoce du jeune veau s'ajouterait à toutes les autres.

La possibilité de détecter les porteurs (hétérozygotes) de la mutation permet cependant de planifier les accouplements, en évitant le croisement de deux porteurs, mais surtout de maîtriser la dissémination du gène en agissant au niveau des taureaux d'I.A. (ne plus accepter de nouveaux hétérozygotes dans les centres d'I.A.). De plus, on est sans doute en présence du premier test génomique susceptible d'aider le clinicien dans son diagnostic en cas d'infections récidivantes chez le jeune bovin.

Avec le concours des nouvelles techniques de la biologie moléculaire, et des structures de recherche qui se développent à l'échelon international (cartographie génétique chez le porc et le bovin- PigMap et BovMap), un nombre croissant de gènes à effets quantitatifs ou pathologiques seront caractérisés, et des tests diagnostics seront développés. Ils existent déjà pour l'hyperthermie maligne chez le porc, et chez les bovins pour le typage des α -, β -, et κ -caséines, de lactoglobulines, et pour les gènes responsables de maladies telles la maladie de Pompe, la citrullinémie et la DUMPS. D'autres gènes, tels ceux responsables de la myéloencéphalopathie dégénérative (weaver) et l'absence de cornes (poll), sont liés à des marqueurs connus, première étape vers leur caractérisation.

Nul doute, au vu de cette évolution, qu'une ère nouvelle s'ouvre en matière de génétique préventive et de sélection animale.

Références

1. Anderson D.C., Schmalstieg F.C., Arnaout M.A., Kohl S., Tosi M.F., Dana N., Buffone G.J., Hughes B.J., Brinkley B.R., Dickey W.D., Abramson J.S., Springer T., Boxer L.A., Hollers J.M., Smith C.W. (1984). Abnormalities of polymorphonuclear leucocyte function associated with a heritable deficiency of high molecular weight surface glycoproteins (GP138) : common relationship to diminished cell adherence. *J Clin Invest* ; 74 : 536-551.
2. Anderson D.C., Schmalstieg F.C., Finegold M.J., Hughes B.J., Rothlein R., Miller L.J., Kohl S., Tosi M.F., Jacobs R.L., Waldrop T.C., Goldman A.S., Shearer W.T., Springer T.A. (1985). The severe and moderate phenotypes of heritable Mac-1, LFA-1 deficiency : their quantitative definition and relation to leucocyte dysfunction and clinical features. *J Infect Dis* ; 152 : 668-689.
3. Anderson D.C., Springer T.A. (1987). Leucocyte adhesion deficiency : an inherited defect in the Mac-1, LFA-1 and p150,95 glycoproteins. *Ann Rev Med* ; 38 : 175-194.
4. Dana N., Clayton L.K., Tennen D.G., Pierce M.W., Lachmann P.J., Law S.A., Arnaout M.A. (1987). Leucocytes from four patients with complete or partial Leu-CAM deficiency contain the common beta-subunit precursor and beta-subunit messenger RNA. *J Clin Invest* ; 79 : 1010-1015.
5. Giger U., Boxer L.A., Simpson P.J., Lucchesi B.R. (1987). Deficiency of leucocyte surface glycoproteins Mol, LFA-1 and Leu M5 in a dog with recurrent bacterial infections : an animal model. *Blood* ; 69 : 1622-1630.
6. Grobet L., Arranz J.J. (1992). A purification procedure of DNA from Whole blood before genotyping for the porcine ryanodine receptor. *Anim Genet* ; 23 : 67s.
7. Grobet L., Charlier C., Hanset R. (1991). Empreintes génétiques et leucochimérisme chez les jumeaux bovins. *Ann Méd Vét* ; 135 : 353-360.
8. Hagemoser W.A., Roth J.A., Löfstedt J., Fagerland J.A. (1983). Granulocytopeny in a Holstein heifer. *J Am Vet Med Assoc* ; 183 : 1093-1094.
9. Kehrli M.E., Schmalstieg F.C., Anderson D.C., Van der Maaten M.J., Hughes B.J., Ackermann M.R., Wilhelmsen C.L., Brown G.B., Stevens M.G., Whetstone C.A. (1990). Molecular definition of the bovine granulocytopeny syndrome : identification of deficiency of the Mac-1

- (CD11b/CD18) glycoprotein *Am J Vet Res* ; 51 : 1826-1836.
10. Kehrli M.E., Shuster D.E., Ackermann M.R. (1992). Leucocyte Adhesion Deficiency among Holstein cattle. *Cornell Vet* ; 82 : 103-109.
 11. Kehrli M.E., Shuster D.E., Dietz A.B., Ackermann M.R., Gilbert R., Pohlenz J. (1992). Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency (BLAD) among Holstein cattle : molecular biology, immunology and clinical phenotypes. In : Proc XIII Int Conf Anim Genet (ISAG), August 1992, p44.
 12. Kishimoto T.K., Hollander N., Roberts T.M., Anderson D.C., Springer T.A. (1987). Heterogeneous mutations in the b subunit common in the LFA-1, Mac-1 and p 150,95 glycoproteins cause leucocyte adhesion deficiency. *Cell* ; 50 : 193-202.
 13. Kishimoto T.K., O'Connor K., Springer T.A. (1989). Leucocyte adhesion deficiency : aberrant splicing of a conserved integrin sequence causes a moderate deficiency phenotype. *J Biol Chem* ; 264 : 3588-3595.
 14. Marlin S.D., Morton C.C., Anderson D.C., Springer T.A. (1986). LFA-1 immunodeficiency disease : definition of the genetic defect and chromosomal mapping of alpha and beta subunits by complementation in hybrid cells. *J Exp Med* ; 164 : 855-867.
 15. Renshaw H.W., Davies W.C. (1979). Canine granulocytopeny syndrome : an inherited disorder of leucocyte function. *Am J Pathol* ; 95 : 731.
 16. Sanchez-Madrid F., Nagy J., Robbins E., Simon P., Springer T.A. (1983). A human leucocyte differentiation antigen family with distinct a-subunits and a common b-subunit : the lymphocyte function-associated antigen (LFA-1), the C3b complement receptor (OKM1/Mac-1), and the 150,95 molecule. *J Exp Med* ; 158 : 1785-1803.
 17. Springer T.A., Thompson W.S., Miller L.J., Schmalstieg F.C., Anderson D.C. (1984). Inherited deficiency of the Mac-1, LFA-1, p150,95 glycoprotein family and its molecular basis. *J Exp Med* ; 160 : 1901-1918.
 18. Stöber M., Kuczka A., Pohlenz J. (1991). Bovine Leukozyten-Adhäsions-Defizienz (BLAD = Hagemoser-Takahasi-Syndrom) : Klinische, pathologisch-anatomische und -histologische Befunde. *Dtsch Tierärztl Wschr* ; 98 : 443-448.
 19. Takahashi K., Miyagawa K., Abe S., et al. (1987). Bovine granulocytopeny syndrome of Holstein-friesian calves and heifers. *Jpn J Vet Sci* ; 49 : 733-736.
 20. Todd R.F., Freyer D.R. (1988). The CD11/CD18 leucocyte glycoprotein deficiency. *Hemat Oncol Clin North Am* ; 2 : 13-28.

14

Développement d'un test cellulaire *in vitro* permettant le diagnostic spécifique de la brucellose sur base de la production d'Interféron gamma

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

Laboratoire d'Immunologie-Microbiologie, Namur, Belgique.

* *Service de l'Inspection Vétérinaire.*

Résumé

Les épreuves sérologiques de dépistage de la brucellose sont basées sur la détection des anticorps anti-lipopolysaccharides (LPS). Du fait de la proximité antigénique entre le LPS de Brucella et le LPS d'autres bactéries à Gram négatif (Yersinia enterocolitica 0:9 par exemple) ces tests manquent de spécificité. La mesure de l'immunité à médiation cellulaire s'est révélée être un complément non négligeable dans la lutte contre la brucellose en raison de sa grande spécificité et de sa précocité. Les principaux inconvénients de ce type de test sont liés à la réalisation in vivo de l'intradermo-réaction (IDR); Dans cet article nous décrivons un test cellulaire in vitro simple et rapide permettant le diagnostic spécifique de la Brucellose. Ce test est basé sur le dosage par ELISA de l'Interféron gamma (IFN γ) produit dans une culture de sang complet hépariné suite à un stimulus antigéno-spécifique.

Le potentiel de ce test par rapport à l'IDR et aux épreuves sérologiques à été évalué d'une manière préliminaire, tant sur des prélèvements de terrain, que lors d'une infection expérimentale.

Les procédés actuels de dépistage sérologique de la brucellose sont basés sur la détection des anticorps anti-lipopolysaccharides (LPS) et ils ont fait preuve de leur efficacité pour une surveillance sanitaire au niveau du troupeau.

Néanmoins, la multiplicité même des techniques utilisées illustre bien les difficultés inhérentes à cette approche sérologique [1]. Ainsi, aucun test à lui seul ne permet de détecter à la fois les animaux infectés récents et les porteurs latents ou chroniques [8]. Ce fait est à mettre en relation avec l'extrême variabilité de la réponse humorale anti-brucellique en fonction de l'animal, de la souche et de la dose infectante; cette hétérogénéité affecte autant l'intensité et la durée de la réponse humorale que sa qualité (isotypie, affinité et spécificité des anticorps produits) [13].

Cependant l'aspect actuellement le plus problématique de ce type de dépistage provient des réactions sérologiques faussement positives (RSFP) [2]. Ces RSFP sont liées à la parenté antigénique bien décrite entre le LPS de *Brucella* et celui d'autres bactéries à Gram négatif (*Yersinia enterocolitica* O:9, *Escherichia coli* O:157, *Salmonella urbana*....) [4].

Un palliatif à ce manque de spécificité est de baser le diagnostic non plus sur le seul LPS mais également sur les protéines de *Brucella* [11]. Cependant, avec les outils actuels, la réponse humorale anti-protéine de *Brucella* est trop hétérogène et trop tardive pour être utilisable en diagnostic sérologique. Il n'en va pas de même de la réponse cellulaire. En tant que parasite intracellulaire facultatif, *Brucella* induit en effet une immunité à médiation cellulaire qui peut être mise à profit pour le diagnostic allergique de la brucellose [7].

Parmi les préparations protéiques utilisées en IDR pour induire une hypersensibilité retardée, la Brucelline INRA (commercialisée sous le nom Brucellergène par Rhône Mérieux) est la plus répandue. Plusieurs études ont en effet démontré que l'IDR au moyen de Brucellergène est une épreuve diagnostique extrêmement spécifique de la brucellose et qui est complémentaire des tests sérologiques [8, Saegerman comm. person].

L'IDR présente cependant différentes limitations : certaines relatives à l'allergène utilisé (elles feront l'objet d'une communication par P. Denoel *et al.* et ne seront pas analysées ici) et d'autres liées à la nature *in vivo* de ce test : le résultat n'est obtenu qu'après deux ou trois jours; les animaux sont manipulés à deux occasions, sa réalisation et son interprétation ne sont pas toujours aisées et la répétition du test peut modifier le statut immun de l'animal.

Une mesure *in vitro* de l'immunité à médiation cellulaire pourrait pallier ces inconvénients. Ainsi, l'identification et/ou le dosage des cytokines de type TH1 semble être en excellente corrélation avec la mesure *in vivo* de l'hypersensibilité retardée [9]). Cette approche a été récemment suivie avec succès par une équipe australienne pour le diagnostic de la Tuberculose bovine [12,14].

La disponibilité d'un test immunoenzymatique commercial de dosage de l'IFN γ bovin nous a permis d'investiguer l'utilité de cette approche dans le cadre du diagnostic de la brucellose.

Cet article décrit le développement d'un test adapté à la brucellose, ainsi que sa première évaluation par rapport à l'IDR et aux épreuves sérologiques, tant sur des prélèvements de terrain, que lors d'une infection expérimentale.

Matériel et méthodes

Animaux de terrain

L'origine des prélèvements est double : 47 proviennent d'animaux issus de deux foyers brucelliques et 24 correspondent à des animaux (issus de 12 exploitations) ayant développé une réponse sérologique faussement positive (RSFP) (tests légaux positifs en dehors de donnée épidémiologique pouvant faire penser à la brucellose).

Infection expérimentale

Dix génisses Pie Noire (âge moyen : 24 mois) indemnes de brucellose ont été infectées par voie conjonctivale au moyen de 6×10^7 *Brucella abortus* 544. (la souche nous a été procurée par J.M. Verger, INRA et a été cultivée par J. Godfroid INRV). Les animaux ont été maintenus en étable protégée (Machelen, INRV) durant toute la durée de l'expérience.

Un suivi sérologique a été réalisé de semaine en semaine et trois épreuves cutanées (IDR au moyen de Brucellergène, lot 96G091) ont été réalisés 35, 55 et 77 jours après l'infection.

Aux jours 0, 10, 25, 35, 55 et 77, les animaux ont été suivis par le test de dosage de l'IFN γ .

Tests sérologiques

Les tests classiques d'agglutination (EDTA), le test de déviation du complément (DC) et le test au Rose Bengale (RB) ont été décrits précédemment [10]. Le seuil légal de positivité des tests EDTA et DC est respectivement de >25 UI/ml et 20 UI/ml. Ces tests ont été réalisés, soit au Centre de Dépistage des Maladies Animales d'Erpent (Dr. Y. Botton) pour les prélèvements de terrain soit, à l'Institut National de Recherche Vétérinaire (Dr. J. Godfroid) pour les prélèvements issus des animaux infectés expérimentalement.

Le test ELISA a été réalisé au laboratoire suivant les modalités publiées [5]; le seuil de positivité de ce test a été fixé à 2,5 UI/ml.

Tests cellulaires

La mesure de la réponse immune à médiation cellulaire a été effectuée *in vivo* par IDR et *in vitro* par stimulation de sang total et mesure de la production d'IFN γ

Stimuli antigéniques

Brucelline INRA

Cet antigène a été préparé par G. Dubray (Station de pathologie Infectieuse, INRA, Tours) [7]. Pour les IDR réalisées sur le terrain, cet allergène a été utilisé à une dose ajustée sur celle du brucellergène. Les doses utilisées lors des tests *in vitro* seront précisées dans la partie résultat.

Brucellergène

Constituant la forme commerciale de la Brucelline, cet allergène (lot 96G091) a été utilisé pour les IDR pendant l'infection expérimentale à la dose de 140 µg par injection

Test *in vivo* : IDR

L'IDR est réalisée par injection d'un volume de 100 µl de brucellergène ou d'une dose équivalente de brucelline au niveau du cou, sur un pli de peau préalablement rasée. L'épaisseur du pli de peau est mesurée au site d'injection juste avant et approximativement 72 hrs après l'injection au moyen d'un cutimètre à ressort.

Un épaissement de 0,1 mm est considéré comme une réaction positive.

Test *in vitro* par culture de sang total

Du sang est récolté par ponction veineuse dans des tubes héparinés et acheminé dans les 12 heures au laboratoire. Les stimulations sont réalisées en double sur des aliquots de 1ml disposés dans une boîte de culture à 24 puits (Gibco BRL) et additionnés de 100 µl de stimulus antigénique : soit du PBS (témoin négatif), soit de la brucelline (à diverses concentrations). Les allergènes sont dépourvus d'agents conservateurs et prédilués en PBS jusqu'à la concentration de travail.

La culture de sang total est incubée pendant 18 à 24 hrs à 37°C en atmosphère humide et en présence de 5% de CO₂ avant la récolte du plasma au dessus du culot de globules rouges. Les échantillons de plasma sont ensuite stockés à -20°C jusqu'au moment du test de dosage de l'IFN γ .

Dosage de l'IFN γ

Les échantillons de plasma sont dosés pour leur contenu en IFN γ en utilisant un test immuno enzymatique commercial (IDDEX) et en suivant les indications du fabriquant. Les résultats d'une plaque sont considérés comme valides si la densité optique (DO) moyenne des contrôles négatifs internes est inférieure à 0,25 et si la DO moyenne des contrôles positifs internes est supérieure à 0,50. Les résultats sont exprimés en indice de stimulation (IS) suivant la formule suivante : DO moyenne en présence d'antigène divisée par la DO moyenne en présence de PBS. Un animal est considéré comme positif s'il présente un indice de stimulation supérieur ou égal à 2,5.

Résultats

Mise au point du test IFN γ

Pour les tests préliminaires un animal infecté par *Brucella* a été sélectionné en fonction de sa positivité à l'ELISA et au test de transformation lymphoblastique (TTL) avec la brucelline comme antigène. Du sang hépariné de cet animal a été stimulé par des doses croissantes de brucelline (1 à 100 $\mu\text{g/ml}$) pendant 24, 48 et 72 heures avant la récolte du plasma. Les résultats sont présentés dans le Tableau I.

Tableau I. Titration de la Brucelline pour l'induction d'IFN γ .

Durée d'incubation (hr)	Production d'IFN γ (IS)				
	Concentration en brucelline ($\mu\text{g/ml}$)				
	1	5	20	50	100
24	4	4,3	4,8	5,2	4,4
48	3,8	4,9	4,9	4,8	4,9
72	3	3,9	4	4,4	4,3

Au moment du test l'animal avait un titre ELISA de 8UI/ml et un indice de stimulation en TTL de 4,9.

La production d'IFN γ est détectable dès après 24 heures de stimulation et un allongement du temps de culture n'améliore pas sensiblement le taux d'IFN γ dans le plasma. La concentration de brucelline qui donne après 24 hrs une production optimale d'IFN γ est comprise entre 20 et 50 $\mu\text{g/ml}$. Pour tous les tests ultérieurs une concentration de 40 $\mu\text{g/ml}$ sera utilisée.

Chez 10 animaux contrôlés provenant d'une région indemne de brucellose depuis au moins 5 ans, cette dose de brucelline n'induit qu'une activité IFN γ limitée (IS = 1,43 +/- 0,46). Sur cette base, un IS sera considéré comme positif s'il est supérieur ou égal à 2,5 (soit approximativement la moyenne de l'IS des animaux contrôlés plus deux écarts types).

Evaluation du test IFN γ dans le cadre d'une infection expérimentale

La voie d'inoculation conjonctivale et la dose infectante ($6 \cdot 10^7$ *Brucella abortus* 544) ont été choisies délibérément sur base des travaux de Limet [10] pour reproduire une évolution sérologique lente et de faible intensité à la limite de détection des tests légaux. Durant l'infection, les animaux ont été suivis par les tests sérologiques (DC, EDTA, RB, ELISA) et les tests cellulaires (IDR, IFN γ) suivant le canevas décrit dans "matériel et méthodes".

Pour chaque test l'évolution du nombre d'animaux positifs depuis le jour de l'infection (J0) jusqu'à l'abattage (J77) est représentée sur la Figure 1.

D'après les critères légaux belges, la sérologie est relativement transitoire puisque les tests DC/EDTA ne détectent que trois animaux au jour 25, puis un seul à partir du jour 55

jusqu'au jour de l'abattage. Le test au Rose Bengal est un peu plus précoce (2 positifs au jour 20) et plus efficace : il révèle 9 des animaux au jour 35; la réponse sérologique qu'il met en évidence reste néanmoins transitoire puisqu'il ne détecte plus qu'un animal lors des deux dernière saignées.

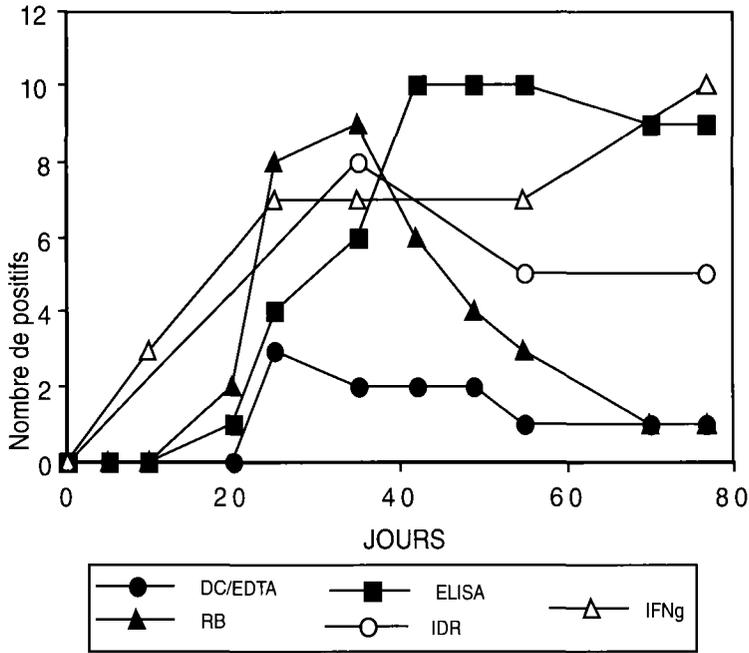


Figure 1. Evolution du nombre d'animaux positifs pour les différents tests durant l'infection expérimentale.

En ELISA, la sérologie est nettement moins passagère, puisque les 10 animaux sont détectés dès le jour 42 et que 9 d'entre eux restent positifs jusqu'à la fin de l'expérience. Bien qu'observée sur un nombre limité d'animaux, ce type d'évolution sérologique est en accord avec les données publiées dans la littérature [10].

En ce qui concerne la réponse aux tests cellulaires, le test IFN γ apparaît comme relativement précoce; en effet, 3 animaux sont détectés dès le jour 10 soit plus d'une semaine avant la première détection sérologique. Un animal détecté lors d'un test reste positif pour tous les tests ultérieurs et tous les animaux deviennent positifs au fil de l'expérience. A l'exception d'une génisse (au jour 35) tous les animaux positifs en IDR sont également positif en IFN γ . L'IDR apparaît cependant moins sensible puisqu'il ne détecte plus que 5 génisses lors des deux derniers tests. L'IDR n'ayant pas été réalisée avant le jour 35, il n'est pas possible de comparer les tests cellulaires entre eux sur le plan de la précocité.

Bien qu'aucun test, à lui seul, ne soit capable de détecter tous les animaux durant toute l'évolution de l'infection expérimentale (Tableau II), l'utilisation conjointe des tests cellulaires (IFN γ ou IDR) et de la sérologie permet de détecter 90 % des animaux dès 25 jours après l'infection et 100 % à partir du jour 35.

Tableau II. Evolution de la complémentarité des tests cellulaires et sérologiques durant l'infection expérimentale.

Jours	Pourcentage d'animaux détectés				
	Sérologie*	IDR	IFN γ	IDR+sérologie	IFN γ +sérologie
10	0	NT	30	NT	30
25	80	NT	70	NT	90
35	90	80	70	100	100
55	100	50	70	100	100
77	90	50	100	90	100

* Toutes techniques confondues (DC/EDTA/RB/ELISA).

Evaluation du test IFN γ dans deux foyers brucelliques

47 animaux issus de deux foyers brucelliques ont été testés à la fois par des tests sérologiques (DC, EDTA, ELISA) et des tests cellulaires (IDR, IFN γ). Les données chiffrées sont présentées en résumé dans le Tableau III, et in extenso dans le Tableau IV.

Tableau III. Sensibilité comparative des divers tests et de leurs combinaisons.

	Pourcentage d'animaux détectés parmi	
	les animaux testée (N=47)	les animaux positifs pour au moins un test (N=36)
CD/EDTA	47	61
ELISA	49	64
Sérologie totale	57	75
IDR	28	36
IFN γ	64	83
IFN γ + sérologie	77	100

Un isolement bactériologique de *Brucella abortus* (biovar 3) a été réalisé sur un animal de chaque exploitation (VRC 30 : dans le lait et PY45 au niveau de la matrice).

En considérant les animaux présentant une réaction positive dans au moins un test, 77 % des animaux sont identifiés à des positifs (N=36).

Tableau IV Données des tests sérologiques et cellulaires dans 2 foyers récents de brucellose.

N° animal	Sérologie (UI/ml) IDR			IFN gamma	(IS)
	DC	EDTA	ELISA	Δ mm	
VRC 1	0	0	0,5	-	1,2
VRC 2	>100	50	85,0	4,4	>20
VRC 3	>50	50	107,0	-	7,7
VRC 4	15	0	23,0	4,5	20,0
VRC 5	0	0	0,5	-	8,1
VRC 6	0	0	0,5	-	1,0
VRC 7	0	0	0,2	-	1,2
VRC 8	0	0	0,4	-	2,4
VRC 9	15	0	19,0	5,5	>20
VRC 10	400	400	103,0	3	3,1
VRC 11	>50	12	0,4	-	1,5
VRC 12	0	0	2,4	-	2,7
VRC 13	0	0	38,0	-	>20
VRC 14	400	400	94,0	5,7	>20
VRC 15	>100	100	32,0	0,13	>20
VRC 16	>50	12	0,7	-	17,9
VRC 17	0	12	2,8	-	5,2
VRC 18	400	400	93,0	1	>20
VRC 19	0	12	0,4	-	1,2
VRC 20	0	50	0,2	-	1,5
VRC 21	15	12	0,3	-	1,4
VRC 22	0	0	0,6	-	2,4
VRC 23	0	12	0,3	-	11,8
VRC 24	0	12	0,9	-	1,3
VRC 25	>50	25	53,0	-	>20
VRC 26	0	0	0,2	-	10,7
VRC 27	400	100	2,5	-	1,5
VRC 28	0	0	0,4	-	2,8
VRC 29	0	12	1,3	-	4,5
VRC* 30	400	400	140,0	-	>20
VRC 31	100	25	7,4	-	8,3
VRC 32	0	0	0,3	-	2,9
VRC 33	0	12	8,8	-	1,1
VRC 34	0	25	0,3	-	2,6
VRC 35	0	12	0,8	-	1,1
VRC 36	0	0	0,6	-	1,9
VRC 37	400	400	80,0	6,5	>20
VRC 38	100	25	0,3	-	2,1
VRC 39	0	0	0,3	-	1,6
PY 40	200	50	50,0	3,8	2,8
PY 41	400	400	55,8	-	1,4
PY 42	60	25	22,9	-	5,0
PY 43	0	12,5	0,0	-	14,3
PY 44	60	25	11,2	2,4	4,3
PY* 45	>400	400	110,0	3	>20
PY 46	>400	400	53,8	2,5	7,4
PY 47	60	25	11,7	1	4,0

Les données en gras indiquent les tests positifs suivant les critères définis dans "matériel et méthodes"

* : indique l'isolement positif de *Brucella abortus*.

Parmi ceux-ci, 61 % (N=22) sont détectés par les tests légaux et 63 % (N=23) par l'ELISA. Les épreuves sérologiques combinées en révèlent 75 % (N=27). L'IDR, bien que détectant 36 % des animaux positifs, n'apporte pas de bonus puisque tous les animaux positifs en IDR sont également positifs en sérologie.

Le test IFN γ semble nettement plus sensible que l'IDR; en effet, il identifie à lui seul 83 % (N=30) des animaux positifs parmi lesquels tous ceux qui sont positifs en IDR. En outre, ce test est clairement complémentaire des données sérologiques puisque 41% (N=15) des animaux positifs ne sont détectés que par l'une ou l'autre des approches ; 9 ne sont révélés que par le test IFN γ et 6 par la seule sérologie.

Evaluation du test IFN γ pour la discrimination des RSFP

24 animaux considérés, en l'absence de données épidémiologiques pouvant faire penser à de la brucellose, comme des faux positifs ont été sélectionnés dans 12 exploitations. L'apport du test IFN γ pour la discrimination des RSFP a été évalué sur du sang hépariné de ces animaux.

Les données sérologiques sont comparées aux résultats du test IFN γ dans le Tableau V.

Des *Yersinia enterocolitica* O:9 ont été isolées des matières fécales de 5 de ces animaux et des *Yersinia pseudotuberculosis* ont été isolées chez trois autres. Parmi les 24 animaux testés, un seul a présenté un test IFN γ positif. Dans le cas de cet échantillonnage limité, la spécificité du test IFN γ est donc estimée à 96 %.

Discussion

L'apport de l'immunité à médiation cellulaire au diagnostic de la brucellose a fait l'objet de nombreux travaux qui, tous, signalent l'intérêt de cette approche du point de vue de sa précocité de détection, de sa spécificité et de sa complémentarité par rapport à la sérologie [3,6].

Dans la majorité des cas ce diagnostic cellulaire est basé sur une épreuve cutanée *in vivo* qui nécessite deux à trois jours et deux manipulations des animaux pour avoir les résultats. L'IDR est en outre parfois difficile à interpréter et risque dans certaines circonstances de modifier le statut immunitaire des animaux testés.

Les techniques *in vitro* de mesure de l'immunité à médiation cellulaire sont dépourvues de ces inconvénients; néanmoins, certaines, comme le test de transformation lymphoblastique (TTL), nécessitent une préparation des cellules mononuclées sanguines et prennent plusieurs jours avant d'obtenir les résultats.

Le dosage d'IFN γ produit en réponse à une stimulation antigéno-spécifique ne souffre d'aucune de ces limitations. Cette technique est non seulement plus rapide et plus simple que l'IDR et le TTL mais également plus sensible [12,15].

Utilisé sur une grande échelle pour le dépistage de la tuberculose bovine en Australie, ce test a démontré une spécificité supérieure à 96 % et une sensibilité nettement augmentée par rapport au test intradermique [14].

Dans cet article, un dosage immunoenzymatique d'IFN γ produit en réponse à une stimulation *in vitro* par de la brucelline a été utilisé comme test cellulaire diagnostique de la brucellose. Ce test a été évalué sur un petit nombre d'animaux infectés expérimentalement et lors d'un essai limité sur le terrain.

Tableau V. Comparaison du test IFN γ avec les données de la sérologie dans le cas des RSFP.

N° animal	Sérologie (UI/ml)				IFN γ (IS)	Bactériologie
	EDTA	RB	DC	ELISA		
LO 1	25	2+	15	30	0,9	Y entero O9
LO 2	25	-	10	4	1,4	Y pseudo
LO 3	50	2+	100	30	1,0	
LO 4	12	-	0	16	1,3	
LO 5	25	-	NT	16	0,9	
VE 6	50	-	15	3	0,8	
DE 7	50	2+	50	43	0,8	Y pseudo
DI 8	25	+	25	40	1,2	
JO 9	12,5	NT	30	>30	2,3	Y pseudo
FE 10	50	3+	15	NT	1,5	
MA 11	50	3+	<100	55	1,0	
MA 12	100	4+	>100	>60	1,5	
ME 13	25	1+	15	8	1,5	
ME 14	25	2+	0	8	2,4	
ME 15	25	4+	0	8	1,4	
ME 16	25	2+	0	8	1,4	
BE 17	25	1+	15	4	1,6	Y entero O9
MT 18	25	3+	0	8	1,2	
MT 19	25	1+	10	16	1,6	Ecoli β hémo
MT 20	25	2+	10	16	2,4	
SC 21	25	2+	60	>30	22,3	Ecoli β hémo
ZE 22	50	NT	50	57	1,3	Y entero O9
ZE 23	50	NT	25	25	1,0	Y entero O9
ZE 24	25	NT	20	20	1,0	Y entero O9

Les deux premières lettres correspondent au code de l'exploitation.

NT : non testé

Les données en gras indiquent les tests positifs suivant les critères définis dans "matériel et méthodes"

L'utilisation d'animaux dont le statut infecté est connu, comme dans une infection expérimentale, donne plus de poids aux réactions observées et permet d'évaluer facilement la sensibilité d'un test diagnostic ainsi que sa précocité. Dans ces conditions, le test IFN γ s'est révélé être plus précoce que les tests sérologiques et plus sensible que l'IDR. Comme les autres tests, il s'avère incapable, à lui seul, d'identifier tous les animaux infectés à n'importe quel moment de l'expérience. Néanmoins l'utilisation conjointe de ce test et de la sérologie permet d'identifier 90 % des infectés dès 25 jours après l'infection et 100 % à partir du jour 35.

Aucune modification du seuil de positivité n'aurait permis d'améliorer l'efficacité de ce test dans la détection des animaux positifs. L'évaluation en milieu infecté naturellement indique que dans ces conditions, c'est le test IFN γ qui détecte le plus grand nombre d'animaux, mais que le maximum de détection n'est atteint qu'en conjonction avec les tests sérologiques. Sur le terrain aussi, le test IFN γ apparaît nettement plus sensible que l'IDR. Au vu de la précocité de détection démontrée lors de l'infection expérimentale, ce test permettrait de limiter la propagation de l'infection lorsqu'il est possible de mettre à l'écart ou d'éliminer les animaux suspects.

Enfin son apport pour la discrimination des réactions sérologiques faussement positive est considérable puisque 96 % des animaux suspects de RSFP sont restés négatif au test IFN γ . A ce niveau, il semble bien que le choix du seuil de positivité ait été adéquat; en effet son abaissement à une valeur de IS = 2 aurait diminué la spécificité de 12 % et son relèvement à une valeur de IS = 3 ou 4 n'apporterait pas de gain de spécificité.

Il n'en reste pas moins que ces essais sont préliminaires et que seule une étude à plus grande échelle sur un nombre important d'animaux certifiés négatifs permettra de calculer avec précision la spécificité réelle de ce test et d'en fixer le seuil de positivité. De même son évaluation sur le terrain devrait être poursuivie notamment en réalisant un suivi de 2 ou 3 mois sur les animaux de foyers brucelliques récents.

Il est vraisemblable que ce test ne soit pas plus capable que les autres tests existant de discriminer entre une vaccination et une infection. Néanmoins, sa spécificité, sa précocité et la forte proportion d'animaux infectés détectés laissent envisager qu'il pourrait être à la base de la génération d'un système diagnostique compatible avec une nouvelle approche vaccinale.

Des études sont actuellement en cours afin d'identifier une ou plusieurs protéines qui soient des allergènes majeurs de *Brucella*. Ces protéines produites par génie génétique seraient à la base d'un test diagnostique cellulaire et la délétion du/des gène(s) correspondant(s) dans une souche vaccinale autoriserait la discrimination entre vaccination et infection [11].

Le test IFN γ apparaît donc comme un test additionnel particulièrement performant en réponse au problème des réactions sérologiques atypiques et qui contribuera à aider les autorités vétérinaires dans leur campagne d'éradication de la brucellose.

Remerciements

Cette recherche a été subventionnée par l'Institut pour l'encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture (IRSIA) et par un volet du Projet de Développement des Zones Rurales (PDZR) (Ministère de l'Agriculture- CEE).

Nous remercions vivement MM. Y. Botton, P. Thiange, B. Limbourg du Centre de Dépistage des Maladies Animales d'Erpent (Namur) et le Dr J. Godfroid (INRV, Bruxelles) pour leur collaboration à ce travail.

Références

1. Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D. *et al.* (1988). *Techniques for the brucellosis laboratory*. Paris : INRA . 199pp.
2. Benet J.J., Massard C., Garin B. (1991). Réaction sérologiques atypiques dans le dépistage de la brucellose bovine. *Epid Sant Anim* ; 19 : 97 .
3. Berkovich Z., Ter Laak E.A. (1990). An evaluation of the DTH test for diagnosing brucellosis in individual cattle : a field study. *Vet Microbiol* ; 22 : 241.
4. Corbel M.J. (1990). Recent advance in the study of *Brucella* antigens and their serological cross reactivity. *Vet Bull* ; 55 : 927
5. Dewaele L., Saegerman C., Gilson D., Thiange P., Vo T.K., Limet J., Letesson J.J. Field evaluation of three serum ELISA using monoclonal antibodies or protein G as peroxydase conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. Submitted in *Vet. Microbiol.*
6. Fensterbank R. (1977). Le diagnostic allergique de la brucellose : utilisation du test allergique dans les troupeaux infectés. *Ann Rech Vet* ; 8 : 195
7. Fensterbank R. (1982). Le diagnostic allergique de la brucellose. *Bull Acad Vét de France* ; 55 : 47 .
8. Garin B. (1993). Le dépistage de la brucellose des ruminants et ses difficultés. *Le point Vét* ; 25 : 115 .
9. Kapsenberg M.L., Wierenga A.L., Bos J.D., Jansen H.M. (1991). Functional subsets of allergen reactive CD4+ T cells. *Immunol Today* ; 12 : 392
10. Limet J., Kerkhofs P., Wijfels R., Dekeyser P. (1988). Le diagnostic sérologique de la brucellose bovine par ELISA. *Ann Med Vet* ; 132 : 565
11. Limet J., Vo T.K., Saegerman C., Dewaele L., Tibor A., Cloeckert A., De Wergifosse P., Zigmunt M., Letesson J.J., Dubray G. (1991). Identification et clonage des antigènes de diagnostic de la Brucellose : perspectives d'application. In : Prevention of Brucellosis in Mediterranean countries. Proceedings of the international Seminar held in Valetta, Malte (October 1991) pp 252-264.
12. Rothel J.S., Jones S.J., Corner L.A., Cox J.C., Wood P.R. (1990). A sandwich immunoassay for bovine interferon gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Aust Vet J* ; 67 : 134 .
13. Sutherland S.S., Searson J. (1990). The immune response to *Brucella abortus* : the humoral response. In : Nielsen and Ducan eds. *Animal Brucellosis*. Boca Raton, USA, CRC Press, 65
14. Wood P.R., Corner L.A., Rothel J.S., *et al.* (1991). Field comparison of the gamma interferon assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Aust Vet J* ; 68 : 286 .
15. Wood P.R., Corner L.A., Plackett P. (1990). Development of a simple rapid *in vitro* cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon. *Res Vet Sci* ; 49 : 46 .

15

Apports de la génétique moléculaire dans la caractérisation de l'espèce *Clostridium perfringens*

G. DAUBE, P. SIMON, B. LIMBOURG*, K. RENIER*, A. KAECKENBEECK

Université de Liège, Faculté de Médecine Vétérinaire, Service de Bactériologie et de Pathologie des Maladies Bactériennes, Liège, Belgique.

** Fédération de lutte contre les Maladies Animales, Erpent, Belgique.*

Résumé

*Depuis le début de ce siècle, plusieurs méthodes de typage de l'espèce *Clostridium perfringens* ont été décrites; la détermination du toxinotype par séroneutralisation des propriétés létales sur souris est la seule véritablement répandue. La génétique moléculaire permet actuellement d'aller beaucoup plus loin dans la caractérisation de cette espèce bactérienne. D'une part, les gènes codant pour la plupart des toxines produites par cette bactérie (toxines alpha, epsilon, iota, thêta et mu, entérotoxine, sialidase) ont été recherchés par une technique d'hybridation ADN-ADN sur colonies. Onze cent vingt-trois souches sauvages ont été étudiées par cette méthode. Les 768 souches isolées de bovins morts d'entérotoxémie en Belgique possèdent toujours les gènes de la toxine alpha et de la sialidase, le plus souvent ceux des toxines thêta et mu, très rarement celui de l'entérotoxine et jamais celui des toxines epsilon et iota. D'autre part, un marqueur épidémiologique de *C. perfringens* a été défini par l'étude des polymorphismes de fragments de restriction par HindIII de l'ADN chromosomique après hybridation successive avec une sonde spécifique du gène de l'ARN ribosomal 16S et quatre sondes spécifiques des gènes*

situés sur le chromosome des toxines alpha, thêta et mu et de la sialidase. Cette méthode a permis de confirmer, par l'étude de 166 souches de *C. perfringens*, l'absence d'homogénéité génomique des différents toxinotypes, ce qui fait suspecter le caractère mobile des principaux gènes de virulence dans cette espèce bactérienne. Les souches isolées de bovins morts d'entérotoxémie se sont révélées génomiquement polymorphes, tant chez un même individu que chez plusieurs individus différents, démontrant l'origine polyclonale de cette affection.

Clostridium perfringens (*C. perfringens*) est une espèce bactérienne cosmopolite largement répandue dans de multiples niches écologiques. On la retrouve principalement dans le tube digestif de l'homme et de la plupart des espèces animales où elle peut être considérée comme saprophyte de l'intestin [3,17]. Certaines souches, pourtant, peuvent proliférer et produire différentes toxines responsables des maladies attribuées à ce germe. [4]. Le diagnostic des affections d'origine digestive repose sur l'isolement, en grand nombre, de *C. perfringens* et la détermination du toxinotype d'une ou de quelques souches [17] (Tableau I). Le typage est principalement effectué par séroneutralisation des toxines létales majeures complétée, éventuellement, par la détermination du sérotype [7]. Ces méthodes ne permettent pas une étude très approfondie de la population de *C. perfringens* présente dans l'intestin et sont, de plus, lourdes à mettre en oeuvre.

Tableau I. Toxinotypes majeurs de *Clostridium perfringens*.

Toxinotypes	Toxines			
	Alpha	Bêta	Epsilon	Iota
A	++	-	-	-
B	+	++	+	-
C	+	++	-	-
D	+	-	++	-
E	+	-	-	++

++: principale toxine produite

+: toxine secondaire produite en général en moindre quantité

-: toxine non produite

Afin de pouvoir réaliser de vastes enquêtes épidémiologiques concernant les clostridies, deux méthodes visant à la caractérisation génétique de cette espèce bactérienne ont été développées :

- d'une part, la recherche des gènes codant pour différentes toxines (alpha, epsilon, iota, thêta et mu, entérotoxine) et pour la sialidase, par hybridation ADN-ADN sur colonies en utilisant des sondes polynucléotidiques spécifiques marquées radioactivement ;
- d'autre part, la mise au point d'une méthode de typage basée sur l'étude du polymorphisme des fragments de restriction de l'ADN chromosomique.

Matériel et méthodes

Souches de *Clostridium perfringens*

Les 1123 souches sauvages de *C. perfringens* utilisées lors de cette étude sont principalement d'origine animale : la plupart d'entre elles (768) ont été isolées, en Belgique, entre 1987 et 1991 de bovins morts d'entérotoxémie. Les autres souches sont d'origine très variée; les souches ovines et caprines proviennent essentiellement de cas d'entérotoxémie, les autres souches d'origine animale ont été souvent isolées de cas pathologiques caractérisés par des lésions ou des troubles intestinaux. Le Tableau II reprend la ventilation des souches en fonction de l'espèce animale à l'origine de leur isolement. Ces souches furent identifiées comme *C. perfringens* sur base de l'aspect des colonies et de l'hémolyse, de l'aspect à la coloration de Gram et de l'hybridation avec une sonde génétique spécifique de la toxine létale majeure alpha. Une étude préliminaire (Daube, résultats non publiés) a montré que toutes les souches de *C. perfringens* hybrident avec cette sonde.

Tableau II. Origine des souches sauvages étudiées

Nombre total de souches	Origine des souches							
	Bovine	Petit ruminant	Porcine	Volailles	Carnivores	Divers	Aliments*	ND**
1123	768	132	61	34	25	26	41	36
	68%	12%	5%	3%	2%	2%	4%	3%

* destinés à l'alimentation humaine

** non déterminée

Les 1123 souches ont été étudiées par hybridation ADN-ADN sur colonies; 166 souches représentatives de tous les toxinotypes ont été caractérisées par étude du polymorphisme de fragments de restriction de l'ADN chromosomique.

La sensibilité et la spécificité des méthodes ont été estimées grâce à une collection de souches de référence ou de souches de contrôle :

- des souches de référence internationale de *C. perfringens* ;
- des souches de contrôle, dont le phénotype a été confirmé par d'autres équipes de recherche et qui nous permettent de valider nos tests.

L'ensemble de ces souches ont été reprises dans le Tableau III avec mention du caractère principal pour lequel chaque souche est utilisée comme contrôle ainsi que du laboratoire qui l'a transmise. Des souches d'autres espèces de clostridies ont été incluses comme témoins de spécificité.

Tableau III. Propriétés et origines des souches de référence et de contrôle

Appellation	Caractère	Origine
NCIB10716	<i>Clost. bifementans</i>	L. Devriese (Gand)
NCIB10676	<i>Clost. cadaveris</i>	L. Devriese (Gand)
CCM6066	<i>Clost. clostridioforme</i>	L. Devriese (Gand)
CCM5943	<i>Clost. histolyticum</i>	L. Devriese (Gand)
CCM5743	<i>Clost. septicum</i>	L. Devriese (Gand)
NCIB10717	<i>Clost. sordellii</i>	L. Devriese (Gand)
G12	<i>Clost. sordellii</i>	R. Schauer (RFA)
CCM6065	<i>Clost. symbiosum</i>	L. Devriese (Gand)
ATCC12922	entérotoxine	ATCC (USA)
F3686	entérotoxine	M. Van Damme (P-B)
NCTC8239	entérotoxine	M. Van Damme (P-B)
NCTC8798(8-6)	entérotoxine	M.R. Popoff (France)
A99	sialidase	R. Schauer (RFA)
DSM756	sialidase	R. Schauer (RFA)
ATCC13124	type A	ATCC (USA)
ATCC3624A	type A	J. Rood (Australie)
CW504	type A	J. Rood (Australie)
JIR323	type A	J. Rood (Australie)
NCTC6785	type A	S.T. Cole (France)
CN3888	type A	Wellcome (G-B)
G23	type B	P. Pohl (Belgique)
CN3922	type B	Wellcome (G-B)
CP232	type C	M.R. Popoff (France)
CWC236	type C	M.R. Popoff (France)
NCTC2062	type D	M.R. Popoff (France)
CN3978	type D	Wellcome (G-B)
NCIB10748	type E	M.R. Popoff (France)

Sondes génétiques

Les sondes génétiques ont été dérivées à partir des gènes codant pour les toxines alpha [15], epsilon [5], iota [13], thêta [20], mu [2], l'entérotoxine [21] et la sialidase [14] (Tableau IV). La sonde pour le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S a été dérivée du plasmide recombinant pBA2 [8], contenant le gène de l'ARN ribosomal 16S de *Bacillus subtilis*; la sonde correspond aux 1100 bases de l'extrémité 3' de ce gène. Les fragments sondes ont été marqués radioactivement (Random Hexanucleotide Primer Kit, Boehringer Mannheim).

Tableau IV. Dérivation des sondes génétiques.

Gène du caractère recherché	Abréviation du gène	Appellation du plasmide recombinant	Endonucléases de restriction utilisées	Taille de la sonde (pb)
Toxine alpha	<i>plc</i>	pTOX5	<i>Bam</i> HI + <i>Hind</i> III	950
Toxine epsilon	<i>etx</i>	pGDS7	<i>Hind</i> III	505
Toxine iota	NP	NP	PCR*	298
Toxine thêta	<i>pfoA</i>	pRT1B	<i>Acc</i> I	736
Toxine mu	<i>nagH</i>	pNAG-S3	<i>Hind</i> III	1300
Entérotoxine	<i>cpe</i>	pLWL10	<i>Kpn</i> I + <i>Hind</i> III	504
Sialidase	<i>nanH</i>	pK14RFA	<i>Kpn</i> I + <i>Hind</i> III	1400

NP : non publié

* : fragment-sonde obtenu par PCR

Méthodes d'hybridation

Les hybridations sur colonies ont été effectuées sur papier filtre Whatman 541 et les résultats ont été lus après autoradiographie [10]. Les adaptations de la technique originale sont les suivantes :

- le milieu Ana Blood Agar Base (Gibco) sans sang a été utilisé pour l'ensemencement de la matrice des souches de *C. perfringens* (50 souches à caractériser et 7 souches-témoins).
- l'ensemencement direct à partir de bouillons de culture de nuit s'est révélé inconstant et a dû être réalisé à partir d'une culture de nuit sur milieu solide (milieu Ana Blood Agar Base plus 8 % de sang de bovin) de chacune des souches (Figure. 1).

Les hybridations sur profils de restriction de l'ADN total ont été réalisées de la manière suivante :

- la méthode d'extraction rapide de l'ADN total de *C. perfringens* a été adaptée de celle décrite par Van Damme-Jongsten *et al.* [21]. Un millilitre et demi d'une culture de nuit en BHI-thioglycollate de *C. perfringens* sont centrifugés dans un tube Eppendorf à 12.000 g pendant 10 minutes; le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 1,2 ml d'une solution TES (Tris-HCl 50 mM (pH 8)/ EDTA 5 mM/ NaCl 50 mM) et centrifugé 10 minutes à 4°C. Le culot est resuspendu dans 320 µl de TES contenant 25 % de sucrose et du lysozyme (concentration finale de 2 mg/ml) et incubé 20 minutes à 37°C. Soixante microlitres d'EDTA 0,25 M (pH 8), puis 300 µl de TES contenant 1 % de SDS et 1 µl de diéthylpyrocarbonate sont ajoutés successivement. Après incubation 10 minutes à 60°C, l'ADN est extrait 2 fois avec 700 µl de phénol-chloroforme-isoamylalcool (25:24:1) et une fois avec 700 µl de chloroforme-isoamylalcool (24:1). Après addition de 2,5 volumes d'éthanol absolu et incubation 10 minutes à -20°C, le culot de centrifugation est rincé avec 300 µl d'éthanol à 70 %. Après une nouvelle centrifugation, le culot est resuspendu dans 36 µl d'eau distillée.

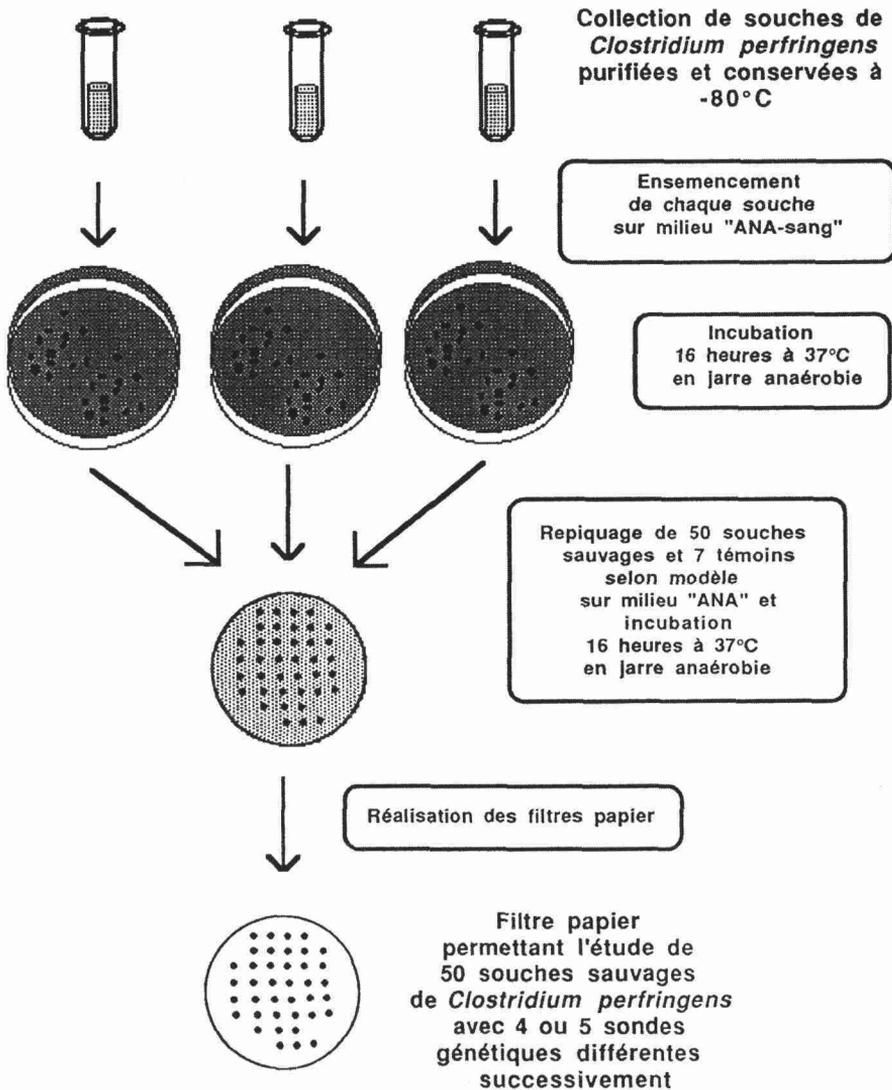


Figure 1. Méthode de réalisation des filtres en vue de l'hybridation sur colonies.

- un tiers de l'ADN extrait est soumis à la digestion par endonucléases de restriction *Hind* III afin de réaliser, après électrophorèse en gel d'agarose 0,8 %, un profil de restriction de l'ADN total, appelé aussi empreinte génétique de la souche étudiée. Les fragments d'ADN sont ensuite transférés sur une membrane de Nylon chargé par la technique de "Vacuum-Blot" et hybridés avec la sonde marquée radioactivement. Les diverses étapes expérimentales sont reprises dans la Figure 2.

Hybridation sur profils de restriction:

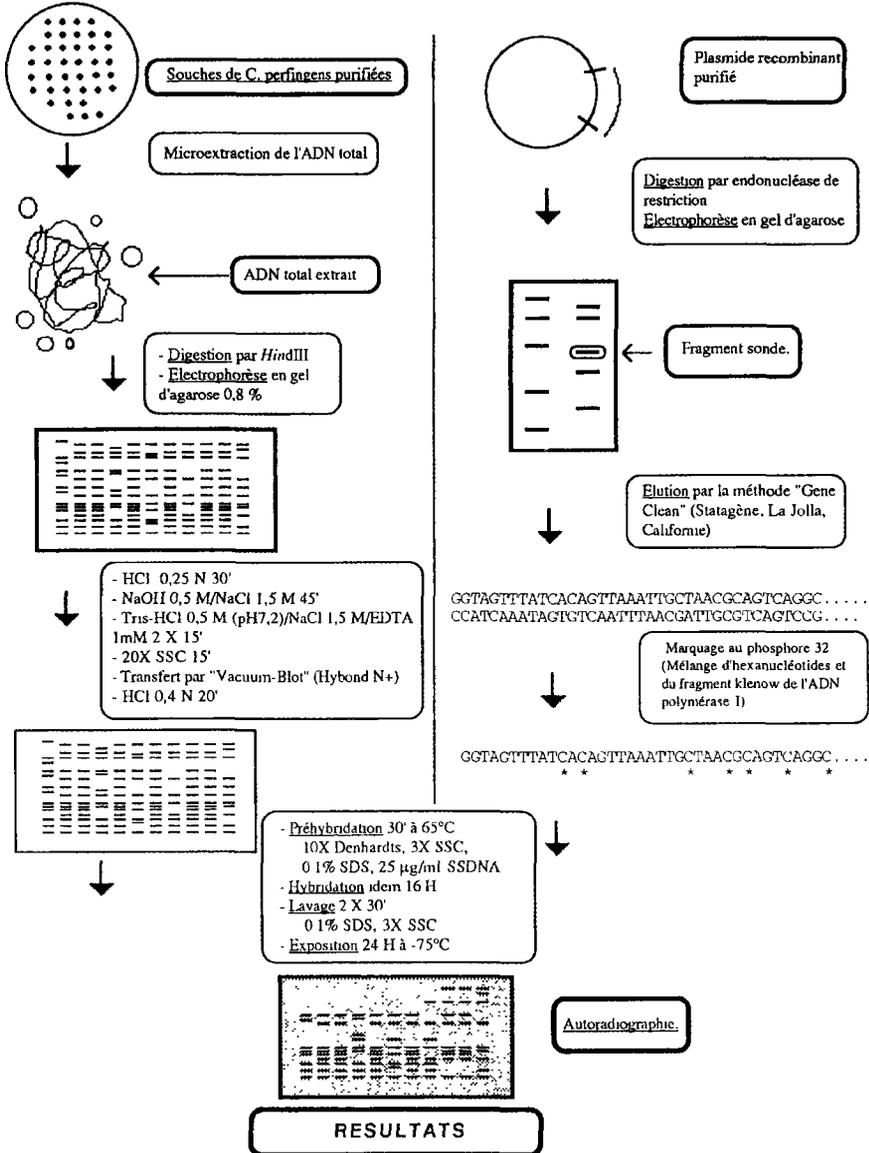


Figure 2. Protocole d'hybridation sur profils de restriction. Etapes expérimentales.

Méthodes d'analyse des profils d'hybridation

Les différents profils ont été comparés visuellement grâce aux marqueurs de taille (λ restreint par *Hind* III et pBR322 restreint par *Hinf* I) et au profil d'hybridation de référence de la souche NCTC2062. Une matrice a été réalisée reprenant le nombre total de bandes distinguées pour chaque souche ainsi que le nombre de bandes de mobilité semblable pour chaque paire de souches possible. Une matrice traduisant le pourcentage d'homologie entre les souches a été réalisée au départ de la première par la transformation suivante :

$$D = 2 \times n_{12} / (n_1 + n_2)$$

où : D est le coefficient de Dice [6] traduisant l'homologie entre les souches 1 et 2,
 n_{12} est le nombre de bandes communes entre les souches 1 et 2,
 n_1 est le nombre total de bandes repérées dans la souche 1,
 n_2 est le nombre total de bandes repérées dans la souche 2.

Cette matrice a été analysée par ordinateur selon l'algorithme de Li [9] utilisant la méthode *Unweighted Pair Group Average Linkage* (UPG) afin de générer un dendrogramme de similarité. Les profils analysés sont constitués du profil d'hybridation avec la sonde pour le gène de l'ARN ribosomal 16S additionné des quatre profils obtenus après hybridation du filtre avec les sondes pour les gènes de la sialidase et des toxines alpha, mu et thêta, quatre gènes situés sur le chromosome de *C. perfringens* [1].

Résultats

Prévalence des gènes codant pour sept toxines ou enzymes

Les résultats obtenus par hybridation ADN-ADN sur colonies sont présentés dans les Tableaux V et VI. L'absence de sonde génétique spécifique du gène de la toxine bêta nous empêche de déterminer le pathotype complet, mais des études phénotypiques complémentaires tentant la mise en évidence de ce facteur montrent que le toxinotype A non entérotoxigène est pratiquement le seul isolé de bovins morts d'entérotaxémie en Belgique.

Typage par étude du polymorphisme de fragments de restriction de l'ADN chromosomique

La sonde spécifique du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S a permis de détecter 10 bandes dans l'ADN restreint de la majorité des souches étudiées. Quarante-deux profils différents, appelés ribotypes, ont été distingués dans l'échantillon de 166 souches (résultats non montrés). La Figure 3 montre les profils obtenus pour quatorze souches isolées de deux bovins morts d'entérotaxémie.

L'utilisation successive des quatre autres sondes a permis de porter à 95 les classes différentes (résultats non montrés). Si on néglige les souches présentant un même profil, mais isolées d'un même animal, et pouvant donc constituer un clone, on obtient 95 catégories pour 116 souches, soit une variabilité corrigée de 82 %. Les souches isolées de bovins morts d'entérotaxémie sont différentes l'une de l'autre dans 94 % des cas, montrant ainsi qu'il ne s'agit pas d'un clone bactérien qui émerge lors de cette maladie. Un même individu peut, en outre héberger jusqu'à 9 électrophorotypes différents (résultats

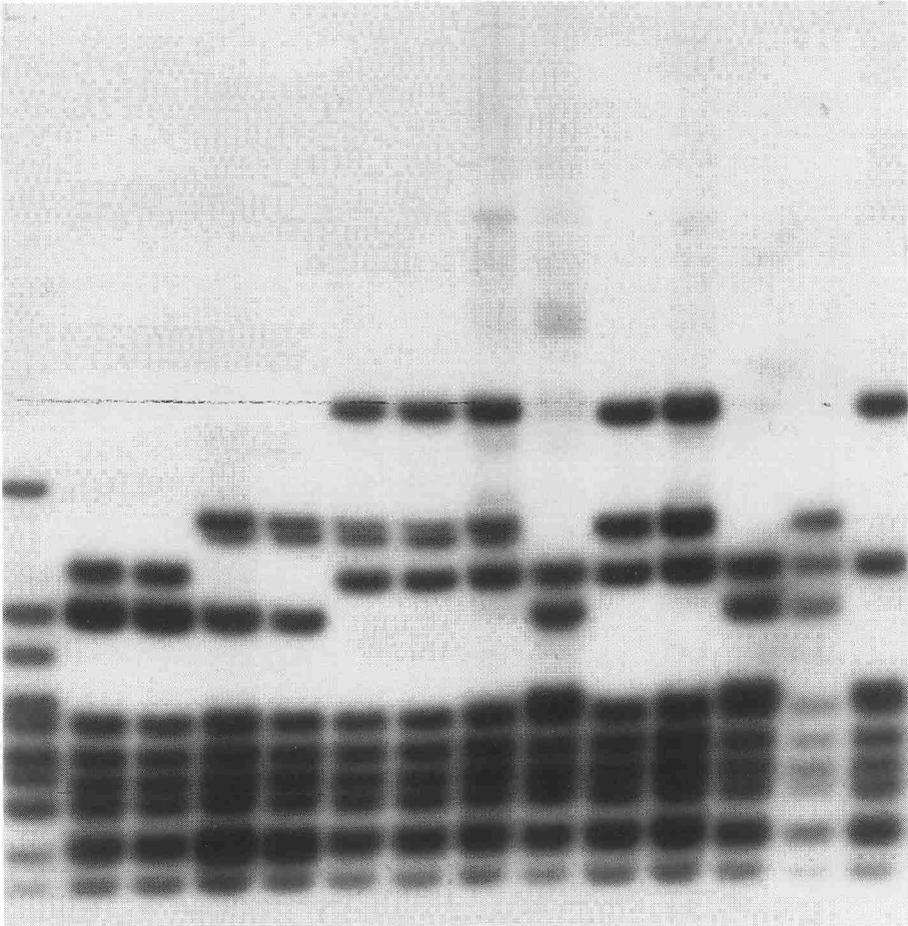


Figure 3. Profils d'hybridation de l'ADBN total extrait de 14 souches de *Clostridium perfringens* et restreint par *HinIII* avec la sonde pour le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S.

non montrés). Les souches des différents toxinotypes sont réparties sur toute la hauteur d'un dendrogramme exprimant l'homologie relative entre les souches (Figure 4).

Malgré le polymorphisme important constaté entre les différentes souches, certaines bandes du ribotype sont fortement conservées et peuvent servir de marqueur ou de carte d'identité d'espèce (Figure 3). L'étude par cette méthode d'espèces bactériennes phylogénétiquement proches devrait être menée afin de voir si le ribotype, utilisé seul, peut être, à la fois, une méthode de différenciation de l'espèce et un marqueur épidémiologique au sein même de l'espèce *C. perfringens*.

Discussion

Prévalence des gènes codant pour sept toxines ou enzymes

Les résultats d'hybridation avec chacune des sondes ont tous été exempts de bruit de fond; les souches qui possèdent le gène recherché ont été détectées par un spot noir sur l'autoradiographie, celles ne le possédant pas n'ont montré aucun signal ou de faibles traces lors d'une longue exposition (Figure. 5). La lecture et l'interprétation des résultats sont donc très simples et parfaitement objectives.

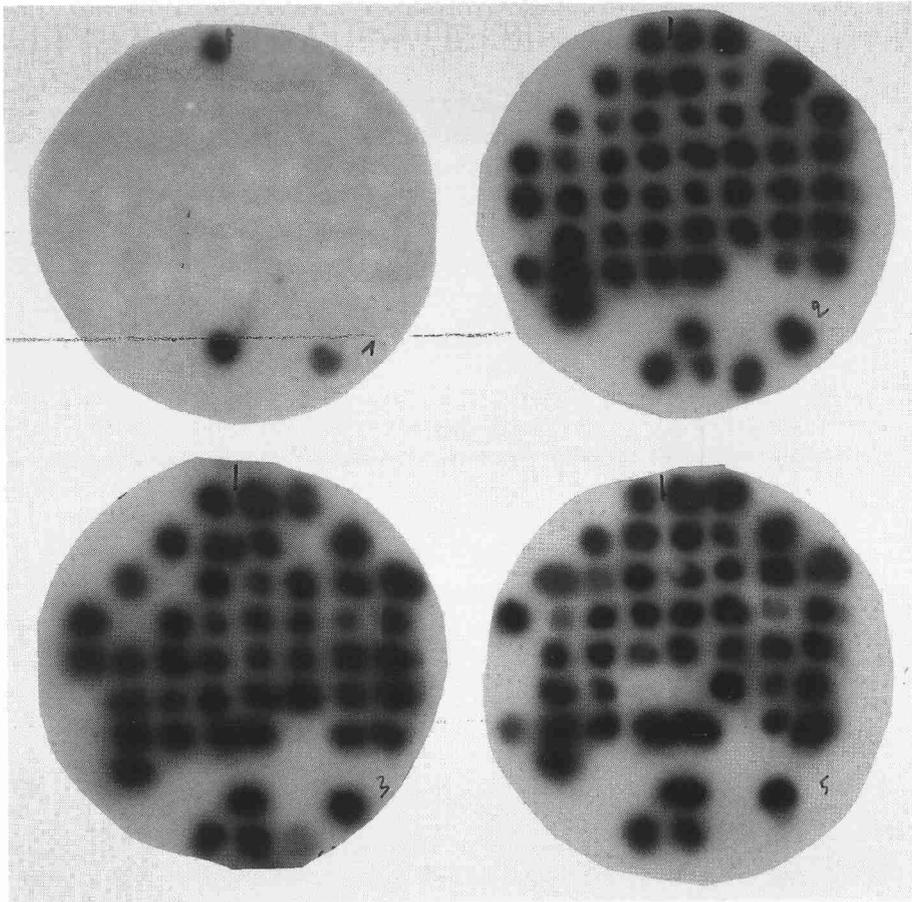


Figure 5. Hybridation ADN-ADN sur colonies avec les sondes génétiques pour les gènes codant pour la toxine epsilon (1), la toxine alpha (2), la toxine thêta (3), et la toxine mu (5).

Excepté trois études recherchant le gène de l'entérotoxine chez des souches de *C. perfringens* isolées de foyers d'intoxication alimentaire chez l'homme (6 % des souches positives), de porcs souffrant de diarrhée de sevrage (aucune souche positive) ou de matières

fécales de divers animaux domestiques sains [19,22,23], aucun travail n'a jusqu'ici utilisé l'outil génétique pour l'étude épidémiologique de pathologies liées à *C. perfringens* [4].

Les résultats rapportés ci-dessous détaillent l'absence ou la présence des gènes de plusieurs facteurs de virulence chez des souches isolées de cas de maladies animales. 41 souches isolées de substances alimentaires ont été ajoutées pour comparaison. La présence de chacun des gènes pris séparément sera étudiée ainsi que l'association de ces gènes dans chacune des souches. Parmi les 1123 souches isolées (appelées "souches sauvages"), une sous population de 768 souches d'origine bovine isolées de cas suspects d'entérotoxémie bovine a été caractérisée pour tenter de cerner les facteurs de virulence importants pour la pathogénie et le type de pathotype impliqué.

Le gène de la toxine alpha est présent dans toutes les souches étudiées. La stabilité de ce facteur de virulence est à mettre en relation avec la position de son gène à proximité de l'origine probable de réplication du chromosome [1]. Toutes les souches de référence hybrident également cette sonde (Tableau V).

Le gène de la toxine epsilon a été détecté dans 27 souches soit 2,4 % du total mais dans aucune des souches d'origine bovine (Tableau VI); ceci exclut l'implication de cette toxine dans l'entérotoxémie bovine en Belgique.

Aucune souche sauvage n'hybride avec la sonde spécifique du gène codant pour la toxine iota et la souche de référence NCIB10748 de type E est la seule à donner un résultat positif. Ces données confirment la rareté de ce toxinotype.

Toutes les souches de référence connues comme entérotoxinogènes ont été détectées par la sonde; celle-ci n'a détecté aucune autre souche de référence réputée non entérotoxinogène, excepté la souche NCIB10748 de type E. Cette souche n'a pu être démontrée comme entérotoxinogène par des tests phénotypiques [13]. Le gène de l'entérotoxine est présent dans 11 souches soit un peu moins d'1% et seule une souche provient d'un bovin suspect d'entérotoxémie. Ces constatations font bien penser que ce facteur de virulence n'est pas impliqué dans le problème de l'entérotoxémie bovine bien que Niilo, en 1978 [11], le rende responsable de diarrhées chez le veau au Canada.

Le gène de la toxine thêta a été détecté dans un peu plus de 90 % des souches étudiées et dans une proportion légèrement moindre parmi les souches d'origine bovine. Quant aux souches de référence, elles sont toutes positives, excepté deux souches de type A (souches G23 et CW504) et trois des quatre souches entérotoxinogènes (ATCC12922, NCTC8239 et NCTC8798). Cette propriété des souches entérotoxinogènes a déjà été rapportée [12].

La sonde pour le gène codant pour la toxine mu a détecté 95 % des souches étudiées dont 679 souches bovines sur 728 (soit 93,27 %).

Le gène de la sialidase intracellulaire de *C. perfringens* est présent dans toutes les souches sauvages étudiées; seule la souche JIR323, souche receveuse pour électroporation [16], n'hybride pas avec la sonde spécifique du gène de ce facteur. Ce facteur semble donc essentiel à la bactérie pour son métabolisme propre, plus qu'elle n'agit comme facteur de virulence proprement dit; cela pourrait être une raison qui explique sa stabilité dans les souches sauvages, la souche JIR323 étant une souche de laboratoire qui n'est sujette à aucune compétition.

L'ensemble de ces résultats permet, pour chaque souche la détermination d'un pathotype, pendant génétique du toxinotype, qui permet d'associer la souche à un tableau

Tableau V. Pathotype des souches de référence.

Souche	Toxine alpha	Toxine epsilon	Toxine iota	Toxine thêta	Toxine mu	Entéro-toxine	Sialdase	Toxinotype
G12	-a	-	-	-	-	-	-	-
CCM5743	-	-	-	-	-	-	-	-
CCM5943	-	-	-	-	-	-	-	-
NCIB10676	-	-	-	-	-	-	-	-
NCIB10717	-	-	-	-	-	-	-	-
CCM6065	-	-	-	-	-	-	-	-
CCM6066	-	-	-	-	-	-	-	-
NCIB10716	-	-	-	-	-	-	-	-
JIR323	+b	-	-	+	+	-	-	A
CW504	+	-	-	-	+	-	+	A
G23	+	-	-	-	+	-	+	Ac
A99	+	-	-	+	+	-	+	A
ATCC13124	+	-	-	+	+	-	+	A
ATCC3624A	+	-	-	+	+	-	+	A
CN3888	+	-	-	+	+	-	+	A
DSM756	+	-	-	+	+	-	+	A
NCTC6785	+	-	-	+	+	-	+	A
CP232	+	-	-	+	+	-	+	C
CWC236	+	-	-	+	+	-	+	C
CN3922	+	+	-	+	+	-	+	B
CN3978	+	+	-	+	+	-	+	D
NCTC2062	+	+	-	+	+	-	+	D
ATCC12922	+	-	-	-	-	+	+	A Ent+ d
NCTC8239	+	-	-	-	-	+	+	A Ent+
NCTC8798	+	-	-	-	+	+	+	A Ent+
F3686	+	-	-	+	+	+	+	A Ent+
NCIB10748	+	-	+	+	+	+	+	E

a : Hybridation négative

b : Hybridation positive

c : Souche obtenue comme type B mais confirmée comme type A

d : Souche de type A productrice d'entérotoxine.

Tableau VI. Nombre et proportion des souches sauvages positives avec chacune des sondes en fonction de l'origine des souches.

	Bovines	petit ruminant	Porcines	Volailles	Carnivores	Divers	Aliment	Non déterminé
Alpha	768 100%	132 100%	61 100%	34 100%	25 100%	26 100%	41 100%	36 100%
Epsilon	0 0%	21 16%	0 0%	1 3%	0 0%	1 4%	0 0%	4 11%
Iota	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%
Théta	688 90%	131 99%	51 84%	31 91%	22 88%	24 92%	37 90%	34 94%
Mu	719 94%	130 98%	61 100%	34 100%	20 80%	26 100%	41 100%	36 100%
Entérotox.	1 0%	5 4%	1 2%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	4 11%
Sialidase	768 100%	132 100%	61 100%	34 100%	25 100%	26 100%	41 100%	36 100%

pathologique particulier. Le clonage du gène de la toxine bêta permettra de remplacer complètement les techniques classiques de typage sur animaux de laboratoire.

Typage par étude du polymorphisme de fragments de restriction de l'ADN chromosomique

Les hybridations sur profils de restriction par *Hind* III réalisées ici permettent de "tracer" des clones de *C. perfringens*. La sonde spécifique du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S a l'avantage de détecter dix opérons dispersés sur un tiers du chromosome autour de l'origine de réplication [1], et donc d'étudier la position relative de minimum 20 sites *Hind* III. Les autres sondes n'étudient que les quelques sites *Hind* III dans et autour de la séquence, présente en un seul exemplaire, repérée par chaque sonde.

Le dendrogramme de similarité montre clairement que la classification établie ici n'est pas du tout superposable avec celle reposant sur le toxinotype. En effet, les souches productrices de toxine bêta, epsilon ou d'entérotoxine sont dispersées dans tout l'arbre. Le degré d'homologie entre certaines souches d'un même toxinotype n'est que de 57,7 %. Pour la toxine epsilon, les divergences vont jusqu'à 30,9 %. De même des souches des divers toxinotypes se retrouvent génomiquement très proches dans notre classification. Seules les souches isolées de porcs au Danemark, qu'elles soient de toxinotype C ou A, sont très semblables par étude des profils d'hybridation (résultats non montrés). Cette constatation avait déjà été faite par Hogh, en 1969, grâce au typage sérologique. Il reste à déterminer si cette proximité est liée à l'isolement géographique, à l'hôte (le porc) ou à la pathologie (l'entérite nécrotique du porc).

Il semble donc que la méthode utilisée confirme le caractère mobile des gènes gouvernant la synthèse de trois toxines importantes dans les pathologies liées à *C. perfringens*. Elle permet de rapprocher aisément des isolats de cette bactérie mais ne préjuge nullement des propriétés toxinogènes de ces souches. Elle complète ainsi parfaitement la classification en pathotypes établie ci-dessus. Elle permet le suivi d'une souche particulière en fonction de marqueurs situés sur le chromosome. Des études devraient être menées afin de connaître la stabilité de ces marqueurs au cours du temps. Cependant la relative homogénéité des résultats obtenus à partir d'isolats d'origines très variées laisse présager une faible variabilité de cette méthode comparée à l'étude des propriétés de virulence ou de résistance aux antibiotiques, facteurs qui sont, la plupart du temps, codés par des gènes situés sur des supports mobiles (plasmides, transposons,...).

Si ces résultats demandent à être confirmés sur un échantillon plus large, il apparaît cependant que cet ensemble de techniques, relativement faciles à mettre en œuvre dans n'importe quel laboratoire, se révèle être un outil épidémiologique très performant, là où les techniques de sérotypage ou de bactériocinotypage se sont montrées lourdes, chères et difficiles à mettre en œuvre. Les foyers d'intoxication alimentaire de l'homme liés à l'entérotoxine seront notamment avantageusement investigués par cette méthode en confrontant les propriétés des souches isolées des aliments et celles des malades. Outre cet aspect épidémiologique au sens propre du terme, toutes les pathologies liées à *C. perfringens*, ou même l'écologie de ce germe dans ses différents habitats, peuvent être étudiées de cette manière.

Conclusion

Les deux méthodes mises en oeuvre ont permis de remplacer avantageusement les méthodes classiques de typage développées au milieu de ce siècle :

- d'une part, la méthode d'hybridation ADN-ADN sur colonies permet de déterminer, rapidement et à un faible coût, les propriétés de virulence de multiples isolats de *C. perfringens*; cette méthode se révèle d'autant plus intéressante que les réactifs de typage classique ne sont plus disponibles; la seule limitation est le manque d'alternative au marquage radioactif des sondes.

- d'autre part, la détermination de l'électrophorétype a montré de multiples avantages sur les techniques classiques de sérotypage, bactériocinotypage ou lysotypage, à savoir que 100 % des souches sont typables par cette méthode, qu'aucun réactif spécifique n'est nécessaire et que le polymorphisme constaté est beaucoup plus grand que par les autres méthodes.

Remerciements

Ce travail a été réalisé grâce au soutien financier de l'IRSIA (Institut pour l'encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture) et de la Région Wallonne (Ministère de l'Agriculture). Les auteurs tiennent à remercier les Drs J. Alonso, L. Devriese, S.T. Cole, M.R. Popoff, J. Rood, R. Schauer, T.A. Trautner, R. Tweten et M. Vandamme-Jongsten pour l'envoi des plasmides recombinants ou des séquences des toxines.

Références

1. Canard B., Cole S.T. (1989). Genome organization of the anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. *Proc Natl Acad Sc.USA* ; 86 : 6676-6680.
2. Canard B. Molecular genetic analysis of the nagH gene encoding the hyaluronidase (mu toxin) of *Clostridium perfringens*. Thèse, Université Paris VII, Biochimie-Microbiologie.
3. Correa A.E.E. (1986). Studies of *Clostridium perfringens* type A enteritis in the pig. Thèse, Glasgow, UK. 1-324.
4. Daube G. (1992). *Clostridium perfringens* et pathologies digestives. *Ann Méd Vét* ; 136 : 5-30.
5. Daube G., Simon P., Kaeckenbeeck A. (1993). IS1151, an IS-like element of *Clostridium perfringens*. *Nucleic Acids Res* ; 21 : 352.
6. Dice L.R. (1945). Majors of the amount of ecologic association between species. *Ecology* ; 26 : 297.
7. Henderson D.W. (1940). The somatic antigens of the *Clostridium welchii* group of organisms. *J Hyg* ; 40 : 501-512.
8. Iglesia S A., Ceglowski P., Trautner T.A. (1983). Plasmid transformation in *Bacillus subtilis*. Effects of the insertion of *Bacillus subtilis* rRNA genes into plasmids. *Mol Gen Genet* ; 192 : 149-155.
9. Li W.H. (1981). Simple method for constructing phylogenetic trees from distance matrices. *Proc Natl Acad Sci USA* ; 78 : 1085-1089.
10. Mainil J.G., Bex F., Jacquemin E., Pohl P., Couturier M., Kaeckenbeeck A. (1990). Prevalence of four enterotoxin (STaP, STaH, STb, and LT) and four adhesin subunit (K99, K88, 987P,

- and F41) genes among *Escherichia coli* isolated from cattle. *Am J Vet Res* ; 51 : 187-190.
11. Niilo L. (1978). Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolated from intestinal contents of cattle, sheep and chickens. *Can J Comp Med* ; 42 : 357-363.
 12. Niilo L. (1980). *Clostridium perfringens* in animal disease : a review of current knowledge. *Can Vet J* ; 21 : 141-148.
 13. Popoff M.R. (1993). Communication personnelle.
 14. Roggentin P., Rothe B., Lottspeich F., Schauer R. (1988). Cloning and sequencing of a *Clostridium perfringens* sialidase gene. *FEBS Letters* ; 238 : 31-34.
 15. Scott P.T., Rood J.I. (1989). Electroporation-mediated transformation of lysostaphin-treated *Clostridium perfringens*. *Gene* ; 82 : 327-333.
 16. Smith H.W., Crabb W.E. (1961). The faecal bacterial flora of animals and man : Its development in the young. *J Pathol Bacteriol* ; 82 : 53-66.
 17. Sterne M., Batty I. (1975). In : *Pathogenic clostridia*. Butterworths, London and Boston : 22-26.
 18. Tschirdewahn B., Notermans S., Wernars K., Untermann F. (1991). The presence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains in faeces of various animals. *Int J Food Microbiol* ; 14 : 175-178.
 19. Tweten R.K. (1988). Nucleotide sequence of the gene for perfringolysin O, theta-toxin, from *Clostridium perfringens*: significant homology with the genes for streptolysin O and pneumolysin. *Infect Immun* ; 56 : 3235-3240.
 20. Van Damme-Jongsten M., Wernars K., Notermans S. (1989). Cloning and sequencing of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene. *Antonie van Leeuwenhoek* ; 56 : 181-190.
 21. Van Damme-Jongsten M., Rodhouse J., Gilbert R.J., Notermans S. (1990). Synthetic DNA probes for detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains isolated from food borne disease outbreaks. *J Clin Microbiol* ; 28 : 131-133.
 22. Van Damme-Jongsten M., Haagsma J., Notermans S. (1990). Testing of *Clostridium perfringens* Type A strains isolated from piglets with diarrhea for the presence of the enterotoxin gene. *Vet Rec* ; 126 : 191-192.

16

Mise au point et validation d'un ELISA sandwich pour la détection d'antigène viral dans les leucocytes des bovins infectés de manière persistante par le virus de la diarrhée virale bovine

B. MIGNON*, J. DUBUISSON**, S. WAXWEILER**, E. THIRY**,
P.P. PASTORET**

* *Service de parasitologie et de pathologie parasitaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Sart-Tilman, Liège, Belgique.*

** *Service de Virologie-Immunologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Sart-Tilman, Liège, Belgique.*

Résumé

Un enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) sandwich a été développé pour la détection des antigènes viraux dans le sang des animaux infectés de manière persistante par le virus de la diarrhée virale bovine (BVD). Des anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine de 48-kDa et contre la protéine de 120/80-kDa ont été utilisés pour la capture et pour la détection. Le test a été évalué sur 761 échantillons sanguins prélevés en ferme chez des bovins ayant un statut déterminé (virémique ou non virémique). Avec un seuil de positivité adéquatement choisi, la sensibilité, la spécificité et les valeurs prédictives d'un résultat positif et négatif étaient égales à 100%. Ces valeurs étaient supérieures à celles obtenues avec la méthode classique d'isolement viral. La corrélation entre l'ELI-

SA et l'isolement viral était supérieure à 90%. L'ELISA développé ici constitue donc une alternative intéressante pour détecter des antigènes du virus BVD chez les animaux infectés persistants par ce virus.

Le virus de la diarrhée virale bovine ou BVDV est le pestivirus responsable de la diarrhée virale bovine (BVD) et de la maladie des muqueuses chez les bovins [3].

L'infection de vaches gestantes par une souche non cytopathogène de virus BVD peut, dans certaines circonstances, entraîner la naissance d'animaux infectés de manière persistante [4]. Ces animaux, le plus souvent en bonne santé apparente, présentent une virémie permanente et excrètent continuellement le biotype non cytopathogène du virus. De ce fait, ils contaminent le reste du troupeau de façon silencieuse. Ils peuvent aussi succomber de maladie des muqueuses.

Bien que la prévalence des animaux infectés de manière persistante soit habituellement inférieure à 1%, les pertes économiques imputables au virus BVD [1] et particulièrement celles liées à l'infection persistante, rendent essentielle la détection des porteurs asymptomatiques.

Les méthodes classiques de détection basées sur l'isolement viral étant longues, coûteuses et peu sensibles, un enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) sandwich a été développé, appliqué sur le terrain et évalué épidémiologiquement comme moyen de diagnostic rapide des animaux infectés persistants par le virus BVD.

Matériel et méthodes

Echantillons sanguins

1006 échantillons de sang hépariné ont été collectés entre les mois de janvier et juillet 1991 chez des bovins de fermes privées et chez tous les taurillons âgés de 6 mois du Centre de Sélection Bovine de Ciney. Certains prélèvements ayant été recueillis à différents moments chez les mêmes animaux pour confirmer une virémie persistante, 989 animaux ont en fait été testés par isolement viral. 761 échantillons sur 1006 ont été testés par ELISA.

Anticorps monoclonaux

Les anticorps (Ac) monoclonaux ont été choisis en fonction de leur affinité relative, de l'absence de compétition réciproque et de leur spectre de reconnaissance envers différentes souches de BVDV [2,9]. Des anticorps dirigés contre la glycoprotéine de 48-kDa et contre la protéine de 120/80-kDa ont été utilisés, tant pour la capture que pour la détection.

ELISA et isolement viral

L'ELISA a été réalisé selon la méthode décrite par Mignon *et al.* [9]. Brièvement, les microplaques ont été enduites pendant une nuit à 4°C avec un mélange de 3 Ac monoclo-

naux purifiés (200ng/puits de chaque Ac)). Les plaques ont été lavées 5 fois avec du PBS-Tween, de même qu'entre chacune des étapes ultérieures. L'antigène a été ajouté pendant 1h à 37°C. Cet antigène a été préparé à partir du buffy coat débarrassé des hématies par lyse au NH_4Cl et traité au Nonidet-P40. Un mélange de 2 Ac biotinylés a ensuite été ajouté (100ng/puits de chaque Ac) pendant 1h à 20°C. L'incubation suivante a été conduite à 37°C pendant 1h avec de la streptavidine-biotine liée à la peroxydase (Amersham) à la dilution 1/400. Le substrat (ABTS, Boeringher-Mannheim) a été incubé pendant 8h à température ambiante et la lecture a été réalisée à 414nm avec un Titertek multiscan. L'isolement viral a été réalisé selon la méthode décrite par Waxweiler *et al.* [10].

Evaluation de l'ELISA

Les prélèvements ont été classés en "virémiques" (V+) et "non-virémiques" (V-) d'après les résultats obtenus au laboratoire et ceux obtenus de manière indépendante par un autre laboratoire en isolement viral (IV). L'isolement viral réalisé au laboratoire a été considéré comme le test standard et a été comparé à l'ELISA.

Un échantillon constitué de 151 prélèvements V- tirés au hasard parmi l'ensemble des V- et de tous les prélèvements V+ (26) a été testé en ELISA en utilisant 2 immunoplaques. Des tables de contingence ont été construites pour différentes valeurs de seuil de positivité (cut-off) et ont permis de calculer les valeurs intrinsèques de l'ELISA : sensibilité (Se) et spécificité (Sp). Les valeurs prédictives d'un résultat positif (VP+) et négatif (VP-) en ELISA ont ensuite été calculées pour différentes estimations de la prévalence (p) par le théorème de Bayes [7]. Les Se, Sp et VP de l'isolement viral ont également été déterminées. La corrélation entre l'ELISA et l'isolement viral a été déterminée par calcul du coefficient Kappa (K) [8].

Résultats

Parmi les 1006 échantillons, 41 étaient virémiques et correspondaient à 24 animaux différents. La prévalence de l'infection persistante était égale à 2,4%.

Le Tableau I montre les tables de contingence construites avec les résultats obtenus en ELISA pour différentes valeurs de cut-off (absorbance A414). Les sensibilité et spécificité calculées à partir des tables de contingence étaient égales à 100%, lorsque le cut-off était choisi entre 0,4 et 0,45 (Tableau I, Figure1).

La probabilité (VP+) qu'un résultat positif en ELISA soit réellement V+ était égale à 100% pour une valeur de cut-off supérieure à 0,4. Pour des valeurs égales ou inférieures à 0,4, VP+ dépendait de la prévalence (Figure 2). La valeur prédictive d'un résultat négatif ($VP- = (1-p)Sp / ((1-p)Sp + p(1-Se))$) était toujours supérieure à 99% pour des valeurs de cut-off situées entre 0,2 et 0,55 et une prévalence inférieure à 5%.

Le Tableau II montre que les Se et VP+ de l'isolement viral sont plus faibles que celles de l'ELISA (Figures 1 et 2). La corrélation entre les deux tests était cependant excellente ($K > 0,9$) pour un cut-off égal ou supérieur à 0,35.

Tableau I. Classification des résultats obtenus en ELISA*.

	V+	V-		
ELISA+	26 ^{VP}	12 ^{FP}	38	Cut-Off = 0,3
ELISA-	0 ^{FN}	139 ^{VN}	139	Se = 100%
	26	151	177	Sp = 92,1%
ELISA+	26 ^{VP}	0 ^{FP}	26	Cut-off = 0,4
ELISA-	0 ^{FN}	151 ^{VN}	151	Se = 100%
	26	151	177	Sp = 100%
ELISA+	25 ^{VP}	0 ^{FP}	25	Cut-off = 0,5
ELISA-	1 ^{FN}	151 ^{VN}	152	Se = 96,2%
	26	151	177	Sp = 100%

VP : vrais positifs VN : vrais négatifs
 FN : faux négatifs FP : faux positifs
 * : un échantillon avec une absorbance supérieure au cut-off choisi est considéré comme positif

Tableau II. Classification des résultats obtenus en isolement viral au laboratoire.

	V+	V-	
IV+	32 ^{VP}	3 ^{FP}	35
IV-	8 ^{FN}	963 ^{VN}	971
	40	966	1006

Se = 80%

Sp = 99,7%

VP- >99% ($5\% \leq p \leq 0,1\%$)VP+ variant de 93,1% ($p = 5\%$) à 20,5% ($p = 0,1\%$)

Discussion

L'analyse épidémiologique de l'ELISA montre que ce dernier peut être appliqué sur le terrain comme une méthode de référence pour la détection d'antigène BVDV chez les bovins infectés de manière persistante.

Des Ac monoclonaux dirigés contre deux protéines différentes du virus BVD, dont la protéine non structurale de 80 kDa relativement bien conservée parmi les différentes souches de virus BVD [5,6], ont été utilisés dans le but de diminuer le pourcentage de faux

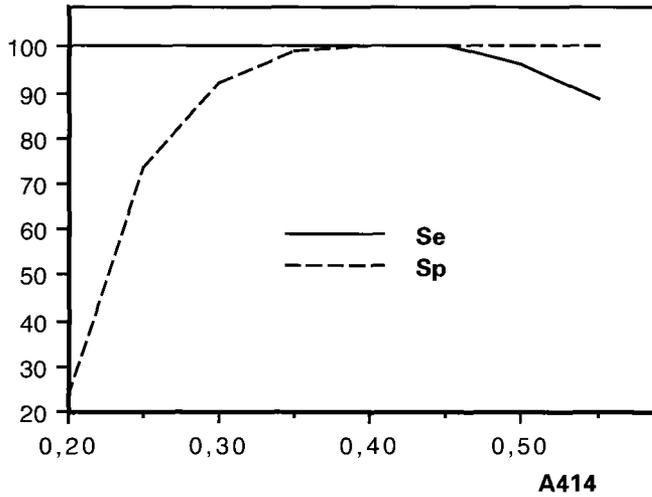


Figure 1. Sensibilité ($Se=VP/(VP+FN)$) et spécificité ($Sp=VN/(VN+FP)$) de l'ELISA pour différentes valeurs de cut-off (A414). Le test est considéré comme positif si A414 est supérieure au cut-off choisi.

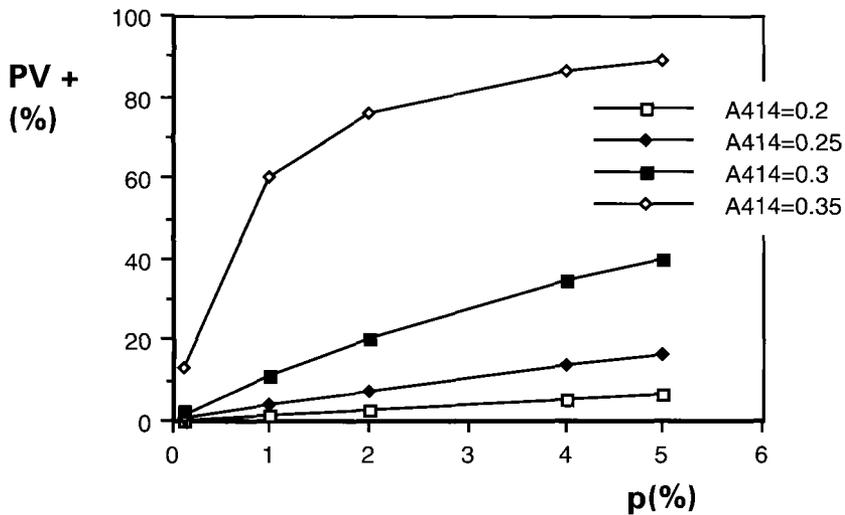


Figure 2. Valeur prédictive d'un résultat positif ($PV+=pSe/(pSe+(1-p)(1-Sp))$) de l'ELISA pour différentes valeurs de cut-off et de prévalence (p).

négatifs. Ce but a été atteint puisque, pour un cut-off égal ou inférieur à 0,45, la sensibilité de l'ELISA était égale à 100%, la spécificité demeurant égale ou supérieure à 90% pour un cut-off supérieur à 0,3. Ces valeurs de Se et Sp, supérieures à celles de l'isolement viral, indiquent que l'ELISA apparaît approprié pour détecter les animaux infectés persistants par le virus BVD. Cette conclusion est renforcée par les hautes valeurs prédictives d'un résultat positif et négatif obtenues en ELISA pour un cut-off égal à 0,4 ou 0,45, même à faible prévalence.

Les Se, Sp et VP de l'ELISA étant supérieures à celles de l'isolement viral et les 2 tests étant bien corrélés, l'ELISA pourrait remplacer l'isolement viral, qui reste actuellement la seule méthode officiellement admise pour la détection des animaux infectés persistants par le virus BVD. Par ailleurs, l'ELISA est beaucoup moins lourd à mettre en oeuvre que l'isolement viral; il est globalement moins coûteux et plus rapide. Il constitue donc un outil intéressant pouvant avoir sa place dans des programmes sanitaires visant à l'éradication de l'infection par le virus BVD.

Références

1. Bennet R.M., Done J.T. (1986). Control of the bovine pestivirus syndrome in cattle : a case for social cost-benefit analysis ? *Proc Soc Vet Epid Prevent Med*, Thrusfield, Edimbourg.
2. Boulanger D., Waxweiler S., Karelle L., Loncar M., Mignon B., Dubuisson J., Thiry E., Pastoret P.P. (1991). Characterization of monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus: evidence of a neutralizing activity against gp48 in the presence of goat anti-mouse immunoglobulin serum. *J Gen Virol* ; 72 : 1195-1198.
3. Brownlie J. (1990). Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine virus diarrhoea virus. *Vet Microbiol* ; 23 : 371-382.
4. Brownlie J., Clarke M.C., Howard C.J., Pocock D.H. (1987). Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection of cattle. *Ann Rech Vet* ; 128 : 157-166.
5. Collet M.S., Moennig V., Horzinek M.C. (1989). Recent advances in Pestivirus research. *J Gen Virol* ; 70 : 253-266.
6. Donis R.O., Dubovi E.J. (1987). Differences in virus-induced polypeptides in cells infected by cytopathic and non-cytopathic biotypes of bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus. *Virology* ; 158 : 168-173.
7. Jenicek M., Cleroux R. (1983). *Epidémiologie. Principes. Techniques. Applications*. Edisem Inc.. Ste Hyacinthe, Québec.
8. Martin S.W., Meek A.H., Willeberg P. (1987). *Veterinary Epidemiology Principles and methods*. Iowa state University press.
9. Mignon B., Dubuisson J., Baranowski E., Koromyslov I., Ernst E., Boulanger D., Waxweiler S., Pastoret P.P. (1991). A monoclonal ELISA for bovine diarrhoea pestivirus antigen detection in persistently infected cattle. *J Virol Methods* ; 35 : 177-188.
10. Waxweiler S., Karelle-Bui-Thi L., Sneyers M., Lambert A.F., Delchambre M., Dubuisson J., Thiry E., Antoine H., Dive M., Detal G., Pastoret P.P. (1989). Circulation de souches non-cytopathogènes du virus BVD-MD dans des lots de taurillons. *Ann Méd Vét* ; 133 : 681-690.

17

Etude par ELISA de compétition de l'immunité contre le virus de la peste bovine chez les bovins du Sénégal

J. SARR, M. DIOP

ISRA, Dakar, Sénégal.

La longue période de sécheresse que traverse le Sahel a durement éprouvé le cheptel bovin du Sénégal, entraînant des pertes directes considérables par mortalité (10% à 30% environ selon les régions), mais aussi des pertes indirectes non chiffrables au niveau des productions et de la productivité. A cette menace s'ajoute aujourd'hui la peste bovine qui est réapparue après une longue période d'accalmie, dans de nombreux pays africains. Au Sénégal, l'effort de vaccination a permis la disparition de la maladie depuis 1968, mais la situation qui prévaut dans les pays limitrophes montre que la menace reste permanente.

La situation immunitaire du cheptel national effectuée en 1991 [3,4], montre que des efforts doivent être réalisés dans de nombreuses zones, en particulier au niveau des régions frontalières avec la Mauritanie et le Mali. L'absence de campagne annuelle de vaccination dans la plupart des régions en 1991-1992 a du également affecter les taux de séro-conversion. L'objectif de cette enquête est :

- d'évaluer la baisse des taux d'immunité, en particulier chez les catégories d'animaux les plus jeunes,
- d'orienter, compte tenu des résultats, la stratégie des campagnes dans une perspective d'éradication de la peste bovine,
- de renforcer la base de données pour améliorer le système d'information en santé animale avec les pays voisins.

Matériel et méthodes

Les prélèvements

Dix départements, sur les trente que compte le Sénégal, ont été tirés au hasard et visités à raison d'un troupeau, également choisi au hasard, par communauté rurale.

Au niveau de chaque troupeau tiré de l'urne, sont prélevés 40 animaux selon les classes d'âge :

- 10 animaux âgés de $0 < x < 1$ an,
- 10 animaux âgés de $1 < x < 2$ ans,
- 10 animaux âgés de $2 < x < 3$ ans,
- 10 animaux âgés de $x > 3$ ans.

Au total, 4200 prélèvements ont été effectués pour une estimation correcte de la prévalence en anticorps contre la peste bovine dans l'intervalle de confiance de 95%.

Le test

Le test utilisé pour la recherche des anticorps contre le virus de la peste bovine est l'ELISA de compétition [1,2] (plaques ELISA Nunc maxisorp, monoclonal anti-proteine H du virus peste bovine).

Le conjugué est constitué par un sérum de lapin anti-immunoglobulines de souris (Dako P 260) conjugué à la peroxydase.

Le substrat et le chromogène sont l'eau oxygénée et l'orthophénylène diamine (OPD). Le pourcentage d'inhibition (PI) est calculé de la façon suivante :

$PI = 100 - (< DO \text{ de l'échantillon} / DO \text{ contrôle AcM} > \times 100)$.

Les valeurs d'inhibition supérieures à 50% sont considérées comme Peste bovine positives.

Résultats

Tous les résultats sont regroupés dans le Tableau I et les Figures 1 et 2.

Région de Diourbel

Au total, 270 prélèvements ont été réalisés dans les 11 communautés rurales du département. La couverture immunitaire moyenne est de 73% seulement, alors qu'il n'y a pas eu d'interruption dans les campagnes annuelles de vaccination depuis 1968. Les catégories les plus réceptives restent les classes d'animaux de 1 à 2 ans avec respectivement 60% et 34% de séro-positifs.

Région de Fatick

269 prélèvements ont été réalisés sur la terre ferme et 371 au niveau des Iles du Saloum. La couverture immunitaire est relativement bonne chez les animaux âgés de 2 ans, avec 82,8%, excellente chez les plus de 3 ans, avec 90%. L'absence de campagne de vaccination en 1991-1992 a entraîné une baisse du taux d'immunité chez les jeunes : 15,4% chez les moins de 1 an, et 18,7% chez ceux âgés de 1 à 2 ans.

Région de Kaolack

75% des 308 prélèvements réalisés se sont révélés positifs. Tous les animaux âgés de plus de 2 ans disposent d'une bonne couverture immunitaire avec 87,5% chez les 2 à 3 ans et 92% chez ceux âgés de plus de 3 ans. Les taux d'immunité restent toujours faibles chez les jeunes : 17,4% chez les moins de 1 an, contre 40,6% pour la classe des 1 à 2 ans.

Région de Louga

Au total, 547 prélèvements ont été effectués. Le taux moyen de séro-conversion positive est de 63%. Aucune classe d'âge n'atteint le taux d'immunité de 85%, généralement considéré comme étant la limite à partir de laquelle le virus de la peste bovine ne peut plus circuler à l'intérieur d'un troupeau.

Région de Tambacounda

Les résultats globaux montrent un taux moyen de séro-conversion positive faible : 60% environ. Aucune catégorie d'animaux, même ceux âgés de plus de 3 ans, ne dispose d'une couverture immunitaire suffisante. Les taux les plus faibles se rencontrent, comme partout ailleurs, chez les animaux les plus jeunes.

Région de Kolda

Sur les 607 prélèvements analysés, seuls les animaux âgés de plus de 3 ans disposent d'un taux supérieur à 85%. Il n'y a pas de communauté rurale disposant d'une couverture immunitaire qui puisse empêcher toute circulation de virus bovine.

Tableau I . Situation immunitaire de la peste bovine au Sénégal (% de séro-positifs)

Région	0<x<1 an	1<x<2 ans	2<x<3ans	x>3ans	Taux moyen
Droubel	60	34	77	85	73
Fatick	15,4	18,7	82,8	90	67
Kaolack	17,4	40,6	87,5	92	75
Louga	53	37	67	86	63
Tambacounda	27	34	55	81	60
Kolda	31	22	66	90	67
Saint Louis	29	16	58	84	64
Ziguinchor	33	28,8	68,5	87	91,7
Taux moyen en fonction de l'âge	33,8	28,8	68,5	72,8	60,32

Région de Saint-Louis

64% seulement des animaux visités possèdent des anticorps contre le virus de la Peste bovine. Seule la catégorie des plus de 3 ans dispose d'un taux d'immunité voisin de 85%. Chez les jeunes âgés de 0 à 3 ans, qui représentent près de 60% de la population totale de la région, les taux restent généralement faibles.

Région de Ziguinchor

161 prélèvements ont été effectués dans cette région. La situation immunitaire moyenne est de 72,6% d'animaux séropositifs. Les taux d'immunité dépassent tous 85% chez toutes les catégories d'animaux âgés de plus de 2 ans.

Discussion

Il est admis aujourd'hui qu'il faut une couverture immunitaire moyenne de 85% ou plus pour assurer à un troupeau ou à un cheptel bovin, quel qu'il soit, une protection efficace contre d'éventuelles contaminations ou de circulation de virus bovine sauvage.

Au niveau de la région de Diourbel, aucun troupeau visité ne dispose de ce taux de couverture immunitaire.

A Fatick, 28% seulement des troupeaux ont un taux supérieur ou égal à 85%, contre 34% dans la région de Kaolack et 19% à Louga.

Aucun troupeau visité ne possède ce taux dans les régions de Tambacounda, de Kolda et de Saint-Louis.

La région de Ziguinchor semble donc avoir la meilleure couverture immunitaire avec près de 40% des troupeaux.

Enfin, il n'y a aucune région qui dispose d'une couverture immunitaire suffisante pouvant la mettre à l'abri d'une circulation éventuelle de virus en cas de contamination. Néanmoins, chez les animaux âgés de plus de 3 ans, ce taux est généralement atteint dans toutes les régions sauf à Tambacounda et Saint-Louis.

Chez les catégories d'animaux âgés de 2 à 3 ans, une couverture immunitaire suffisante existe à Fatick et Ziguinchor. Partout ailleurs, elle reste à améliorer.

Au niveau des moins de 2 ans, cette couverture est généralement insuffisante dans tout le pays.

Compte tenu de l'importance de cette catégorie d'animaux par rapport au cheptel bovin national (30% à 40% environ), la peste bovine pourrait revêtir, en cas de contamination, des allures épizootiques, en particulier dans les zones où, par manque d'intérêt, les éleveurs présentent de moins en moins l'ensemble des animaux aux campagnes annuelles de vaccination, pourtant obligatoires.

Cependant, des efforts ciblés sur les catégories les plus jeunes, devraient permettre, au Sénégal, et à moindre coût, d'améliorer considérablement les acquis de nombreuses campagnes annuelles de vaccination, depuis la dernière Campagne Panafricaine pour l'éradication de la peste bovine en Afrique, appelée PC15 de 1962 à 1969, pour l'Afrique de l'Ouest et du Centre.

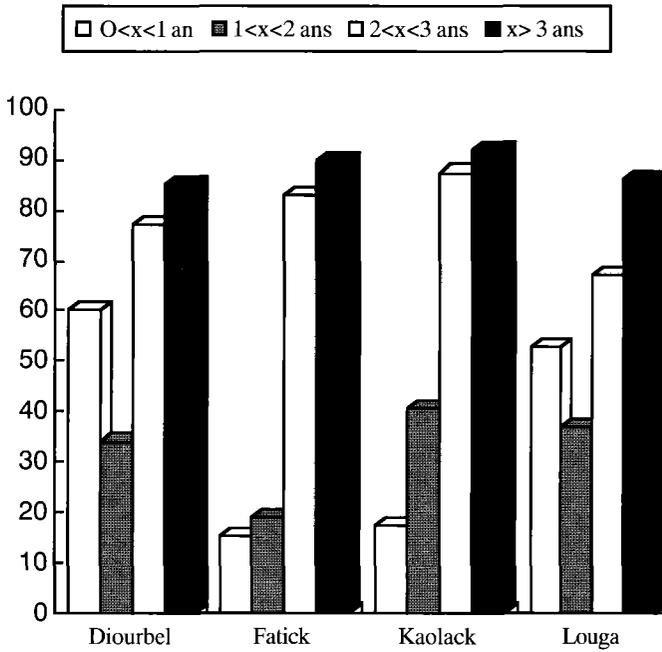


Figure 1. Situation immunitaire de la peste bovine dans les régions I.

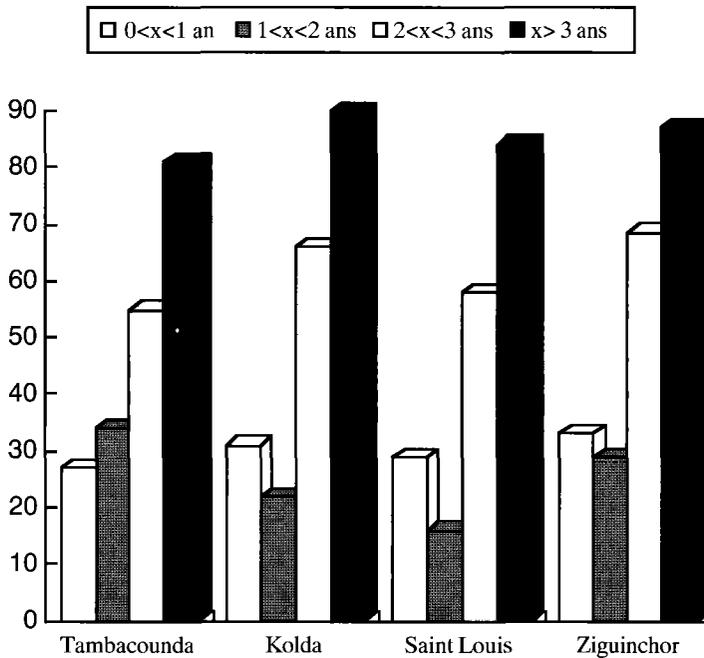


Figure 2. Situation immunitaire de la peste bovine dans les régions II.

Références

1. Anderson J. *et al.* (1991). In : The sero-monitoring of rinderpest throughout Africa phase I. AIEA TECDOC 623 Vienna 55.
2. Rinderpest Competitive ELISA, Bench protocol. Version RPV 1,0. AIEA TECDOC Sept 1991
3. Sarr J., Diop M. (1991). Situation immunitaire de la peste bovine au Sénégal. Direction des Recherches sur les Productions et la Santé Animales (ISRA), Dakar, Sénégal, 250 p; Dec. 1991.
4. Sarr J., Diop M. (1992). La peste bovine au Sénégal : Etat immunitaire du cheptel bovin national. In : The sero-monitoring of Rinderpest throughout Africa Phase II. AIEA/ FAO/ SIDA/ OUA/ IBAR/ PARC coord meet. Entebbe, Uganda 15-21 Sept. 1992.

18

Utilisation de l'amplification en chaîne par polymérase pour la détection du virus de la peste équine à partir d'échantillons cliniques

S. ZIENTARA, C. SAILLEAU, S. MOULAY

CNEVA-Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires, Maisons-Alfort, France.

Résumé

La peste équine est une maladie virale qui affecte les équidés et plus particulièrement les chevaux dont elle provoque très fréquemment la mort. Le virus (AHSV ou African horse sickness virus) est transmis par l'intermédiaire d'insectes piqueurs, notamment les culicoides qui sont des vecteurs biologiques. Le virus appartient à la famille des Réoviridae et au genre Orbivirus. Neuf sérotypes viraux ont, à ce jour, été décrits. Cet article décrit l'utilisation de la méthode combinée de transcription inverse et d'amplification en chaîne par polymérase pour la détection des ARN génomiques du virus de la peste équine, à partir d'échantillons cliniques. Les ARN totaux ont été extraits à partir de 100 mg de rates de chevaux infectés par le virus AHSV sérotype 4 (le virus a été isolé de chacune des rates) par la méthode d'extraction à l'isothiocyanate de guanidium. Des rates de 10 chevaux non infectés ont été soumises au même traitement. L'ARN a ensuite été dénaturé par l'hydroxyde de méthyl mercure. Dans un même tube et en une seule manipulation, l'ADN complémentaire du segment génomique 7 est synthétisé par la transcriptase inverse du virus de la myélodblastose aviaire et amplifié par la Taq polymérase. Les fragments géno-

miques amplifiés sont visualisés sur gel d'agarose (1179 pb) et leur spécificité vérifiée par l'analyse de leurs profils de restriction obtenus avec 8 enzymes. Aucun fragment n'a été amplifié à partir de rates de chevaux non infectées.

La peste équine est une maladie virale qui affecte les équidés et plus particulièrement les chevaux dont elle provoque très fréquemment la mort. Le virus (AHSV ou African horse sickness virus) est transmis par l'intermédiaire d'insectes piqueurs notamment les culicoïdes [5] qui sont des vecteurs biologiques. Le virus appartient à la famille des *Réoviridae* et au genre *Orbivirus* [16]. Neuf sérotypes viraux ont, à ce jour, été décrits [8]. En juillet 1987, l'Espagne fut déclarée infectée de peste équine (virus du sérotype 4). La maladie frappa aussi le Portugal en 1989, puis le Maroc la même année.

Le génome du virus équine est constitué de dix molécules d'ARN double-brin [1,10]. La capside externe de ce virus nu est composée de deux protéines majeures (VP2 et VP5) qui portent les sites de fixation au récepteur cellulaire et les épitopes de neutralisation.

La capside interne est composée de deux protéines majeures (VP3 et VP7) [2,4] et de trois protéines mineures (VP1, VP4 et VP6). Des protéines non-structurales (NS1, 2, 3 et 4) [6,9] sont aussi présentes dans les cellules infectées.

Les méthodes classiques de diagnostic direct de cette infection sont l'inoculation intracérébrale aux souriceaux nouveau-nés et l'infection aux cultures cellulaires (BHK1 ou cellules Vero). Le diagnostic sérologique repose sur la recherche des anticorps fixant le complément qui est la méthode officielle.

Mais aucune de ces méthodes n'est suffisamment sensible et précoce pour détecter de faibles quantités de virus.

Nous décrivons l'utilisation de la méthode combinée de transcription inverse et d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR pour "Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction") pour la détection des ARN génomiques viraux à partir d'échantillons cliniques.

Matériel et méthodes

Echantillons cliniques

Deux groupes de 10 et 19 échantillons de rates de chevaux suspects d'être morts de peste équine nous ont été fournis par le Dr El-Harrack (Laboratoire Biopharma, Maroc) et par le Dr Hooghuis du laboratoire de référence communautaire d'Algete (Madrid). Un échantillon d'une rate prélevée sur un cadavre d'un cheval marocain d'une région non-infectée par la peste nous a aussi été adressé. Dix rates non infectées prélevées sur des cadavres de chevaux français ont été utilisées aussi comme témoins négatifs (Tableau I).

Tableau I. Caractéristiques (année et origine géographique) des échantillons spléniques analysés par RT-PCR.

Echantillon N°	Origine	Année	Isolement viral	Résultats par PCR
1	Kenitra (Maroc)	1989	-	+
2	Ouarzazate (Maroc)	1989	+	+
3	Khouribga (Maroc)	1989	+	+
4	Taounate (Maroc)	1989	+	+
5	Boulaouane (Maroc)	1989	+	+
6	Missour (Maroc)	1989	-	+
7	Fes (Maroc)	1989	+	+
8	Agadir (Maroc)	1989	+	+
9	Tahla (Maroc)	1989	+	+
10	Oujda (Maroc)	1989	- (témoin négatif)	-
11	Espagne	1990	+	+
12	Espagne	1990	+	+
13	Espagne	1990	+	+
14	Espagne	1990	+	+
15	Espagne	1990	+	+
16	Espagne	1990	+	+
17	Espagne	1990	+	+
18	Espagne	1990	+	+
19	Espagne	1990	+	+
20 à 29	France	de 1990 à 1993	- (témoins négatifs)	-

Recherches virales

Les recherches virales ont été réalisées par inoculation par voie intracérébrale à des souris nouveau-nés et par inoculation à des cultures de cellules Vero (réf. ATCC* CCl 81) cultivées en boîtes de 175 cm² avec du milieu RPMI 1640 supplémenté par du sérum de veau fœtal (8%), de la streptomycine (100 I/μl) et de la pénicilline (100 UI/ml) [7]. Le sérotype est déterminé par la méthode de séroneutralisation [11].

Extraction des acides nucléiques

Les ARN totaux sont extraits de 100 mg de prélèvements de rates (infectées ou non infectées) par la méthode de Chominczynski et Sacchi [3] à l'isothiocyanate de guanidium.

Cent mg de tissu splénique sont broyés et homogénéisés en présence d'une solution D (d'isothiocyanate de guanidium 4M, 25 mM citrate de sodium, pH 7, sarcosyl 0,5%, β-

* American Type Culture Collection

mercap-toéthanol 0,5M). Après extraction au phénol-chloroforme isoamylalcool (24:1), la solution obtenue est centrifugée à 13 000 tours/minute à 4°C.

Vingt unités de RNAsin (40 U/μl ; Boehringer-Mannheim, Meylan, France) sont ajoutés à la phase aqueuse récupérée et qui contient les ARN. Les ARN sont précipités par l'isopropanol à -20°C pendant une nuit. Le culot obtenu après centrifugation (13 000 tours/minute, pendant 10 minutes) est repris dans 150 μl de la solution D et précipité par l'isopropanol 2 heures à -20°C. Après centrifugation, le culot est resuspendu dans 1 ml d'éthanol à 75%, précipité, séché sous vide et repris dans 10 μl d'eau traitée par le diéthylpyrocarbonate (DEPC).

Le même protocole est employé pour préparer les acides nucléiques extraits de cultures cellulaires infectées et non-infectées utilisées comme témoins positifs et négatifs.

Amplimères

Les amplimères ont été sélectionnés à partir de la séquence publiée [13] du segment 7 du virus AHSV-4 (souche isolée en Espagne en 1987). Les oligonucléotides choisis permettent l'amplification entière du gène 7 [18].

La taille du segment génomique est de 1179 pb et le poids moléculaire de 7,7.10⁵ Da [13]. Les séquences des deux oligonucléotides sont respectivement :

5'GTAAAATTCGGTTAGGATG3' et 5'GTAAGTGTATTCGGTATTGA3'.

RT-PCR

Les ARN db, repris sous un volume de 2,5 l, sont dénaturés par l'addition d'un volume égal d'hydroxyde de méthyl mercure 0,02 M et laissés 10 minutes à température ambiante [17].

Après réduction de l'hydroxyde de méthyl mercure par addition de 1 μl de β-mercaptoéthanol 0,7 M, 2 μl de RNAsin sont ajoutés (5 minutes à température ambiante).

Tous les réactifs nécessaires à la transcription inverse et à l'amplification en chaîne par polymérase sont ajoutés simultanément dans le même tube Eppendorf (0,5 ml) et les deux réactions sont effectuées pendant le même cycle de programmation dans le thermocycleur [15].

Quatre μl du mix sont ajoutés à 100 μl de Tris, pH 8,8, 50 mM KCl, 200 μM de chaque dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 mg/ml de gélatine, 10 pmol de chaque paire d'amplimères. Dix unités de la transcriptase inverse du virus de la myéloblastose aviaire (AMV-RT, Appligène, Illkirch, France) et 7 unités de la Taq polymérase (Boehringer-Mannheim) sont ajoutées dans chaque tube. Le rapport RT-Taq est inférieur à 3:2 comme le recommandent Sellner *et al* [14]. Après addition de 100 μl d'huile minérale, les tubes sont incubés dans un thermocycleur PTC 100/60 (Prolabo). Le protocole des cycles thermiques est le suivant : 1 heure à 37°C, 5 minutes à 95°C, 40 cycles à 55°C pendant 1 minute, 70°C pendant 2 minutes et 95°C pendant 1 minute puis une étape d'extension terminale à 70°C pendant 8 minutes.

Analyse des produits de la PCR

Dix μl du produit d'amplification de chaque réaction est déposé sur un gel d'agarose à 2% (1% Nu-sieve/1% Sea-kem) (Nalgène, Tebu), dans un tampon Tris-borate EDTA 1 X. La

migration s'effectue pendant 2 heures à 100 V. Après trempage dans du bromure d'éthidium, le gel est observé au transilluminateur. La migration des fragments viraux amplifiés est comparée à celle d'ADN marqueurs de poids moléculaires (marqueur de Boehringer-Mannheim, cat. n° 10662590).

Analyse par polymorphisme des profils de restriction

Des aliquotes de 10 µl des produits d'amplification obtenus à partir des ARN génomiques de chaque sérotype sont hydrolysés par des enzymes de restriction (10 U par réaction) : *Asn* I, *Bam* HI, *Hinf* I, *Pvu* II, *Sac* I, *Sph* I, *Cfo* I (Boehringer-Mannheim) et *Hph* I (Ozyme) sous un volume total de 20 l à 37°C pendant 2 heures.

Les fragments de digestion sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% [18].

Résultats

Recherches virales

Le virus de la peste équine a été isolé à partir de tous les échantillons suspects (rates espagnoles et marocaines) à l'exception des rates marocaines n°1 (Kenitra) et 6 (Missour). Les tests de neutralisation ont confirmé que les virus (souches espagnoles et marocaines) appartenaient au sérotype 4

RT-PCR

Un seul segment de 1179 pb est observé sur gel d'agarose après amplification à partir d'acides nucléiques extraits de cultures cellulaires infectées (Figure 1, puits 2), de cerveaux de souriceaux infectés (Figure 1, puits 3 à 5) et d'échantillons spléniques (Figure. 2A-2B, puits 10).



Figure 1. Produits d'amplification après électrophorèse sur gel d'agarose. Puits 1 : cellules Vero non infectées ; puits 2 : cellules infectées par AHSV-4 ; puits 3 à 5 : cerveaux de souriceaux nouveaux-nés infectés par AHSV-4 ; puits 6 et 7 : cerveaux de souriceaux non infectés. Le marqueur de poids moléculaire (M) est le plasmide de pBR 328 digéré par *Bgl* I et *Hinf* I.

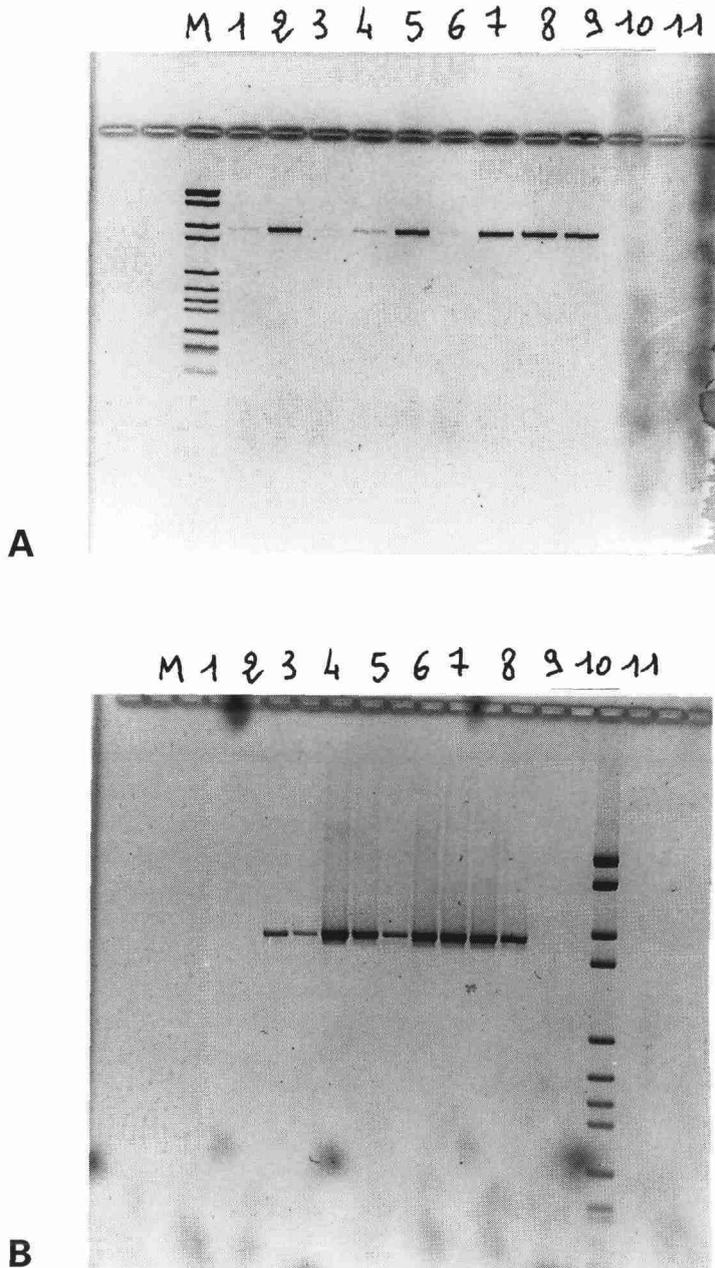


Figure 2. Produits d'amplification obtenus après RT-PCR à partir de rates infectées prélevées sur des chevaux marocains (A) et espagnols (B). A : puits 1 à 9 : rates de chevaux infectés ; puits 10 : rate de cheval marocain non infecté. B : puits 1 à 9 : rates de chevaux infectés ; puits 10 : rate non infectée ; puits 11 : témoin négatif (absence d'ADNc). Le marqueur de poids moléculaire (M) est le plasmide digéré par le *Bgl* I et *Hinf* I.

La Figure 3 représente l'électrophorèse des fragments obtenus après digestion de l'ADN complémentaire (ADNc) du gène 7 du virus AHSV-4 de la souche marocaine par huit enzymes de restriction pour vérification de la spécificité du produit d'amplification. Le profil de restriction obtenu est identique à celui de l'ADNc du gène 7 de la souche espagnole du virus AHSV-4 (données personnelles ; [18]).



Figure 3. Vérification de la spécificité des produits d'amplification après RT-PCR du segment génomique 7 de la souche marocaine du virus AHSV-4 par polymorphisme de restriction. Puits 1 : *Sac* I ; puits 2 : *Hinf* I ; puits 3 : *Bam* H I ; puits 4 : *Pvu* II ; puits 5 : *Sph* I ; puits 6 : *Asn* I ; puits 7 : *Hph* I ; puits 8 : *Cfo* I et puits 9 : ADNc amplifié non digéré. M : marqueur de poids moléculaire.

Comparaison RT-PCR et recherches virales

Le Tableau I résume les résultats respectifs de l'amplification génique RT-PCR et des recherches virales à partir des échantillons biologiques. Dix-huit échantillons spléniques (n°1 à 9 et n°11 à 19) se sont avérés être positifs par RT-PCR. De seize d'entre eux, le virus a pu être isolé par inoculation aux cultures cellulaires et des échantillons n°1 et 6, aucun virus n'a pu être isolé.

Discussion

La mise au point d'une technique RT-PCR effectuée en une seule étape pour la détection du virus de la peste équine est décrite. La transcription inverse ("reverse transcription") suivie d'une amplification en chaîne par polymérase ("polymerase chain reaction" ou PCR) des ARN db génomiques du virus équine par l'emploi d'amplimères spécifiques, associées à une analyse du polymorphisme de restriction, constitue une méthode sensible et relativement rapide pour la détection et l'identification du virus AHSV à partir d'échantillons cliniques.

La technique RT-PCR détecte moins de 600 DCP₅₀ (doses cytopathogènes 50%) (à partir de cultures cellulaires infectées) alors que l'ELISA sandwich n'en détecte que 2,5x10³ DCP₅₀ [7]. Mais les DCP₅₀ ne sont qu'une mesure du pouvoir infectieux et leur corrélation avec le nombre de particules virales, et donc de génomes viraux, n'est pas nécessairement proportionnel. Bien que la RT-PCR se soit révélée positive, aucun virus n'a pu être isolé à partir des deux échantillons 1 et 6. Ces résultats divergents peuvent s'expliquer par une très faible quantité de particules virales dans l'échantillon clinique ou par une inactivation du virus équine à cause d'un délai trop long entre la mort de l'animal et le prélèvement biopsique, ainsi que par les mauvaises conditions de conservation de l'échantillon. Par contre, les ARN génomiques ont pu être amplifiés.

Le diagnostic de laboratoire dans le cas d'une suspicion d'épizootie de peste équine ne doit pas être uniquement basé sur des analyses sérologiques (car un grand nombre d'animaux infectés peuvent mourir avant que les anticorps ne soient décelables) [12], mais sur la détection du virus dans les échantillons cliniques (rates, sang, coeur...) prélevés sur cadavres. La technique d'amplification en chaîne par polymérase est une méthode de détection spécifique, sensible et rapide (les résultats sont obtenus en moins de 48 heures alors que plusieurs jours sont parfois nécessaires pour l'isolement viral). Mais de par l'emploi de quelques réactifs parfois dangereux qu'elle nécessite, et de par les contraintes de locaux et les précautions que cette technique impose afin d'éviter les contaminations, la PCR reste encore réservée à des laboratoires spécialisés.

Remerciements

Nous tenons à remercier le Dr Hooghuis du laboratoire de référence communautaire (Madrid) et le Dr El-Harrack (laboratoire Biopharma à Rabat) pour les échantillons qu'ils nous ont adressés. Ce travail a été financé par la Communauté Economique Européenne (projet 8001-CT 91-0211).

Références

1. Bremer C.W. (1976). A gel electrophoretic study of the protein and nucleic acid components of African horsesickness virus. *Onderstepoort J Vet Res* ; 43 : 193-200.
2. Bremer C.W., Huismans H., Van Dijk A.A. (1990). Characterization and cloning of the African horsesickness virus genome. *J Gen Virol* ; 71 : 793-799.
3. Chomczynski P., Sacchi N. (1987). A single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* ; 162 : 156-159.
4. Chuma T., Le Blois H., Sanchez-Vizcaino J.M., Diaz-Laviada M., Roy P. (1992). Expression of the major core antigen VP7 of the African horsesickness virus by a recombinant baculovirus and its use as a group-specific diagnostic reagent. *J Gen Virol*; 73 : 925-931.
5. Du Toit R.M. (1944). The transmission of bluetongue and horse sickness by Culicoides. *Onderstepoort J Vet Res* ; 50 : 536-541.
6. Grubman M.J., Lewis S.A. (1992). Identification and characterization of the structural and non-structural proteins of African horsesickness virus and determination of the genome coding assignments. *Virology* ; 186 : 444-451.
7. Laviada M.D., Babib M., Dominguez J., Sanchez-Vixcaino J.M. (1992). Detection of African horsesickness in infected spleens by a sandwich ELISA using two monoclonal antibodies spe-

- cific for the VP7. *J Virol Methods* ; 38 : 229-242.
8. Mc Intosh B.M. (1958). Immunological types of horsesickness virus and their significance in immunization. *Onderstepoort J Vet Res* 1 ; 27 : 465-538.
 9. Mizukoshi N., Sakamoto K., Iwata A., Tsuchiya T., Ueda S., Watanabe T., Kamada M., Fukusho A. (1992). The complete sequence of African horsesickness virus serotype 4 (vaccine strain) RNA segment 5 and its predicted polypeptide compared with NS 1 of bluetongue virus. *J Gen Virol* ; 73 : 2425-2428.
 10. Oellermann R.A., Els H.J., Erasmus B.J. (1970). Characterization of African horsesickness virus. *Arch Gesamte Virusforsch* ; 29 : 163-174.
 11. Reed L.J., Muench H. (1938). Simple method of estimating 50 percent end points. *Am J Hyg* ; 27 : 493.
 12. Rodriguez M., Hooghuis H., Castano M. (1993). Current status of the diagnosis and control of African horsesickness. *Vet Res* ; 24 : 189-197.
 13. Roy P., Hirasawa T., Fernandez M., Blinov V.M., Sanchez-Vixcaino R. (1991). The complete sequence of the group-specific antigen, VP 7, of African horsesickness disease virus serotype 4 reveals a close relationship to bluetongue virus. *J Gen Virol* ; 72 : 1237-1241.
 14. Sellner L.N., Coellen R.J., Mackenzie J.S. (1992). Reverse-transcriptase inhibits Taq polymerase activity. *Nucl Acids Res* ; 20 : 1487-1490.
 15. Sellner L.N., Coellen R.J., Mackenzie J.S. (1992). A one-tube, one manipulation RT-PCR reaction for detection of Ross River Virus. *J Virol Methods* ; 40 : 255-264.
 16. Verwoerd D.W., Huisman H., Erasmus B.J. (1979). Orbiviruses. In : Fraenkel-Conrat H., Wagner R.R. eds. *Comprehensive Virology*, Plenum Press, New York, 14 : 285-345.
 17. Wade-Evans A.M., Mertens P.P.C., Bostock C.J. (1990). Development of the polymerase chain reaction for the detection of bluetongue virus in tissue samples. *J Virol Methods* ; 30 : 15-24.
 18. Zientara S., Sailleau C., Moulay S., Crucière C. (1993). Diagnosis and molecular epidemiology of the African horsesickness virus by the polymerase chain reaction and restriction patterns. *Vet. Res* ; in press.

