

UNIVERSITÉ PARIS-EST

ÉCOLE DOCTORALE ABIES

Thèse de doctorat

Champ disciplinaire : Microbiologie

Marion HOLZAPFEL

**De l'épidémiologie moléculaire aux analyses fonctionnelles de
Brucella chez les ruminants, une approche intégrée pour
l'identification et l'étude de la diversité phénotypique d'un genre
génétiquement homogène**

Thèse dirigée par Claire PONSART

Soutenue le 26 novembre 2018

Jury

M. Axel CLOECKAERT, Directeur de recherche, INRA

M. Mathieu PICARDEAU, Directeur de recherche, Institut Pasteur

Mme Nadia HADDAD, Professeure, UMR BIPAR, ENVA

Mme Suzana SALCEDO, Chargée de recherche, CNRS

Mme Céline PUJOL, Chercheure, DGA Maîtrise NRBC

Mme Claire PONSART, Chercheure, ANSES

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Membre invitée

Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Ce projet a été réalisé au sein de l'Unité des Zoonoses Bactériennes de l'ANSES, sous la direction du Docteur Claire Ponsart, et co-financé l'industriel IDVet et par une bourse de la Direction Générale de l'Armement (DGA).

Je souhaite remercier MM Axel Cloeckert et Mathieu Picardeau pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs ; ainsi que Mmes Nadia Haddad et Suzana Salcedo pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse en tant qu'examinatrices.

Je souhaite remercier Pascal Boireau, le directeur du Laboratoire de Santé Animale, de m'avoir accueillie au sein de son établissement, et pour son soutien durant ma thèse.

Je remercie particulièrement Claire Ponsart, ma directrice de thèse, de m'avoir encadrée durant ces 3 années, d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir conseillée et aidée à aller jusqu'au bout.

Je souhaite remercier Philippe Pourquier, directeur de l'entreprise IDVet® à Montpellier, sans qui ce projet n'aurait pas pu voir le jour. Je vous remercie de m'avoir fait confiance et de m'avoir intégrée à votre entreprise. Je pense également à IDVet Genetics avec qui j'ai travaillé, et notamment à Lise Grewis et Mathieu Laffont, mes encadrants, pour leur entrain et leur aide lors de mes déplacements à Montpellier. Merci enfin à Léa et au reste des équipes de Prod et de Dev d'IDVet Genetics.

Je remercie l'école doctorale ABIES et particulièrement Irina Vassileva, qui a été un soutien et avec qui il a été très agréable de travailler pour l'organisation du forum professionnel de l'école doctorale Doc'Avenir 2018.

Je tiens aussi à remercier les membres de mon comité de thèse Sylvie Perelle, David O'Callaghan et Michel Zygmunt, qui ont eu la gentillesse d'accepter de suivre mon travail, et dont les conseils et les critiques m'ont beaucoup aidée. Je souhaite également remercier Céline Pujol, ma tutrice de la DGA.

Je remercie le laboratoire du CAHEC à Qingdao en Chine, et surtout Lili et Dongdong qui m'ont accueillie dans leurs locaux les 2 premières semaines de ma thèse, et m'ont initiée aux traditionnels « gānbēi » lors de diners pantagruéliques.

Je tiens à remercier profondément toutes les équipes du laboratoire vétérinaire IZS de Raguse en Sicile, pour leur accueil si chaleureux et leur aide durant mes 2 semaines sur place. Je tiens particulièrement à remercier Alessandro qui a été très présent tant sur le terrain qu'au laboratoire et qui m'a fait découvrir sa région. Je souhaite également remercier Pipo et sa mère, qui m'ont hébergée et appris à cuisiner sicilien. Ce séjour était une expérience riche, tant scientifiquement que culinairement.

Je souhaite remercier l'Unité Inserm U1047 dirigée par David O'Callaghan, qui m'a accueillie durant 2 mois pour la réalisation de mes expériences d'infections cellulaires. Mon séjour a été un des moments clé de ma thèse et m'a énormément apporté. Je vous remercie du fond du cœur de m'avoir intégrée à votre équipe. Plus particulièrement je souhaite remercier Anne Keriell et David O'Callaghan qui m'ont accordé du temps et

m'ont prodigué de nombreux conseils. Un merci également à Yara Tasrini et Soledad Hielpos grâce à qui mon séjour a été encore plus agréable.

Un énorme merci à toutes les personnes de l'UZB ! Mon Unité d'adoption. Krystel et Guillaume pour leur gentillesse, qui m'ont soutenue même dans les moments difficiles, et qui ont toujours été disponibles. Bérénice, Ludivine et ma super co-doctorante Maëlllys, les 3 folles sans qui ce voyage de 3 ans n'aurait pas eu la même couleur.

L'équipe brucellose : Acacia, Maëline, Thomas et particulièrement Yohan, Yannick, Benoît, Luca et Maryne qui ont su me supporter dans le P3, toujours avec le sourire. Ali, Vincent, Fabien, toujours là pour rigoler ou offrir une croûte de pizza à la cantine.

Virginie Mick qui m'a prise sous son aile et qui m'a transmis sa passion pour la recherche. Toujours à fond pour me faire progresser, et dans la bonne humeur.

Karine, Maria-Laura pour leurs coups de pouce, leurs conseils toujours bienveillants qui m'ont fait avancer.

Egalement merci à Christiane, Madeleine (avec ton rire légendaire), Lorraine, Sylvie, Cécile, Rachid, Rébiha, Claire B., Nora, pour votre gentillesse.

Je souhaite remercier mes amis et à ma famille. Mes sœurs et mes parents, vous me faites grandir et m'épanouir, et je vous remercie pour la relation si simple et forte que nous partageons.

Enfin, je voudrais remercier Nils. Sans en dire plus, car avec ce qui nous attend et qui gigote sous mon nombril, j'ai des frissons et des larmes d'émotion qui montent. Je t'aime.

RÉSUMÉ

La brucellose est une zoonose causée par le genre bactérien *Brucella* (*B.*) dont l'incidence mondiale est estimée à 500 000 cas humains par an. Le réservoir est animal, touchant principalement les espèces de rente. Les espèces les plus importantes pour l'Homme sont *B. melitensis*, *B. abortus* et *B. suis* qui partagent plus de 90% d'identité de séquence. Bien qu'elles soient très apparentées sur le plan génétique, elles présentent une diversité de caractéristiques phénotypiques, de préférence d'hôte et de pathogénicité. L'homogénéité génétique de ces espèces peut apparaître comme un atout pour le développement d'outils de diagnostic universels robustes. En revanche, il s'agit d'un défi pour les distinguer, rendant difficile la caractérisation précise des isolats issus d'un même foyer. Dans le cadre de cette thèse, un outil de diagnostic moléculaire de PCR en temps réel ciblant le genre *Brucella* a été développé et optimisé. L'outil a été évalué sur des prélèvements de lait de ruminants, ces prélèvements non invasifs pouvant être une source importante de *Brucella* et donc utiles au dépistage de la maladie à l'échelle du troupeau. Basée sur la détection de l'élément d'insertion IS711, une séquence présente en plusieurs exemplaires dans le génome, cette méthode affiche des valeurs de sensibilité et de spécificité qui la rendent intéressante pour un schéma global de lutte contre la brucellose. D'autre part, en vue d'améliorer la compréhension de la stabilité génétique de *B. melitensis*, un panel original de souches isolées dans le cadre d'un foyer et impliquant 4 espèces d'hôtes différentes a été étudié. Ainsi à l'aide de différentes approches complémentaires, leurs séquences génomiques, les caractères phénotypiques ainsi que leurs comportements dans un modèle *in vitro* ont été comparés. Nos résultats n'ont pas mis en évidence de marqueurs qui laisseraient à penser que des mutations dans le génome soient indispensables pour s'adapter à un nouvel hôte.

Mots clés : *Brucella*, diagnostic moléculaire, génomique comparative, adaptation, lait

SUMMARY

From molecular epidemiology to functional analysis of *Brucella* in ruminants, an integrated approach for the identification and the study of the diversity of phenotypes from a genetically homogenous genus

Brucellosis is a zoonotic disease caused by the bacterial genus *Brucella* (*B.*), whose global incidence is estimated at 500,000 human cases per year. The reservoir is animal, affecting mainly livestock. The most important species for humans are *B. melitensis*, *B. abortus* and *B. suis*, which share more than 90% sequence identity. Although highly genetically related, *Brucella* spp. exhibit a variety of phenotypical characteristics, host preference and pathogenicity. The genetic homogeneity of these species may appear as an asset for the development of robust universal diagnostic tools. On the other hand, it is a challenge to distinguish them, making it difficult to precisely characterize isolates from the same outbreak. As part of this thesis, a real-time PCR molecular diagnostic tool targeting the genus *Brucella* was developed and optimized. The method has been evaluated on ruminant milk samples; these samples may be an important source of *Brucella* and may be useful for herd-scale disease screening. Based on the detection of the IS711 insertion element, a sequence present in several copies within the genome, this method displays sensitivity and specificity values that make it interesting for a global scheme to fight against brucellosis. On the other hand, in order to improve the understanding of the genetic stability of *B. melitensis*, an original panel of strains isolated in an outbreak and involving four different host species was investigated. Thus, using different complementary approaches, their genomic sequences, phenotypic characteristics and their behavior in an *in vitro* model were compared. Our results did not highlight markers that would suggest that mutations in the genome are essential to adapt to a new host.

Key words: *Brucella*, molecular diagnostic, comparative genomics, adaptation, milk

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN :	Acide Désoxyribonucléique
AMOS-PCR :	Abortus-Melitensis-Ovis-Suis PCR
ANSES :	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, Environnement et Travail
ANSM :	Agence Nationale de Sécurité du Médicament
BCV :	Brucella Containing Vacuole
BHQ :	Black Hole Quencher
CBG :	Bêta-1.2-glucane cyclique
CDC :	Centers for Disease Control and prevention
Cq :	Cycle seuil
Cy5 :	Cyanine5
FAM :	6-carboxyfluorescein
FLSN :	Fluorescéine
FRET :	Fluorecence Resonance Energy Transfer
HOOF :	Hypervariable Octomeric Oligonucleotide Finger Prints
LPS :	LipoPolySaccharide
Mb	Mega bases
MGB :	Minor Groove Binding
MLSA :	Multi locus sequence analysis
MLST :	Multi locus sequence typing
MLVA :	Multi locus VNTR analysis
MOT :	Micro-Organisme et Toxine hautement pathogènes
MRT :	Milk Ring Test, test de l'anneau
NHQ :	Non Fluorescent Quencher
OIE :	Organisation Internationale des Epizooties
Omp :	Outer Membrane Protein
ORF	Cadre de lecture ouvert (Open Reading Frame)
Pb :	Paire de bases
PCR :	Réaction de polymérisation en chaine
RB51 :	Souche vaccinale issues de souches vivantes atténuées de <i>B. abortus</i>
RE :	Réticulum endoplasmique
Rev.1 :	Souche vaccinale issues de souches vivantes atténuées de <i>B. melitensis</i>
ROX :	Carboxy-X-rhodamine
RFLP :	Polymorphisme de longueur de fragment de restriction
SDS :	Sodium Dodecyl Sulfate
SNP :	Single Nucleotide Polymorphism
T4SS :	Système de sécrétion de type 4
TAMRA :	5-carboxytetramethylrhodamine
TLR :	Toll-like Receptor
VIC :	2'-chloro-7'phenyl-1,4-dichloro-6-carboxy-fluorescein
VNTR :	Variable Number of Tandem Repeats
WGS :	Whole Genome Sequencing

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Bref historique de la brucellose	14
Figure 2 Représentation circulaire des chromosomes de <i>Brucella melitensis</i> 16M (adapté de patricsbrc.org) Légende: de l'intérieur vers l'extérieur: G-C%, facteur de virulence, non-CDS, CDS rev, CDS fwd, chromosomes, échelle (Mbp)	18
Figure 3 Trafic intracellulaire des <i>Brucella</i> dans la cellule hôte.....	21
Figure 4 Chronologie d'une infection par <i>Brucella</i> spp., exemple chez une femelle ruminant en cours de gestation (d'après (Philippon <i>et al.</i> 1970, Alton 1985, Godfroid <i>et al.</i> 2010)).....	29
Figure 5 Cartes représentant l'incidence de la brucellose chez l'Homme dans le monde	31
Figure 6 Cartes du nombre de foyers de brucellose (<i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i> et <i>B. suis</i>) chez les ruminants rapportés à WAHIS en 2014.....	31
Figure 7 : Transmission et importance de la brucellose.....	34
Figure 8 Caractéristiques des principaux tests utilisés pour le diagnostic sérologique de la brucellose chez les ruminants.	39
Figure 9 : Biotypage des souches de <i>Brucella</i> spp.	41
Figure 10 La séquence d'insertion IS711 chez <i>Brucella</i>	43
Figure 11 Courbe d'amplification par PCR en temps réel	44
Figure 12 Principe de l'émission de fluorescence des sondes TaqMan.....	45
Figure 13 Méthodes d'extraction et de purification d'ADN sur colonnes ou billes magnétiques	50
Figure 14 Principaux outils de typage moléculaire de <i>Brucella</i> sp. Adapté de (Jay <i>et al.</i> 2014).....	53
Figure 15 Arbres phylogénétiques de <i>Brucella</i> spp. réalisés à partir (A) de marqueurs MLSA21 (adapté de (Whatmore <i>et al.</i> 2016) et (B) des SNPs du core génome (adapté de (Wattam <i>et al.</i> 2014)).....	57
Figure 16 Protocole général d'optimisation de l'extraction d'ADN à partir de lait artificiellement contaminé.....	70
Figure 17 Effet du chauffage dans la détection de l'IS711 dans le lait.....	78
Figure 18 Optimisation de l'extraction d'ADN à partir de lait artificiellement contaminé, à partir de 3 kits commerciaux.....	80
Figure 19 Effet du temps de conservation de lait +4°C sur la détection de l'IS711 des contrôles internes endogène et exogène par PCR IDBRU à partir d'échantillons de lait cru contaminés artificiellement par <i>B. melitensis</i> 16M.....	82
Figure 20 Comparaisons multiples de cibles pour la détection de <i>Brucella</i> spp. à partir de lait naturellement contaminé	84
Figure 21 Différences moyennes des nombres de cycles observés pour les différentes fractions du lait (lait, gras, surnageant, culot, comparés 2 à 2) utilisées pour la détection de <i>Brucella</i> spp. par PCR IDBRU	86
Figure 22 Détection des contrôles internes de la méthode IDBRU en fonction de la matrice testée après centrifugation du lait (lait total, gras, surnageant, culot)	86
Figure 23 Comparaison de la précocité de détection de <i>Brucella</i> à partir d'échantillons de lait congelés naturellement contaminés, pour 3 kits d'extraction ayant présenté les meilleures performances analytiques	87
Figure 24 Proposition d'intégration de la PCR dans la procédure de diagnostic de la brucellose chez les ruminants en région indemne (exemple de la France).....	127

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Espèces de <i>Brucella</i> et leurs hôtes de préférence.....	17
Tableau 2 Caractéristiques des génomes de <i>B. ovis</i> , <i>B. suis</i> , <i>B. abortus</i> et <i>B. melitensis</i> (d'après (Tsolis <i>et al.</i> 2009)).....	19
Tableau 3 Modèles cellulaires d'étude de la pathogénicité chez <i>Brucella</i> spp.....	23
Tableau 4 Excrétion de <i>Brucella</i> dans le lait de vache (adapté de (Garin-Bastuji 2011)).	27
Tableau 5 Principales méthodes de diagnostic sérologique de la brucellose chez les ruminants (d'après (OIE 2016)).	38
Tableau 6 Comparaison de l'utilisation de molécules fluorescentes et de sondes spécifiques pour le diagnostic par PCR en temps réel	44
Tableau 7 : Détection des souches vaccinales de <i>Brucella</i>	46
Tableau 8 Limite de détection de méthodes PCR utilisant différentes amorces publiées pour la détection du genre <i>Brucella</i>	47
Tableau 9 Limite de détection du genre <i>Brucella</i> par PCR dans différentes matrices	49
Tableau 10 Types de contrôle de PCR en temps réel	52
Tableau 11 Kits commerciaux de PCR pour le diagnostic de la brucellose.....	65
Tableau 12 Description des analyses réalisées sur les échantillons de lait de terrain.....	67
Tableau 13 Protocoles testés dans cette étude.....	69
Tableau 14 Séquences des amorces et sondes utilisées en PCR en temps réel dans cette étude.....	71
Tableau 15 Interprétation des résultats de PCR IDBRU en fonction des valeurs de Cq obtenus avec la cible IS711 et les contrôles internes exogène et endogène.....	73
Tableau 16 Limite de détection de la PCR IDBRU	77
Tableau 17 Limite de détection de la méthode PCR IDBRU à partir de lait.....	81
Tableau 18 Comparaison des proportions d'échantillons détectés par PCR IDBRU et par culture à partir d'échantillons de laits de vaches naturellement infectées (seuil de positivité Cq=40).	85
Tableau 19 Comparaison des proportions d'échantillons détectés par PCR IDBRU et par culture à partir d'échantillons congelés de lait de chèvres issues de troupeaux avec historique de brucellose (tableau de contingence).....	88
Tableau 20 Résultats de sérologie et de PCR sur lait de vache (prélèvements individuels et lait de tank) de différents troupeaux de Sicile.....	89
Tableau 21 Limite de détection de diverses PCR selon les protocoles d'extraction d'ADN, à partir de lait	92
Tableau 22 Comparaison des proportions d'échantillons détectés par PCR IDBRU et par culture à partir d'échantillons congelés de lait de vaches et chèvres issues de troupeaux avec historique de brucellose.....	98
Tableau 23 Récapitulatif des valeurs de sensibilité et spécificité de la méthode PCR IDBRU comparée à l'isolement bactérien, à partir de prélèvements de lait congelés.	98

SOMMAIRE

RÉSUMÉ	5
SUMMARY	5
LISTE DES ABBREVIATIONS	7
LISTE DES FIGURES	8
LISTE DES TABLEAUX.....	9
INTRODUCTION GENERALE	13
A. Les bactéries du genre <i>Brucella</i>	15
A.1. Caractéristiques bactériologiques	15
A.2. Taxonomie	16
A.3. Génomique	18
B. <i>Brucella</i> pathogène intracellulaire : caractérisation de la pathogénicité	20
B.1. Facteurs de virulence	20
B.2. Infection de macrophages par <i>Brucella</i> , pathogène intracellulaire.....	20
B.3. Autres modèles cellulaires d'étude de la pathogénicité.....	22
C. La brucellose du point de vue de l'hôte.....	24
C.1. Chez l'Homme.....	24
C.2. Chez les ruminants	24
C.2.1. Signes cliniques.....	24
C.2.2. Pathogénie, excrétion et réponse immunitaire chez les ruminants	26
C.2.2.1. Pathogénie	26
C.2.2.2. Excrétion dans le lait	27
C.2.2.3. Réponse immunitaire.....	28
D. Epidémiologie de la brucellose, zoonose mondiale	30
D.1. Importance et répartition mondiale.....	30
D.2. Étiologie, source et transmission	32
D.3. Prévention, traitement et programme de lutte.....	35
D.3.1. Maladie règlementée.....	35
D.3.2. Chez l'Homme.....	35
D.3.3. Chez les ruminants.....	35
E. Diagnostic chez les ruminants	37
E.1. Diagnostic indirect : détection de la réponse humorale	37
E.2. Diagnostic direct de référence : l'isolement bactériologique.....	40
E.3. Diagnostic direct moléculaire de la brucellose	41
E.3.1. Principaux gènes cibles spécifique du genre <i>Brucella</i>	42
E.3.2. La méthode de PCR au service du diagnostic de la brucellose	43
E.3.2.1. La méthode de PCR conventionnelle	43
E.3.2.2. La méthode de PCR en temps réel	44
E.3.3. Avantages et limites de la méthode PCR dans le diagnostic de la brucellose	46
E.3.4. L'extraction de l'ADN et substances inhibitrices de PCR	47
E.3.4.1. Importance de la matrice de départ	47
E.3.4.2. Extraction et purification de l'ADN	49
E.3.5. Importance des contrôles internes pour assurer la fiabilité du diagnostic.....	51
F. Outils moléculaires utilisés du typage moléculaire à l'analyse génomique fonctionnelle.....	53
F.1. Typage moléculaire : de la taxonomie à la phylogénie.....	53
F.2. Séquençage du génome : de la phylogénie à la génomique comparative	57
OBJECTIFS ET PROBLEMATIQUE.....	59
PARTIE 2 : TRAVAIL EXPERIMENTAL.....	63
Chapitre I : Optimisation d'un outil de diagnostic moléculaire pour le genre <i>Brucella</i> à partir de prélèvements de lait	64

A.	INTRODUCTION.....	64
B.	MATERIEL ET METHODES	66
B.1.	Souches bactériennes.....	66
B.2.	Echantillons de lait de terrain	66
B.3.	L'extraction d'ADN.....	68
B.3.1.	Protocoles d'extraction d'ADN utilisés.....	68
B.3.2.	Matrice de lait utilisée pour la comparaison des protocoles d'extraction d'ADN.....	70
B.4.	Caractéristiques de la méthode PCR en temps réel	71
B.4.1.	Amorces et sondes pour la détection de <i>Brucella</i> spp. par IDBRU.....	71
B.4.2.	Contrôles interne de la PCR IDBRU	72
B.4.3.	Conditions de la méthode PCR IDBRU	73
B.5.	Sensibilité et spécificité analytique de la PCR IDBRU.....	73
B.6.	Effet de la conservation à +4 °C de lait artificiellement contaminé sur la détection par PCR	74
B.7.	Isolement de <i>Brucella</i> spp. par culture et bio-typage	74
B.8.	Analyses sérologiques des laits	75
B.9.	Analyses statistiques.....	75
C.	RESULTATS	76
C.1.	Performances analytiques de la PCR IDBRU	76
C.1.1.	Spécificité analytique.....	76
C.1.2.	Limite de détection analytique (sensibilité analytique)	76
C.2.	Optimisation de la méthode complète à partir de lait artificiellement contaminé par <i>Brucella</i>	77
C.2.1.	Inactivation de <i>Brucella</i> spp. pour augmenter la biosécurité.....	77
C.2.2.	Evaluation de la capacité d'extraction d'ADN de kits commerciaux en fonctions de certains paramètres (lait artificiellement contaminé).....	78
C.2.3.	Limite de détection de la méthode complète sur lait artificiellement contaminé	80
C.2.4.	Effet de la conservation à +4 °C sur la détection de <i>Brucella</i> spp. par PCR.....	81
C.3.	Analyse d'échantillons de lait de terrain : évaluation de la capacité d'extraction d'ADN de kits commerciaux et de la PCR IDBRU par rapport à l'isolement bactérien et la sérologie	82
C.3.1.	Analyse de prélèvements congelés de lait issus de vaches naturellement contaminées (Chine).....	83
C.3.1.1.	Comparaison de la cible IS711 de la méthode IDBRU <i>versus</i> d'autres cibles décrites (échantillons congelés de laits de bovins de Chine).....	83
C.3.1.2.	Comparaison des performances de détection par PCR IDBRU et par isolement bactérien (échantillons congelés de laits de bovins de Chine)	84
C.3.1.3.	Effet de la centrifugation du lait sur les performances de détection de la PCR IDBRU (échantillons congelés de laits de bovins de Chine).....	85
C.3.1.4.	Comparaison de 3 kits d'extraction (échantillons congelés de laits de bovins de Chine)	87
C.3.2.	Analyse de prélèvements congelés de lait issus de chèvres naturellement contaminées (Sultanat d'Oman) : comparaison des performances de détection par isolement bactérien et par PCR IDBRU	87
C.3.3.	Analyse de prélèvements de lait frais issus de vaches naturellement contaminées (Sicile) : comparaison des performances de détection par PCR IDBRU et sérologie	88
D.	DISCUSSION	90
D.1.	Etude de la sensibilité analytique de la méthode IDBRU	90
D.2.	Intérêt des contrôles internes.....	92
D.3.	Travail de la matrice lait : limite et optimisation en vue de la PCR IDBRU	94
D.3.1.	Optimisation de la méthode d'extraction d'ADN à partir de lait	94
D.3.2.	Effet de la conservation	95
D.3.3.	Intérêt de la matrice « gras » obtenue après centrifugation	96
D.4.	Etude de la sensibilité et spécificité diagnostiques à partir d'échantillons de terrain	97
D.4.1.	Sensibilité diagnostique de la PCR IDBRU par rapport à la culture.....	97
D.4.2.	Comparaison à la sérologie.....	100
D.5.	Bilan : intérêt de la matrice lait dans le diagnostic par méthode PCR de la brucellose	101
D.6.	Conclusion.....	101
D.7.	Travaux en perspective sur l'amélioration de la PCR dans le diagnostic de la brucellose	102
Chapitre II : Etude de la possible adaptation de <i>B. melitensis</i> biovar 3 à un changement d'hôte.		104
A.	Résumé de l'article en français	104

B. Article	105
PARTIE 3 : DISCUSSION GENERALE	121
A. Biologie moléculaire au service de l'étude d'agent pathogène monophylétique : Intégrer la PCR IDBRU dans le processus global de diagnostic de la brucellose	122
A.1. Utilisation de la PCR en zone indemne de brucellose chez les ruminants - Exemple de la France	124
A.2. Utilisation de la PCR en zone endémique de brucellose	127
B. Importance de la sélection de la population bactérienne dans une étude comparative	128
C. Limite et complémentarité des outils permettant de comparer les génomes et des outils d'analyse fonctionnelle de virulence	129
C.1. Séquençage et outils bio-informatiques d'analyse de génome	129
C.2. Modèles cellulaires pour l'étude de la pathogénicité de <i>Brucella</i> spp.	131
D. Notion d'adaptation à un stress et d'évolution chez <i>Brucella</i> spp.	132
E. La notion de préférence d'hôte chez <i>Brucella</i> spp.	134
F. Forte stabilité du génome de <i>Brucella</i> spp.	135
CONCLUSION GENERALE	137
REFERENCES	141
ANNEXES	163

INTRODUCTION GENERALE

David Bruce et Lady Bruce sont les premiers à isoler *Micrococcus melitensis* (*Brucella* (*B.*) *melitensis*) en 1887 à Malte, à partir de la rate d'un soldat britannique décédé d'une fièvre de Malte (Hughes 1893). Quelques années plus tard Themistocles Zammit démontra la nature zoonotique de cette fièvre, en isolant *B. melitensis* à partir de prélèvements de lait de chèvre. Depuis, d'autres espèces de *Brucella* ont été décrites comme agents pathogènes responsables de la brucellose chez de nombreuses espèces animales domestiques, sauvages terrestres et marines (nom adopté en 1920 (Meyer and Shaw 1920) (Figure 1).

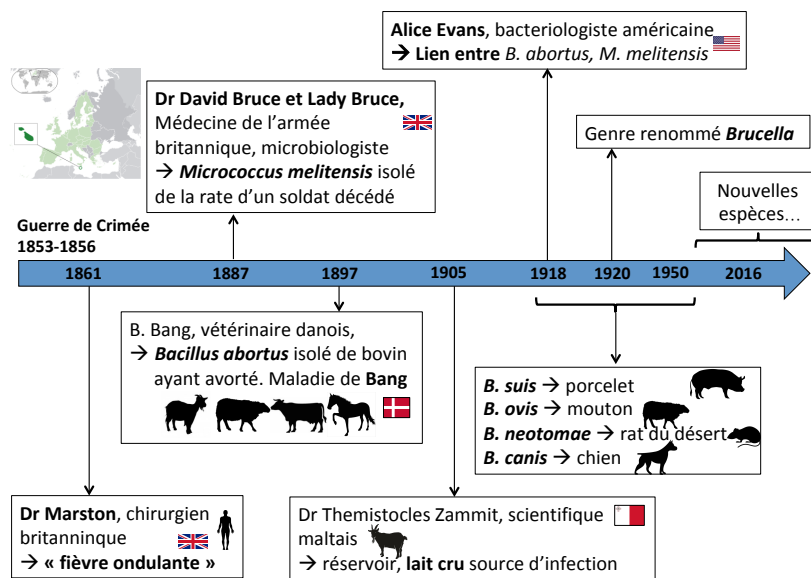


Figure 1 Bref historique de la brucellose

(Bang 1897, Traum 1914, Evans 1918, Meyer and Shaw 1920, Buddle 1956, Stoenner and Lackman 1957, Carmichael and Bruner 1968, Wyatt 2013, Scholz *et al.* 2018)

L'introduction générale de ce travail de thèse comprendra 6 parties détaillant les caractéristiques phénotypiques, génomiques, et de pathogénicité du genre *Brucella* ; les particularités de la brucellose du point de vue de l'hôte (des signes cliniques à l'épidémiologie de la maladie dans le monde) ; les outils de diagnostic et de typage ainsi que les principales connaissances issues de l'analyse fonctionnelle des génomes de *Brucella*.

A. Les bactéries du genre *Brucella*

A.1. Caractéristiques bactériologiques

Les bactéries du genre *Brucella* sont des coccobacilles Gram négatifs mesurant 0,6 à 1,5 µm x 0,5 à 0,7 µm, non motiles (malgré la présence des gènes codant pour un flagelle (Fretin *et al.* 2005)), non sporulés et non capsulés. Intracellulaires/extracellulaires facultatifs : les *Brucella* se multiplient dans des cellules phagocytaires (macrophages et cellules dendritiques) et non phagocytaires (cellules trophoblastiques). Les bactéries du genre *Brucella* sont capables de produire la catalase, la cytochrome oxydase et la nitrite réductase. La plupart des espèces sont capables d'hydrolyser l'urée (Scholz *et al.* 2018).

Elles poussent en 3-4 jours sur milieux gélosés à 37°C, en milieu aérobie ou supplémenté avec 5% de CO₂. Certaines espèces sont dépendantes de la présence en CO₂ (certains biovar de *B. abortus* et *B. ovis*), critère étudié lors du typage phénotypique. Les espèces « classiques » (*cf* paragraphe A.2 Taxonomie) ont une vitesse de croissance plus lente que certaines espèces atypiques récemment isolées (*B. microti* et *B. inopinata*) qui possèdent des vitesses de croissance plus proches des bactéries du genre *Ochrobactrum* (colonies visibles en moins de 24 h de culture en conditions optimales)

Les colonies des *Brucella* varient en fonction des espèces, leur morphologie étant liée à la composition du LPS de la paroi externe.

- Les *Brucella* « lisses » (smooth, S) : les colonies « lisses » sont rondes, translucides, convexes avec des contours nets,
- Les *Brucella* « rugueuses » (rough, R) : les colonies sont de taille et de forme identiques, granuleuses, mais de couleur plus opaque avec des bords irréguliers, de couleur blanche mate à marron. *B. ovis* et *B. canis* sont les seules espèces rugueuses.

Les colonies lisses peuvent se dissocier en colonies rugueuses avec le temps (cultures anciennes).

Brucella spp. peut survivre plusieurs semaines voire quelques mois dans la poussière, l'eau, les tissus d'avortons, la viande et les produits laitiers (*cf* Revue en Annexe 4) (Corbel *et al.* 2006).

A.2. Taxonomie

Le genre *Brucella* appartient à la classe des alpha-2 Protéobactéries, comme les genres bactériens *Ochrobactrum*, *Agrobacterium*, *Bartonella*, *Rickettsia*, à l'ordre des Rhizobiales, et à la famille des *Brucellaceae* (Yanagi and Yamasato 1993). D'après la séquence de leur ARNr 16S, il s'agit d'un groupe monophylétique, dont le genre le plus proche phylogénétiquement est *Ochrobactrum*, genre comportant des espèces saprophytes dont certaines peuvent être des pathogènes opportunistes chez l'Homme (Kampfer *et al.* 2007, Scholz *et al.* 2008). Cette proximité est importante à considérer lors de l'élaboration et l'interprétation de tests sérologiques et moléculaires pour le diagnostic de la brucellose.

Actuellement, 12 espèces sont reconnues :

- Six espèces « classiques » : *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*,
- Les espèces découvertes plus récemment : *B. microti*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. inopinata*, *B. vulpis*, *B. papionis*.

(Hughes 1893, Schmidt 1901, Traum 1914, Buddle 1956, Stoenner and Lackman 1957, Carmichael and Bruner 1968, Foster *et al.* 2007, Scholz *et al.* 2008, Scholz *et al.* 2010, Whatmore *et al.* 2014, Scholz *et al.* 2016)

Trois espèces sont subdivisées en biovars : *B. melitensis* regroupe 3 biovars (1-3), *B. abortus* regroupe 7 biovars (1-6, 9) et *B. suis* en regroupe 5 (1-5). Un biovar se définit comme un ensemble de souches d'une même espèce possédant des critères biochimiques et physiologiques communs.

Le nom d'espèce est lié à l'espèce animale à partir de laquelle la bactérie a été isolée la première fois. Cela correspond parfois à son hôte préférentiel, c'est à dire l'espèce chez qui elle est majoritairement isolée (Tableau 1).

Tableau 1 Espèces de *Brucella* et leurs hôtes de préférence(Garin-Bastuji *et al.* 2014, OIE 2016)

Espèce de <i>Brucella</i>	Espèce animale majoritaire (*hôte préférentiel)	Pathogénicité pour l'Homme
<i>B. abortus</i> biovar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9	Bovin domestique* (<i>Bos taurus</i>), buffle* (<i>Bubalus bubalis</i>), bison* (<i>Bison spp.</i>), yak (<i>Bos grunniens</i>), élan (<i>Cervus canadensis</i>), chameau (<i>Camelus spp.</i>)	Modérée
<i>B. melitensis</i> biovar 1, 2, 3	Ovin* (<i>Ovis spp.</i>) et caprin* (<i>Capra spp.</i>), bovin, chamois (<i>Rupicapra rupicapra</i>), bouquetins (<i>Capra ibex</i>), chameau	Forte
<i>B. suis</i> biovar 1, 2, 3, 4, 5	Biovar 1 et 3 : porc domestique* (<i>Sus scrofa domesticus</i>) et sauvage* (<i>Sus scrofa</i>). Biovar 2 : sanglier* (<i>Sus scrofa</i>), lièvre* (<i>L. europaeus</i>) Biovar 4 : caribou* et renne* (<i>Rangifer tarandus</i>) Biovar 5 : rongeurs sauvages*	Biovar 1, 3, 5 : forte Biovar 2 : très faible Biovar 4 : modérée
<i>B. ovis</i>	Ovin*,	Nulle
<i>B. canis</i>	Chien* (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Faible
<i>B. neotomae</i>	Rat du désert (<i>Neotoma lepida</i>)	Inconnue
<i>B. microti</i>	Campagnol (<i>Microtus arvalis</i>)	Inconnue
<i>B. ceti</i> , <i>B. pinnipedialis</i>	Cétacés* et pinnipèdes* resp.	Faible
<i>B. vulpis</i>	Renard roux (<i>Vulpes vulpes</i>)	Inconnue
<i>B. papionis</i>	Babouin (<i>Papio spp.</i>)	Inconnue
<i>B. inopinata</i>	Humain, grenouilles	Inconnue

Depuis la définition du genre *Brucella* en 1920 (Meyer and Shaw 1920) et encore aujourd'hui, la classification des espèces de *Brucella* fait débat. Initialement, la distinction des différentes espèces était justifiée par l'étude du phénotype, l'épidémiologie de la maladie et la préférence d'hôte.

Plus tard en 1986, sur la base de critères génétiques et immunologiques, le genre *Brucella* a été re-classifié en une espèce unique, *B. melitensis*, contenant différents biovars (correspondant aux espèces décrites actuellement). En effet, les techniques d'hybridation ADN/ADN mettent en évidence plus de 90% d'identité des séquences ADN entre les différentes espèces « classiques », critère permettant la définition d'une espèce bactérienne (le seuil étant de 70% d'hybridation ADN-ADN (Wayne *et al.* 1987)) (Verger *et al.* 1985).

Néanmoins, en 2003, la communauté scientifique s'accorde pour un retour vers la classification d'origine, encore utilisée actuellement. Aux critères phénotypiques et épidémiologiques utilisés s'ajoutent les résultats de nombreuses analyses moléculaires : électrophorèse en champs pulsé (pulse-field gel electrophoresis, PFGE), analyse de VNTR (Multi-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis, MLVA), analyse de gènes de ménage (Multi-Locus Sequence Analysis, MLSA) et plus récemment par les

études du polymorphisme de nucléotide simple (Single Polymorphism Nucleotides, SNPs) (Foster *et al.* 2012).

A.3. Génomique

Le génome des espèces de *Brucella* spp. décrites à ce jour contient 2 chromosomes circulaires, sauf *B. suis* biovar 3 qui ne possède qu'un seul chromosome. Des bactériophages de *Brucella* ont été isolés (Corbel 1987), mais pas de plasmides ni de phages lysogéniques. La taille du génome est de 3,29 Mb environ, dont 2,11 Mb et 1,18 Mb pour les chromosome I et chromosome II respectivement (DelVecchio *et al.* 2002, Paulsen *et al.* 2002, Halling *et al.* 2005) (Figure 2, Tableau 2). Environ 3200-3400 gènes sont décrits, et le pourcentage de GC est en moyenne de 57,2%.

Le premier génome de *Brucella* séquencé est celui de la souche *B. melitensis* 16M en 2002 (DelVecchio *et al.* 2002), suivi de celui de la souche *B. suis* 1330 (Paulsen *et al.* 2002), et des souches *B. abortus* 3208 et 9-941 (Chain *et al.* 2005, Halling *et al.* 2005).

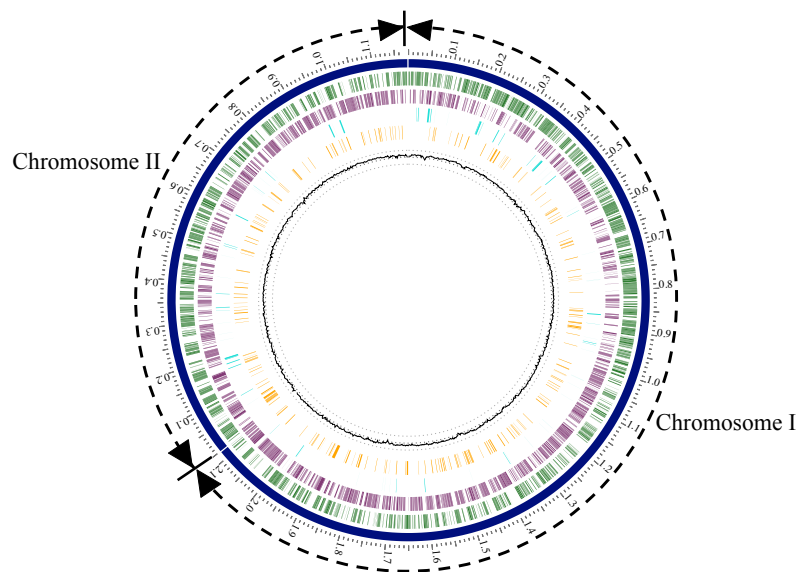


Figure 2 Représentation circulaire des chromosomes de *Brucella melitensis* 16M (adapté de patricsbrc.org) Légende: de l'intérieur vers l'extérieur: G-C%, facteur de virulence, non-CDS, CDS rev, CDS fwd, chromosomes, échelle (Mbp)

Tableau 2 Caractéristiques des génomes de *B. ovis*, *B. suis*, *B. abortus* et *B. melitensis*
(d'après (Tsolis *et al.* 2009))

	<i>B. ovis</i> ATCC 25840		<i>B. suis</i> 1330		<i>B. abortus</i> 2308		<i>B. melitensis</i> 16M	
	Chr I	ChrII	Chr I	ChrII	Chr I	ChrII	Chr I	ChrII
Taille (pb)	2111370	1164220	2107792	1207381	2121359	1156950	2117144	1177787
GC %	57,2	57,2	57,2	57,3	57,2	57,3	57,2	57,3
Nb gènes codant des protéines	1928	962	2123	1149	2000	1034	2090	1075
Nb opérons ARNr	2	1	2	1	2	1	2	1
Nb ARNt	39	14	41	14	41	14	40	14
Nb de pseudogènes (%)	119 (5,8)	125 (11,5)	61 (2,8)	1 (0,1)	186 (8,5)	130 (11,2)	83 (3,8)	80 (6,9)
Nb d'IS711	25	13	5	2	5	2	5	2

Les premières analyses comparatives ont permis de confirmer le très fort degré de conservation entre les génomes avec une moyenne de 1 SNP pour 463 nucléotides (O'Callaghan and Whatmore 2011). Par exemple chez *B. abortus* souche 9-941, *B. melitensis* souche 16M et *B. suis* souche 1330 plus de 90% des gènes annotés possèdent 98-100% d'identité de séquence (à l'échelle nucléotidique) (Chain *et al.* 2005, Ratushna *et al.* 2006). L'architecture du génome de 6 espèces de *Brucella* (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ceti*, *B. ovis*) est décrite comme similaire, sauf pour *B. suis* biovar 2, qui présente une translocation de 210 kb du chromosome I au chromosome II, et *B. abortus* une inversion de 700 kb dans le chromosome II (Wattam *et al.* 2009).

A l'heure actuelle, au moins un représentant de chaque espèce et chaque biovar est séquencé. Les séquences publiques sont disponibles via plusieurs sites spécialisés sur *Brucella* :

- *Brucella* Bioinformatique Portal
(<http://www.phidias.us/bbp/data/index.php>),
- PATRICS (Pathosystems Resource Integration Center)
(https://patricbrc.org/view/Taxonomy/234#view_tab=overview)
- Broad Institute (<https://olive.broadinstitute.org/projects/brucella>)

L'apport du séquençage de génomes complets de nombreuses souches de *Brucella* sp. est détaillé dans un paragraphe ultérieur (*cf* partie F.2 de l'Introduction Générale).

B. *Brucella* pathogène intracellulaire : caractérisation de la pathogénicité

B.1. Facteurs de virulence

Les bactéries du genre *Brucella* ne présentent pas de facteurs classiquement impliqués dans la virulence comme les capsules, plasmides, formes de résistance, pili, et exotoxines. Néanmoins ces bactéries sont capables de pénétrer et de se répliquer dans les cellules de l'hôte en s'adaptant à des conditions environnementales pauvres en nutriments et en oxygène, à des pH acides et en échappant au système immunitaire de l'hôte. Les « facteurs de virulence » décrits chez *Brucella* sont des composants de l'enveloppe cellulaire, des systèmes de sécrétion, des systèmes de régulation, des transporteurs et des effecteurs, à savoir principalement : le lipopolysaccharide (LPS), les Bêta-1,2-glucanes cycliques (C β G), le système à deux composants BvrR/BvrS, le système de sécrétion de type 4 T4SS VirB, et quelques protéines de la membrane externe (Omp).

Le principal facteur antigénique est le LPS (Lapaque *et al.* 2005), composant essentiel de la membrane externe des bactéries Gram négative, composé du lipide A, du core oligosaccharidique et de l'antigène O (chaîne polysaccharidiques). Chez les espèces rugueuses, le LPS ne possède pas de chaîne O-polysaccharides (R-LPS) (Seleem *et al.* 2008).

B.2. Infection de macrophages par *Brucella*, pathogène intracellulaire

Brucella spp. sont capables d'infecter des cellules phagocytaires (macrophages, cellules dendritiques, polynucléaires neutrophiles), et des cellules non-phagocytaires comme les fibroblastes, trophoblastes, cellules épithéliales (Moreno and Gorvel 2004). Ces différents modèles sont ainsi autant d'outils d'étude de la pathogénicité (von Bargen *et al.* 2012) (Figure 3).

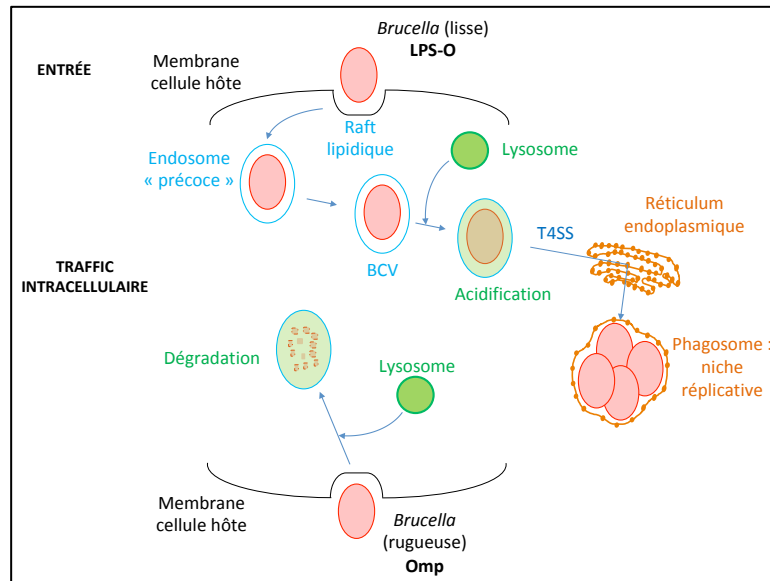


Figure 3 Trafic intracellulaire des *Brucella* dans la cellule hôte

Etape de l'infection cellulaire : Adhésion, entrée, trafic intracellulaire, réplication et survie, avec adaptation au milieu intracellulaire et échappement au système immunitaire. BCV : vacuole contenant les *Brucella* répliquatives ; T4SS : système de sécrétion de type IV. Adapté de (Atluri *et al.* 2011, de Figueiredo *et al.* 2015).

L'adhésion cellulaire implique des récepteurs de l'hôte contenant de l'acide sialique et des résidus sulfatés, et des adhésines bactériennes comme SP41, mis en évidence chez *B. abortus* dans les cellules HeLa mais dont l'importance *in vivo* n'a pas été montrée. Puis, *Brucella* pénètre dans la cellule hôte en quelques minutes (Castaneda-Roldan *et al.* 2006). L'entrée des *Brucella* lisses dans les phagocytes professionnels est dépendante de la formation de radeaux lipidiques (Barquero-Calvo 2007). Ce mode d'entrée, lié en partie à l'Ag-O du LPS, contribue au contrôle de la réponse immunitaire de l'hôte pendant la phase précoce de l'infection en limitant la fusion phagosome-lysosome. Initialement il était admis que les *Brucella* rugueuses dont le LPS ne possède pas de chaînes O-polysaccharidiques, entraînent de manière indépendante des radeaux lipidiques, et seraient rapidement tuées, incapables de limiter l'activation des macrophages (Porte *et al.* 2003). Néanmoins, une étude récente a mis en évidence que l'entrée des *Brucella* naturellement rugueuses, *B. ovis* et *B. canis*, est dépendante des radeaux lipidiques, suggérant ainsi que d'autres acteurs entreraient en jeu (Martin-Martin *et al.* 2010).

Une fois entrée dans les cellules, *Brucella* se situe dans une vacuole BCV (*Brucella* containing Vacuole), qui suit la voie endocytaire et mature. Rapidement, la BCV interagit avec les endosomes précoces et tardifs qui acquièrent des marqueurs membranaires. Les BCV interagissent également avec les lysosomes, entraînant la destruction de près de 90% des *Brucella* dans les heures qui suivent l'infection. Les 10%

qui survivent rejoignent le réticulum endoplasmique (RE) (von Bargen *et al.* 2012). Certains facteurs de virulence permettent de limiter l'interaction avec les lysosomes (C β G périplasmiques, LPS), ce qui réduit la destruction des bactéries. Elle est néanmoins indispensable à l'acidification de la BCV, induisant l'expression de l'opéron *virB*, codant pour le T4SS, dont les effecteurs sont essentiels à manipulation du trafic intracellulaire et à l'établissement d'une niche répliquative dans le RE (Boschiroli *et al.* 2002, Lacerda *et al.* 2013). La membrane des BCV acquiert des marqueurs membranaires du RE, qui est la principale source de membrane lors de la répliquation de *Brucella*. La répliquation et la persistance intracellulaires sont dépendantes du T4SS VirB et de ses protéines effectrices ainsi que des C β G périplasmiques qui modifient les sécrétions protéiques de la cellule (Arellano-Reynoso *et al.* 2005). La répliquation intensive de *Brucella* ne perturbe pas l'intégrité de la cellule hôte (von Bargen *et al.* 2012). Les mécanismes de sortie et dissémination entre cellules ne sont néanmoins pas totalement élucidés.

Grâce à l'expression de certains facteurs de virulence, les *Brucella* sont capables de limiter leur reconnaissance par les cellules immunitaires, de résister aux défenses innées, de limiter l'activation et la maturation des cellules immunitaires (macrophages, cellules dendritiques et polynucléaires neutrophiles). Les *Brucella* inhibent l'apoptose des macrophages murins et humains *in vitro*, malgré leur forte répliquation (Gross *et al.* 2000, Wang *et al.* 2001), ce qui leur permet de persister sans entraîner d'activation d'autres éléments du système immunitaire.

B.3. Autres modèles cellulaires d'étude de la pathogénicité

Pour étudier la virulence *in vitro* de *Brucella*, le modèle d'infection de macrophages est le plus largement utilisé (majoritairement de souris et d'humain) (He 2012), mais d'autres modèles cellulaires ont également été publiés comme les cellules dendritiques, les neutrophiles, les trophoblastes, les cellules épithéliales (von Bargen *et al.* 2012). Le Tableau 3 décrit quelques modèles cellulaires publiés.

Tableau 3 Modèles cellulaires d'étude de la pathogénicité chez *Brucella* spp.

mdDC : Monocyte-derived dendritic cells ; BMDC : Bone-marrow-derived dendritic cells ; mDM : monocytes derived macrophages ; Bovin (*Bos taurus*) ; Humain (*Homo sapiens*) ; *Phoque à capuchon (*Cystophora cristata*) ; Ovin (*Ovis* spp.) ; Zébu (*Bos taurus indicus*) ; Souris (*Mus musculus*) ; Sanglier (*Sus Scrofa*) ; Singe vert Africain (*Chlorocebus* spp.) ; PNN : polynucléaires neutrophiles.

Type cellulaire	Nom de la lignée	Tissu d'origine	Animal d'origine	Référence
Cellule dendritique	mdDC	Sang	Bovin	(Heller <i>et al.</i> 2012)
	-	Sang	Humain	(Billard <i>et al.</i> 2007)
	BMDC	Moelle osseuse	Souris	(Macedo <i>et al.</i> 2008, Salcedo <i>et al.</i> 2008)
Cellule épithéliale	HeLa	Tumeur maligne du col de l'utérus	Humain	(Rossetti <i>et al.</i> 2009, Rossetti <i>et al.</i> 2011, Kim <i>et al.</i> 2012, Larsen <i>et al.</i> 2013)
	-	Os (Ostéoblaste)	Humain	(Delpino <i>et al.</i> 2009, Scian <i>et al.</i> 2012)
	MC3T3-E1	Os (Ostéoblaste)	Souris	(Gentilini <i>et al.</i> 2018)
	O-Y4	Os (Ostéocyte)	Souris	(Pesce Viglietti <i>et al.</i> 2016)
	Vero	Rein	Singe	(Deltieux <i>et al.</i> 1990)
	-	Rate	Souris	(Roux <i>et al.</i> 2007, Brandao <i>et al.</i> 2012)
	-	Rate	Sanglier	(Galindo <i>et al.</i> 2010)
	-	Placenta	Bovin	(Carvalho Neta <i>et al.</i> 2008)
	JEG-3, BeWo, HTR8	Placenta	Humain	(Salcedo <i>et al.</i> 2013, Fernandez <i>et al.</i> 2016)
	Hep-G2	Foie	Humain	(Delpino <i>et al.</i> 2010)
Cellule gliale	-	Système nerveux central	Souris	(Larsen <i>et al.</i> 2016)
	-	-	Phoque*	
Macrophage	-	Glande mammaire	Bovin	(Garcia Samartino <i>et al.</i> 2010)
	-	Moelle osseuse	Souris	(Price <i>et al.</i> 1990)
	J774.A1	Sang	Souris	(Xavier <i>et al.</i> 2013)
	RAW 264.7	Sang	Souris	(Arenas <i>et al.</i> 2000, Eskra <i>et al.</i> 2003, He <i>et al.</i> 2006, Al Dahouk <i>et al.</i> 2008, Covert <i>et al.</i> 2009, Lamontagne <i>et al.</i> 2009, Chen <i>et al.</i> 2011, Larsen <i>et al.</i> 2013)
	mDM	Sang	Humain	(Covert <i>et al.</i> 2009, Kim <i>et al.</i> 2012, Larsen <i>et al.</i> 2013)
	mDM	Sang	Bovin (résistant ou non)	(Rossetti <i>et al.</i> 2011, Heller <i>et al.</i> 2012, Macedo <i>et al.</i> 2013)
	mDM	Sang	Zébu	(Macedo <i>et al.</i> 2013)
	-	Poumon	Ovin	(Macedo <i>et al.</i> 2015)
Monocyte	THP-1	Sang (Leucémie monocyttaire aigue)	Phoque*	(Larsen <i>et al.</i> 2013)
PNN	-	-	Humain	(Larsen <i>et al.</i> 2013)
	-	Sang	Bovin	(Keleher and Skyberg 2016)
	-	-	Humain	(Zwerdling <i>et al.</i> 2009)

Les bactéries du genre *Brucella* possèdent un génome très homogène, mais présentent une diversité de critères phénotypiques et de pathogénicité. La capacité à se répliquer à l'intérieur des cellules est bien étudiée, et des modèles cellulaires sont décrits et sont utiles afin de caractériser la virulence de souches de terrain.

C. La brucellose du point de vue de l'hôte

C.1.Chez l'Homme

“The disease rarely kills anybody, but it often makes a patient wish he were dead”
(TIME magazine 1943)

La brucellose humaine est également connue sous d'autres noms : fièvre de Malte, fièvre ondulante, fièvre méditerranéenne, fièvre de Crimée pour n'en citer que quelques-uns.

L'incubation varie de 1-3 semaines à plusieurs mois.

La brucellose peut entraîner des symptômes très variés, et parfois être asymptomatique. La maladie est rarement mortelle mais peut être à l'origine de symptômes débilitants nécessitant de longues hospitalisations.

Les formes aiguës ne sont pas spécifiques, et entraînent des symptômes proches de ceux de la grippe : fièvre « ondulante », faiblesse générale, sudations nocturnes avec une odeur caractéristique, malaises, anorexie. Des complications sont possibles et peuvent affecter tous les organes et appareils : ostéo-articulaires, urogénitales, nerveuses, hépatiques, cardiovasculaire.

La forme aiguë peut durer quelques semaines à plusieurs mois, et évoluer en forme chronique (quand les symptômes persistent sur une durée supérieure à 6 mois (Memish and Balkhy 2004)), en présence ou en l'absence de traitement.

C.2.Chez les ruminants

C.2.1. Signes cliniques

Chez l'animal, on distingue des formes aiguës, des formes chroniques et des formes asymptomatiques.

Après infection, la période d'incubation peut varier en fonction de l'espèce animale et de l'espèce de *Brucella*, du stade de gestation et de l'état physiologique de l'animal au moment de l'infection. En effet l'incubation peut être plus longue si l'animal est infecté au début de la gestation (Corbel *et al.* 2006).

Lors de forme aiguë, la brucellose est responsable d'avortement au cours du dernier trimestre de gestation (5^{ème} – 8^{ème} mois). Les vaches infectées peuvent également mettre bas des veaux mort-nés, ou très faibles. Généralement les femelles infectées n'avortent

qu'une fois, et les gestations suivantes se déroulent normalement (Carvalho Neta *et al.* 2010, Megid *et al.* 2010).

Chez le mâle, la brucellose peut entraîner des lésions d'orchites, évoluant en orchite chronique et en fibrose du parenchyme testiculaire (épididymite). Ces lésions sont associées à de l'infertilité.

Des troubles articulaires aigus telles que des arthrites sont également rapportés.

Les formes chroniques de brucellose peuvent faire suite aux formes aiguës non traitées, ou asymptomatiques chez des animaux dont l'infection est contrôlée par le système immunitaire. Les veaux infectés très précocement (*in utero*, lors de la mise bas ou par ingestion de lait contaminé) demeurent séronégatifs jusqu'à l'âge adulte sans manifester de signes cliniques (Nicoletti 1980, Aparicia 2013). Comme mentionné plus haut, généralement les femelles n'avortent qu'une fois. Néanmoins, certains animaux continuent de sécréter la bactérie dans le lait et les sécrétions vaginales lors des gestations suivantes. Certains auteurs décrivent des cas de « super-excréteurs », capables d'excréter de très grandes quantités de *Brucella* (Capparelli *et al.* 2009).

Les formes chroniques de brucellose entraînent une baisse de la production de lait dans les troupeaux laitiers, et des troubles de la reproduction (Carvalho Neta *et al.* 2010). Des cas de mammites modérées causées par *Brucella* sont également rapportés, et liés à une augmentation du nombre de cellules somatiques et une excrétion de la bactérie dans le lait (Xavier *et al.* 2009). Au contraire, certaines études ne mettent en évidence aucune différence de performances de reproduction ni de production laitière entre des animaux séropositifs et séronégatifs appartenant à des troupeaux infectés par *B. abortus* (Boyd and Reed 1961, Mellado *et al.* 2014).

Des troubles articulaires chroniques sont également rapportés (arthrites, hygromas).

L'infection chez les petits ruminants, c'est-à-dire les moutons et les chèvres, est très similaire à celle observée chez les bovins domestiques (Aparicia 2013).

Chez l'animal, la brucellose est ainsi responsable, à l'échelle d'un troupeau, de troubles majeurs de la reproduction (avortement, mortalité post-natale élevée, trouble de la fertilité), de chutes de production lors du passage à la chronicité, et parfois de troubles articulaires.

C.2.2. Pathogénie, excrétion et réponse immunitaire chez les ruminants

C.2.2.1. Pathogénie

Un point clé de la pathogénie de la brucellose repose sur la capacité des *Brucella* d'infecter de nombreux types cellulaires : leur localisation intracellulaire leur permet d'échapper à la réponse immunitaire cellulaire et établir une infection prolongée (Moreno and Gorvel 2004).

Lors de l'infection, les *Brucella* sont capables de traverser les muqueuses via des cellules épithéliales, et sont phagocytées par les macrophages et les cellules dendritiques. Très rapidement, les bactéries sont retrouvées dans les nœuds lymphatiques proches du lieu d'infection.

Par la suite, les bactéries sont disséminées par voie lymphatique et/ou sanguine jusqu'aux organes « cibles », lieu préférentiel de leur réplication, ainsi que dans leurs nœuds lymphatiques associés : trophoblastes du placenta, poumon du fœtus, système réticuloendothélial, tractus génital (utérus, testicules et ses annexes), glande mammaire (Poester *et al.* 2013).

La présence des bactéries dans ces organes est corrélée aux signes cliniques classiquement retrouvés (avortement, arthrite, orchite, épididymite, mammite), et entraîne une excrétion dans les fluides et tissus liés : le lait, les sécrétions vaginales, les produits d'avortement, le sperme (Poester *et al.* 2013). L'excrétion est rapportée chez des animaux malades et asymptomatiques, jusqu'à 1×10^{13} unité formant colonie UFC/ml dans les fluides allantoïdes, et 1×10^{13} UFC/g de tissu dans les cotylédons (Meador and Deyoe 1986). La bactériémie est relativement courte (moins d'un mois chez les petits ruminants) et n'est pas corrélée aux signes cliniques (Blood and Henderson 1974). Shimi and Tabatabayi décrivent des cas de bactériémies plus longues chez des chèvres infectées expérimentalement à *B. melitensis* (Shimi and Tabatabayi 1981).

La phase de réplication peut être suivie par une mise en place d'une immunité cellulaire efficace chez l'hôte, qui permet de limiter la prolifération des *Brucella*. Néanmoins, une partie des bactéries peuvent échapper à la réponse immunitaire et persister de longues périodes.

Le tropisme de *B. abortus* pour le tractus génital pourrait être lié aux fortes concentrations

d'érythriol et d'hormones stéroïdes retrouvées dans ces tissus, métabolisés comme source de carbone (Samartino and Enright 1996). La présence d'érythriol stimule la croissance de *B. abortus* et *B. melitensis* (Keppie *et al.* 1965). Néanmoins, la relation de cause à effet de l'utilisation de l'érythriol et du tropisme pour l'utérus gravide chez les bovins n'a jamais été établie.

C.2.2.2. Excrétion dans le lait

Cette partie est plus détaillée dans la Revue en cours de rédaction située en Annexe 4.

Chez les bovins infectés, *B. abortus* se retrouve principalement dans les ganglions supra mammaires, la glande mammaire et l'utérus (Corbel *et al.* 2006). Dans la mamelle, *B. abortus* a été localisée dans les macrophages du parenchyme, et également libre dans le lait (Meador *et al.* 1989, Xavier *et al.* 2009).

L'excrétion de *Brucella* dans le lait est variable en durée et en intensité chez les vaches, les bufflonnes et les petits ruminants (Edwards *et al.* 1946, Morgan and McDiamid 1960, Schoenaers 1976, Meador *et al.* 1989, Blasco *et al.* 1994) (Tableau 4). Chez les petits ruminants infectés par *B. melitensis*, la quantité de bactéries excrétée dans le lait varie de 4.10^3 à 2.10^6 UFC/ml, et jusqu'à 3.10^8 CFU/ml, valeur obtenue pour des chèvres infectées expérimentalement (Meador *et al.* 1989).

Tableau 4 Excrétion de *Brucella* dans le lait de vache (adapté de (Garin-Bastuji 2011))

Référence	Espèce animale	Excrétion (UFC/ ml)			Méthode	Infection	
		lait	Crème et culot	Crème	Bactériologie	Expérimentale	Naturelle
Philippon <i>et al.</i> 1971	Bovins (<i>Bos taurus</i>)		5-5x10 ²		Bactériologie	X	
Saegerman <i>et al.</i> 2010		10 ³			Bactériologie	X	
Carpenter et Boak 1928		1,5 10 ⁵			Bactériologie	X	
		0,2-5 10 ²			Bactériologie		X
Perdrix et Chirol 1975				10-10 ²	Bactériologie		X
O’Leary <i>et al.</i> 2006		2 10 ² -2 10 ⁴			Bactériologie		X

Des concentrations plus élevées ont été décrites dans le colostrum et le lait juste après la mise-bas (ou l'avortement), mais également à la fin de la période de lactation (Carpenter 1926, Morgan and McDiamid 1960). D'autres études réalisées chez les bovins et les petits ruminants ont montré que l'excrétion dans le lait pouvait durer toute la lactation, et persister sur plusieurs lactations successives (Roguinsky *et al.* 1972, Perdrix and Chirol

1975, Grillo *et al.* 1997, Tittarelli *et al.* 2005, Xavier *et al.* 2010). *Brucella* a également été isolée de lait de chamelle (Abou-Eisha 2000, Hamdy and Amin 2002, Dawook 2008). Il n'y a néanmoins aucune étude concernant les mécanismes d'excrétion dans le lait, ni d'étude relative au tropisme pour la mamelle dans cette espèce à notre connaissance.

L'excrétion dans le colostrum serait plus fréquente que dans les sécrétions vaginales chez les vaches présentant une mise-bas normale (Manthei and Carter 1950). Par ailleurs, l'intensité de l'excrétion dans le lait ne serait pas liée à l'avortement par rapport à des mise-bas normales (Philippon *et al.* 1971).

L'excrétion de souches vaccinales a également été montrée, chez des vaches et des bufflonnes vaccinées par la souche vivante atténuée *B. abortus* B19 (Pacheco *et al.* 2012) et la souche vivante atténuée *B. abortus* RB51 (Uzal *et al.* 2000, Longo *et al.* 2009), ainsi que chez des chèvres vaccinées par la souche vivante atténuée *B. melitensis* Rev1 (Zundel *et al.* 1992, Blasco and Molina-Flores 2011, Higgins *et al.* 2017). Néanmoins l'impact sur la santé publique serait très faible (Miranda *et al.* 2016).

De nombreuses études combinant une détection par culture et un dépistage sérologique sur le lait de vaches et de chèvres montrent l'importance des animaux porteurs et excréteurs asymptomatiques (Jouve 1952, Ebadi 1971, Perdrix and Chirol 1973, Zowghi *et al.* 1990, Lindahl-Rajala *et al.* 2017).

C.2.2.3. Réponse immunitaire

La réponse immunitaire varie selon l'hôte et l'espèce de *Brucella* impliqués. On distingue la réponse immunitaire innée, première ligne de défense de l'hôte, et la réponse immunitaire adaptative qui peut être humorale (liée aux lymphocytes B) et cellulaire (liée aux lymphocytes T).

Lors de la réponse humorale, les anticorps produits par les lymphocytes B et dirigés contre les antigènes de *Brucella* permettent de favoriser la phagocytose par leur pouvoir opsonisant. Néanmoins leur rôle est limité : la réponse humorale est peu protectrice contre la brucellose.

Les données concernant le délai de séroconversion lors de brucellose ont été obtenues suite à des études d'infections expérimentales de bovins. Les femelles infectées dès la

naissance présenteraient une séroconversion seulement au moment de la première mise bas (Plommet *et al.* 1971). Chez des bovins infectés par *B. abortus*, la production d'IgM est détectable 1 à 3 semaines post-infection, suivie de la production d'IgG. Dans d'autres études, les anticorps sont détectables seulement plusieurs mois après l'infection (Schoenaers 1976, Skendros and Boura 2013). Chez les petits ruminants, un délai de 3 à 5 semaines entre l'infection et l'apparition des anticorps dans le sang est décrit (Renoux 1961). Les anticorps peuvent persister tout au long de la vie de l'animal. Néanmoins, quelques études rapportent des cas d'animaux séronégatifs qui excrétaient des *Brucella* dans le lait (Zowghi *et al.* 1990, Arellano-Reynoso *et al.* 2013). Les études sérologiques dépendent beaucoup de la sensibilité et de la spécificité des tests utilisés.

La réponse immunitaire cellulaire est la plus protectrice lors de brucellose. Elle est médiée par une réponse T helper 1 (Th1), basée sur l'activation des lymphocytes T CD4+ principalement. Cette réponse est induite par l'IL-12, cytokine produite par les macrophages, et entraîne la production d'interféron-gamma IFN γ (Skendros and Boura 2013).

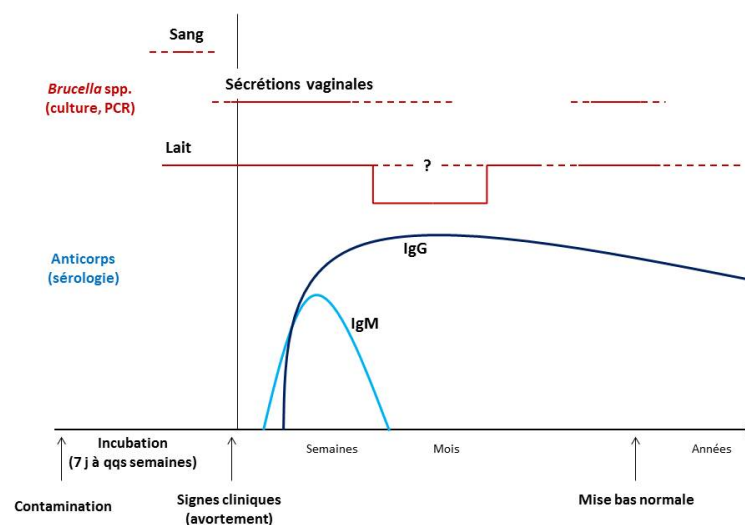


Figure 4 Chronologie d'une infection par *Brucella* spp., exemple chez une femelle ruminant en cours de gestation (d'après (Philippon *et al.* 1970, Alton 1985, Godfroid *et al.* 2010))

L'aspect majeur de la pathogénèse de *Brucella* est lié à sa capacité de survie et de réplication dans les macrophages en échappant au système immunitaire inné. *Brucella* module également la réponse immunitaire adaptative, lui conférant une protection vis-à-vis des traitements antibiotiques. Ces capacités sont responsables de période de latence parfois longue de plusieurs années et d'infections chroniques graves chez l'Homme et l'animal (Castaño and Solera 2009). Chez les ruminants, la persistance de *Brucella* dans l'organisme conduit à l'excrétion de la bactérie dans le lait et les sécrétions vaginales de manière intermittente et sur des périodes pouvant être longues. Ceci rend difficile le diagnostic précoce et représente un enjeu majeur de santé publique et vétérinaire.

D. Epidémiologie de la brucellose, zoonose mondiale

D.1. Importance et répartition mondiale

La brucellose est une des zoonoses les plus répandues dans le monde. Actuellement, les régions endémiques de brucelloses se situent dans le pourtour méditerranéen (sur de l'Europe, Afrique du Nord et de l'Est, pays du Moyen-Orient), en Asie Centrale et du Sud, et en Amérique Centrale et du Sud.

Certaines régions sont considérées indemnes de brucellose chez les ruminants, c'est-à-dire qu'officiellement aucun cas autochtone n'est déclaré durant 5 années : les pays d'Europe septentrionale, centrale et orientale, l'Australie, le Canada, le Japon et la Nouvelle Zélande (Figures 5 et 6).

Néanmoins des foyers de réémergence et l'apparition de nouveaux foyers dans la faune sauvage, ainsi que la découverte de nouvelles espèces de *Brucella* sont autant d'arguments, en plus de son aspect zoonotique et les conséquences économiques qu'elle engendre, montrant que la brucellose reste un enjeu majeur de santé publique.

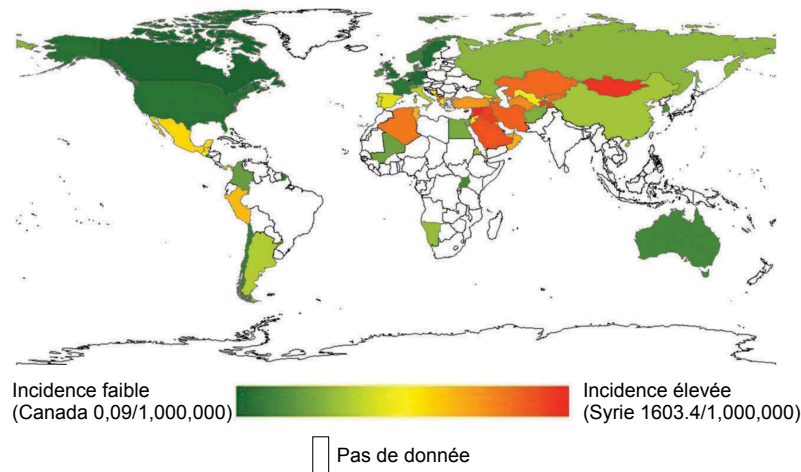


Figure 5 Cartes représentant l'incidence de la brucellose chez l'Homme dans le monde
Incidence humain pour 1 000 000 habitants (Adapté de (Hull and Schumaker 2018)).

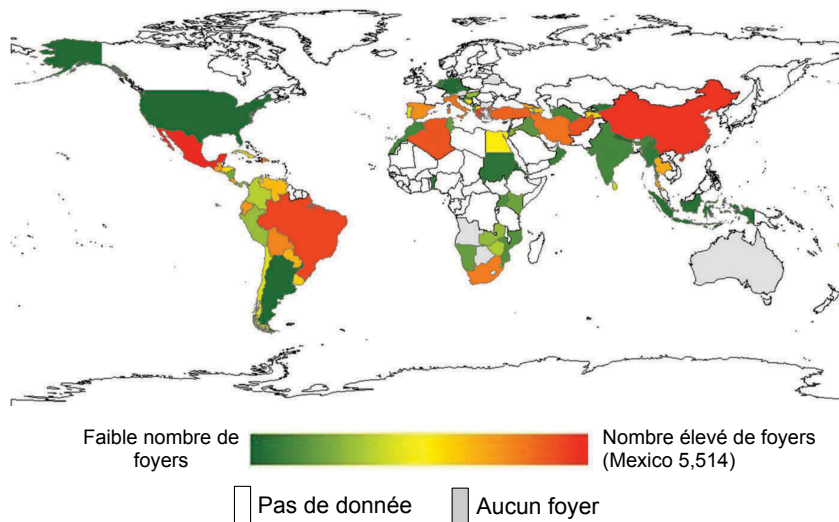


Figure 6 Cartes du nombre de foyers de brucellose (*B. abortus*, *B. melitensis* et *B. suis*) chez les ruminants rapportés à WAHIS en 2014

WAHIS: World Animal Health Information Database. Adapté de (Hull and Schumaker 2018).

L'incidence de la maladie chez l'Homme varie entre et au sein des pays (Dean *et al.* 2012) de 0,03 à plus de 160 cas pour 100 000 habitants (Taleski *et al.* 2002, Pappas *et al.* 2006). On estime l'incidence annuelle moyenne à 500 000 cas humains dans le monde (Pappas *et al.* 2006). Néanmoins, malgré les réglementations et l'obligation de déclaration dans de nombreux pays, la réelle incidence de la brucellose reste sous-estimée (Franc *et al.* 2018).

L'évolution de la prévalence humaine est le reflet de la situation chez les ruminants, couplée à des facteurs socio-économiques, et à la mise en œuvre de programmes de contrôle.

Les pertes économiques liées à la brucellose sont très importantes. Elles peuvent être distinguées de la manière suivante :

- les pertes directes liées à la maladie chez l'animal : baisses de production de lait/laine, problèmes de fertilité et avortement, avortements, ainsi qu'aux coûts des traitements vétérinaires,
- les pertes directes liées à la maladie chez l'Homme : coûts d'hospitalisation et d'arrêt de travail,
- les pertes indirectes liées à l'impact sur le commerce d'animaux et de produits issus de l'élevage (Franc *et al.* 2018).

D.2. Étiologie, source et transmission

Le risque et la sévérité de la maladie dépendent de l'espèce de *Brucella* impliquée. *Brucella* spp. ont un pouvoir infectieux très important et sont facilement aérosolisables : moins de 100 organismes sont capables d'infecter un humain (Teske *et al.* 2011, CDC 2017).

Les espèces de *Brucella* les plus pathogènes responsables d'infections sévères chez l'Homme sont *B. melitensis* (tous les biovars), puis *B. suis* (biovars 1, 3, 4) et *B. abortus* (tous les biovars). *B. canis* est également un agent important mais responsable de maladies moins graves.

B. melitensis est l'espèce la plus fréquemment rapportée avec 70% des cas humains dans le monde (Memish and Balkhy 2004, Corbel *et al.* 2006), suivi de *B. suis* (~25%) et *B. abortus* (~5%) (Doganay and Aygen 2003). Trois cas d'infection naturelle à *B. pinnipedialis* présentant le même génotype ST27 ont été rapportés (Sohn *et al.* 2003, McDonald *et al.* 2006, Whatmore *et al.* 2008), et un cas de contamination humaine en laboratoire est décrit (Brew *et al.* 1999). *B. inopinata* a été isolée d'un implant mammaire (souche BO1) et d'un Homme atteint de pneumonie (souche BO2). Enfin, un cas humain de brucellose causée par *B. neotomae* a été décrit au Costa Rica en 2008 et 2011 (Suárez-Esquivel *et al.* 2017) (voir Tableau 1).

B. abortus et *B. melitensis* sont les agents majeurs de la brucellose chez les ruminants dans le monde. Quelques rares cas d'infection à *B. suis* biovar 1, 2 et 3 ont été rapportés

chez les bovins (Cook and Noble 1984, Anderson and Pedersen 1995, Ewalt *et al.* 1997, Jaý *et al.* 2013, Szulowski *et al.* 2013).

La Figure 7 propose un schéma des voies de transmission et des sources de brucellose chez l'Homme et l'animal.

La source principale d'infection de l'Homme et des animaux est animale : les animaux d'élevages (bovins, petits ruminants, porcins), mais aussi plus rarement certaines espèces sauvages terrestres et marines. Les animaux peuvent excréter la bactérie avec ou sans signes cliniques, la période critique étant située autour de la mise bas ou de l'avortement. Les matières infectieuses sont principalement l'utérus gravide et la sphère génitale pendant l'avortement ou la mise-bas, les produits d'avortement, les sécrétions vaginales, l'urine, le lait et le colostrum, le sperme et plus rarement les liquides articulaires.

Lorsque les conditions sont favorables (pH>4, fort taux d'humidité, températures optimales, faible luminosité), les *Brucella* survivent plusieurs mois dans l'eau, les produits d'avortement, la laine, la paille (Nicoletti 1980, Corbel *et al.* 2006, Falenski *et al.* 2011). Leur survie dans le lait et les produits laitiers (*cf* Revue en Annexe 4) dépend du type de fabrication des fromages (pH, humidité, flore bactérienne, durée de la fermentation). *Brucella* sont inactivées par la chaleur (autoclave, pasteurisation (Davies and Casey 1973)), et la plupart des décontaminant chimiques.

Les voies de contamination principales sont les voies conjonctivale et cutanée (peau saine ou lésée, inhalation d'aérosol), la voie digestive et vénérienne.

Chez les ruminants la transmission a lieu principalement d'animal à animal (Nicoletti 1980, Corbel *et al.* 2006), par contact avec les produits d'avortements ou lors des mises bas, et lors de partage de pâtures lors des transhumances, mais :

- elle peut également être très précoce : *in utero*, et très rapidement après la mise-bas, ou par ingestion de lait et de colostrum contaminé, ce qui entraîne des infections latentes asymptomatiques et sans séroconversion (Ray *et al.* 1988),
- la transmission sexuelle n'a pas un impact important dans la transmission de la brucellose bovine en lien avec une pratique majoritaire de l'insémination artificielle, contrairement à la brucellose chez les petits ruminants (Rankin 1965).

Chez l'Homme on distingue 4 modes de transmission :

- La consommation de lait et produits laitiers crus est une cause importante de brucellose. La pasteurisation du lait permet la destruction de la bactérie, mais dans certains pays le lait est largement consommé cru. Par ailleurs, la fabrication de fromage à partir de lait cru contaminé ne permet pas toujours de détruire les *Brucella*,
- Les contacts avec des animaux infectés ou un environnement contaminé,
- Il s'agit d'une maladie professionnelle : les éleveurs, vétérinaires, employés d'abattoirs et le personnel de laboratoire sont des professionnels à risque. Il s'agit de la maladie bactérienne la plus couramment impliquée dans des infections de laboratoire (Traxler *et al.* 2013),
- La transmission interhumaine est considérée comme anecdotique et sans impact sur l'épidémiologie de la maladie. Les rares cas décrits rapportent une transmission par voie trans-placentaire, lors de l'allaitement, par voie sexuelle, et plus rarement suite à une transplantation de moelle osseuse et par transfusion sanguine (Tuon *et al.* 2017).

Dans les pays indemnes de brucellose chez les ruminants, les rares cas humains sont retrouvés chez les personnes travaillant en laboratoire et les voyageurs ayant consommé des produits laitiers crus à l'étranger.

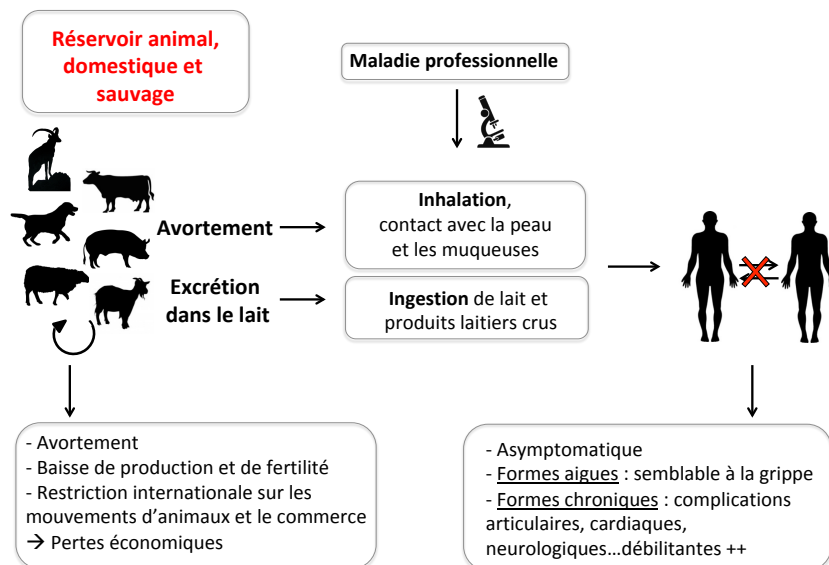


Figure 7 : Transmission et importance de la brucellose

B. melitensis, *B. abortus* et *B. suis* sont les espèces les plus dangereuses et les plus fréquemment rencontrées chez l'Homme, et sont classifiées comme MOT et agents potentiels du bioterrorisme. Les sources principales de *Brucella* spp. sont les animaux infectés excréteurs malades ou asymptomatiques. La période de contagion est variable et intermittente, mais souvent maximale lors des mises-bas. La diminution du nombre de cas humains passe inmanquablement par le contrôle de la maladie chez les animaux.

D.3. Prévention, traitement et programme de lutte

D.3.1. Maladie règlementée

Il s'agit d'un danger sanitaire de première catégorie dans de nombreux pays, comme en France, où la plupart des *Brucella* sp. sont également classées comme M.O.T. (Microorganisme et Toxine hautement pathogènes) donc soumis à une réglementation très stricte. Par ailleurs, le CDC (Center for Disease Control and Prevention in the USA) inclut *B. melitensis*, *B. abortus* et *B. suis* sur la liste des agents potentiels du bioterrorisme.

D.3.2. Chez l'Homme

La prévention de la brucellose chez l'Homme consiste à éviter et contrôler les principales sources d'infection : exposition professionnelle et consommation de produits alimentaires contaminés. Elle implique entre autre la gestion des foyers de brucellose animale, le port d'équipements de protection individuelle et collective pour les professionnels, la pasteurisation du lait.

Le traitement de la brucellose humaine consiste en une antibiothérapie longue. Les antibiotiques préconisés sont la doxycycline (100 mg deux fois par jour pendant 6 semaines) associée à la rifampicine (600-900 mg par jour pendant 6 semaines) ou la streptomycine (1 g par jour pendant 2-3 semaines). Il existe des rechutes possibles. Il n'y a pas de recommandation pour les cas de brucellose chronique, et il n'existe pas de vaccin humain (Corbel *et al.* 2006, Ponsart and Maurin 2018).

D.3.3. Chez les ruminants

La prophylaxie sanitaire repose sur des programmes de contrôle, d'éradication et de surveillance qui doivent être clairement établis par les services publics et adaptés au contexte épidémiologique de la région. Ces programmes impliquent des protocoles de

diagnostic aux normes (échelles individuelle et du troupeau), des mesures d'hygiène en élevage et aux abattoirs (mise en quarantaine), une identification individuelle des animaux et le contrôle des mouvements d'animaux.

- 1- Contrôle : réduction de la prévalence au minimum. La vaccination est fortement appliquée. Un dépistage massif est mis en place, et les animaux adultes malades sont abattus. Ce programme est appliqué en régions endémiques de brucellose.
- 2- Eradication : élimination totale du pathogène, inapplicable en région de haute prévalence. La vaccination devient interdite. Le dépistage massif est associé à des tests plus spécifiques de confirmation. L'abattage est la règle pour tout individu ou troupeau malade. Ce programme est appliqué dans les régions endémiques en voie de devenir indemnes.
- 3- Surveillance : lorsque la maladie a été éradiquée, la détection d'éventuels nouveaux foyers est nécessaire (déclaration obligatoire des avortements, surveillance sérologique annuelle). Ce programme est appliqué en régions indemnes de brucellose.

La prophylaxie médicale repose sur la vaccination, et principalement :

- Les souches vivantes atténuées *B. abortus* S19 (lisse) et RB51 (rugueuse) : recommandées pour la brucellose bovine
- La souche vivante atténuée *B. melitensis* Rev.1 : pour la brucellose à *B. melitensis* des petits ruminants.

La vaccination n'empêche pas l'infection mais diminue les signes cliniques et les niveaux d'excrétion (OIE 2016). Il n'y a pas de vaccins pour les suidés.

Dans le cadre des programmes de lutte et d'éradication de la maladie, aucun traitement n'est administré aux animaux de rente.

La prévention et la lutte contre la brucellose reposent sur un système de diagnostic fiable et facilement réalisable, associés à un ensemble de mesures de gestion sanitaire systématisées. Les outils de dépistage et les programmes mis en place doivent être adaptés au contexte épidémiologique de la région.

E. Diagnostic chez les ruminants

Les premières étapes du diagnostic consistent en une évaluation épidémioclinique menant à une suspicion. Pour l'Homme celle-ci peut inclure des commémoratifs de voyages et de consommation de produits laitiers non pasteurisés. La description des signes cliniques est également une étape clé.

Chez les ruminants, tout avortement doit conduire à une suspicion de brucellose. Le diagnostic différentiel étudié à la suite d'un avortement chez les ruminants comprend (plateforme d'Epidémiosurveillance Santé Animale (ESA)) :

- des maladies bactériennes : fièvre Q (*Coxiella burnetii*), chlamydiose (*Chlamydia* spp.), listériose (*Listeria* spp.), leptospirose (*Leptospira* spp.), salmonellose (*Salmonella enterica* sérotype Typhimurium et Dublin, *Salmonella Abortus ovis*), *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp.,
- des maladies parasitaires : néosporose (*Neospora caninum*), toxoplasmose (*Toxoplasma gondii*)
- des maladies virales : infection au virus de Schmallenberg (petits ruminants), border disease des petits ruminants (Border Disease Virus), BVD (virus BVD)

Les signes cliniques tardifs et peu spécifiques peuvent rendre le diagnostic de brucellose difficile.

Le diagnostic de la brucellose repose sur la mise en évidence de *Brucella* spp. ou de marqueurs d'exposition. Les techniques existantes sont donc de deux types : le diagnostic indirect et le diagnostic direct.

E.1. Diagnostic indirect : détection de la réponse humorale

Le dépistage indirect consiste à rechercher des traces d'infection (concomitante ou ancienne), en mettant en évidence la présence d'anticorps IgM, IgG (IgG1 et IgG2) et IgA dirigés contre *Brucella*, présents dans le sérum ou le lait. De nombreux tests ont été développés, qui varient dans le type d'antigène utilisé (lysate cellulaire total ou partiel), les conditions de réactions et le type d'échantillon utilisé. La plupart des tests utilisent des antigènes de *B. abortus* biovar 1. Le Tableau 5 résume les principales méthodes utilisées pour le diagnostic sérologique des ruminants.

Tableau 5 Principales méthodes de diagnostic sérologique de la brucellose chez les ruminants (d'après (OIE 2016))

Méthode	Principe	Matrice	Avantages/inconvénients	Utilisation
Test Rose Bengale (RB)	Agglutination sur lame des antigènes colorés au rose Bengale et des anticorps sériques agglutinants (IgG surtout)	Sérum individuel	Rapide Très sensible	Dépistage
Test d'agglutination en tube (SAT/SAW)	Agglutination en tube des antigènes avec les anticorps sériques, plusieurs dilutions de sérum sont testées	Sérum individuel	Uniquement chez les bovins Test long Manque de sensibilité et de spécificité Robuste	Dépistage l'OIE ne recommande plus son utilisation pour le diagnostic bovin
Fixation du complément (FC)	Détection des IgG1 et IgM par formation de complexes anticorps-antigène et la capacité du complément à réagir avec ces complexes.	Sérum individuel	Très spécifique Moins sensible que le RB et l'ELISA	Confirmation d'un premier test sérologique positif
ELISA indirect (enzyme-linked immunosorbent assay, i-ELISA) et compétitif (cELISA)	Détection des anticorps spécifiques à <i>Brucella</i> par formation de complexe avec des antigènes fixés à une surface formés par ajout d'anticorps secondaires couplés à une enzyme capable d'émettre un signal lumineux ou fluorescent par ajout d'un substrat	Sérum individuel Lait	iELISA : très sensible mais défaut de spécificité cELISA : plus spécifique et moins sensible que l'iELISA Variabilité entre les kits, problème de seuil.	Dépistage des troupeaux laitiers (bovins, petits ruminants)
Test de l'anneau sur lait de tank (MRT)	Agglutination des anticorps avec un antigène coloré en bleu visible sous forme d'anneau sous la surface (phase grasse du lait, liée à la fraction Fc des anticorps qui se fixe aux globules gras.	Lait	Uniquement bovin Rapide et peu coûteux Défauts de spécificité en cas de mammite, de présence de colostrum, et si faible prévalence (Rolfe and Sykes 1987)	Dépistage des troupeaux bovins laitiers

Aucun test n'est adapté à toutes les situations épidémiologiques. Ainsi, en fonction du contexte et de la stratégie de lutte, un test de dépistage (très sensible) devra ou non être suivi d'un test de confirmation plus spécifique (Figure 8).

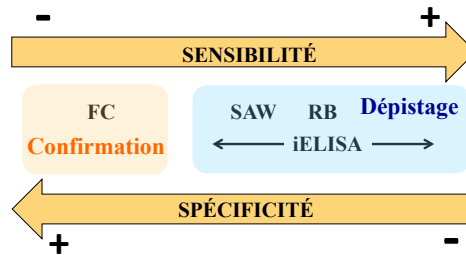


Figure 8 Caractéristiques des principaux tests utilisés pour le diagnostic sérologique de la brucellose chez les ruminants.

FC : fixation du complément ; SAW = SAT : test d'agglutination en tube ; RB : test du rose Bengale ; iELISA : ELISA indirect.

Avantages/limites :

Les outils de sérologie sont sensibles et peu chers pour la majorité et permettent un diagnostic très précoce, applicable à un dépistage à l'échelle individuelle en utilisant des sérums individuels, et un dépistage à l'échelle du troupeau avec des mélanges de sérum et du lait de tank. Selon la méthode, le principal inconvénient consiste généralement en un défaut de spécificité, liés à deux phénomènes :

- ils ne permettent pas de différencier une infection ancienne ou active d'une réaction vaccinale,
- ils entraînent des réactions croisées. Les tests utilisés reposent sur l'immunité humorale dirigée contre le S-LPS et la chaîne O-polysaccharidique, qui sont des antigènes très présents et qui présentent des similarités avec le LPS d'autres pathogènes. *Yersinia enterocolitica* serotyp O-9 est responsable de réactions croisées très fortes (Perry and Bundle 1990). *Escherichia coli* O157 et O116 et *Salmonella* group N entraînent également des résultats faussement positifs, mais dans une moindre mesure. Il existe aussi des réactions croisées avec le genre *Ochrobactrum*, qui sont des bactéries très proche phylogénétiquement de *Brucella* spp.

Il est également rapporté un manque de sensibilité dans certains cas précis (animaux infectés séronégatifs (Cordes and Carter 1979)).

Le diagnostic indirect peut également être basé sur la mise en évidence de l'immunité cellulaire contre *Brucella* avec le test intradermique à la brucelline (extrait de *Brucella* rugueuse). Après injection intra-dermique de brucelline, une réaction d'hypersensibilité retardée est observée après 48-72h (enflure au point d'injection) si l'animal a été en contact avec la bactérie. Ce test est très sensible mais il existe des réactions croisées et ce

test ne doit pas être utilisé pour le diagnostic individuel ou en cas de vaccination.

La sérologie est majoritairement utilisée pour le dépistage de la brucellose animale. Les tests actuels néanmoins possèdent des limitations. Les défauts de sensibilité et de spécificité nécessitent l'association de plusieurs techniques. En fonction du contexte et de la stratégie de lutte, un test de dépistage (très sensible) devra ou non être suivi d'un test de confirmation plus spécifique.

E.2. Diagnostic direct de référence : l'isolement bactériologique

Pour le diagnostic direct, le choix du prélèvement est primordial. Il est principalement réalisé à partir de tissu sur animal abattu: placenta, avorton lors d'avortement, nœud lymphatiques prélevés à l'autopsie. Le dépistage peut également se réaliser à partir de lait (et colostrum) et d'écouvillons vaginaux ou prépuceaux. Chez l'Homme, le prélèvement biologique de choix est le sang, mais il convient parfois de prélever des tissus/fluides liés aux sites des complications de la maladie (moelle osseuse, liquide céphalo-rachidien, pus).

La bactérioscopie consiste à étaler sur lame des prélèvements biologiques et de les colorer (colorations de Stamp, Köster, Machiavello). Cette technique manque de sensibilité et de spécificité (morphologie de bactérie de même niche écologique similaire, comme *Coxiella Burnetti*, *Chlamydia psittaci*) et n'est plus beaucoup utilisée.

Le diagnostic de certitude repose sur la mise en culture, l'isolement et le typage de prélèvements biologiques. Les milieux de culture utilisés peuvent être gélosés ou liquides, standards (trypticase soja liquide ou gélosé, avec 2-5% de sérum bovin ou équin) et sélectifs après ajout d'antibiotiques (Farrell (Stack *et al.* 2002), CITA (De Miguel *et al.* 2011)). Les *Brucella* sont des germes à culture lente par rapport à d'autres bactéries (4 à 7 jours selon les espèces), l'utilisation de milieux sélectifs est indispensable pour permettre de limiter la croissance des autres bactéries.

A partir de colonies isolées, le genre, l'espèce et le biovar sont déterminés grâce à des méthodes de typage bactériologiques reposant sur des caractéristiques morphologiques,

biochimique, antigénique, la sensibilité à des colorants et des phages (Alton 1988) (Figure 9).

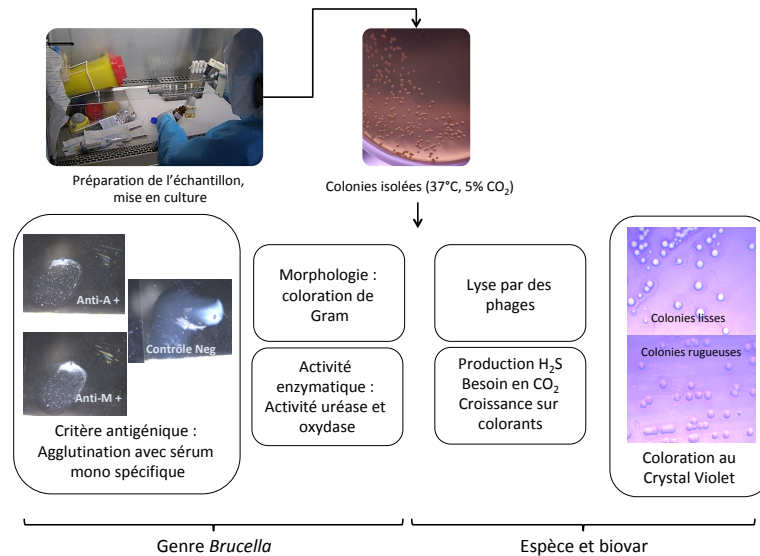


Figure 9 : Biotypage des souches de *Brucella* spp.

Détermination du genre *Brucella* : morphologie des bactéries (coloration de Gram), test d'agglutination sur lame avec des anti-sérum polyclonaux anti-*Brucella* (anti-sérum contre les *Brucella* lisses anti-M ou anti-A, anti-sérum anti-*Brucella* rugueuse), tests oxydase et uréase. Typage : morphologie des colonies (lisse ou rugueuse, Crystal violet), sensibilité à certains colorants (fuschine et thionine) et certains phages (Tbilisi (Tb), Weybridge (Wb), Izatnagar₁ (Iz₁) et R/C), besoin en CO₂, production de H₂S. (OIE 2016).

L'isolement et l'identification de colonies est long et fastidieux et doit être réalisé en laboratoire de confinement de type 3, par un personnel expérimenté. Cette méthode est très spécifique, mais peut manquer de sensibilité. La sensibilité diagnostique de la bactériologie dépend de la charge bactérienne et de la nature de l'échantillon, du niveau et du stade d'infection de l'animal, de la prise éventuelle d'antibiotique avant l'échantillonnage, ainsi que de la qualité des expérimentations.

E.3. Diagnostic direct moléculaire de la brucellose

Les méthodes de PCR permettant de détecter l'ADN de bactéries du genre *Brucella*, sont de plus en plus utilisées pour la détection à partir de prélèvements biologiques ou pour l'identification de colonies isolées, en parallèle de la bactériologie. La détection par PCR à l'échelle de l'espèce et du biovar est du ressort du typage.

E.3.1. Principaux gènes cibles spécifique du genre *Brucella*

Les principaux gènes ciblés pour la détection du genre *Brucella* sont les suivants :

- **ARNr16S** codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal ;
- ***bcs31*** codant pour une protéine immunogène de surface de 31 kDa très conservée au sein du genre *Brucella*, bien que non exprimée chez *B. ovis* (Halling and Zehr 1990). Des réactions croisées avec *Ochrobactrum anthropi* ont été décrites avec des méthodes de PCR utilisant *bcs31* comme cible (Da Costa *et al.* 1996, Casanas *et al.* 2001) ;
- ***per*** (ou *rfbE*) codant pour la péroamine synthétase, une enzyme impliquée dans la synthèse de la chaîne O-polysaccharidique du LPS et qui présente des similitudes avec *E. coli* O:157, *Salmonella* groupe N O:30, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Vibrio cholerae* O:1, et *Yersinia enterocolitica* O:9 (Perry and Bundle 1990, Moreno *et al.* 2002) ;
- ***eryC*** codant pour l'enzyme D-erythrulose-1-phosphate déshydrogenase impliquée dans le métabolisme de l'érythriol (Rodríguez-Lázaro *et al.* 2017) ;
- **IS711** ou IS6501 est une séquence d'insertion conservée dans toutes les espèces du genre *Brucella*, spécifique du genre.

L'IS711 de *B. ovis* possède 53,8% d'identité de séquence avec la séquence d'insertion IS427 d'*Agrobacterium tumefaciens* sur 742 bp (Ouahrani *et al.* 1993). Le nombre et la position des éléments d'insertion IS711 varient en fonction des espèces (Tableau 10). L'IS711 mesure 842 pb et possède un pourcentage en G-C de 54%, comparable avec celui des génomes du genre *Brucella*. La séquence est insérée entre 2 IR (inverted repeats, répétitions inversées) imparfaits de 20 pb environ, avec un motif YTAR (R, purines; Y, pyrimidines) retrouvé de part et d'autre (Halling *et al.* 1993). Il comprend deux ORF (Open Reading Frame, cadre de lecture ouvert) qui se chevauchent, et sembleraient être transcrits en un unique polypeptide, codant chacun pour une transposase (Figure 10).

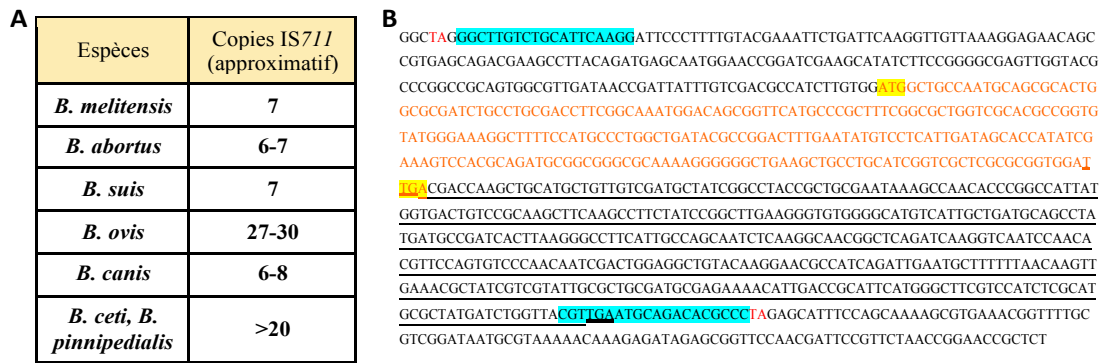


Figure 10 La séquence d'insertion IS711 chez *Brucella*

A Nombre approximatif de copies d'IS711 chez différentes espèces de *Brucella* (Scholz *et al.* 2018). **B** Région IS711 de *B. ovis* (1174649...1175598) (NCBI). Surligné en bleu : IR, en rouge : site d'insertion en YTAR, surligné en jaune : codons start et stop de l'ORF 1 (en orange) : Bov_RS05730, souligné double trait : codons start et stop de l'ORF2 (souligné) : Bov_RS05735

L'insertion des séquences IS711 dans le génome de *Brucella* est associée à des points chauds de séquences conservées, notamment BRU-RS1 et BRU-RS2 (Halling *et al.* 2005). L'IS711 est très stable (Ouahrani *et al.* 1993), et le polymorphisme associé entre les espèces de *Brucella* est utilisé dans le diagnostic et le typage de souches. Une faible activité de transposition a néanmoins été mise en évidence chez *B. ovis* et *B. pinnipedialis* (Ocampo-Sosa and Garcia-Lobo 2008) et *B. abortus* (Mancilla *et al.* 2011). C'est d'ailleurs l'interruption du gène *wboA* par une copie d'IS711 dans la souche parentale *B. abortus* qui a conduit au phénotype rugueux de la souche vaccinale RB51 (Vemulapalli *et al.* 1999).

E.3.2. La méthode de PCR au service du diagnostic de la brucellose

La PCR permet d'amplifier *in vitro* de manière très importante une séquence connue d'acide nucléique à partir d'une faible quantité initiale d'acide nucléique, basée sur l'utilisation d'une polymérase et des propriétés d'hybridation/dés hybridation des brins d'acides nucléiques complémentaires en fonction de la température. Il existe des techniques de PCR conventionnelle et PCR en temps réel adapté au diagnostic de *Brucella*.

E.3.2.1. La méthode de PCR conventionnelle

Pour la méthode de PCR conventionnelle (ou traditionnelle), l'amplification de la séquence cible par PCR est suivie de la révélation par électrophorèse des amplicons, de taille connue. Cette technique ne permet pas de quantifier précisément le nombre de séquences d'intérêt. La première méthode de PCR appliquée au diagnostic de *Brucella* sp.

publiée en 1990 ne mentionnait pas les amorces utilisées (Fekete *et al.* 1990). De nombreuses études ont depuis été développées et adaptées (Tableau en Annexe 1).

E.3.2.2. La méthode de PCR en temps réel

Pour la méthode de PCR en temps réel, l'ADN amplifié est quantifié à chaque cycle par un marqueur fluorescent, dont la fluorescence émise est proportionnelle à la quantité d'ADN présent. Initialement le signal est faible et non distinguable du bruit de fond. Il augmente ensuite exponentiellement pour se stabiliser lorsqu'un des réactifs est épuisé. Le moment d'apparition de ce signal seuil dénommé cycle seuil ou **C_q** (Cycle threshold) est dépendant de la quantité d'ADN cible initiale (Didenko 2001, Kubista *et al.* 2006) (Figure 11).

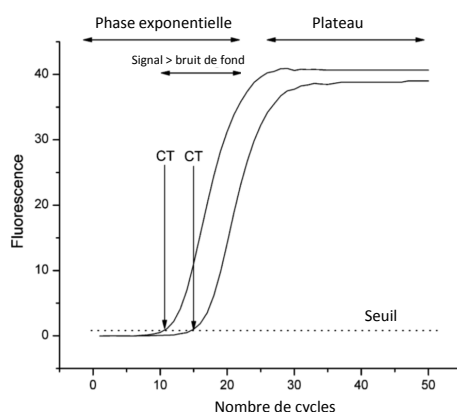


Figure 11 Courbe d'amplification par PCR en temps réel

CT : cycle seuil ou C_q

Il existe différents types de « reporter » fluorescent : des sondes spécifiques et des intercalants de l'ADN double brin (Tableau 6).

Tableau 6 Comparaison de l'utilisation de molécules fluorescentes et de sondes spécifiques pour le diagnostic par PCR en temps réel

	Molécule fluorescente	Sondes spécifiques
Exemple	SYBR Green	Sondes linéaires (sonde TaqMan, sondes d'Hybridation), ou avec une structure secondaire (Molcelar Beacon, sonde Scorpions, Lion Probes)
Principe	Intercalant de l'ADN double brin, non spécifique. L'émission de fluorescence a lieu en présence d'ADN double brin.	Court oligonucléotide synthétisé, complémentaire d'une séquence spécifique incluse dans l'amplicon, et qui n'émet pas de fluorescence sans être hybridée à sa séquence cible
Avantages	Peu cher	Spécifique : résultat positif obtenu seulement si la sonde s'est hybridée à la séquence cible Multiplexage possible
Limites	Peu spécifique : résultat positif obtenu pour tous les ADN double brins (amplicons, mais aussi dimères d'amorces ou ADN parasites)	Optimisation et design des sondes plus complexes

Les méthodes PCR en temps réel appliquées à la détection de *Brucella* sp. utilisent principalement des sondes TaqMan (ou exonucléasique), les sondes d'hybridation et le SYBR Green (Newby *et al.* 2003).

Les sondes TaqMan sont des oligonucléotides simple-brin de 10-30 nucléotides. Elles sont composées d'un fluorophore (émetteur d'énergie) à l'extrémité 3', et d'un « quencher » (ou accepteur d'énergie) à l'extrémité 5'. Ce dernier inhibe l'émission de fluorescence par « l'émetteur » lorsqu'ils sont à proximité. Au cours de la PCR, si la sonde est hybridée sur sa cible, elle est hydrolysée par l'activité 5'-3' exonucléasique de l'ADN polymérase (Figure 12).

Les PCR basées sur les sondes d'hybridation se réfèrent à l'utilisation de deux sondes adjacentes, chacune portant un fluorophore (un accepteur, l'autre émetteur). L'émission de fluorescence a lieu lorsque les deux sondes sont hybridées et adjacentes.

Le spectre d'absorption de l'accepteur d'énergie doit coïncider avec le spectre d'émission « reporter » pour permettre le transfert d'énergie, selon le principe du FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) (Didenko 2001, Kubista *et al.* 2006).

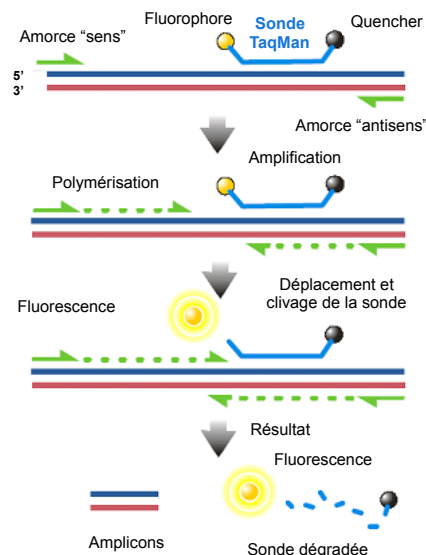


Figure 12 Principe de l'émission de fluorescence des sondes TaqMan
(Adapté de (Wikipedia))

De nombreuses publications présentent des amorces utilisables en PCR conventionnelle et en temps réel pour la détection du genre *Brucella*, ciblant les gènes décrits plus haut (Baily *et al.* 1992, Herman and De Ridder 1992, Leal-Klevezas *et al.* 1995, Romero *et al.*

1995, Hinic *et al.* 2008, Bounaadja *et al.* 2009, Ning *et al.* 2012, Rodríguez-Lázaro *et al.* 2017), décrites dans le tableau en Annexe 1.

E.3.3. Avantages et limites de la méthode PCR dans le diagnostic de la brucellose

Par rapport à la mise en culture, la méthode PCR permet de réduire considérablement la durée de manipulation des matières infectieuses et des *Brucella*. Il s'agit d'une méthode présentant moins de risque pour l'expérimentateur, et étant plus rapide puisqu'un résultat est obtenu en quelques heures contre plusieurs jours pour la bactériologie. Par ailleurs, selon les cibles utilisées, il est possible de différencier les animaux vaccinés des animaux infectés naturellement (Tableau 7).

Tableau 7 : Détection des souches vaccinales de *Brucella*

Cible	Gène	Référence	Taille
<i>B. melitensis</i> Rev1	mutation dans <i>rpsL</i> (PCR-RFLP)	(Cloekaert <i>et al.</i> 2002)	224 pb
<i>B. abortus</i> RB51	insertion d'une séquence IS711 dans <i>wboA</i> (<i>eri1-eri2</i>)	(Bricker and Halling 1995)	364 pb
<i>B. abortus</i> RB51	insertion d'une séquence IS711 dans <i>wboA</i>	(Vemulapalli <i>et al.</i> 1999)	594 pb
<i>B. abortus</i> S19	délétion de 702 pb dans <i>eryCD</i>	(Sangari <i>et al.</i> 1994)	350 pb

La sensibilité et la spécificité de la PCR dépendent de nombreux paramètres dont les réactifs de PCR, les amorces utilisées, la méthode d'extraction d'ADN, la matrice de départ. Il est ainsi difficile de comparer les études. En comparaison avec *bcbp31* et *per*, la détection de l'IS711 permet d'obtenir des résultats plus précoces, mais sans différence statistiques avec *bcbp31* et *per* (Bounaadja *et al.* 2009). Le Tableau 8 synthétise les études estimant une limite de détection de *Brucella* à partir d'échantillons biologiques, en fonction des techniques d'extraction et de PCR. De plus en plus d'études mettent en évidence une sensibilité et une spécificité similaires ou meilleures à celles de la détection par culture (Fekete *et al.* 1992, Leal-Klevezas *et al.* 2000, Ilhan *et al.* 2007).

Enfin, la méthode de PCR en temps réel permet d'obtenir des résultats plus rapidement en limitant considérablement les risques de contamination de l'environnement avec des amplicons.

Tableau 8 Limite de détection de méthodes PCR utilisant différentes amorces publiées pour la détection du genre *Brucella*

F4-R2 (ARNr16S) (Romero *et al.* 1995), B4-B5 (*bcs31*) (Baily *et al.* 1992), JPF-JPR (*omp-2*) (Leal-Klevezas *et al.* 1995), ISP1-ISP2 (IS6509) (Ouahrani-Bettache *et al.* 1996), Ba148/928 (ARNr16S) (Herman and De Ridder 1992), 31ter/sd (*omp31*) (Vizcaino *et al.* 1997). LD : limite de Détection.

Référence	Matrice	Souche	LD (UFC/ml)	Amorces	Méthode d'extraction
(Marianelli <i>et al.</i> 2008)	Lait	<i>B. abortus</i> RB51	4.10 ³	B4-B5	Phénol-Chloroforme
			4.10 ⁵	F4-R2	
(Baddour and Alkhalifa 2008)	Sang	<i>B. melitensis</i>	700	B4-B5	Pure Gene Kit (Gentra Systems)
			7.10 ⁵	F4-R2	
			7.10 ⁷	JPF-JPR	
(Al-Ajlan <i>et al.</i> 2011)	Sang (eau)	<i>B. melitensis</i>	100 (25)	B4-B5	MagnaPure LC kit (Roche)
			200 (100)	ISP1-ISP2	
			800 (200)	F4-R2	
(Zamanian <i>et al.</i> 2015)	Sérum	<i>B. abortus</i> S19	9.10 ⁴	B4-B5	Ebullition
			9.10 ⁵	F4-R2	
			9.10 ⁷	JPF-JPR	
(Ciftci <i>et al.</i> 2017)	Culture pure (sang)	<i>B. melitensis</i>	14 (32)	F4-R2	DNeasy tissue kit (Qiagen)
			20 (320)	Ba148/928	
			2.6.10 ³ (10 ⁴)	31ter/sd	
			1.2.10 ⁴ (10 ⁵)	JPF-JPR	

E.3.4. L'extraction de l'ADN et substances inhibitrices de PCR

E.3.4.1. Importance de la matrice de départ

Les techniques actuelles de diagnostic moléculaire permettent de diagnostiquer les bactéries à l'échelle du genre *Brucella* et même de l'espèce, en PCR conventionnelle et en PCR en temps réel à partir de différents échantillons (Tableau 9) :

- de sang (Leal-Klevezas *et al.* 1995, Guarino *et al.* 2000, Ciftci *et al.* 2017),
- de lait (Leal-Klevezas *et al.* 1995, Romero *et al.* 1995, Rijpens *et al.* 1996, Hamdy and Amin 2002, Ciftci *et al.* 2017),
- de sécrétion nasale (Sreevatsan *et al.* 2000),
- de rate (Gallien *et al.* 1998),
- de sperme (Amin *et al.* 2001, Manterola *et al.* 2003, Ciftci *et al.* 2017),
- de ganglions lymphatiques (O'Leary *et al.* 2006),
- de produits d'avortement (Fekete *et al.* 1992, Ciftci *et al.* 2017),
- d'écouvillons vaginaux et préputiaux (Dauphin *et al.* 2009),
- de contenu stomacal de fœtus (Leyla *et al.* 2003, Ciftci *et al.* 2017).

Les substances inhibitrices sont naturellement présentes dans de nombreux échantillons biologiques, mais proviennent aussi de certains réactifs utilisés lors de la purification des acides nucléiques. En voici quelques exemples (Schrader *et al.* 2012) :

- Des composés organiques : sels biliaires, mélanine, urée, phénol, éthanol, polysaccharides, SDS (sodium dodecyl sulphate), EDTA, détergents,
- Des protéines : collagène, hémoglobine, lactoferrine, immunoglobulines, protéinases, DNases,
- Des composés inorganiques : calcium.

La limite de détection de diverses méthodes (extraction d'ADN et PCR) sont décrites dans le Tableau 9.

Tableau 9 Limite de détection du genre *Brucella* par PCR dans différentes matrices

Ba148/928 (ARNr16S) (Herman and De Ridder 1992), F4-R2 (ARNr16S) (Romero *et al.* 1995), JPF-JPR (*omp-2*) (Leal-Klevezas *et al.* 1995), IS711 (Hinic *et al.* 2008), BRU P5-BRU P8 (région spacer 16S-23S rRNA) (Rijpens *et al.* 1996), *eryC* (Rodríguez-Lázaro *et al.* 2017), P1-P2 (*bcs31*) (Ohtsuki *et al.* 2008), B4-B5 (*bcs31*) (Baily *et al.* 1992), *bcs31* (Serpe *et al.* 1999). C : PCR conventionnelle ; LD : limite de détection ; RT : PCR en temps réel ; LAMP : Loop mediated isothermal amplification.

Échantillon	LD (UFC/ml)	Souche inoculée	Extraction de l'ADN	Amorces	PCR	Référence
Contenu stomacal (Foetus)	44	<i>B. melitensis</i>	DNeasy tissue kit (Qiagen)	Ba148/928	C	(Ciftci <i>et al.</i> 2017)
Foie (Souris)	2.10 ³	<i>B. abortus</i> S19	DNeasy tissue kit (Qiagen)	P1-P2	LAMP	(Ohtsuki <i>et al.</i> 2008)
Lait (Mouton)	4	<i>B. ovis</i> REO 189	Phénol-Chloroforme	<i>eryC</i>	RT	(Rodríguez-Lázaro <i>et al.</i> 2017)
Lait (Bovin, chèvre)	10	<i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i>	Phénol-Chloroforme	JPF-JPR	C	(Leal-Klevezas <i>et al.</i> 1995)
Lait (Bufflonne)	30	<i>B. abortus</i>	NulceoSpin® Food (Machery Nagel)	Kit <i>rpoB</i> (Applied Biosystem®)	RT	(Amoroso <i>et al.</i> 2011)
Lait (Bovin)	50	<i>B. abortus</i> 2308	Phénol-Chloroforme	F4-R2	C	(Romero and Lopez-Goñi 1999)
Lait	64	<i>B. melitensis</i>	DNeasy tissue kit (Qiagen)	F4-R2	C	(Ciftci <i>et al.</i> 2017)
Lait (Bovin)	100	-	Phénol-Chloroforme	IS711	C	(Ning <i>et al.</i> 2012)
Lait (Bufflonne)	400	<i>B. abortus</i> RB51	Phénol-Chloroforme	B4-B5	RT	(Marianelli <i>et al.</i> 2008)
Lait (Bovin)	2,8.10 ⁴	<i>B. abortus</i> Tulya	Phénol-Chloroforme	BRU P5-BRU P8	C	(Rijpens <i>et al.</i> 1996)
Lait	4,2.10 ⁴	<i>B. melitensis</i>	Congélation/décongélation	<i>bcs31</i>	C	(Serpe <i>et al.</i> 1999)
Lait pasteurisé	4,9.10 ⁴	<i>B. abortus</i> S19	DNeasy tissue kit (Qiagen)	P1-P2	LAMP	(Ohtsuki <i>et al.</i> 2008)
Rate (Souris)	820	<i>B. abortus</i> S19	DNeasy tissue kit (Qiagen)	P1-P2	LAMP	(Ohtsuki <i>et al.</i> 2008)
Sang	32	<i>B. melitensis</i>	DNeasy tissue kit (Qiagen)	F4-R2	C	(Ciftci <i>et al.</i> 2017)
Sang	100	<i>B. melitensis</i>	MagnaPure LC (Roche)	B4-B5	C	(Al-Ajlan <i>et al.</i> 2011)
Sang	700	<i>B. melitensis</i>	Pure Gene Kit (Gentra Systems)	B4-B5	C	(Baddour and Alkhalifa 2008)
Sérum	9.10 ⁴	<i>B. abortus</i> S19	ébullition	B4-B5	C	(Zamanian <i>et al.</i> 2015)
Sperme	82	<i>B. melitensis</i>	DNeasy tissue kit (Qiagen)	F4-R2	C	(Ciftci <i>et al.</i> 2017)

E.3.4.2. Extraction et purification de l'ADN

L'extraction et la purification des acides nucléiques sont les étapes préalables à toute analyse moléculaire. A partir d'échantillons biologiques, le but est d'obtenir de l'ADN pur et de bonne qualité exempt de tout contaminants, compatibles avec une réaction de PCR. Les méthodes organiques comme le phénol-chloroforme permettent d'obtenir de

l'ADN de grande qualité en grande quantité (Chomczynski and Sacchi 1987). Néanmoins, en laboratoire de diagnostic, cette méthode traditionnelle est de plus en plus remplacée par des kits commerciaux proposant des protocoles plus ou moins automatisés, à partir de colonnes de silices, ou de billes magnétiques (Figure 13). La méthode utilisée doit être adaptée à l'échantillon de départ, et l'application en aval (PCR, séquençage).

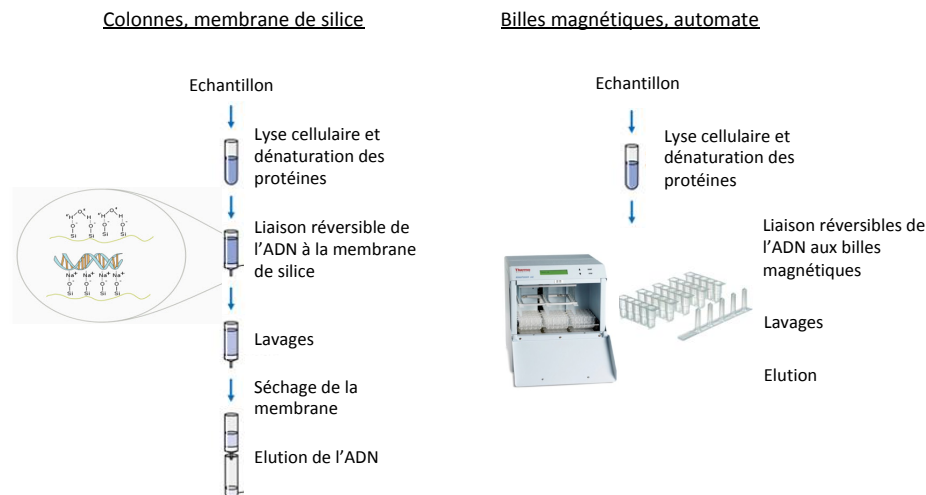


Figure 13 Méthodes d'extraction et de purification d'ADN sur colonnes ou billes magnétiques

Focus sur l'extraction d'ADN à partir de lait

Les principaux éléments étudiés pour améliorer l'efficacité des méthodes d'extraction d'ADN de *Brucella* spp. appliqués au diagnostic par PCR (kit ou méthodes organiques) sont les suivants :

- Volume de l'échantillon (de 50 µl à plusieurs ml),
- Centrifugation du lait à des vitesses (1000 g à 9700 g) et des durées variables (10 à 30 min) afin de séparer le lait en 3 phases : le gras, le surnageant et le culot (Sreevatsan *et al.* 2000, Marianelli *et al.* 2008),
- Incubation à des températures variables pour les étapes de lyses chimiques ou enzymatiques (température ambiante, 50°C, 70°C, 80°C, 100°C) (Leal-Klevezas *et al.* 1995, Romero and Lopez-Goñi 1999),
- Enzyme utilisée pour la lyse (protéinase K, trypsine, lipase et phospholipase (Rijpens *et al.* 1996), lysozyme (Romero and Lopez-Goñi 1999),

- Lyse mécanique par microondes (Rijpens *et al.* 1996), billes de verre, Chelex®100 (BioRad) (Romero and Lopez-Gofi 1999).

Des études menées sur d'autres genres bactériens à partir de lait (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium (Quigley *et al.* 2012), bactéries de la flore (Furet *et al.* 2004), *Staphylococcus aureus* (Kim *et al.* 2001, Cremonesi *et al.* 2006, Dibbern *et al.* 2015, Unno *et al.* 2015)) décrivent également l'utilisation d'étapes de pré-enrichissement, de billes de verre (Unno *et al.* 2015), de Chelex® (Giraffa *et al.* 2000, Kim *et al.* 2001).

Une étude comparant différentes méthodes d'extraction (méthode organique et kit commercial), conclut que la méthode permettant d'obtenir la meilleure sensibilité en PCR sur des échantillons de lait de bufflonnes dopés avec *B. abortus* RB51 (Marianelli *et al.* 2008) est celle décrite par Romero and Lopez-Goni (1999) :

- une étape de lyse chimique à 80 °C pendant 10 min avec du tampon NET (50mM NaCl, 125mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH -7) et du SDS comme détergent,
- suivie d'une étape de lyse enzymatique à 50 °C pendant au moins 1 h avec de la protéinase K (325 µg/ml),
- suivie de l'extraction de l'ADN au phénol-chloroforme (Romero and Lopez-Gofi 1999).

E.3.5. Importance des contrôles internes pour assurer la fiabilité du diagnostic

Le but principal des contrôles en PCR est de pouvoir détecter :

- les résultats faussement négatifs, causés par la présence d'inhibiteur de PCR, l'absence d'échantillon dans le puits, la défaillance du mix réactionnel de PCR ou d'extraction d'ADN,
- les résultats faussement positifs, causés par contamination croisée lors de la manipulation des échantillons, ou avec un contrôle positif externe.

Deux types de contrôles sont importants : les contrôles internes qui sont détectés simultanément avec la cible, et les contrôles externes qui sont détectés dans un puits différent (Hoorfar *et al.* 2004).

Il existe différentes stratégies pour l'élaboration des contrôles internes : homologue ou hétérologue, selon que les amorces utilisées ciblent la même région que la séquence cible ou non. Les contrôles internes homologues sont synthétisés en modifiant la séquence d'ADN ciblée par insertion, délétion ou ajout de sites de restriction (Sidor *et al.* 2013, Majidzadeh *et al.* 2014). Les contrôles internes hétérologues couramment utilisés ciblent des gènes de ménage eucaryotes ou sont synthétiques (Tableau 10).

La longueur de la séquence amplifiée du contrôle interne peut avoir une influence sur la détection de l'ADN cible (Pionzio and McCord 2014). Ainsi il est conseillé de préférer une taille d'amplicon plus grande pour le contrôle interne que la séquence cible.

Tableau 10 Types de contrôle de PCR en temps réel

Type de contrôle			Cible	Avantage / Inconvénient
Interne	Contrôle positif Endogène		Gène de ménage eucaryote (Bêta-2-Microglobuline, gène mitochondriaux, GAPDH,...)	Naturellement présent dans l'échantillon, Valide la présence de l'échantillon, Vérifie la stabilité de l'ADN cellulaire, Vérifie l'efficacité de l'extraction et amplification Présent en quantité différente selon la matrice et L'espèce d'hôtes, Risque de compétition avec la cible : baisse de sensibilité
	Contrôle positif Exogène	Homologue : amorces identiques à la cible, sonde différente	Matrice artificielle (Plasmide)	Détection d'inhibiteur de PCR, Minimisent les risques de d'hybridation entre amorces, Risque de compétition avec la cible : baisse de sensibilité, Mise au point complexe, Pas universel (adapté à une cible et un couple amorce/sonde)
		Hétérologue : amorces/sonde différentes	Matrice naturelle (ADN bactérien ou viral) ou artificielle	Détection d'inhibiteur de PCR, Quantité calibrée optimisée, Utilisable avec d'autres cibles
Externe	Contrôle positif		ADN de <i>Brucella</i> , quantité calibrée	Validité des réactifs et du thermocycleur
	Contrôle négatif		Eau stérile	Détection de contaminants

De nombreuses techniques de PCR conventionnelle et en temps réel sont décrites pour le diagnostic du genre *Brucella*. De même, les méthodes d'extraction d'ADN, étape fondamentale, existantes sont variées et reposent sur l'utilisation de réactifs organiques et de kits commerciaux. Néanmoins toutes les méthodes ne présentent pas les mêmes performances. Outre la sensibilité et la spécificité, les critères de choix d'une méthode incluent la présence de contrôles internes robustes, le coût, la rapidité d'obtention des résultats. Le diagnostic moléculaire doit être réalisé en association avec l'isolement et la sérologie.

F. Outils moléculaires utilisés du typage moléculaire à l'analyse génomique fonctionnelle

F.1. Typage moléculaire : de la taxonomie à la phylogénie

Les espèces de *Brucella* sont très proches génétiquement, néanmoins elles peuvent être différenciées les unes des autres par différents outils de typage moléculaire (Scholz and Vergnaud 2013). La méthode appropriée dépend de la problématique (taxonomie, épidémiologie), du contexte, des échelles de temps et d'espace, et souvent, plusieurs méthodes sont associées (Figure 14).

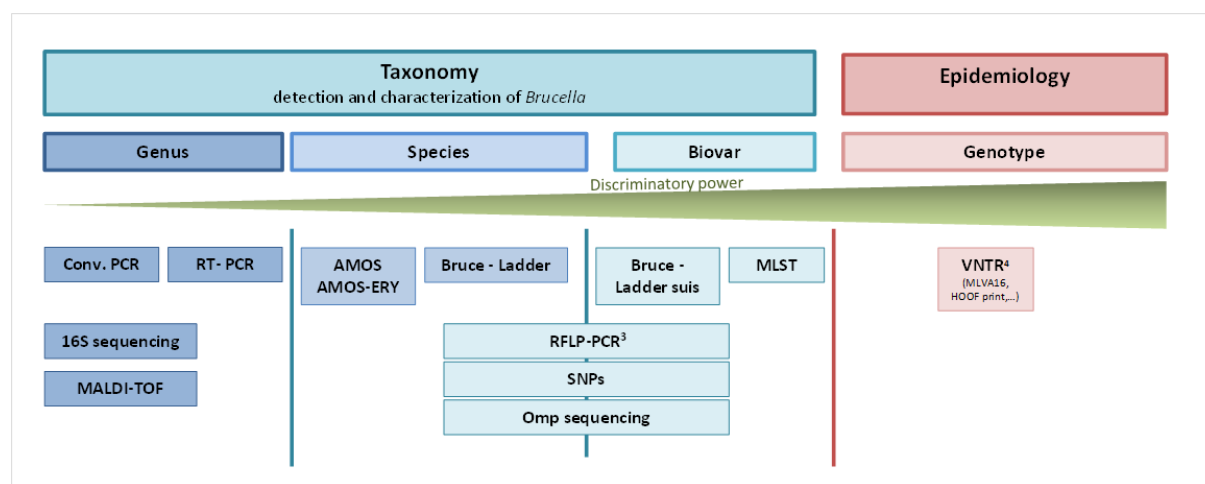


Figure 14 Principaux outils de typage moléculaire de *Brucella* sp. Adapté de (Jay *et al.* 2014)

Les premières techniques de typage moléculaire reposent sur l'analyse de polymorphisme en utilisant des PCR conventionnelle et la révélation de bande par électrophorèse.

La PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) appliquée à des gènes polymorphiques chez *Brucella* (*omp25*, *omp2a* et *omp2b*) est utilisée pour différencier les espèces (Ficht *et al.* 1990, Cloeckaert *et al.* 1995, Cloeckaert *et al.* 2001, Al Dahouk *et al.* 2005). Cette technique est encore utilisée aujourd'hui, malgré l'apparition de méthodes plus discriminantes comme la MLVA-16.

L'AMOS-PCR (Abortus-Melitensis-Ovis-Suis) fut la première PCR conventionnelle multiplexe adaptée au typage moléculaire de *Brucella* (Bricker and Halling 1995). Elle est basée sur le polymorphisme de localisation des séquences d'insertion IS711 dans le génome de *Brucella*. Elle permet de ne détecter que certaines espèces et ne différencie pas les biovars au sein d'une même espèce. Les résultats produits sont en accord avec les méthodes de biotypage classiques. Plus tard, des marqueurs ont été ajoutés pour permettre la détection de souches vaccinales (Ewalt and Bricker 2000).

La Bruce-Ladder est une PCR conventionnelle multiplexe développée plus récemment et a petit à petit remplacé l'AMOS-PCR (Garcia-Yoldi *et al.* 2006). Elle permet de détecter le genre *Brucella*, et d'identifier les 6 espèces classiques, les *Brucella* marines, *B. microti* et *B. inopinata* (Mayer-Scholl *et al.* 2010), ainsi que les souches vaccinales S19, RB51 et Rev1 (Lopez-Goni *et al.* 2008). Cette technique présente des difficultés d'identification de certaines souches de *B. canis* en *B. suis*. Développée plus tard, la Bruce-Ladder Suis permet de distinguer les différents biovars de *B. suis* (Lopez-Goni *et al.* 2011). Ces techniques sont largement utilisées en laboratoire de diagnostic.

Par ailleurs, des PCR en temps réel permettant la distinction à l'échelle de l'espèce de *Brucella*, basées sur l'insertion d'IS711 à des loci particuliers, ou des séquences spécifiques de gènes comme *omp31* sont également décrites (Bricker and Halling 1994, Vizcaino *et al.* 1997, Redkar *et al.* 2001, Newby *et al.* 2003, Probert *et al.* 2004, Hinic *et al.* 2008, Hansel *et al.* 2015).

D'autres méthodes ont été développées basées sur l'analyse des génomes : les méthodes MLVA, MLST ou encore l'analyse des SNPs. Ces techniques offrent un meilleur pouvoir discriminant, allant du genre à l'échelle individuelle. Elles permettent d'étudier de la diversité génétique entre des souches de *Brucella* (taxonomie, phylogénie, épidémiologie). Les résultats d'analyses MLVA, MLST et SNP sont souvent représentés

sous forme d'arbre, selon différents algorithmes (exemple : arbre de maximum de parcimonie, arbre de maximum de vraisemblance, arbre de recouvrement de longueur minimum).

La méthode MLST est basée sur le séquençage de courtes régions de 7 à 9 gènes de ménage après amplification par PCR. Chaque séquence différente représentant un allèle. Ces marqueurs sont d'évolution lente présentant de rares loci de polymorphisme. Ils permettent ainsi d'étudier les relations de phylogénie entre des souches, mais pas d'étudier de manière approfondie les souches d'un même foyer épidémiologique (Whatmore *et al.* 2007). Cette technique a été utilisée pour la définition de nouvelles espèces de *Brucella* (*B. papionis*, *B. vulpis*) (Tiller *et al.* 2010, Whatmore *et al.* 2014). La MLSA-21 (Whatmore *et al.* 2016) est une technique similaire dans laquelle les séquences de gènes de ménage sont concaténées et les analyses de phylogénie résultent du nombre de nucléotides différents pour chaque chimère. Elle intègre plus de marqueurs, de vitesse évolutive différente, et peut être appliquée à des études de foyers épidémiologiques (Figure 15). Néanmoins elle reste couteuse et lourde.

Les SNPs sont des substitutions de nucléotides causées par des erreurs de réplication de l'ADN non réparées (Keim *et al.* 2004). Ils sont identifiés après séquençage du génome complet. Les SNPs sont très stables dans le génome. Il est très peu probable qu'un SNP soit apparu deux fois indépendamment (très peu d'homoplasie). De même, il est très peu probable qu'un SNP mute à nouveau pour retrouver son état antérieur car le taux de réversion est très faible (Keim *et al.* 2004). Les SNPs sont donc des marqueurs moléculaires puissants, de plus en plus utilisés pour la phylogénie (Gopaul *et al.* 2008). La comparaison des génomes de différentes espèces de *Brucella* a mis en évidence des centaines de SNPs capable de distinguer différentes souches. Les arbres réalisés à partir d'analyses des SNPs coïncident avec ceux réalisés à partir d'autres outils (MLST, MLVA) et avec le biotypage (Figure 15). Des méthodes de PCR en temps réel sont développées pour le typage rapide de souches de *Brucella* (Fretin *et al.* 2008, Gopaul *et al.* 2008, Foster *et al.* 2012, Gopaul *et al.* 2014).

La MLVA consiste à déterminer le nombre de répétitions de VNTR choisis à différents loci déterminés, par PCR multiplexe et électrophorèse sur gel (ou séquençage capillaire). Les VNTR sont des séquences d'ADN répétées, courtes, adjacentes, dont le nombre de

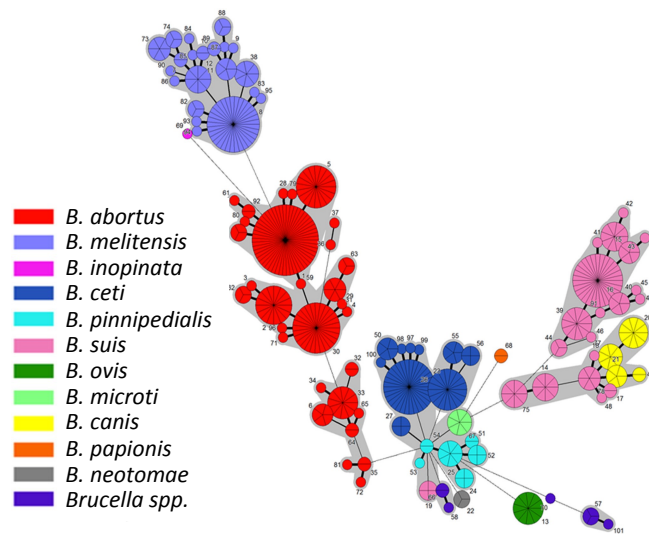
répétitions varie pour un même locus. Ils résultent d'erreur au cours de la réplication de l'ADN ou de recombinaison entre régions répétées homologues (van Belkum *et al.* 1998). Ils sont largement dispersés dans le génome de *Brucella* dans des régions codantes et non codantes. Il s'agit de marqueurs moléculaires de vitesse évolutive rapide (Whatmore 2009) possédant un fort pouvoir discriminant. Néanmoins, ils sont sujet à l'homoplasie et ne sont pas utilisés comme outil de phylogénie/identification d'espèce. Cette méthode a largement fait ses preuves dans de nombreuses études. Elle est utilisée pour investiguer un foyer, étudier les rechutes de brucellose chez un même individu (Al Dahouk *et al.* 2005), ou pour démontrer la stabilité génétique d'un vaccin vivant (Garcia-Yoldi *et al.* 2006).

La première application des VNTR au typage de *Brucella* est la « HOOF-print » (hypervariable Octomeric Oligonucleotide Finger Prints) développée en 2003 à partir des premiers génomes séquencés de *Brucella* (Bricker *et al.* 2003). Puis des marqueurs moléculaires de vitesses évolutives différentes ont été ajoutés au panel initial, pour atteindre 16 (MLVA-16) et 21 VNTR (Le Fleche *et al.* 2006, Whatmore *et al.* 2006, Al Dahouk *et al.* 2007) offrant un pouvoir plus discriminant. Les 16 marqueurs couramment utilisés peuvent être divisés en deux panels : le panel 1 de 8 minisatellites et le panel 2 considéré comme hypervariable de 8 microsatellites subdivisé en panel 2A (3 marqueurs) et 2B (5 marqueurs).

La classification utilisant la MLVA-16 est en accord avec les autres techniques et le biotypage.

Il existe une base publique internationale regroupant tous les résultats de MLVA de *Brucella*, qui facilite la mise en commun et l'interprétation des résultats : MLVA-NET (<http://mlva.u-psud.fr/brucella/>). En effet, les résultats peuvent parfois être difficiles à interpréter car par exemple la taille des bandes ne reflète pas toujours le nombre de répétitions (insertion, délétion, duplication).

A



B

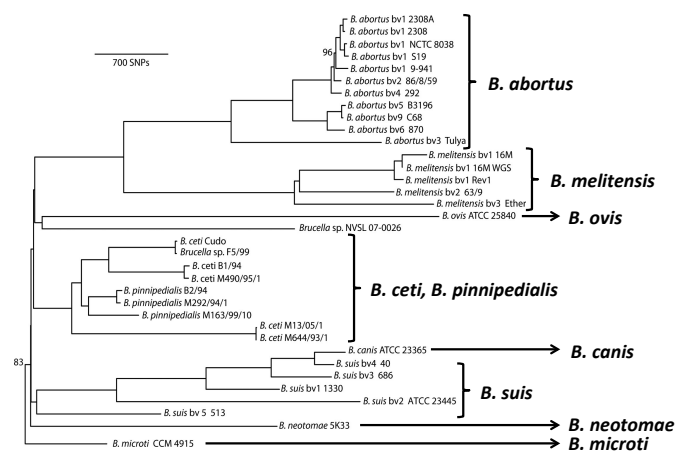


Figure 15 Arbres phylogénétiques de *Brucella* spp. réalisés à partir (A) de marqueurs MLSA21 (adapté de (Whatmore *et al.* 2016) et (B) des SNPs du core génome (adapté de (Wattam *et al.* 2014))

F.2. Séquençage du génome : de la phylogénie à la génomique comparative

La génomique comparative consiste en la comparaison du génome d'organismes différents, à différentes échelles : séquence ADN, gène, séquences de régulation de l'expression des gènes, architecture générale. En mettant en relief avec l'analyse de traits phénotypes (pathogénicité, distribution géographique, spécificité d'hôte), il est possible de mettre en évidence des différences génétiques qui pourraient entraîner des variations

de fonctions entre des organismes, et également de mieux appréhender l'apparition d'agents pathogènes émergents ou résistants.

La caractérisation des séquences génomiques permet de révéler le polymorphisme génétique des souches, basé sur l'existence de transferts latéraux d'éléments extra-chromosomiques, de réarrangements chromosomiques (transpositions, insertions, délétions), de mutations ponctuelles (SNPs), et de séquences répétées. La diversité génétique (désignant le degré de variété des gènes au sein d'une même espèce) peut être ainsi acquise par perte, acquisition ou inactivation de gènes. L'inactivation d'un gène, ou pseudogénéisation correspond à la perte de la fonction du gène alors qu'il est toujours présent dans le génome, sous une forme inactive, suite à un décalage du cadre de lecture, une délétion/insertion ou la présence d'un codon stop prématuré (Bolotin and Hershberg 2015). Elle conduit à une réduction génomique.

La comparaison de 10 génomes d'espèces différentes de *Brucella* a montré la présence de 4,6% de pseudogènes (Wattam *et al.* 2009). Il s'agirait du mécanisme principal, par rapport à la perte et l'acquisition de gènes, de diversité génétique au sein du genre, conduisant à la spéciation et la préférence d'hôte (Chain *et al.* 2005). La différence de préférence d'hôte et de répartition géographique de *Brucella* isolées de mammifères marins serait associée à la présence de SNPs et d'insertions d'IS711 (nombre et loci particuliers) responsables de pseudogénéisation de gènes de certaines voies métaboliques (Suárez-Esquivel *et al.* 2017).

Au sein d'une population donnée, le core génome est défini comme les gènes présents chez tous les membres de la population étudiée, et le génome accessoire comme les gènes présents de façon variable au sein des membres de cette population. Le tout représentant le pan-génome. Par exemple, parmi 42 génomes de *Brucella* de différentes espèces, le core génome est composé de nombreux gènes essentiels pour la survie, notamment des gènes impliqués dans le métabolisme (Yang *et al.* 2016).

OBJECTIFS ET PROBLEMATIQUE

La brucellose est une zoonose de répartition mondiale causée par le genre bactérien *Brucella* dont l'incidence est estimée à 500 000 cas humains par an. Le réservoir est animal, touchant principalement les espèces de rente, ce qui entraîne d'importantes pertes économiques relatives aux signes cliniques (perte de production, avortement, baisse de fertilité) et aux échanges commerciaux d'animaux et produits dérivés. L'Homme se contamine au contact ou par ingestion de substances animales infectées, et peut alors développer des symptômes débilissants sévères très proches d'une grippe. Différentes caractéristiques liées à la gravité des signes cliniques et à la faible dose infectante font que certaines espèces de *Brucella* sont classifiées comme MOT, et considérées comme agent potentiel de bioterrorisme. Dans les zones endémiques, la contamination des ruminants, associée à la consommation de produits laitiers reste une réelle préoccupation de santé publique vétérinaire et humaine. La maîtrise de la brucellose humaine repose sur le contrôle de la maladie chez l'animal, qui implique des connaissances solides sur l'épidémiologie de cette maladie, et notamment sur les agents pathogènes responsables.

Au sein du genre *Brucella*, 12 espèces sont décrites actuellement, dont les plus importantes pour l'Homme sont *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* et *B. canis*, qui partagent plus de 90% d'identité de séquence par hybridation ADN-ADN. Malgré le fait que ces espèces soient très apparentées sur le plan génétique, elles présentent une diversité de caractéristiques phénotypiques, de préférence d'hôte et de pathogénicité. L'homogénéité génétique des espèces de *Brucella* peut apparaître comme un atout pour le développement d'outils de diagnostic universel robuste. Il s'agit par ailleurs d'un challenge rendant difficile la caractérisation précise des isolats issus d'un même foyer.

D'une part le but de ce travail de thèse est d'apporter des éléments d'amélioration des outils appliqués au diagnostic de la brucellose, en termes de sensibilité et spécificité principalement. Actuellement le diagnostic repose sur la combinaison d'outils de sérologie, de PCR et d'isolement bactérien (la méthode de référence permettant un diagnostic de certitude). La méthode PCR en temps réel apparaît de plus en plus comme un outil de choix, permettant un diagnostic rapide et fiable. Néanmoins, dans les faits, en région endémique où l'objectif est de contrôler et d'éradiquer la maladie, la lutte est majoritairement basée sur l'approche sérologique. Or les méthodes sérologiques utilisées pour le dépistage sont généralement très sensibles, conduisant à la détection de faux positifs. Le manque de moyens financiers et matériels alloués à la gestion des zoonoses

dans ces régions pourrait être un frein à l'utilisation de la méthode PCR, apparaissant comme une bonne alternative à la sérologie. D'un autre côté, dans les régions indemnes de brucellose, ayant souvent des moyens financiers compatibles avec l'implantation de méthodes moléculaires, le but est de surveiller l'apparition de nouveaux foyers. Néanmoins les méthodes PCR décrites à ce jour manquent de sensibilité et ne sont donc pas toujours incluses dans les procédures globales de diagnostic.

Le premier objectif de cette thèse consiste donc à développer et optimiser un test diagnostique moléculaire universel par PCR en temps réel plus sensible que les méthodes déjà décrites. Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'application de cette méthode sur des échantillons de lait de ruminants, qui constituent à la fois une source importante de *Brucella* et une matrice non invasive intéressante pour le dépistage de la maladie à l'échelle des troupeaux.

D'autre part, si les grandes étapes clés de l'évolution de *Brucella* ayant conduit à la pathogénicité de certaines espèces ont été décrites, des questions fondamentales restent non élucidées, notamment concernant les mécanismes liés à l'adaptation à un hôte de préférence, et aux différences de virulence entre espèces et biovars. Au sein de ce genre bactérien très homogène et stable génétiquement, le second objectif de cette thèse vise à déterminer si des modifications génétiques seraient nécessaires à (ou induites par) l'infection d'hôtes de différentes espèces ; le changement d'hôte pouvant être considéré comme facteur de variation des agents pathogènes.

Le second but de ce travail de thèse est d'investiguer la stabilité génétique de *B. melitensis* en se basant sur l'étude d'un panel original de souches de terrain, en lien épidémiologique, avec un historique connu, et impliquant 4 espèces d'hôtes différentes (bovins, caprins, ovins, humain). Ainsi, différentes approches complémentaires ont été mises en œuvre, pour estimer les caractéristiques génomiques, phénotypiques, de préférence d'hôte et de pathogénicité.

Nous nous proposons de présenter les résultats en deux parties indépendantes.

PARTIE 2 : TRAVAIL EXPERIMENTAL

Chapitre I : Optimisation d'un outil de diagnostic moléculaire pour le genre *Brucella* à partir de prélèvements de lait

A. INTRODUCTION

L'enjeu pour contrôler la maladie repose sur le diagnostic rapide et précoce des animaux infectés et l'identification des souches circulantes. Actuellement, le dépistage sérologique des animaux est majoritairement utilisé : différentes méthodes existent, plus ou moins sensibles selon les outils, et économiques. Cependant elles manquent parfois de spécificité (Ducrotoy *et al.* 2016). La méthode de référence pour le diagnostic de certitude reste la bactériologie, nécessitant de travailler en laboratoire de confinement de type 3. Cette approche requiert 10 jours de culture (Alton 1988, OIE 2016). Des méthodes de diagnostic moléculaire (par PCR en temps réel ciblant le plus souvent la séquence IS711 et les gènes *bcsp31* et *per*) sont également décrites pour l'identification du genre *Brucella*, par exemple par Bounaadjia *et al.* (2009), Hinic *et al.* (2008), Probert *et al.* (2004). Quelques études se sont intéressées à l'application de ces méthodes sur des échantillons de terrain pour la détection du génome bactérien. Néanmoins, les méthodes proposées manquent encore de sensibilité pour être incluses dans la procédure globale de diagnostic.

L'objectif du premier axe de cette thèse est de développer une PCR en temps réel (TaqMan) en collaboration avec l'industriel IDVet (Montpellier, France), robuste et applicable à plusieurs échantillons de terrain. Nous nous sommes également concentrés sur l'optimisation d'une méthode d'extraction d'ADN à partir de prélèvements de lait, dans l'optique de fournir un kit de détection de la brucellose à l'échelle individuelle et de troupeau (lait de tank). En effet, le lait est une matrice facile à prélever et un tel outil permettrait un diagnostic rapide, applicable aux deux échelles. Une revue sur l'excrétion et la détection de *Brucella* à partir du lait a été rédigée au cours de la thèse (Annexe 4), étayant l'importance du lait comme matrice pour le diagnostic direct de la brucellose chez les ruminants. Par ailleurs, les kits de détection par PCR de *Brucella* spp. déjà commercialisés ont été recensés et leurs performances comparées (Tableau 11).

Il ressort de cette synthèse que les méthodes d'extraction à partir de lait déjà décrites sont fastidieuses et souvent associée à une méthode organique phénol-chloroforme, ou ne sont pas optimisées pour *Brucella*.

Par conséquent, les travaux menés ont visé au développement d'une méthode de détection par PCR en temps réel spécifique du genre *Brucella* qui soit rapide et moins fastidieuse que la bactériologie, plus sensible et plus spécifique que les méthodes PCR déjà proposées, afin de permettre un dépistage précoce des individus porteurs. La cible IS711 a été sélectionnée car il s'agit d'une séquence spécifique de ce genre, présente en multi-copies dans le génome. Cette cible permettrait ainsi d'obtenir de meilleurs résultats de sensibilité par rapport à des cibles présentes en copie unique (*bcs31*, *per*).

Tableau 11 Kits commerciaux de PCR pour le diagnostic de la brucellose

C : PCR conventionnelle ; TR : PCR en temps réel ; NP : non précisé

Fournisseur	Kit	Méthode	Détection	Cible	Limite de détection
AmpliSens	<i>Brucella</i> spp.-FRT PCR kit	TR	<i>Brucella</i> spp.	NP	1.10 ³ UFC/ml
Anatolia Geneworks	Bosphore <i>Brucella</i> Detection kit v1	TR	<i>Brucella</i> spp.	<i>bcs31</i>	
Applied Biosystems/ Life techno	TaqMan <i>Brucella</i> species detection kit	TR	<i>Brucella</i> spp.	NP	Amoroso <i>et al.</i> 2011
BioinGentech	VetPCR <i>B. abortus</i> Detection kit	C	<i>B. abortus</i> . (autre kit pour <i>B. melitensis</i>)	NP	
Biotecon	Foodproof <i>Brucella</i> detection kit	TR	<i>Brucella</i> spp., <i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i>	NP	1.10 ³ UFC/ml
Genesig, Primerdesign Ltd	Advanced Kit <i>Brucella</i> genus	TR	<i>Brucella</i> spp.	Protéine de surface	100 copies
Ingenetix	BactoReal Kit <i>Brucella</i> spp.	TR	<i>Brucella</i> spp.	IS711	5 copies/PCR (50% des cas)
Liferiver	<i>Brucella</i> RealTime PCR kit (Shanghai ZJ Bio-Tech Co)	TR	<i>Brucella</i> spp.	NP	5.10 ³ copies/ml
MOLBIOL	LightMix Kit <i>Brucella</i> Genus	TR	<i>Brucella</i> spp.	IS711	NP
MyBioSource	<i>Brucella abortus</i> Reagent	TR	<i>B. abortus</i>	Transporteur de surface	NP
NOACK	Multiplex PCR for <i>Brucella</i> spp detection and differentiation	C et TR	<i>Brucella</i> spp., <i>B. melitensis</i> , <i>B. abortus</i> , <i>B. suis</i> , <i>B. ovis</i> , vaccins (RB51, B19 et Rev1)	NP	NP
Qiagen	Microbial DNA qPCR Multi-Assay kit, <i>Brucella</i> spp Pathogenicity	TR	<i>B. canis</i> , <i>B. ovis</i> , <i>B. suis</i> , <i>Br. pinnipedialis</i> , <i>B. microti</i> , <i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i>	<i>wbKA</i> et <i>wzt</i>	NP
Techne	qPCR <i>B. abortus</i>	TR	<i>B. abortus</i>	Transporteur de surface	100 copies

B. MATERIEL ET METHODES

Le projet a comporté plusieurs étapes :

- mise au point d'une méthode de PCR en temps réel sensible et spécifique,
- optimisation de l'extraction d'ADN à partir de la matrice « lait » (dilutions successives de lait cru artificiellement contaminé par *B. melitensis*)
- validation de la méthode complète à partir de prélèvements de lait terrain.

Le travail de développement et de validation de la méthode PCR IDBRU a été réalisé selon la norme NF U47-600-02. Les définitions de spécificité et sensibilité analytiques et diagnostiques, de limite de détection analytique, limite de détection de méthode, domaine de linéarité, s'y réfèrent (AFNOR 2015).

B.1. Souches bactériennes

La liste des souches étudiées est présentée dans le tableau en Annexe 2. Elle inclut des souches de *Brucella*, ainsi que des souches d'espèces différentes dans le but de tester la spécificité analytique de la méthode PCR développée, dont : des bactéries présentant des réactions croisées en sérologie avec *Brucella* spp., des bactéries proches phylogénétiquement de *Brucella* spp., des agents causals d'avortement chez les ruminants.

Les souches de *Brucella* spp. ont été cultivées sur milieu solide (sang + agar n°2, Oxoid, France), supplémenté en sérum équin, à 37 °C en présence de 5% de CO₂ pendant 48 à 72 h. Les souches obtenues de la collection BCCM-LMG ont été cultivées selon les recommandations du laboratoire (<http://bccm.belspo.be>).

Toutes les souches sont conservées à -20 °C en bouillon trypticase soja (BioMérieux, France) avec 10% de glycérol.

B.2. Echantillons de lait de terrain

Le Tableau 12 décrit les analyses ayant pu être réalisées à partir de chaque prélèvement de terrain. Au total 3 séries d'échantillons de terrain ont été analysées par PCR en temps réel, et/ou culture, et/ou sérologie.

(1) Un total de 52 échantillons de lait issus de troupeaux bovins avec historique de brucellose en Chine a été analysé. Pour 10 de ces prélèvements, nous n'avons aucune

information épidémiologique. Néanmoins, les autres 42 échantillons proviennent de 19 animaux de la même exploitation, prélevés à différentes dates entre octobre 2016 et mars 2017, et correspondent à un mélange des 4 quartiers.

(2) Par ailleurs, 208 échantillons de lait de chèvres appartenant à des troupeaux avec historique de brucellose (avortements, séropositivité) ont été prélevés au Sultanat d'Oman (issus de 125 animaux, un prélèvement pour chaque mamelle).

Ces prélèvements ont été envoyés au laboratoire à -80 °C puis ont été conservés à -20 °C et analysés au laboratoire.

(3) Enfin, 19 échantillons de lait de vache ont été prélevés entre le 5 et le 12 mars 2018 en Sicile (région de Raguse), conservés à +4 °C et analysés dans les 48 h (6 sont des laits de tanks et 14 des laits individuels). Par ailleurs, 12 vaches d'un même troupeau, ainsi que leur lait de tank, sont inclus dans l'étude.

Tableau 12 Description des analyses réalisées sur les échantillons de lait de terrain

^a Les cibles IS711-ref, *bcp31* et *per* sont décrites dans Bounaadja *et al.* (2009).

^b La culture est réalisée selon les normes OIE (OIE 2016), à partir de 400 µl de lait dans un bouillon CITA pendant 4 jours puis sur milieu Farrell et milieu BS pendant 4-5 jours.

^c Méthode iELISA (kit ELISA ID Screen® Brucellosis Milk Indirect, IDVET diagnostics, France)

Protocoles d'extraction d'ADN : B ID Gene™ Spin Universal (IDVet, France) ; L IDGene™ Mag MAP Kit (IDVet, France) ; M High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, France).

Pays		Chine	Sultanat d'Oman	Italie (Sicile)
Année d'échantillonnage		2016-2017	2015	2018
Espèce animale		Bovin	Caprin	Bovin
Nombres d'échantillons		52	208	19
Conservation		- 20 °C	- 20 °C	+ 4 °C
PCR en temps réel	IDBRU	X	X	X
	IS711-ref ^a	X		
	<i>bcp31</i> ^a	X		
	<i>per</i> ^a	X		
Protocole d'extraction d'ADN	B	X	X	X
	L	X		
	M	X		
Centrifugation du lait		X		
Culture ^b		X	X	
Sérologie ^c				X

B.3. L'extraction d'ADN

Tous les ADN extraits ont été conservés à -20 °C en tampon d'élution ou en eau sans nucléase.

B.3.1. Protocoles d'extraction d'ADN utilisés

L'ensemble des protocoles d'extraction d'ADN testés à partir de lait (lait naturellement et expérimentalement infectés) est résumé dans le Tableau 13.

Les kits commerciaux utilisés dans cette étude sont les suivant :

- Kits sur colonne :
 - High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) Roche Diagnostics, France. Ce kit est validé et utilisé en routine au LNR Brucellose ;
 - IDGene™ Spin Universal kit (SPIN), IDVet, France.
- Kits sur billes magnétiques avec automate KingFisher®
 - IDGene™ Mag Fast Universal Kit (MagFAST), IDVet, France ;
 - IDGene™ Mag MAP Kit (MagMAP), IDVet, France.

➤ Optimisation de la méthode d'extraction d'ADN à partir de lait

Au total 13 protocoles différents ont été testés (voir Tableau 13), en faisant varier les paramètres suivants :

- le volume de la prise d'essai,
- l'ajout de protéinase K,
- l'effet d'une incubation à -20 °C pendant 1 h pour la précipitation des ADN.

Ces paramètres ont été sélectionnés car ils apparaissaient comme critiques dans de nombreux protocoles d'extraction d'ADN à partir de lait publiés (Oswald , Romero and Lopez-Goñi 1999).

Par ailleurs, l'effet de la centrifugation des échantillons de lait a été étudié : l'ADN est alors extrait à partir d'une des phases obtenues (phase de gras, surnageant ou culot). Les conditions de centrifugation sont appliquées à un volume de 1,8 ml de lait : 7000 g 15 min (Alton 1988). Ces conditions ont été choisies car elles semblaient être une alternative intermédiaire, facilement réalisable en laboratoire peu équipé, dans l'optique

d'une utilisation universelle des méthodes proposées (petite centrifugation de paillasse suffisante).

L'effet du chauffage des échantillons de lait à différents temps et températures (80 °C ou 100 °C pendant 15 min ou 30 min) a également été testé dans l'optique d'inactiver les *Brucella* spp. potentiellement présentes, avant même de commencer l'extraction d'ADN. Cette mesure visait à diminuer le risque de contamination de l'expérimentateur lors de cette étape, et de pouvoir manipuler les échantillons en dehors d'un laboratoire confiné.

➤ Extraction d'ADN à partir de culture bactérienne pure

L'ADN de souches isolées de *Brucella* spp. a été obtenu par méthode phénol-chloroforme, à partir d'une suspension en PBS (phosphate buffer saline) comme décrit précédemment (Da Costa *et al.* 1996).

L'ADN des autres espèces a été extrait et purifié à partir de kits commerciaux selon les instructions du fournisseur (protocole M, voir Tableau 13).

Tableau 13 Protocoles testés dans cette étude

Quatre kits (IDGene™ Spin Universal kit (SPIN) ; IDGene™ Mag Fast Universal kit (Mag FAST) ; IDGene™ Mag Map kit (MagMAP) ; High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics (ROCHE)) sont comparés pour l'extraction d'ADN à partir de lait de vache artificiellement contaminé par *B. melitensis* 16M. PK: protéinase K ; Rav1 LFAST LMAP et BB sont les tampons de lyse inclus dans les kits commerciaux.

Protocole	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
Kit	SPIN					Mag FAST						Mag MAP	Roche
Volume lait (µl)	100					50	100	50	100	50	50	100	200
PK	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
Tampon de lyse	Rav1	LMAP	Rav1	LMAP	Rav1	LFAST	LFAST	LMAP	LMAP	LFAST	LMAP	LMAP	BB
Précipitation (-20 °C, 1 h)	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

B.3.2. Matrice de lait utilisée pour la comparaison des protocoles d'extraction d'ADN

Afin d'optimiser la méthode d'extraction à partir de lait, des échantillons de lait de bovins issus de troupeaux officiellement indemnes de brucellose ont été prélevés, conservés à -20 °C et expérimentalement infectés avec *B. melitensis* 16M (Figure 16).

Une concentration estimée à 750 UFC/ml (soit environ 1.5-2 fois la limite de détection de la méthode incluant l'extraction d'ADN avec le protocole M, et la PCR IDBRU) a été utilisée pour comparer 12 protocoles d'extraction d'ADN (décrits dans le Tableau 13).

Afin de déterminer la limite de détection de la méthode globale « extraction d'ADN + PCR », des dilutions successives d'échantillons de lait cru artificiellement contaminés ont été analysées.

La concentration initiale de la suspension utilisée, calibrée puis diluée dans le lait, a été vérifiée par dénombrement de colonies après étalement sur boîtes.

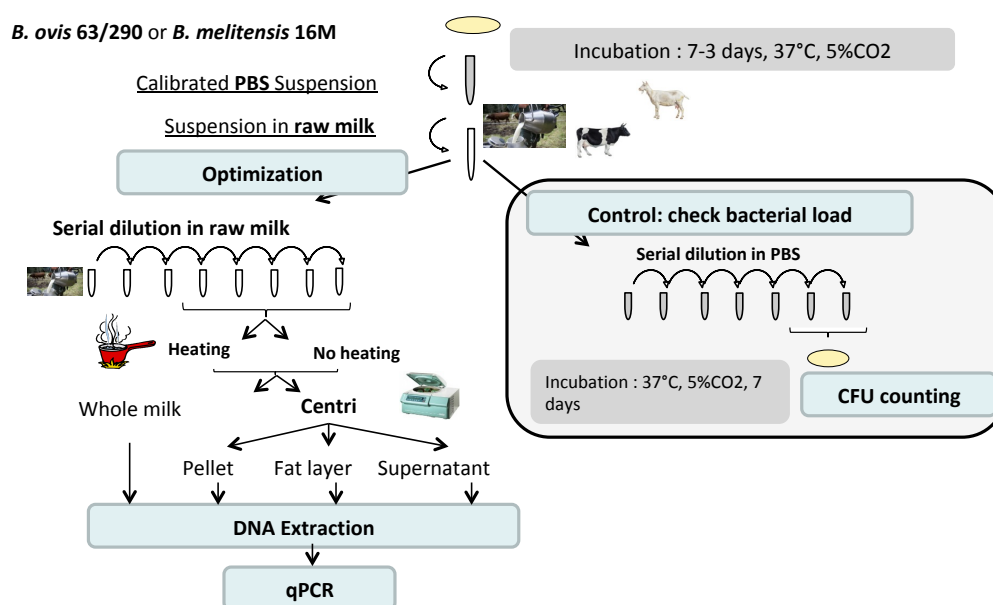


Figure 16 Protocole général d'optimisation de l'extraction d'ADN à partir de lait artificiellement contaminé

B.4. Caractéristiques de la méthode PCR en temps réel

La méthode développée ici pour le diagnostic par PCR en temps réel de la brucellose a été désignée IDBRU. L'ensemble des séquences des amorces et des sondes utilisées dans cette étude est décrit dans le Tableau 14.

Tableau 14 Séquences des amorces et sondes utilisées en PCR en temps réel dans cette étude

Cible	Taille produit de PCR (bp)	Amorces (5'-3') et sondes (5'Fluorophore-3'Quencher)	Référence
<i>per</i>	68	Sens GTTTAGTTTCTTTGGGAACAAGACAAV Anti-sens GAGGATTGCGCGCTAGCA Sonde FAM-TACGACCGGTGAAGGCGGGATGMGB-NFQ	Bounaadja <i>et al.</i> 2009
<i>bcp31</i>	178	Sens TCTTTGTGGGCGGCTATCC Anti-sens CCGTTCGAGATGGCCAGTT Sonde FAM-ACGGGCGCAATCT-MGB-NFQ	Bounaadja <i>et al.</i> 2009
IS711	113	Sens CGCTCGCGCGGTGGAT Anti-sens CTTGAAGCTTGCGGACAGTCACC Sonde FAM-ACGACCAAGCTGCATGCTGTTGTCGATG-TAMRA	Bounaadja <i>et al.</i> 2009
IS711	61	Sens AAGTGATCGGCATCATAGGC Anti-sens TATCCGGCTTAGAGGGTGTG Sonde FAM-CATCAGCAATGACATGCCC-BHQ2	Cette étude
Contrôle exogène		Sens / Anti-sens / Sonde Cy5 - - BHQ2	Cette étude (IDVet®)
Contrôle endogène		Sens / Anti-sens / Sonde YY- - BHQ2	Cette étude (IDVet®)

B.4.1. Amorces et sondes pour la détection de *Brucella* spp. par IDBRU

Pour la détection du genre *Brucella*, plusieurs cibles sont décrites (*cf* Introduction Générale, partie E.3.1). La cible IS711 a été sélectionnée dans ce travail car il s'agit d'une séquence spécifique de ce genre, présente en multi-copies dans le génome. Cette cible permettrait ainsi d'obtenir de meilleurs résultats de sensibilité par rapport à des cibles présentes en copie unique (*bcp31*, *per*).

Un couple d'amorce et une sonde TaqMan ont été conçus à partir d'un alignement de la séquence de l'IS711 de *B. melitensis* 16M, *B. abortus* 2308, *B. suis* 1330, *B. canis*

ATCC23365 et *B. ovis* ATCC25840 par le logiciel MEGA6 (Tamura *et al.* 2013) puis sélectionnés en utilisant Primer3Plus Version 2.4.2 (Untergasser *et al.* 2012).

Un alignement utilisant la base de données Genbank (BLAST, Basic Local Alignment Search Tool) a été réalisé afin de vérifier la spécificité *in silico* des oligonucléotides choisis. La sonde TaqMan IDBRU est pourvue d'un reporteur FAM à l'extrémité 5' et d'un quencher BHQ2 à l'extrémité 3'.

B.4.2. Contrôles interne de la PCR IDBRU

Deux autres paires d'amorces et de sondes ont été incluses dans le milieu réactionnel. Ils permettent d'amplifier deux contrôles internes :

- un contrôle interne exogène, dont la cible est ajoutée à chaque échantillon au début de l'étape d'extraction d'ADN,
- un contrôle interne endogène, qui correspond à un gène de ménage de ruminant.

Pour chaque réaction de PCR, un contrôle positif (ADN de *Brucella* déjà caractérisé) et un contrôle négatif (eau pure) ont été inclus.

La valeur des Cq du contrôle interne exogène obtenue pour un échantillon ne doit pas différer de plus de 3 Cq par rapport à la valeur obtenue pour le contrôle négatif. Une trop grande différence indiquerait la présence d'inhibiteurs de la PCR, et nécessiterait de recommencer l'analyse après dilution de l'ADN extrait au 1/10^{ème} (Tableau 15).

Les valeurs des Cq du contrôle interne endogène sont liées à la matrice utilisée.

Ces deux contrôles internes ont été produits par IDVet® (séquences non précisées, secret industriel) et sont inclus dans la PCR dans un but d'harmonisation des gammes de kits de PCR en temps réel produites par la compagnie. L'intérêt de tester deux contrôles pourra être discuté.

Tableau 15 Interprétation des résultats de PCR IDBRU en fonction des valeurs de Cq obtenus avec la cible IS711 et les contrôles internes exogène et endogène

Une valeur de Cq du contrôle interne exogène différant de plus de 3 Cq par rapport à la valeur de Cq obtenue pour le témoin négatif doit être interprétée comme la présence d'inhibiteurs potentiels de PCR. Dans ce cas l'échantillon doit être dilué au 1/10^{ème} et testé à nouveau par PCR.

^(a) Un résultat est invalide si au moins un contrôle interne n'est pas détecté par PCR (Cq > 40).

Interprétation du résultat de PCR IDBRU	Cq IS711 IDBRU	Cq contrôle interne exogène	Cq contrôle interne endogène
Positif	≤ 40	≤ 40	≤ 40
Négatif	> 40	≤ 40	≤ 40
Invalide	≤ ou > 40	> 40 ^(a)	> 40 ^(a)

B.4.3. Conditions de la méthode PCR IDBRU

La réaction de PCR IDBRU est réalisée avec un volume final de 13 µl : 8 µl de mix et 5 µl d'ADN. Le mix réactionnel comprend l'ensemble des 3 couples d'amorces et sonde, un MasterMix contenant le fluorephore ROX, et de l'eau libre de DNases. Sa composition exacte n'est pas précisée (secret industriel, IDVET®).

La PCR comprend :

- un cycle à 50 °C pendant 2 min ;
- un cycle de dénaturation préliminaire à 95 °C pendant 10 min,
- 40 cycles de dénaturation/hybridation/amplification 95 °C 15 sec ; 60 °C 1 min

Trois automates ont été utilisés : Thermocycler QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System, Applied Biosystems® et ViiA™ 7 System et Life technologies Applied Biosystems™.

B.5. Sensibilité et spécificité analytique de la PCR IDBRU

La spécificité analytique a été testée à l'aide de l'ADN de souche de *Brucella* de toutes espèces et biovars, ainsi que de souches d'autres microorganismes décrits dans le tableau en Annexe 2.

La sensibilité analytique a été mesurée en nombre de copies d'IS711 par réaction de PCR, grâce à un plasmide pEX - A2 contenant une partie de la séquence d'IS711 de *B. melitensis* 16M (PLS-BRU) ciblée par les amorces et sondes sélectionnées. Elle a été déterminée grâce à des dilutions en cascade en Tris-EDTA de 10⁵ à 1 copies de plasmide

par PCR. La concentration du plasmide a été estimée avec un fluoromètre QuBit®, à l'aide du kit QuBit® dsDNA HS (Fisher Scientific), et la relation avec le nombre de copies par PCR a été calculée selon la formule suivante :

$$\text{Nb copies / PCR} = \left(\text{concentration} \cdot \frac{Na}{M} \right) \cdot 10^{-3} \cdot 2$$

Na Nombre d'Avogadro, M poids moléculaire du plasmide 895597,45 g/mol (calculé par ms.bioinformatics).

B.6. Effet de la conservation à +4 °C de lait artificiellement contaminé sur la détection par PCR

Du lait de vache contaminé artificiellement avec une quantité calibrée de *B. melitensis* 16M (7.10^8 UFC/ml de lait) a été analysé par PCR IDBRU (l'extraction d'ADN est réalisée avec le kit B) juste après infection (J0), à 24 h (J1) et 36 h (J3). L'échantillon a été conservé à +4 °C. Pour chaque temps post-infection, deux réplicats biologiques ont été analysés, chacun étant amplifié également en duplicatas par PCR (soit 4 répétitions pour chaque dilution testée).

B.7. Isolement de *Brucella* spp. par culture et bio-typage

La mise en culture des prélèvements de lait a été réalisée selon les protocoles décrits dans le Manuel Terrestre de l'OIE (OIE 2016).

Les milieux utilisés sont :

- Le milieu basal gélosé (BS) : composé de gélose au sang Oxoid™ supplémenté avec 5 % de sérum équin. Les boîtes ont étéensemencées avec 400 µl de lait ;
- Le milieu sélectif Farrell (Stack *et al.* 2002) : il s'agit du milieu basal additionné d'antibiotiques. Les boîtes ont étéensemencées avec 400 µl de lait ou 400 µl de bouillon CITA ;
- Le milieu sélectif CITA (De Miguel *et al.* 2011) : il s'agit d'un milieu plus sélectif que le BS, mais moins que le milieu Farrell. Par ailleurs, la culture liquide est conseillée pour augmenter comme étape d'enrichissement des échantillons peu chargés en bactéries (OIE 2016). Pour les échantillons de terrain, 5 ml de lait ont été dilués dans 5 ml de milieu CITA liquide. Des boîtes de CITA solides ont étéensemencées avec 400 µl de bouillon CITA.

Pour chaque échantillon de lait, deux boîtes de BS, deux boîtes de Farrell ainsi qu'un bouillon CITA ont été ensemencés. Une culture du bouillon CITA est réalisée sur milieu Farrell (deux boîtes) et CITA (2 boîtes) une semaine post ensemencement (OIE 2016).

B.8. Analyses sérologiques des laits

Les laits issus de troupeaux bovins de Sicile ont été testés par iELISA avec le kit ID Screen® Brucellosis Milk Indirect (IDVet, France), selon les recommandations du fabricant.

B.9. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont utilisées les tests suivants :

- Test de Kruskal-Wallis pour comparer des valeurs quantitatives de séries non appariées, non paramétriques ($p < 0,05$ considéré comme significatif réalisé sur GraphPad Prism®),
- Test ANOVA de Friedman pour comparer des valeurs quantitatives de séries appariées, non paramétriques ($p < 0,05$ considéré comme significatif, réalisé sur GraphPad Prism®),
- Test de Cochran pour comparer des valeurs qualitatives de séries appariées, non paramétriques ($p < 0,05$ considéré comme significatif, réalisé sur GraphPad Prism®),
- Test de Chi-2 de McNemar et test de concordance pour l'analyse des tables de contingence (séries appariées).

Les résultats quantitatifs sont exprimés comme suit : moyenne +/- erreur standard à la moyenne (SEM).

C. RESULTATS

C.1. Performances analytiques de la PCR IDBRU

C.1.1. Spécificité analytique

La spécificité du locus ciblé IS711 a été validée *in silico* par comparaison des alignements de la séquence des amorces et de la sonde, grâce à la base de données Genbank (BLAST, Basic Local Alignment Search Tool).

Le test d'inclusivité a été réalisé sur un panel d'ADN de tous les biovars et espèces du genre *Brucella* : IDBRU a détecté toutes les souches de référence de *Brucella* spp..

L'exclusivité a été évaluée avec de l'ADN provenant de micro-organismes autres que *Brucella* issus de la même niche écologique, associés à des avortements de ruminants ou présentant une réaction sérologique croisée. La PCR IDBRU est spécifique pour la détection de *Brucella* spp., car aucun produit d'amplification n'a été observé pour les autres micro-organismes.

Au cours de cette étape de validation analytique, tous les contrôles (contrôle positif et négatif, contrôles internes) étaient compatibles avec l'absence d'inhibition de la PCR et l'absence de contamination des puits par des ADN de *Brucella* spp. ou génomique de ruminant « contaminants » (contrôle négatif non amplifié).

C.1.2. Limite de détection analytique (sensibilité analytique)

La limite de détection de la PCR correspond au plus petit nombre de copies de la cible par unité de volume, qui peut être détecté dans 95% des cas. Pour déterminer la limite de détection de la PCR IDBRU, des dilutions en série de PLS-BRU ont été analysées, en conditions de répétabilité intra-essais (8 répliquats par dilution testée) et inter-essais (3 séances indépendantes).

La limite de détection de la PCR IDBRU en programme classique à 95% a été estimée à 12,5 copies/réaction (Tableau 16).

Le domaine de linéarité est déterminé par l'équation de la droite de régression (droite affine type $y=ax+b$) dont les paramètres permettent de décrire l'efficacité de la PCR (pente = -3.23 ; coordonnées à l'origine = 39.1 ; coefficient $R^2 = 0.994$). L'efficacité moyenne de la PCR IDBRU a été estimée à 103%.

Tableau 16 Limite de détection de la PCR IDBRU

Des dilutions en série de plasmide incluant la cible ont permis de déterminer la limite de détection de la PCR IDBRU.

Copies d'IS711 / PCR	Nb de positifs Essai 1	Nb de positifs Essai 2	Nb de positifs Essai 3	Total positifs	Total testés	Fréquence de détection (%)
50	8/8	8/8	8/8	24	24	100
25	8/8	8/8	8/8	24	24	100
12,5	8/8	8/8	7/8	23	24	95,8
6,25	7/8	6/8	5/8	18	24	75
3,125	2/8	5/8	3/8	10	24	41,7
1,56	2/8	2/8	2/8	6	24	25

C.2. Optimisation de la méthode complète à partir de lait artificiellement contaminé par *Brucella*

Pour ce travail, des échantillons de lait de vache conservés à -20 °C ont été expérimentalement infectés avec des suspensions calibrées de *B. melitensis* 16M. Des dilutions en cascade de lait artificiellement contaminé ont été analysées, en vérifiant systématiquement la concentration par culture à chaque dilution.

C.2.1. Inactivation de *Brucella* spp. pour augmenter la biosécurité

La capacité d'inactivation de *Brucella* a été vérifiée pour toutes les méthodes d'extraction de l'ADN incluses dans l'étude. En particulier, dans chaque condition (tampon de lyse utilisé, présence de protéinase K ou non, conditions de temps et de température), le volume total obtenu après l'étape de lyse a été étalé sur gélose et aucune colonie n'a été détectée après 14 jours de culture. Cette étape correspond à la sortie des échantillons du laboratoire de confinement de niveau 3 et assure la sécurité du manipulateur pour la suite du protocole réalisée en laboratoire conventionnel (niveau 1 ou 2).

Par ailleurs, afin d'inactiver *Brucella* avant de procéder à l'extraction de l'ADN (c'est-à-dire directement à partir des prélèvements de lait), une étape supplémentaire de chauffage des échantillons de lait a été testée. Les différentes conditions de temps et de température

testées conduisent à l'inactivation de *Brucella* dans le lait (80 °C ou 100 °C pendant 15 min et 30 min). Néanmoins, cette étape de prétraitement a augmenté la limite de détection et a retardé la détection (Cq supérieur). Ces résultats préliminaires nous ont conduits à ne pas intégrer cette étape de chauffage préalable à la méthode finale d'extraction d'ADN (Figure 17).

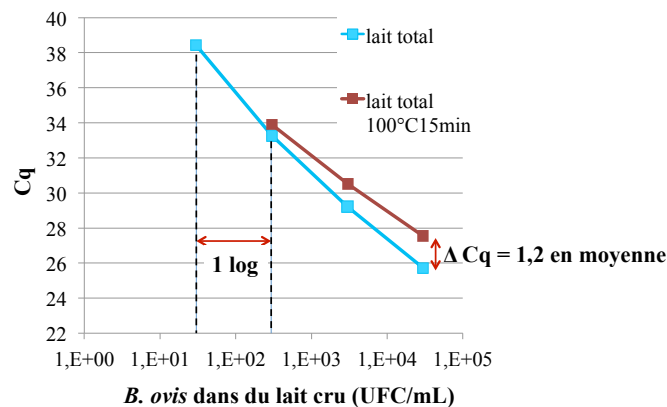


Figure 17 Effet du chauffage dans la détection de l'IS711 dans le lait

B. ovis dilué dans du lait cru est analysé par PCR IDBRU après extraction d'ADN (protocole M). L'effet du chauffage à 100 °C pendant 15 min a été établi par comparaison des Cq. Résultats correspondant à une seule expérience.

C.2.2. Evaluation de la capacité d'extraction d'ADN de kits commerciaux en fonctions de certains paramètres (lait artificiellement contaminé)

Au total 12 protocoles ont été testés (A à L, voir Tableau 13), adaptés de 3 kits commerciaux dont un kit sur colonne (SPIN) et de deux kits à billes magnétiques sur automate (MagFAST et MagMAP). La matrice de départ était constituée de lait de vache décongelé, contaminé artificiellement avec une suspension calibrée de *B. melitensis*, estimée à 750 UFC/ml. Pour deux kits commerciaux (SPIN et MagFAST), l'effet de la prise d'essai, de la protéinase K, du tampon de lyse et d'une étape de précipitation des ADN à -20 °C 1 h ont été testés.

Les résultats présentés correspondent à une compilation de 1 à 3 expériences indépendantes. Pour chaque expérience, chaque méthode d'extraction a été réalisée en triple réplicats biologiques, et chaque ADN extrait a été amplifié en double. L'efficacité de l'extraction a été évaluée à partir i) des nombres moyens de cycles observés pour les différentes modalités. Les résultats ont été comparés à l'aide du test de Kruskal-Wallis, (et représentés sous forme de boîtes à moustache indiquant la médiane et les quartiles des

Cq) et ii) de la proportion d'échantillons pour lesquels l'ADN de *Brucella* a été détecté (test de Cochran).

Pour le kit sur colonne (SPIN, protocoles A à E), l'extraction a été améliorée par l'utilisation du tampon de lyse LMAP (A vs B, $p=0,047$ pour l'IS711, $p=0,0003$ pour le contrôle interne exogène). L'étape de précipitation de l'ADN à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 1 h n'a pas amélioré statistiquement la détection (cf comparaisons des protocoles A vs C d'une part, et B vs D d'autre part ; $p=0,048$ entre A vs D pour l'IS711).

Concernant le kit sur billes magnétiques (MagFAST, protocoles F à K), le tampon de lyse LMAP a fortement amélioré l'efficacité de détection de l'IS711, mais aucune différence significative n'a été observée pour la détection du contrôle interne exogène (F vs H ; G vs I ; J vs K).

L'ajout de protéinase K n'a pas eu d'effet significatif, quel que soit le kit utilisé (A vs E ; F vs J ; F vs K) et ce, pour les 2 cibles (détection de l'IS711 et contrôle interne exogène).

D'après les résultats des tests statistiques et les valeurs moyennes de Cq observées à partir des échantillons positifs, les meilleurs résultats ont été obtenus avec les méthodes B (SPIN avec le tampon de lyse LMAP et ajout de protéinase K) et H (MagFAST avec le tampon de lyse LMAP et protéinase K) (Figure 18 A).

Ces deux méthodes ont ensuite été comparées entre elles et avec un autre kit (protocole L) commercialisé pour le diagnostic de la paratuberculose dans le lait (Figure 18 B). En conclusion, les méthodes L et H sont meilleures que la méthode B ($p=0,05$ et $p=0,018$ respectivement pour détection de l'IS711 (B vs H pour la détection du contrôle interne exogène, $p<0,0001$). Par ailleurs, une ANOVA prenant en compte l'ensemble des protocoles, a conduit à des résultats cohérents, indiquant des résultats significativement meilleurs pour les protocoles L et H par rapport aux 10 autres protocoles testés.

En conclusion, deux méthodes avec billes magnétiques et automates (MagFAST et MagMAP) ainsi qu'une méthode sur colonne (SPIN) ont été optimisées dans le cadre de la détection de *Brucella* dans le lait par PCR.

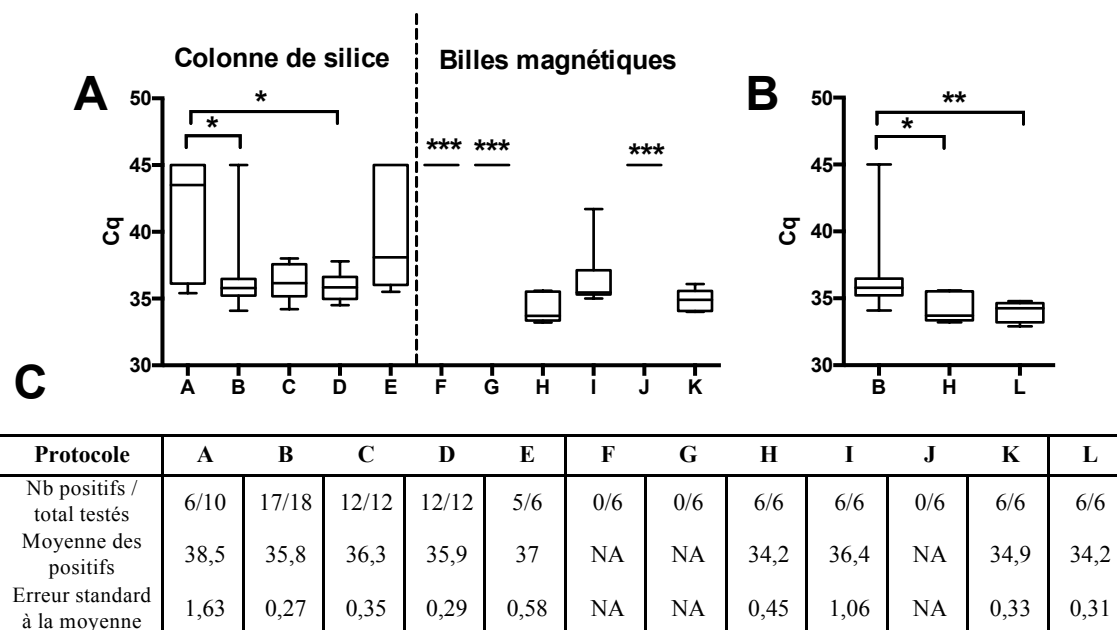


Figure 18 Optimisation de l'extraction d'ADN à partir de lait artificiellement contaminé, à partir de 3 kits commerciaux

Trois kits (de A à E : IDGene™ Spin Universal kit (SPIN) ; de F à K : IDGene™ Mag Fast Universal kit (Mag FAST) ; L : IDGene™ Mag Map kit (MagMAP)) sont comparés en PCR IDBRU (Cq), à partir de lait de vache dopé à 750 UFC/ml de *B. melitensis* 16M. Les résultats négatifs ont été arbitrairement quantifiés à Cq=45. **A** : Comparaison des protocoles d'extraction A à K. La médiane, et les quartiles sont indiqués par les boîtes à moustache ; **B** : comparaison des 3 meilleures méthodes d'extraction L, B et H. La médiane et les quartiles sont indiqués par les boîtes à moustache ; **C** : Moyenne, erreur standard à la moyenne des résultats positifs en fonction des protocoles utilisés (A à L). ANOVA, test de Kruskal-Wallis * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

C.2.3. Limite de détection de la méthode complète sur lait artificiellement contaminé

La limite de détection de la PCR IDBRU a été déterminée avec 3 kits (B, L et M, voir Tableau 13), dont deux ont montrés les meilleurs résultats à partir de prélèvements de lait artificiellement infectés avec *Brucella* précédemment (B et L), et un utilisé en routine au LNR Brucellose (protocole M).

Pour le kit B, la limite de détection a été estimée à environ 700-7000 CFU *Brucella* par ml de lait (38-100%). Pour les kits L et M, la limite de détection a été estimée à environ 350-700 CFU *Brucella* par ml de lait (50-100%) (Tableau 17).

Cette valeur correspond à 35 Génome-Equivalent (GE) par 100 µl de lait utilisé pour l'extraction de l'ADN (si 100% d'efficacité de l'extraction de l'ADN, élué dans 80 µl), soit 2 GE par réaction PCR (5 µl d'échantillon), qui correspondent à 18 copies de IS711 par réaction (avec le protocole L).

Tableau 17 Limite de détection de la méthode PCR IDBRU à partir de lait

La limite de détection est estimée à partir de dilution sériée de *B. melitensis* 16M dans du lait cru de vache, dont l'ADN a été extrait avec 3 protocoles différents B, M et L.

CFU/ml	Dilution	Protocol B			Protocol L			Protocol M		
		Moyenne Cq	SEM	Fréquence de détection (n=8)	Moyenne Cq	SEM	Fréquence de détection (n=8)	Moyenne Cq	SEM	Fréquence de détection (n=8)
7000	10 ⁻⁵	33,9	0,68	100%	31,6	0,59	100%	31,4	0,52	100%
700	10 ⁻⁶	34,7	1,09	38%	34	0,71	100%	34,4	0,75	100%
350	5.10 ⁻⁷	35,3	0,92	50%	36,2	1,66	50%	34,7	0,74	63%
175	2,5.10 ⁻⁷	38	0,39	25%	36,1	1,2	63%	35,1	0,72	75%

C.2.4. Effet de la conservation à +4 °C sur la détection de *Brucella* spp. par PCR

Des échantillons de lait cru de vache expérimentalement infectés avec différentes concentrations de *B. melitensis* 16M ont été analysés à différents temps post infection et conservés à +4 °C (extraction d'ADN avec protocole A, PCR IDBRU), afin de vérifier l'impact de la conservation au froid pour la détection de *Brucella* spp..

Aucune différence significative n'a été observée pour la détection de l'IS711 entre les échantillons analysés immédiatement après infection (J0), après 24 h (J1) et après 36 h (J3), quelle que soit la concentration initiale (700 ou 350 UFC/ml) (test de Kruskal Wallis) (Figure 19 B).

Néanmoins, la détection des contrôles internes endogène (ciblant un gène de ménage eucaryote) et exogène est significativement plus précoce à J3 par rapport à J0 (respectivement $p<0,001$ et $p<0,001$) et J1 (respectivement $p=0,004$ et $p=0,002$) (Figure 19 C et D).

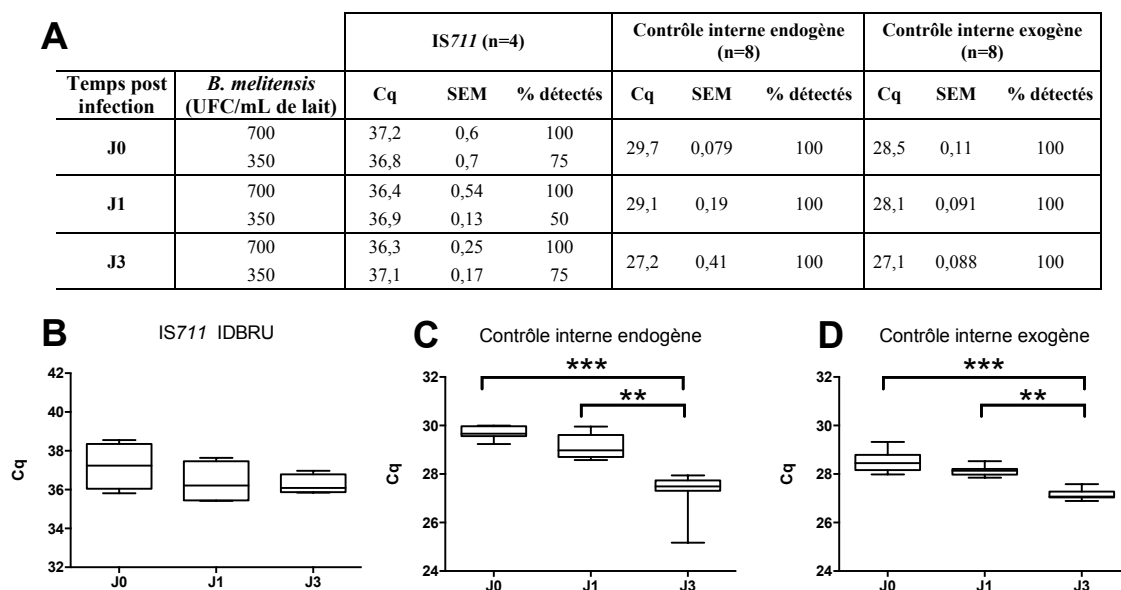


Figure 19 Effet du temps de conservation de lait +4°C sur la détection de l'IS711 des contrôles internes endogène et exogène par PCR IDBRU à partir d'échantillons de lait cru contaminés artificiellement par *B. melitensis* 16M

Des échantillons de lait de vache cru contaminés artificiellement à différentes concentrations de *B. melitensis* 16M sont extraits et analysés par PCR IDBRU **A** Les résultats présentés représentent les valeurs moyennes du nombre de cycles (Cq) et l'erreur standard à la moyenne (SEM) obtenus pour la détection de l'IS711 et des deux contrôles internes, ainsi que la proportion d'échantillons détectés (%). **B** Valeurs moyennes des Cq et SEM obtenus pour l'IS711 IDBRU à J0, J1 et J3. **C** Valeurs moyennes des Cq et SEM obtenus pour le contrôle interne endogène à J0, J1 et J3. **D** Valeurs moyennes des Cq et SEM obtenus pour le contrôle interne exogène à J0, J1 et J3. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (test Kruskal-Wallis).

C.3. Analyse d'échantillons de lait de terrain : évaluation de la capacité d'extraction d'ADN de kits commerciaux et de la PCR IDBRU par rapport à l'isolement bactérien et la sérologie

Le but de l'analyse des échantillons de terrain est d'estimer les performances diagnostiques de la méthode IDBRU obtenues, à partir de laits naturellement infectés, et de comparer ces résultats avec ceux obtenus par isolement bactérien et par sérologie. Des troupeaux de bovins avec historique de brucellose en Chine et en Sicile, ainsi qu'un troupeau de caprins au Sultanat d'Oman ont été prélevés et analysés.

Certains échantillons ont également pu être caractérisés par typage moléculaire (MLVA-16, séquençage en cours).

C.3.1. Analyse de prélèvements congelés de lait issus de vaches naturellement contaminées (Chine)

Tous les résultats sont présents dans le Tableau en Annexe 3. Un total de 52 échantillons de lait de bovins provenant de troupeaux de Chine a été testé par PCR en temps réel (4 cibles différentes) après extraction d'ADN, et par culture.

Au total 15 échantillons ont présenté des résultats positifs en PCR IDBRU à partir de lait total, et 4 échantillons supplémentaires ont été détectés à partir de la crème exclusivement (obtenue après centrifugation, voir ci-après). Au total donc, 19 échantillons ont été détectés positifs en PCR IDBRU.

C.3.1.1. Comparaison de la cible IS711 de la méthode IDBRU *versus* d'autres cibles décrites (échantillons congelés de laits de bovins de Chine)

La PCR IDBRU a été comparée à celle publiée par Bounaadja *et al.* validée et utilisée en routine au LNR Brucellose de (ANSES, Maisons Alfort) à partir du panel de 19 échantillons positifs en PCR : IS711-ref, *bcs31* and *per* (Bounaadja *et al.* 2009).

La cible IS711 de la méthode IDBRU a détecté une plus grande proportion (analyse qualitative) d'échantillons positifs (15 échantillons détectés) que les cibles *bcs31* et *per* (6 et 8 échantillons détectés respectivement ; $p < 0,01$), mais aucune différence significative n'a été observée entre IDBRU et IS711-ref (13 échantillons détectés ; $p = 0,157$) (test de Cochran). Toutefois, la comparaison des valeurs moyennes du nombre de cycles (Cq) pour détecter chaque échantillon a permis de conclure que IDBRU donnait des résultats plus précoces d'environ 2,8 Cq par rapport à la PCR ciblant l'IS711 décrite précédemment (Test de Friedman ; $p < 0,0001$) (Figure 20).

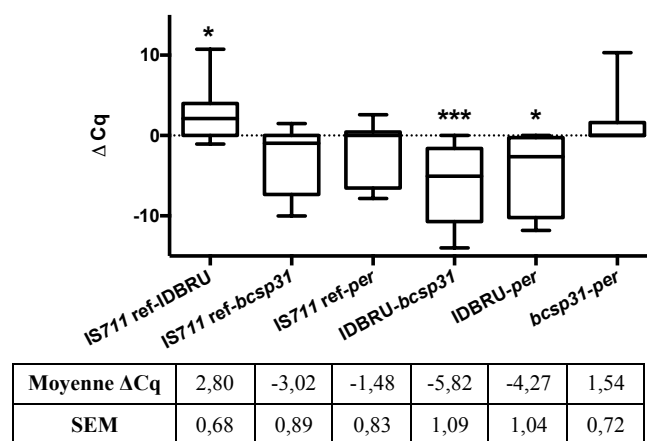


Figure 20 Comparaisons multiples de cibles pour la détection de *Brucella* spp. à partir de lait naturellement contaminé

La différence moyenne des nombres de cycles (ΔCq) entre deux cibles est représentée avec l'erreur standard à la moyenne (SEM), pour les 4 cibles testées sur N=19 échantillons : IDBRU, et 3 cibles décrites précédemment : IS711-ref, *bcsp31* et *per* (Bounaadja *et al.* 2009). Test de Friedman * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

C.3.1.2. Comparaison des performances de détection par PCR IDBRU et par isolement bactérien (échantillons congelés de laits de bovins de Chine)

En parallèle de la détection par PCR, tous les échantillons de lait ont été mis en culture. Les techniques de biotypage classiques ont permis d'isoler et d'identifier *B. melitensis* bv3 et *B. abortus* bv3 à partir de 7 et 2 échantillons respectivement.

Quarante-deux échantillons ont présenté des résultats concordants entre la PCR et la culture : 7 échantillons étaient positifs par PCR IDBRU et en culture, alors que 35 étaient négatifs par les deux méthodes. Les résultats sont discordants pour 10 échantillons : à partir de 8 échantillons, l'ADN de *Brucella* a été détecté, mais aucune bactérie n'a été isolée, et pour deux échantillons présentant une PCR négative, *Brucella* sp. a été isolée (Tableau 18).

Il n'y a pas de différence significative de détection entre la culture et la PCR IDBRU (test de Chi-2 de McNemar non significatif). La concordance de ces deux tests est moyenne (Kappa de concordance 0,47). La sensibilité calculée est de 77% (Intervalle de confiance à 95% [39,99 - 97,2]), la spécificité de 81% (intervalle de confiance à 95% [66,6 – 91,6]). Il est important de noter que sans une phase d'enrichissement en milieu liquide CITA, aucun échantillon n'aurait donné de résultat positif en culture.

Tableau 18 Comparaison des proportions d'échantillons détectés par PCR IDBRU et par culture à partir d'échantillons de laits de vaches naturellement infectées (seuil de positivité Cq=40).

La PCR réalisée à partir d'ADN extrait avec le protocole M. La culture est réalisée selon les normes de l'OIE, incluant une phase d'enrichissement en milieu CITA liquide.

	Culture +	Culture -	Total
PCR +	7	8	15
PCR -	2	35	37
Total	9	43	52

C.3.1.3. Effet de la centrifugation du lait sur les performances de détection de la PCR IDBRU (échantillons congelés de laits de bovins de Chine)

Afin de comparer la détection de *Brucella* spp. avec la PCR IDBRU à partir du lait total, de la couche de graisse (gras), du surnageant et du culot, les 19 échantillons positifs de lait de vache naturellement contaminés précédemment décrits ont été centrifugés avant extraction d'ADN (2 ml de lait à 7000 g pendant 15 min), afin d'analyser séparément différentes fractions du lait.

L'ADN de *Brucella* sp. a été détecté dans 19 « gras », 8 « surnageants » et 10 « culots » (sur 52 échantillons de lait de bovins de Chine).

L'analyse qualitative a montré que la centrifugation avait un effet significatif sur la proportion de détection : l'analyse du surnageant seul a limité la proportion d'échantillons positifs détectés par IDBRU (42%) par rapport à l'analyse du lait entier et du « gras » ($p < 0,0001$; test de Cochran). Cette proportion est intermédiaire pour l'analyse du culot (52,6%) et maximale pour le lait total (78,9%) et le gras (94,7%), ces deux matrices n'étant pas significativement différentes (test de Cochran).

L'ADN de *Brucella* provenant d'échantillons positifs est détecté plus tôt (Cq plus précoces) dans la matrice « gras » que dans les autres matrices ($p = 0,086$, tendance par rapport au lait total ; $p < 0,0001$ par rapport au surnageant ; $p = 0,0003$ par rapport au culot) (test de Friedman). Le surnageant apparaît donc comme la matrice la moins adaptée à la détection précoce de *Brucella*, ce qui est concordant avec l'analyse qualitative (Figure 21).

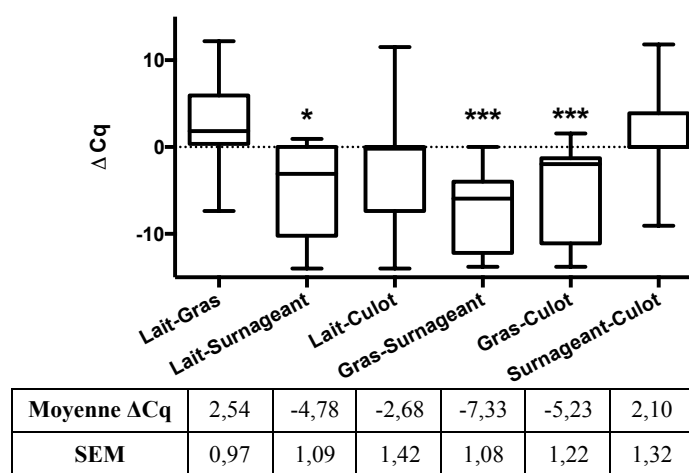


Figure 21 Différences moyennes des nombres de cycles observés pour les différentes fractions du lait (lait, gras, surnageant, culot, comparés 2 à 2) utilisées pour la détection de *Brucella* spp. par PCR IDBRU

La différence moyenne des écarts des nombres de cycles (ΔCq) entre deux matrices est représentée avec l'erreur standard à la moyenne (SEM) pour chaque matrice testée (N=19) : lait total, gras, surnageant et culot (obtenus après centrifugation de lait total à 7000 g 15 min). Test de Friedman * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

L'analyse des résultats d'amplification des contrôles internes endogène et exogène suggère que le gras est la matrice présentant la meilleure précocité de détection (Figure 22).

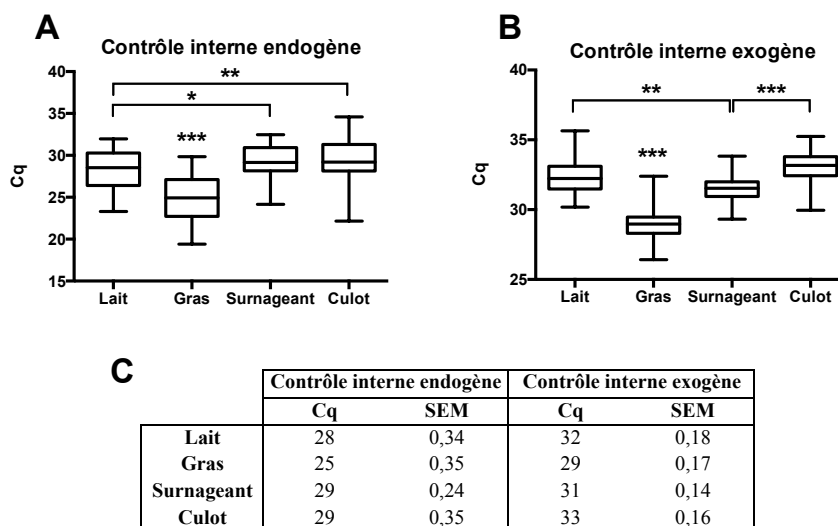


Figure 22 Détection des contrôles internes de la méthode IDBRU en fonction de la matrice testée après centrifugation du lait (lait total, gras, surnageant, culot)

Nombre moyen de cycles (Cq) et erreur standard à la moyenne (SEM) obtenus après amplification des deux contrôles internes inclus dans la méthode IDBRU (endogène et exogène), à partir de laits de vaches naturellement infectées en fonction de la matrice : lait total, gras, surnageant et culot (obtenus après centrifugation de lait total à 7000 g 15 min). **A** Moyenne des Cq observés pour le contrôle interne endogène (N=51). **B** Moyenne des Cq observés pour le contrôle interne exogène (N=48). **C** Valeur des moyennes de Cq et du SEM des deux contrôles internes. Test de Friedman * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

C.3.1.4. Comparaison de 3 kits d'extraction (échantillons congelés de laits de bovins de Chine)

Les 3 kits d'extraction d'ADN ayant présenté les meilleures performances analytiques (à partir de lait artificiellement contaminé par *Brucella*) ont été comparés par la PCR IDBRU, à partir de lait ou de gras (obtenu après centrifugation 7000 g 15 min) issus de bovins naturellement contaminés de Chine : les protocoles B, L et M (Figure 23).

Contrairement à ce qui a été observé à partir de lait artificiellement contaminé, le protocole B a détecté les échantillons positifs le plus précocement à partir de lait total (M vs B $p < 0,05$) (Figure 23 A). Cette différence n'est pas significative par rapport à la matrice « gras » (Figure 23 B).

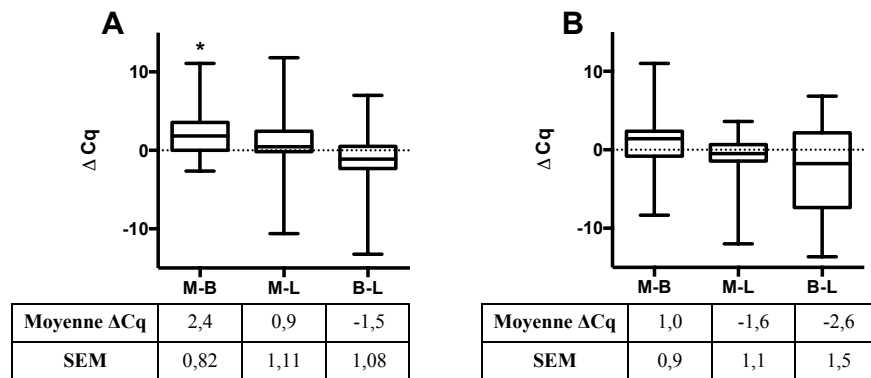


Figure 23 Comparaison de la précocité de détection de *Brucella* à partir d'échantillons de lait congelés naturellement contaminés, pour 3 kits d'extraction ayant présenté les meilleures performances analytiques

A Comparaison de la détection de l'IS711 à partir de lait total (N=19). **B** Comparaison de la détection de l'IS711 à partir du gras (N=17). M : protocole d'extraction M (ROCHE) ; B : protocole B ; L : protocole L. SEM : erreur standard à la moyenne. * $p < 0,05$ (test de Friedman)

C.3.2. Analyse de prélèvements congelés de lait issus de chèvres naturellement contaminées (Sultanat d'Oman) : comparaison des performances de détection par isolement bactérien et par PCR IDBRU

Afin de tester la PCR IDBRU sur des échantillons de laits de chèvres de terrain et de comparer les résultats avec la bactériologie, des prélèvements provenant de chèvres du Sultanat d'Oman (n=208) et conservés depuis 2013 au laboratoire à -20 °C ont été analysés (extraction d'ADN avec le protocole M, PCR IDBRU).

Sur 208 laits testés, 6 ont présenté des résultats positifs en PCR (Cq de 21,5 à 37,3), dont 3 à partir desquels *Brucella* a été isolée par culture puis identifiée *B. melitensis* biovar 3 (Tableau 19).

Il n'y a pas de différence significative de détection entre la culture et la PCR IDBRU (test de Chi-2 de McNemar non significatif). La concordance de ces deux tests est moyenne (Kappa de concordance 0,66). La sensibilité calculée est de 100% par rapport à la culture (Intervalle de confiance à 95% [29 - 100]), la spécificité de 98% (intervalle de confiance à 95% [95,8 – 99,7]). Il est important de noter que sans une phase d'enrichissement en milieu liquide CITA, aucun échantillon n'avait donné de résultat positif en culture.

Tableau 19 Comparaison des proportions d'échantillons détectés par PCR IDBRU et par culture à partir d'échantillons congelés de lait de chèvres issues de troupeaux avec historique de brucellose (tableau de contingence)

^(a) Nombre moyen de cycles observés pour les échantillons détectés par culture : 21,5 ; 23 ; 33,4. ^(b) Nombre moyen de cycles observés pour les échantillons détectés par PCR uniquement : 32,3 ; 35,8 ; 37,3. L'isolement par culture a été réalisé après enrichissement en milieu CITA liquide avant étalement sur milieu Farrell solide.

Laits chèvre	Culture +	Culture -	Total
PCR +	3 ^(a)	3 ^(b)	6
PCR -	0	202	202
Total	3	205	208

C.3.3. Analyse de prélèvements de lait frais issus de vaches naturellement contaminées (Sicile) : comparaison des performances de détection par PCR IDBRU et sérologie

Afin d'avoir accès à des prélèvements frais de lait, des prélèvements de lait de vaches issues de troupeaux avec un historique d'avortement et de brucellose ont été réalisés en Sicile (région de Raguse), lors d'un déplacement. L'analyse de ces prélèvements avait pour but la comparaison de détection par iELISA sur lait individuel et lait de tank par rapport à la PCR sur lait individuels.

Au total 19 échantillons de lait de vache ont été prélevés entre le 5 et le 12 mars 2018, conservés à +4 °C et analysés dans les 48 h (6 sont des laits de tanks et 14 laits individuels). Parmi les prélèvements disponibles, 12 vaches provenant d'un même

troupeau, ainsi que leur lait de tank, sont inclus dans l'étude (extraction de l'ADN avec protocole B, PCR IDBRU). Les iELISA et les PCR n'ont été réalisés qu'une seule fois.

Sur 19 échantillons de laits de vaches, 9 sont positifs en PCR et négatifs en iELISA, et 8 sont négatifs en PCR et négatifs en iELISA (seuls résultats concordants), et deux sont positifs en iELISA mais négatifs en PCR (Tableau 20).

Au sein du troupeau de 12 vaches, tous les résultats sont négatifs en sérologie (lait individuels et de tank), alors que 7 individus, ainsi que le lait de tank du troupeau possèdent un résultat de PCR positif.

Tableau 20 Résultats de sérologie et de PCR sur lait de vache (prélèvements individuels et lait de tank) de différents troupeaux de Sicile

^(a) vaches appartenant au même troupeau. Les laits frais ont été analysés dans les 48 h après prélèvements (conservés à +4°C).

N° échantillon	Prélèvement	Conservation	iELISA lait	IDBRU (Cq)
1	Individuel	Frais	-	-
2	Individuel ^(a)	Frais	-	-
3	Individuel ^(a)	Frais	-	+ (35,6)
4	Individuel ^(a)	Frais	-	+ (39,6)
5	Individuel ^(a)	Frais	-	-
6	Individuel ^(a)	Frais	-	+ (38,3)
7	Individuel ^(a)	Frais	-	+ (36,7)
8	Individuel ^(a)	Frais	-	+ (36,4)
9	Individuel ^(a)	Frais	-	-
10	Individuel ^(a)	Frais	-	-
11	Individuel ^(a)	Frais	-	+ (37,4)
12	Individuel ^(a)	Frais	-	-
13	Individuel ^(a)	Frais	-	+ (37)
14	Tank ^(a)	Frais	-	+ (42,6)
15	Tank	Frais	+	-
16	Tank	Frais	+	-
17	Tank	Frais	-	-
18	Tank	Frais	-	+ (36,2)
19	Tank	Frais	-	-

D. DISCUSSION

La brucellose est une zoonose d'importance mondiale, dont la principale cause de contamination de l'Homme est la consommation de lait cru et de produits laitiers non pasteurisés. Le contrôle de la brucellose humaine passe par le contrôle de la maladie chez l'animal, qui repose principalement sur l'utilisation de méthodes diagnostiques robustes, fiables, sensibles, spécifiques, et rapides (Approche One Health). Par ailleurs, le lait constitue une matrice intéressante dans le diagnostic de la brucellose, facilement prélevée *en ante mortem* et permettant l'évaluation de lait de mélange.

Le but de cette étude était, d'une part, de développer une PCR en temps réel « tout terrain » applicable à la détection de *Brucella* spp. et d'optimiser un protocole d'extraction d'ADN à partir de lait de ruminants.

D'autre part, l'objectif était d'appliquer ces méthodes à des prélèvements de terrain, en vue de les comparer aux méthodes de référence (culture et sérologie).

D.1. Etude de la sensibilité analytique de la méthode IDBRU

La spécificité du nouveau design des amorces et des sondes ciblant IS711 a été évaluée *in silico* puis *in vitro* et a démontré une spécificité analytique et une sensibilité à *Brucella* spp. de 100%. Aucune réaction croisée avec *O. anthropi* n'a été observée, espèce phylogénétiquement proche de *Brucella* spp. avec laquelle les réactions croisées par PCR avaient déjà été décrites (Herman and De Ridder 1992, Romero *et al.* 1995). Par ailleurs, la sensibilité analytique de la PCR IDBRU a été estimée à 12,5 copies d'IS711 par réaction.

La cible IS711 développée pour la PCR IDBRU était capable de détecter significativement plus d'échantillons positifs que les cibles *bcsp31* et *per* (Bounaadja *et al.* 2009). Ceci est potentiellement lié au fait que *bcsp31* et *per* ne sont présents qu'une fois dans le génome de *Brucella* spp., contrairement à l'IS711 qui est une séquence répétée (Scholz *et al.* 2018). Par ailleurs, la comparaison des valeurs moyennes du nombre de cycle (Cq) pour détecter chaque échantillon a permis de conclure que IDBRU donnait des résultats plus précoces par rapport à la PCR ciblant la séquence d'insertion IS711 décrite précédemment et préconisée par l'OIE (Bounaadja *et al.* 2009). Ceci pourrait être lié à la plus petite taille des amplicons produits par notre méthode (64 pb)

par rapport à celle déjà décrite (179 pb), ou à la composition du mastermix (non présentée, secret industriel IDVet®).

Une partie importante du travail consistait à valider la méthode globale, incluant l'étape d'extraction de l'ADN à partir d'échantillons de lait. En effet, selon la matrice utilisée (lait, eau, organes), plusieurs Mastermix de PCR en temps réel testés ont donné des résultats différents (données non présentées).

L'utilisation du lait comme matrice pour la détection moléculaire de *Brucella* spp. a déjà été décrite (Romero *et al.* 1995, O'Leary *et al.* 2006). La méthode IDBRU atteint une limite de détection de 350 UFC/ml de *B. melitensis* 16M dans le lait cru de vache, suite à l'extraction de l'ADN par deux méthodes différentes (protocoles L et M). Ces résultats sont similaires à ceux d'autres études décrivant une limite de détection de 400 CFU *B. abortus*/ml de lait de bufflonne, ou 800 UFC de *B. abortus*/ml de lait de vache (Sreevatsan *et al.* 2000, Marianelli *et al.* 2008). Des limites de détection plus faibles à partir de lait de vache ont été décrites (de 4 à 100 UFC/ml), mais incluaient une méthode d'extraction d'ADN basée sur le phénol-chloroforme (Leal-Klevezas *et al.* 1995, Romero and Lopez-Goñi 1999, Ning *et al.* 2012). L'avantage des méthodes utilisées dans cette étude (extraction d'ADN et PCR) est que les résultats sont accessibles en moins de 3 heures et ne nécessitent pas l'utilisation de solvants organiques (Tableau 21).

Deux études incluant des méthodes d'extraction d'ADN par kit (kit colonne de silice) décrivent des limites de détection à partir de lait meilleures que ce que nous avons obtenus (30 et 64 UFC/ml) (Amoroso *et al.* 2011, Ciftci *et al.* 2017). Ces différences pourraient s'expliquer par une différence d'efficacité des kits d'extraction et des PCR, par la différence de composition des laits de bufflonne (Amoroso *et al.* 2011) et de vache (notre étude), ou par une différence de méthode d'évaluation de la concentration en *Brucella* des laits artificiellement contaminés. Nous prévoyons de comparer ces méthodes avec notre PCR IDBRU à partir d'échantillons de lait artificiellement dopés et d'échantillons de lait de terrain naturellement infectés par *Brucella*.

Tableau 21 Limite de détection de diverses PCR selon les protocoles d'extraction d'ADN, à partir de lait

Ba148/928 (ARNr16S) (Herman and De Ridder 1992), F4-R2 (ARNr16S) (Romero *et al.* 1995), JPF-JPR (*omp-2*) (Leal-Klevezas *et al.* 1995), IS711 (Hinic *et al.* 2008), BRU P5-BRU P8 (région spacer 16S-23S rRNA) (Rijpens *et al.* 1996), *eryC* (Rodríguez-Lázaro *et al.* 2017), P1-P2 (*bcs31*) (Ohtsuki *et al.* 2008), B4-B5 (*bcs31*) (Baily *et al.* 1992), *bcs31* (Serpe *et al.* 1999). C : PCR conventionnelle ; LD : limite de détection ; RT : PCR en temps réel.

Extraction de l'ADN	Origine du lait	LD (UFC/ml)	Souche inoculée	Amorces	PCR	Référence
Congélation/décongélation	-	4,2.10⁴	<i>B. melitensis</i>	<i>bcs31</i>	C	Serpe <i>et al.</i> 1999
Kit Colonne NucleoSpin® Food (Machery Nagel)	Bufflonne	30	<i>B. abortus</i>	Kit <i>rpoB</i> (Applied Biosystem®)	RT	Amoroso <i>et al.</i> 2011
Kit Colonne DNeasy tissue kit (Qiagen)	-	64	<i>B. melitensis</i>	F4-R2	C	Ciftci <i>et al.</i> 2017
Kit Colonne QIAamp Blood and Tissue (Qiagen)	Bovin	800	<i>B. abortus</i> 2308	<i>bcs31</i>	C	Sreevatsan <i>et al.</i> 2000
Phénol-Chloroforme	Ovin	4	<i>B. ovis</i> REO 189	<i>eryC</i>	RT	Rodriguez-Lazaro <i>et al.</i> 2017
	Bovin, caprin	10	<i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i>	JPF-JPR	C	Leal-Klevezas <i>et al.</i> 1995b
	Bovin	50	<i>B. abortus</i> 2308	F4-R2	C	Romero and Lopez-Goni 1999
	Bovin	100	-	IS711	C	Ning <i>et al.</i> 2012
	Bufflonne	400	<i>B. abortus</i> RB51	B4-B5	RT	Marianelli <i>et al.</i> 2008
	Bovin	100 - 1000	<i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i>	IS711	C	Hamdy and Amin 2002
	Ovin	1,7.10³	<i>B. melitensis</i> 16M	IS711 (<i>B. melitensis</i>)	C	Ilhan <i>et al.</i> 2008
	Bovin	2,8.10⁴	<i>B. abortus</i> Tulya	BRU P5-BRU P8	C	Rijpens <i>et al.</i> 1996

D.2. Intérêt des contrôles internes

Le but de l'étape d'extraction de l'ADN est de se débarrasser des inhibiteurs de la PCR afin d'obtenir un ADN le plus pur possible. Les inhibiteurs de la PCR sont des substances ayant un effet négatif sur la PCR entraînant une diminution de la sensibilité ou l'apparition de résultats faussement négatifs (Schrader *et al.* 2012). Dans le lait, les plus couramment décrites sont les protéases (comme la plasmin) qui dégradent la polymérase Taq (Powell *et al.* 1994) et les ions calcium, qui entraînent une compétition avec les co-facteurs de l'ADN polymérase. La teneur en gras du lait est souvent mentionnée comme étant un inhibiteur important de PCR, mais Bickley *et al.* (1996) considèrent qu'elle

n'aurait qu'une influence mineure (Bickley *et al.* 1996). La détection des inhibiteurs de la PCR repose sur l'utilisation de contrôles internes pendant l'étape d'amplification.

La méthode IDBRU comprend deux contrôles internes d'amplification non compétitifs (endogènes et exogènes) qui sont co-amplifiés avec la cible IS711, en utilisant d'autres couples d'amorces et sondes. Ils n'ont pas d'impact sur l'amplification de la séquence cible (données non présentées). L'un des contrôles internes est «endogène»: il cible un gène de ménage issu de l'échantillon et garantit la non-dégradation de l'échantillon. Le second est «exogène», ajouté en externe lors de l'étape d'extraction de l'ADN, à une concentration calibrée, sert d'indicateur de l'inhibition potentielle de la PCR, et permet de s'assurer de l'absence de résultats faussement négatifs.

Le travail a été réalisé sur les deux contrôles dans un but d'homogénéité des gammes de kit PCR produites par IDVet®, et dans le but de pouvoir adapter cette PCR IDBRU à d'autres matrices que le lait. Néanmoins, la question de l'intérêt d'avoir deux contrôles internes se pose. D'après ce que nous avons observés, la présence du contrôle interne exogène suffirait à l'interprétation des résultats de PCR. Par ailleurs, il s'agit d'un contrôle « universel » pouvant être utilisés pour tout type de matrice, dont la cible est lyophilisable. Si la détection de ce contrôle dans l'échantillon diffère de plus de 3 Cq par rapport à la valeur obtenue pour le témoin négatif (matrice identique mais de statut négatif), l'analyse doit être renouvelée en diluant l'échantillon au 1/10^{ème}.

Le contrôle interne endogène a par contre tout son intérêt lorsque la matrice de départ utilisée est difficile à manipuler (biopsie de cartilage d'oreille pour la détection du virus de la diarrhée virale bovine ou BVD), ou lorsqu'il est impossible de vérifier qu'un écouvillon a bien été utilisé : la détection de ce contrôle certifie la présence de tissu animal dans l'échantillon.

Pour chaque PCR, un contrôle négatif et un contrôle positif sont également ajoutés, dans des puits séparés, pour assurer l'absence de contamination et pour confirmer l'efficacité de tous les réactifs respectivement (Hoorfar *et al.* 2004).

D.3. Travail de la matrice lait : limite et optimisation en vue de la PCR IDBRU

D.3.1. Optimisation de la méthode d'extraction d'ADN à partir de lait

Ici, la validation expérimentale a été effectuée à partir d'échantillons de lait artificiellement infectés par *B. melitensis* 16M, dont la concentration en *Brucella* a été vérifiée par étalement de dilution appropriée sur boîte. Nous n'avons pas utilisé la quantification de la quantité d'ADN obtenu (spectrophotomètre, fluoromètre) après l'étape d'extraction comme argument pour sélectionner le kit d'extraction optimal, car tous les ADN génomiques de l'agent pathogène et de l'hôte sont purifiés : il n'est pas possible de discriminer la proportion de chacun dans l'éluât final. Nous avons plutôt comparé les méthodes utilisant les valeurs de C_q obtenus après l'étape de PCR.

L'optimisation de l'extraction d'ADN à partir de lait artificiellement infecté a été réalisée à partir de kits commerciaux sur colonnes et sur billes magnétiques (utilisées avec un automate), qui sont les deux principales méthodes appliquées à des kits pour l'extraction d'acides nucléiques.

Premièrement, et surtout, toutes les méthodes testées ont été en mesure d'inactiver *Brucella* spp., ce qui assure la sécurité lors de la manipulation des échantillons.

Par ailleurs, pour chacun des kits, l'extraction est significativement améliorée par l'utilisation d'un tampon de lyse plus riche en détergent (composition non mentionnée, IDVet®). Dans nos conditions, les meilleurs résultats ont été obtenus avec les protocoles B (kit sur colonne), H (billes magnétiques, programme rapide automatisé) et L (billes magnétiques, programme classique automatisé). De plus, les protocoles basés sur les billes magnétiques sont meilleurs que celui basé sur colonne. Ils ont également l'avantage d'être automatisés et rapides (20 et 40 min respectivement).

L'augmentation du volume de lait prélevé (de 50 µl à 100 µl) n'améliore pas l'efficacité de la méthode sur bille magnétique, ce qui peut être dû à la saturation des billes magnétiques et à la quantité insuffisante d'autres réactifs. Par ailleurs, l'efficacité des protocoles L (billes magnétiques) et M (colonne) est similaire, alors que la quantité initiale de lait utilisée est de 100 µl et 200 µl respectivement.

Dans nos conditions, aucune différence n'a été observée avec ou sans addition de protéinase K lors de l'étape de lyse. Dans une autre étude sur l'extraction d'ADN à partir de lait, la PCR était moins efficace si une faible concentration de protéinase K était utilisée (moins de 325 µg / ml) (Romero and Lopez-Goñi 1999). Néanmoins, ici, sans protéinase K, certains échantillons de lait étaient impossibles à purifier à travers la colonne (données non présentées). Ainsi ce réactif est maintenu dans le protocole final.

D.3.2. Effet de la conservation

Dans notre étude, la conservation à +4 °C de lait artificiellement contaminé n'a pas d'impact sur la détection de l'IS711, alors que les contrôles internes endogène et exogène sont statistiquement mieux détectés après 36 h. Est-ce lié à une évolution de la matrice permettant de rendre plus accessibles les acides nucléiques présents ? Ou à une diminution de l'effet inhibiteur sur la PCR des substances présentes dans le lait ? Une dégradation des inhibiteurs pourrait compenser la dégradation des ADN de *Brucella* et expliquer les résultats observés.

Il est important de noter que tous les tests ont été réalisés à partir de lait cru décongelé. Or, la congélation aurait pour effet de détériorer les cellules (Barkema *et al.* 1997), d'hydrolyser des triglycérides, entraînerait la décomposition des globules de gras ainsi que la déstabilisation des protéines (Wendorff 2001). D'un autre côté, d'autres études ne mettent pas en évidence de différence de composition ni de concentration en lipides et en protéines d'échantillons de lait congelés jusqu'à 6 mois (Voutsinas *et al.* 1995, Fava *et al.* 2013). Toutefois on peut considérer que la durée et la température de congélation sont des critères importants à prendre en compte. En effet, la congélation a plus d'effets délétères sur le lait à des températures supérieures à -20 °C, par rapport à des températures inférieures à -20 °C (Koschak *et al.* 1981). Ces résultats seront ainsi à confirmer par l'analyse de la conservation à +4 °C et à -20 °C d'échantillons de lait naturellement infecté, et jamais congelé. Pour des raisons pratiques, l'analyse de lait de terrain n'a été effectuée qu'après congélation-décongélation des échantillons. Seules les analyses préliminaires par PCR réalisées dans un élevage infecté en Sicile, ont été menées sur des laits conservés à +4 °C, mais sans possibilité de pouvoir les comparer à de la culture bactériologique.

Des analyses plus poussées sont nécessaires afin de mieux décrire l'impact de la température sur la conservation de lait contaminé, dans l'optique d'une détection de

Brucella par PCR. D'autres éléments seraient également à prendre en compte, comme la flore bactérienne présente, le nombre de cellules somatiques ou encore le moment du cycle de lactation qui aurait pu induire une variation de la composition du lait.

D.3.3. Intérêt de la matrice « gras » obtenue après centrifugation

La centrifugation du lait entraîne la formation de 3 couches : la couche de gras sur le dessus, le surnageant et le culot. Différents volumes de lait, et différentes vitesses de centrifugation ont déjà été étudiées pour l'extraction de l'ADN de *Brucella* à partir du lait : 3000 g, 7000 g et 9700 g pendant 15 min (Alton 1988, O'Leary *et al.* 2006, Marianelli *et al.* 2008). En effet, d'après une étude menée par Philippon *et al.* (1971), les *Brucella* sont mieux détectées dans la couche de gras et dans le culot obtenus après centrifugation (Philippon *et al.* 1971). Dans ce projet, nous avons décidé de tester la même condition que dans Alton *et al.* (1988), à partir de 1,8 ml de lait. Ces conditions nous semblaient être une alternative intermédiaire, facilement réalisable en laboratoire peu équipé, dans l'optique d'une utilisation universelle des méthodes proposées (petite centrifugation de paillasse suffisante). Nos résultats obtenus à partir de lait de vaches naturellement infectées montrent que l'utilisation de la couche de gras permet une détection plus précoce (Cq plus bas) d'un nombre plus élevé d'échantillons positifs (également observé sur lait artificiellement infectés, non présenté).

L'affinité de *Brucella* spp. à la crème déjà été mentionnée, mais jamais démontrée. Une des explications serait liée à la présence d'anticorps spécifiques de *Brucella* spp. dans le lait : les globules de gras absorberaient la fraction Fc des anticorps présents, ce qui entrainerait un regroupement des *Brucella* entre les globules de gras (Kenyon *et al.* 1966). C'est le principe du test de l'anneau (MRT) réalisé à partir de lait de bovins.

La différence observée entre les 3 couches peut être liée à la localisation de *Brucella* dans le lait : la proportion de *Brucella* localisée dans les macrophages par rapport à la fraction libre dans le lait est inconnue (Xavier *et al.* 2009). De plus, la quantité de liquide (lait, surnageant ou culot prélevée avec des pipettes) ou de gras (échantillonnée avec des oeses) n'est pas exactement la même, ce qui génère un biais potentiellement responsable des différences observées. La couche de gras peut être difficile à collecter en fonction de la conservation de l'échantillon, en particulier suite un cycle de congélation-décongélation. La crème est moins bien formée, surtout si la température ambiante lors de la manipulation est élevée.

Enfin, l'ajout d'une étape de centrifugation augmente le risque de contamination des manipulateurs, et prend beaucoup de temps. La brucellose étant l'une des infections bactériennes les plus fréquemment rencontrées chez les personnels de laboratoire (Hull and Schumaker 2018), cette étape de prétraitement n'a pas été retenue dans le protocole final.

D.4. Etude de la sensibilité et spécificité diagnostiques à partir d'échantillons de terrain

La plupart des espèces de *Brucella* sont considérées comme des M.O.T. et agents potentiels de bioterrorisme. Compte tenu des conditions de travail et des réglementations imposées par l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament) en termes de transport de matériel contaminé par *Brucella* sp. il n'a pas toujours été possible d'associer une analyse par culture. De même il n'a pas été possible de réaliser autant de réplicats que nécessaire, ce qui aurait permis d'interpréter de manière statistique les tendances observées.

Notre PCR IDBRU a permis de détecter de l'ADN de *Brucella* spp. à partir d'échantillons de lait frais (n=9 sur 19) et congelé de bovins (n=19 sur 52 laits de bovins), ainsi que de lait congelés de chèvres (n= 6 sur 208).

Les échantillons positifs en PCR IDBRU présentent des valeurs de Cq allant de 27,4 à 42,6 à partir de lait de vache (frais ou congelé), et de 21,5 à 37,3 à partir de lait de chèvre (congelé), ce qui est proche de ce qui a déjà été publié (Cq variant de 26,5 à 38) (Lindahl-Rajala *et al.* 2017).

D.4.1. Sensibilité diagnostique de la PCR IDBRU par rapport à la culture

Les résultats obtenus à partir d'échantillons de lait congelés de chèvres naturellement infectées sont concordants avec ceux obtenus de laits de vaches naturellement infectées : la PCR IDBRU a permis de détecter un nombre plus important d'animaux infectés que la culture, mais sans différence significative.

Néanmoins, en regroupant les résultats obtenus à partir de tous les prélèvements de lait congelés inclus dans l'étude, provenant de vaches et de chèvres naturellement infectées (Tableau 22), la PCR IDBRU donne de meilleurs résultats que la culture (test de Chi-2 de McNemar significative ; 6,23). La concordance des méthodes IDBRU et la culture est

moyenne (Kappa de concordance 0,58). La sensibilité diagnostique calculée de la méthode IDBRU est de 83% (Intervalle de confiance à 95% [51,6 – 97,9]), la spécificité de 96% (intervalle de confiance à 95% [92,2 – 99,8]) (Tableau 23).

Tableau 22 Comparaison des proportions d'échantillons détectés par PCR IDBRU et par culture à partir d'échantillons congelés de lait de vaches et chèvres issues de troupeaux avec historique de brucellose.

L'isolement par culture a été réalisé après enrichissement en milieu CITA liquide avant étalement sur milieu Farrell solide.

Laits	Culture +	Culture -	Total
PCR +	10	11	21
PCR -	2	237	239
Total	12	248	260

Tableau 23 Récapitulatif des valeurs de sensibilité et spécificité de la méthode PCR IDBRU comparée à l'isolement bactérien, à partir de prélèvements de lait congelés.

Les valeurs de sensibilité (Se) et de spécificité (Sp) de la méthode IDBRU sont calculées par rapport aux résultats obtenus par isolement bactérien. Les intervalles de confiance à 95% sont indiqués. La concordance des deux méthodes est évaluée par un test Kappa de concordance, et un test Chi-2 de McNemar.

Laits	Se (intervalle de confiance à 95%)	Sp (intervalle de confiance à 95%)	K de concordance	Chi-2
Vaches	77 [39,99 - 97,2]	81 [66,6 – 91,6]	0,47	NS
Chèvres	100 [29 - 100]	98 [95,8 – 99,7]	0,66	NS
Pool	83 [51,6 – 97,9]	96 [92,2 – 99,8]	0,58	6,23

Certaines études ont déjà montré une meilleure sensibilité de la PCR par rapport à la culture (Leal-Klevezas *et al.* 1995, Hamdy and Amin 2002, Amoroso *et al.* 2011, Shakerian *et al.* 2016), alors que d'autres ne mettent pas en évidence de différence entre les deux méthodes (O'Leary *et al.* 2006).

La meilleure détection de *Brucella* dans les échantillons de lait par la méthode IDBRU par rapport à l'isolement peut s'expliquer notamment par le fait que la méthode PCR détecte le matériel génétique des bactéries vivantes et mortes. Les résultats discordants positifs en PCR mais négatifs en culture pourraient être liés à une mauvaise conservation des échantillons, entraînant une dégradation des bactéries cultivables (congélation trop longue), à l'absence ou la faible concentration en *Brucella* liée à l'excrétion intermittente dans le lait, ou à une mauvaise homogénéisation des échantillons. Inversement, la

présence d'échantillons détectés en culture mais pas en PCR indique que la limite de détection de la bactériologie serait inférieure à celle de la PCR IDBRU.

Il est important de souligner que dans tous nos conditions, aucun isolement n'a été possible à partir d'échantillons de lait naturellement infecté sur milieu solide Farrell, milieu recommandé pour l'isolement de *Brucella* spp. (OIE 2016). En effet, une étape d'incubation en milieu liquide CITA (De Miguel *et al.* 2011) pendant 4 jours, préalable à la mise en culture sur milieu solide était nécessaire. Ces deux milieux (CITA et Farrell) sont des milieux sélectifs contenant un cocktail d'antibiotiques adapté à l'isolement de *Brucella* (culture plus lente par rapport à d'autres espèces bactériennes). Le milieu CITA est décrit comme légèrement moins sélectif que le milieu Farrell (De Miguel *et al.* 2011, OIE 2016). Cette particularité dépend des espèces de *Brucella* et est particulièrement vraie pour *B. melitensis* (De Miguel *et al.* 2011). Ainsi, nous concluons qu'afin d'augmenter les chances d'isoler la bactérie à partir de prélèvements de lait, la culture devrait inclure une étape d'enrichissement en milieu CITA liquide, puis un étalement sur milieu solide Farrell.

Il est intéressant de constater que des études menées sur d'autres pathogènes montrent que la température et la durée de la conservation des échantillons auraient un effet significatif sur la sensibilité de la culture de bactéries pathogènes intramammaires (Sanchez *et al.* 2002). Par exemple les pathogènes intra-mammaires Gram- (présents dans le lait) seraient significativement moins bien isolés par culture après conservation à -20 °C plutôt qu'à -80 °C, surtout après de longues périodes (> 60 jours) (Sanchez *et al.* 2002) ; inversement, la congélation à -20 °C pendant 7 jours augmenterait la quantité de *Staphylococcus aureus* isolées par culture. D'autres études montrent au contraire que la congélation à -20 °C pendant 6 semaines n'affecte pas la récupération par culture de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium bovis* et *E. coli* (Murdough *et al.* 1996, Hubáčková and Ryšánek 2007). Une des explications serait la localisation intracellulaire de *Staphylococcus* spp. et la dégradation des cellules phagocytaires par la congélation/décongélation (Schukken *et al.* 1989). Dans notre cas, il serait intéressant de vérifier la viabilité de *Brucella* spp., pathogène intracellulaire facultatif, et la sensibilité des méthodes IDBRU et de culture après différents temps de congélation de prélèvements de lait.

D.4.2. Comparaison à la sérologie

La comparaison de la sérologie (iELISA sur lait) par rapport à la PCR IDBRU a été réalisée sur des laits de vaches prélevés en Sicile pendant ma thèse. Les résultats obtenus sont préliminaires, mais les tendances observées peuvent néanmoins être discutées.

D'une part, nous observons que les résultats de sérologie *versus* PCR IDBRU sur le lait sont majoritairement discordants. Ceci pourrait être le reflet de la réduction du taux d'anticorps au cours du temps après l'infection, d'une exposition ancienne avec chute du titre d'anticorps, d'un échantillonnage au stade précoce de l'infection (pas encore séroconversion) (Godfroid *et al.* 2010), ou d'individu séronégatif infectés *in utero* ou juste après la naissance (Corbel *et al.* 2006). Il aurait été intéressant de comparer ces résultats avec ceux de sérologie sur sang (RBT, iELISA ou CFT). En effet, la détection d'anticorps dans le lait et dans le sang n'est pas toujours corrélée, possiblement compte tenu de l'irrégularité de filtration des anticorps du sang vers le lait (Pat and Panigrahi 1965). Néanmoins, la détection d'ADN dans le lait d'animaux infectés séronégatifs a déjà été décrite (Cordes and Carter 1979, Barkallah *et al.* 2017, Lindahl-Rajala *et al.* 2017), notamment chez des animaux dont l'excrétion dure longtemps. L'excrétion dans le lait jusqu'à 3 ans chez des ovins infectés expérimentalement par *B. melitensis* bv 3 (Tittarelli *et al.* 2005). Les discordances entre les résultats de sérologie et de PCR IDBRU pourraient également être le reflet d'un défaut de sensibilité de la PCR par rapport à la sérologie, liée à l'intermittence de l'excrétion dans le lait (Morgan and McDiamid 1960, Alton 1988). Une étude réalisée sur des laits de différentes espèces animales concluait que la PCR n'avait pas permis de détecter de l'ADN chez tous les individus séropositifs (Hamdy and Amin 2002). Par ailleurs, les résultats de sérologie dépendent beaucoup de la méthode utilisée. Par exemple à partir de lait, l'iELISA serait plus sensible que le MRT, avec une spécificité comparable (Vanzini *et al.* 2001).

Afin de conclure sur la différence de sensibilité de la méthode PCR IDBRU par rapport à la sérologie, des expériences sur des individus infectés (naturellement ou expérimentalement) incluant les différentes méthodes diagnostiques devraient être conduites. Des expériences longitudinales incluant toute la période de lactation seraient également intéressantes pour vérifier la cinétique d'excrétion d'anticorps et de bactéries au cours d'un cycle de lactation.

D.5. Bilan : intérêt de la matrice lait dans le diagnostic par méthode PCR de la brucellose

Ainsi, le lait est être une matrice privilégiée permettant le diagnostic de la brucellose par sérologie, culture et PCR. Il est très aisément prélevé dans les troupeaux laitiers (prélèvement non invasif et rapide), où le lait permet un diagnostic à l'échelle individuelle et du troupeau. Néanmoins, il ne représente pas une matrice intéressante dans le cas d'élevage de races à viande, qui ne sont pas traites.

Par ailleurs, la sensibilité des méthodes de diagnostic direct décrites ici (IDBRU) et dans la littérature (d'autres PCR, culture) est encore trop faible pour permettre un dépistage robuste à partir de lait de mélange (ou lait de tank). Cela dépend bien évidemment du niveau d'infection du troupeau ainsi que du nombre d'individus inclus dans le lait de tank. Par ailleurs, au sein des troupeaux laitiers, le lait de tous les individus du troupeau n'est pas retrouvé dans le lait de tank : les génisses, les vaches proches du terme de mise bas (en tarissement, 2 mois environ avant vêlage) et les vaches présentant des signes de mammites sont par exemple exclues. Nos résultats de PCR IDBRU réalisés sur 12 vaches du même troupeau et sur leur lait de tank suggèrent que les investigations en phase précoce d'infection utilisant la méthode PCR permettent de détecter l'excrétion de bactéries avant même qu'une séroconversion ne soit détectable. Néanmoins ces résultats, préliminaires, doivent être approfondis.

Enfin, la composition du lait est différente selon les espèces animales, ce qui pourrait avoir un impact sur la détection de *Brucella* spp. par PCR et culture. Par exemple, la PCR a déjà montré de meilleurs résultats à partir de laits de bovins alors que la culture serait plus sensible à partir de laits d'ovins (Hamdy and Amin 2002). Des analyses complémentaires sont nécessaires pour conclure, et vérifier que les méthodes d'extraction d'ADN optimisées dans ce travail à partir de lait de vache sont également optimisées pour du lait d'origines différentes.

D.6. Conclusion

L'objectif de ce travail était de développer un outil de diagnostic de la brucellose par PCR en temps réel et de l'adapter à l'analyse de prélèvements de lait.

Nous avons développé une PCR IDBRU permettant la détection de *Brucella* spp., incluant des contrôles internes robustes assurant la fiabilité des résultats fournis. Par ailleurs, la méthode d'extraction d'ADN à partir de prélèvements de lait a été optimisée à partir de kits commerciaux faciles à utiliser. Elle permet d'obtenir des résultats en moins de 3 h, *versus* 10 jours pour la culture, de manière sécuritaire. La méthode IDBRU semble être plus sensible que la détection par bactériologie, et elle présente une excellente spécificité diagnostique. Au regard de ces résultats, la méthode IDBRU paraît être un outil rapide et fiable de diagnostic de la brucellose à partir de prélèvements de lait de ruminants.

D.7. Travaux en perspective sur l'amélioration de la PCR dans le diagnostic de la brucellose

Des expériences complémentaires pourraient être conduites en vue d'améliorer la méthode développée ici.

Par exemple, afin de préciser la souche infectante de *Brucella* spp., il serait intéressant de multiplexer la cible IS711 avec la détection des souches vaccinales utilisées pour la lutte contre la brucellose en zone endémiques : *B. abortus* S19 et RB51 et *B. melitensis* Rev.1 (Sangari *et al.* 1994, Vemulapalli *et al.* 1999, Cloeckart *et al.* 2002). En effet, des souches vaccinales ont été isolées dans le lait de buffles et de vaches d'eau (Capparelli *et al.* 2009, Longo *et al.* 2009). Ceci constituerait un réel avantage par rapport au dépistage par sérologie, ne permettant pas de différencier les animaux infectés des animaux vaccinés.

La PCR IDBRU pourrait aussi être associée à la détection d'autres agents pathogènes responsables d'avortement chez les ruminants. Cette détection pourrait alors être réalisée à partir d'ADN extrait :

- de lait pour la détection de *Brucella*, *Coxiella Burnetti* principalement,
- d'autres matrices comme le sang, les écouvillons, les ganglions, les fèces ou les tissus fœtaux pour la détection de *Chamydia* spp., *Leptospira* spp., *Neospora caninum*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Toxoplasma gondii*, *Campylobacter fetus*.

De plus, la méthode d'extraction d'ADN optimisée pour la détection de *Brucella* spp. par PCR pourrait être également optimisée en vue de fournir de l'ADN de qualité compatible avec les techniques de typage moléculaires (HRM, MLVA-16) et de séquençage du génome, directement à partir de prélèvements. Ceci permettrait d'accélérer le processus global de diagnostic et de typage de *Brucella* sp., et de diminuer les risques de contamination des manipulateurs, plus importants lors de la réalisation du diagnostic par bactériologie.

La validation finale de la PCR IDBRU selon la norme NF U47-600-2 (AFNOR 2015) permettra d'intégrer cette méthode dans le processus global de diagnostic de la brucellose. Elle pourra également être adaptée à d'autres matrices que le lait : les écouvillons vaginaux et préputiaux, les ganglions, les tissus d'avortons ou de placenta. Pour la validation de test diagnostic, un nombre minimum d'animaux dont le statut est connu vis-à-vis de la brucellose devront être testés afin d'obtenir une estimation la plus significative possible de la sensibilité et de la spécificité diagnostique. Ce nombre théorique d'individus dépend de la sensibilité et la spécificité diagnostiques estimée et de la marge d'erreur accordée. Notre étude inclut déjà l'analyse du lait issu de 142 animaux négatifs (122 chèvres et 20 vaches), et 12 animaux positifs (3 chèvres et 9 vaches), dont le statut a été établi par isolement, la méthode de référence actuelle.

Par ailleurs, des expériences sont actuellement en cours au laboratoire pour inclure des écouvillons d'animaux sauvages et d'autres matrices.

Chapitre II : Etude de la possible adaptation de *B. melitensis* biovar 3 à un changement d'hôte

A. Résumé de l'article en français

Brucella spp. sont des bactéries responsables de la brucellose, une zoonose de répartition mondiale provoquant des troubles de la reproduction chez les animaux. La classification des espèces dans ce genre homogène génétiquement est basée sur des critères bactériologique et biochimique. Par ailleurs, un hôte mammifère préférentiel, mais non exclusif est décrit pour chaque espèce de *Brucella*. Cependant, ce concept peut être remis en cause, car de nombreuses espèces de *Brucella* sont capables d'infecter un large éventail d'espèces animales. L'adaptation à un hôte spécifique peut être un facteur de variation des agents pathogènes. Il est généralement admis que les espèces de *Brucella* ont des génomes très stables et conservés, néanmoins le degré de variation génomique au cours d'une infection naturelle n'a pas été documenté. Dans cette étude, nous avons étudié la diversité génétique potentielle et la virulence d'isolats de *B. melitensis* biovar 3 obtenus à partir d'un seul foyer, mais d'espèces hôtes différentes (humain, bovin, petits ruminants). Un modèle unique de MLVA-16 suggérait que tous les isolats étaient clonaux. Les analyses génomiques comparatives ont montré une diversité génétique presque inexistante parmi les isolats (un seul SNP ; aucun réarrangement architectural) et n'ont mis en évidence aucune signature spécifique pour l'adaptation à l'hôte. De même, les souches ont montré des capacités identiques d'entrée et de réplication dans un modèle *in vitro* d'infection de macrophages.

Dans notre étude, l'absence de variabilité génomique et une virulence similaire soulignent que *B. melitensis* biovar 3 est un agent pathogène à large spectre d'hôtes, sans nécessité d'adaptation à différents hôtes.

B. Article

Comparative genomics and *in vitro* infection of field clonal isolates of *Brucella melitensis* biovar 3 did not identify signature of host adaptation

Article soumis à Frontiers of Microbiology le 18 juillet 2018.

DOI: 10.3389/fmicb.2018.02505

Comparative genomics and *in vitro* infection of field clonal isolates of *Brucella melitensis* biovar 3 did not identify signature of host adaptation

Marion Holzapfel¹, Guillaume Girault¹, Anne Kerié^{2,3}, Claire Ponsart¹, David O’Callaghan^{2,3}, Virginie Mick¹

¹ Anses/Paris-Est University, EU/OIE/FAO & National Reference Laboratory for Brucellosis, Animal Health Laboratory, Maisons-Alfort, France. ² VBMI, Inserm, U1047, Université de Montpellier, Nîmes, France. ³ CNR Laboratoire Expert *Brucella*, Service de Microbiologie, CHU Caremeau, Nîmes.

* Correspondence:

Corresponding Author

virginie.mick@anses.fr

Keywords: Brucellosis¹, *Brucella melitensis*², host preference³, Whole Genome Sequencing⁴, comparative genomics⁵, macrophage infection⁶, adaptation⁷ (Min.5-Max. 8)

Abstract

Brucella spp. are responsible for brucellosis, a widespread zoonosis causing reproductive disorders in animals. Species-classification within this monophyletic genus is based on bacteriological and biochemical phenotyping. Traditionally, *Brucella* species are reported to have a preferential, but not exclusive mammalian host. However this concept can be challenged since many *Brucella* species infect a wide range of animal species. Adaptation to a specific host can be a driver of pathogen variation. It is generally thought that *Brucella* species have highly stable and conserved genomes, however the degree of genomic variation during natural infection has not been documented. Here, we investigated potential genetic

diversity and virulence of *Brucella melitensis* biovar 3 field isolates obtained from a single outbreak but from different host species (human, bovine, small ruminants). A unique MLVA-16 pattern suggested all isolates were clonal. Comparative genomic analyses showed an almost nonexistent genetic diversity among isolates (only one SNP; no architectural rearrangements) and did not highlight any signature specific to host adaptation. Similarly, the strains showed identical capacities to enter and replicate in an *in vitro* model of macrophage infection.

In our study, the absence of genomic variability and similar virulence underline that *B. melitensis* biovar 3 is a broad-host-range pathogen without the need to adapt to different hosts.

Introduction

Brucellosis, caused by bacteria of the *Brucella* genus, is a widespread zoonosis causing reproductive disorders in animals and a debilitating infection in humans. *Brucella* classification is based on bacteriological and biochemical phenotypes (Ficht 2010). Traditionally, different species were reported to have a preferential mammalian host, however in reality, spill over into a wide range of animal species has been reported. *B. melitensis*, for example, primarily responsible for disease in domestic small ruminants (sheep and goats), also causes natural infections in bovids, camelids and wild ruminants (*e.g.* ibex) (OIE 2016) (Garin-Bastuji *et al.* 2014) and is the major species responsible for human infections.

Comparative genomics have allowed us to identify the key steps in the evolution of *Brucella* from a soil organism to a stealth pathogen. This has involved the acquisition of a battery of virulence factors followed by a toning down of virulence (Wattam *et al.* 2014). What is not understood is how the different species have adapted to their ‘preferential’ host, or the time line of this adaptation. Despite the strong sequence homogeneity within the genus (>94% nucleotide identity) (Wattam *et al.* 2009), genome-wide studies suggest genetic variation, especially pseudogenization, *i.e.* due to *IS711* insertion and point mutations within marine *Brucella* genomes (Suárez-Esquivel *et al.* 2017), might play a key role in *Brucella* host preference as the bacteria evolved with their respective preferential hosts (Chain *et al.* 2005). In a recent report, Ke and collaborators suggested that *B. melitensis* rapidly accumulates mutations during *in vivo* passage, however this observation is not supported by the high levels of sequence conservation seen between the genome sequences available in Genbank (Ke *et al.* 2012).

In this study we investigate seven clonal isolates of *B. melitensis* biovar 3 (bv3) isolated from different mammalian hosts during a well characterized outbreak in southern France. We used *in vitro* virulence assays and comparative genomics to determine whether genetic variation is required for the ability to infect different hosts.

Materials and Methods

- Bacterial strains

Seven isolates (Table S1) collected over a one-year period (2000-2001) from a restricted geographical area (Drôme, South-East France) from different host species: human (n=1); bovine (n=2); small ruminants (sheep and goat) (n=4) were biotyped using standard procedures (OIE 2016). Records regarding this epidemiological event available at the National Reference Laboratory (NRL) for brucellosis were examined. At least one abortion occurred amongst infected animals, probably in small ruminant. Epidemiological and serological investigations conducted to the slaughtering of the herd.

B. melitensis reference strains 16M (bv1) and Ether (bv3) (Table S1) were included in this study.

- Molecular analyses and comparative genomics

Genomic DNA was extracted using High Pure DNA Template Preparation kit (Roche Diagnostics, France), according to the manufacturer's recommendations. Real Time-PCR and MLVA-16 assays were performed as previously described (Bounaadja *et al.* 2009) (Al Dahouk *et al.* 2007).

Genome sequencing was performed on an Illumina HiSeq2500 platform (2x250bp paired-end reads). Raw reads were trimmed using Trimmomatic (Bolger *et al.* 2014) and quality controls were conducted with FastQC (Andrews 2010). Mapping assemblies against reference concatenated genomes (*i.e.* both chromosomes I and II are concatenated together in a single file) of Ether and 16M were performed using Bionumerics v7.6.2 (Burrows-Wheeler Aligner BWA (Li *et al.* 2009)), as well as *de novo* assembly using SPAdes v3.9. Annotations were performed with Prokka (Seemann 2014) and alignments with progressiveMAUVE (Darling *et al.* 2010) and BLAST Ring Image Generator (BRIG) 0.95 (Alikhan *et al.* 2011). Genome assemblies were evaluated with QUAST 4.6.3 (Gurevich *et al.* 2013).

Single Nucleotide Polymorphism (SNP) and clustering (maximum-parsimony) analyses were performed using Bionumerics v7.6.2 (wgSNP-module). Applied filters removed indels, repeated regions and rRNAs with minimum ten bp-distance between SNPs. Non-synonymous, synonymous and intergenic SNPs were identified against 16M. Local alignment of interesting regions were done with ClustalW (Thompson *et al.* 1994) via MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013).

To functionally analyse genomes, Roary v3.6.1 (Page *et al.* 2015) was used to generate matrices of presence/absence of core (*i.e.* genes present in all genomes included in the study) and accessory (*i.e.* not core genes) genes among seven investigated genomes, or among seven genomes vs 16M. Scoary (Brynildsrud *et al.* 2016) was used to associate the presence/absence of genes/SNPs to given clustering according to host-range.

Sequences were deposited in European-Nucleotide-Archive (Study PRJEB26921) (Table S1).

- Macrophage infection assays

Murine J774.1 macrophages (ATCC® TIB-67™) were cultivated and infected with *Brucella* using a standard gentamycin protection protocol as described previously (Soler-Llorens *et al.* 2016). All experiments were performed in triplicate and independently repeated three times.

The ability of infection of different field isolates was represented as the *Brucella* penetration index (BPI) and the *Brucella* multiplication index (BMI). BPI was defined as the percentage of the inoculum inside macrophages at 2 h post-inoculation (PI); BMI as the ratio of CFU in cell lysates at 48 h PI to CFU at 2h PI. Results were analyzed using a non parametric Kruskal-Wallis test (GraphPad Prism program) with significant *p*-values < 0.05.

Results

Seven investigated isolates were confirmed as *B. melitensis* bv3 using classical microbiological and molecular methods. All seven isolates had identical phenotypes. All isolates had an identical MLVA-16 pattern: Bruce06 3U; Bruce08 5U; Bruce11 3U; Bruce12 13U; Bruce42 1U; Bruce43

1U; Bruce45 3U; Bruce55 3U; Bruce18 7U; Bruce19 42U; Bruce21 8U; Bruce04 8U; Bruce07 5U; Bruce09 12U; Bruce16 8U; Bruce30 3U. This suggests that the isolates were clonal.

Comparative genomics

The global genomic architecture of the seven strains was consistent with those of published *B. melitensis* genomes (*i.e.* presence of two chromosomes). The field isolates had a genome size of approximately 3.3 Mbp, a G-C content similar to that of the Ether genome (57.24% *vs* 57.22%) with 3,210-3,218 predicted protein-encoding genes (QUAST). After filtering, a total of 2,748 SNPs were identified among all studied strains *vs* 16M, but only one SNP was observed amongst the seven field strains, in an ovine isolate (Fig. 1). This C-to-T substitution at position 267 of the *hisN* gene coding for histidinol-phosphatase (BME_RS10415) is a silent mutation. Manual analysis also showed a bovine isolate harbored another SNP in *hisN* (A-to-G at nucleotide 599) that was discarded by automated analysis; this lead to an Asp200Gly modification of HisN.

Genome-wide comparison from *de novo* assemblies showed a perfect collinearity of the seven genomes as well as with those of 16M and Ether, highlighting absence of genomic rearrangements (Fig. 1). Further comparison regarding the pan-genome, *i.e.* among seven genomes, highlighted a total amount of 3,196 predicted genes, including 3,141 core genes and 55 accessory genes. The strains showed a full complement of previously described virulence factors (He 2012).

Macrophage infection assays

The virulence of the isolates was compared within an *in vitro* murine macrophage infection model. The seven bv3 isolates showed similar ability to infect and multiply in macrophages as the reference strain. In our conditions, *B. melitensis* bv3 small ruminant isolates had slightly but

significantly lower BPI values than 16M ($p=0.02$), unlike human and bovine isolates ($p>0.99$ and $p=0.19$ respectively) (Fig. 2B). BPI values showed no significant difference among isolates whatever host-species ($p=0.34$ for human vs small ruminants to >0.99 for other comparisons) (Fig. 2B). At 48h PI, BMI observed between 16M vs isolates ($p>0.99$ for all comparisons) and among isolates did not show significant difference ($p=0.26$ bovine vs human; $p=0.37$ bovine vs small ruminants; $p>0.99$ human vs small ruminants) correlated with host-species (Fig. 2C). Indeed, multiplication inside macrophages was similar to the intracellular growth of reference 16M (Fig. 2A), and statistically identical among tested isolates.

Discussion

Brucella species have been classically assigned to preferential, but not exclusive animal hosts. Hence, *B. melitensis* is associated with infection of small ruminants and *B. abortus* with cattle. There have however been numerous reports of *B. melitensis* causing abortion in cattle (Verger *et al.* 1989) (Alvarez *et al.* 2011) (El-Diasty *et al.* 2018). In this study, we characterized seven *B. melitensis* bv3 field isolates, considered as epidemiologically related because isolated from a same outbreak (same geographical area, same time-period), but from different mammalian hosts. As it was not possible to distinguish between the strains phenotypically and the strains all had the same single identical pattern in MLVA-16, we considered the seven strains as clonal, according to the definition of a “clone” from Tenover *et al.*: isolates that are indistinguishable from each other by a variety of genetic tests (*e.g.*, PFGE, multilocus enzyme electrophoresis, or ribotyping) or that are so similar that they are presumed to be derived from a common parent (Tenover *et al.* 1995). Consequently, this study mimics an *in vivo* experimental infection aiming to determine whether genetic modifications are induced during the short-time adaptation of *B. melitensis* to a transition of environment, *i.e.* different host species, host being considered as driver of pathogen variation. Adaptation is defined as the process of change by which an organism or species becomes better suited to its environment (Ryall *et al.* 2012).

Comparison with the genomes of two *B. melitensis* reference strains showed perfect synteny. Our in-depth comparative genomics analyses revealed an almost nonexistent genetic diversity among the seven *Brucella* field isolates, with only one SNP confirming that there is no signature of adaptation to different host-species. Most importantly, our data is in complete contrast with the study from Ke *et al.* (Ke *et al.* 2012) who reported over 5,000 SNPs after 13 weeks mouse passage of *B. melitensis* 16M and suggested that *Brucella* accumulates a large number of adaptive mutations during chronic infection.

The seven field isolates showed identical virulence in murine macrophages. *B. melitensis* clearly has the intrinsic capacity to infect a wide range of mammalian hosts without the need to adapt. It is more likely that the traditional host preference was due to the epidemiology and lack of contact between infected small ruminants and other livestock. Domestic dogs and cats, and feral swine are occasionally infected with *Brucella* through contact with infected livestock (Lucero *et al.* 2008) (Hinic *et al.* 2010) (Wareth *et al.* 2017) (Stoffregen *et al.* 2007). *B. melitensis* bv3 has also been isolated from Nile catfish, probably infected by contaminated animal waste in the water contamination, showing the broad spectrum of hosts (El-Tras *et al.* 2010). Some *Brucella* species have a more restricted host range. *B. suis* bv2, which is endemic in wild boar and hares in much of Europe, shows low levels of pathogenicity for ruminants and for humans (Mailles *et al.* 2017). Genome analysis showed a large inversion and a number of INDELs and SNPs, although none were predicted to affect known virulence factors (Ferreira *et al.* 2017). The clearest example of host restriction is *B. ovis*, which is almost only pathogenic for sheep, with some studies reporting clinical sign in Red Deer (Ridler *et al.* 2012). Here a clear process of genome degradation and accumulation of pseudogenes is evident (Tsolis *et al.* 2009). Genomic decay seems to be associated with a host-restricted pattern, whereas intact genes are present in broad-host-range

pathogen.

In conclusion, this study shows that *B. melitensis* does not require any adaptive mutations when infecting different mammalian hosts. We cannot exclude the possibility that adaptation to a different host requires differential expression of specific genes that cannot be detected with the simple experimental models that we use.

Reference

- Al Dahouk, S., P. L. Fleche, K. Nockler, I. Jacques, M. Grayon, H. C. Scholz, H. Tomaso, G. Vergnaud and H. Neubauer (2007). "Evaluation of Brucella MLVA typing for human brucellosis." J Microbiol Methods 69(1): 137-145 DOI: 10.1016/j.mimet.2006.12.015.
- Alikhan, N. F., N. K. Petty, N. L. Ben Zakour and S. A. Beatson (2011). "BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons." BMC Genomics 12: 402 DOI: 10.1186/1471-2164-12-402.
- Alvarez, J., J. L. Saez, N. Garcia, C. Serrat, M. Perez-Sancho, S. Gonzalez, M. J. Ortega, J. Gou, L. Carbajo, F. Garrido, J. Goyache and L. Dominguez (2011). "Management of an outbreak of brucellosis due to *B. melitensis* in dairy cattle in Spain." Res Vet Sci 90(2): 208-211 DOI: 10.1016/j.rvsc.2010.05.028.
- Andrews, S. (2010). "FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data." <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Bolger, A. M., M. Lohse and B. Usadel (2014). "Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data." Bioinformatics 30(15): 2114-2120 DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- Bounaadja, L., D. Albert, B. Chenais, S. Henault, M. S. Zygmunt, S. Poliak and B. Garin-Bastuji (2009). "Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: a comparative study of IS711, *bcs*31 and *per* target genes." Vet Microbiol 137(1-2): 156-164 DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.12.023.
- Brynildsrud, O., J. Bohlin, L. Scheffer and V. Eldholm (2016). "Rapid scoring of genes in microbial pan-genome-wide association studies with Scoary." Genome Biol 17(1): 238 DOI: 10.1186/s13059-016-1108-8.
- Chain, P. S., D. J. Comerici, M. E. Tolmasky, F. W. Larimer, S. A. Malfatti, L. M. Vergez, F. Aguero, M. L. Land, R. A. Ugalde and E. Garcia (2005). "Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic Brucellae." Infect Immun 73(12): 8353-8361 DOI: 10.1128/IAI.73.12.8353-8361.2005.
- Darling, A. E., B. Mau and N. T. Perna (2010). "progressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement." PLoS One 5(6): e11147 DOI: 10.1371/journal.pone.0011147.
- El-Diasty, M., G. Wareth, F. Melzer, S. Mustafa, L. D. Sprague and H. Neubauer (2018). "Isolation of Brucella abortus and Brucella melitensis from Seronegative Cows is a Serious Impediment in Brucellosis Control." Vet Sci 5(1) DOI: 10.3390/vetsci5010028.

- El-Tras, W. F., A. A. Tayel, M. M. Eltholth and J. Guitian (2010). "*Brucella* infection in fresh water fish: Evidence for natural infection of Nile catfish, *Clarias gariepinus*, with *Brucella melitensis*." Vet Microbiol 141(3-4): 321-325 DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.09.017.
- Ferreira, A. C., M. I. Correa de Sa, R. Dias and R. Tenreiro (2017). "MLVA-16 typing of *Brucella suis* biovar 2 strains circulating in Europe." Vet Microbiol 210: 77-82 DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.09.001.
- Ficht, T. A. (2010). "*Brucella* Taxonomy and Evolution." Future Microbiol. 5(6): 859-866 DOI: 10.2217/fmb.10.52.
- Garin-Bastuji, B., J. Hars, A. Drapeau, M. A. Cherfa, Y. Game, J. M. Le Horgne, S. Rautyreau, E. Maucci, J. J. Pasquier, M. Jay and V. Mick (2014). "Reemergence of *Brucella melitensis* in Wildlife, France." Emerging Infectious Diseases 20(9): 1570-1571 DOI: 10.3201/eid2009.131517.
- Gurevich, A., V. Saveliev, N. Vyahhi and G. Tesler (2013). "QUAST: quality assessment tool for genome assemblies." Bioinformatics 29(8): 1072-1075 DOI: 10.1093/bioinformatics/btt086.
- He, Y. (2012). "Analyses of *Brucella* pathogenesis, host immunity, and vaccine targets using systems biology and bioinformatics." Front Cell Infect Microbiol 2: 2 DOI: 10.3389/fcimb.2012.00002.
- Hinic, V., I. Brodard, E. Petridou, G. Filioussis, V. Contos, J. Frey and C. Abril (2010). "Brucellosis in a dog caused by *Brucella melitensis* Rev 1." Vet Microbiol 141(3-4): 391-392 DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.09.019.
- Ke, Y., X. Yang, Y. Wang, Y. Bai, J. Xu, H. Song, L. Huang and Z. Chen (2012). "Genome Sequences of *Brucella melitensis* 16M and Its Two Derivatives 16M1w and 16M13w, Which Evolved *In Vivo*." Journal of Bacteriology 194(19): 5489 DOI: 10.1128/JB.01293-12
- Kirzinger, M. W. and J. Stavrinos (2012). "Host specificity determinants as a genetic continuum." Trends Microbiol 20(2): 88-93 DOI: 10.1016/j.tim.2011.11.006.
- Li, H. and R. Durbin (2009). "Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform." Bioinformatics 25(14): 1754-1760 DOI: 10.1093/bioinformatics/btp324.
- Lucero, N. E., S. M. Ayala, G. I. Escobar and N. R. Jacob (2008). "Brucella isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006." Epidemiol Infect 136(4): 496-503 DOI: 10.1017/S0950268807008795.
- Mailles, A., M. Ogińska, F. Kemiche, B. Garin-Bastuji, N. Brieu, Z. Burnus, A. Creuwels, M. P. Danjean, P. Guet, V. Nasser, B. Tourrand, F. Valour, M. Maurin, D. O'Callaghan, V. Mick, V. Vaillant, M. Jay, J. P. Lavigne and H. De Valk (2017). "*Brucella suis* biovar 2 infection in humans in France: emerging infection or better recognition?" Epidemiology & Infection 145(13): 2711-2716 DOI: 10.1017/S0950268817001704.
- OIE (2016). Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*)(Infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*). OIE Terrestrial Manual.
- Page, A. J., C. A. Cummins, M. Hunt, V. K. Wong, S. Reuter, M. T. Holden, M. Fookes, D. Falush, J. A. Keane and J. Parkhill (2015). "Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis." Bioinformatics 31(22): 3691-3693 DOI: 10.1093/bioinformatics/btv421.
- Ridler, A. L., D. M. West and C. M. G. (2012). "Pathology of *Brucella ovis* infection in red deer stags (*Cervus elaphus*)." New Zealand Veterinary Journal 60(2): 146-149 DOI: 10.1080/00480169.2011.638269.
- Ryall, B., G. Eydallin and T. Ferenci (2012). "Culture history and population heterogeneity as determinants of bacterial adaptation: the adaptomics of a single environmental transition." Microbiol Mol Biol Rev 76(3): 597-625 DOI: 10.1128/MMBR.05028-11.

- Seemann, T. (2014). "Prokka: rapid prokaryotic genome annotation." *Bioinformatics* 30(14): 2068-2069 DOI: 10.1093/bioinformatics/btu153.
- Soler-Llorens, P. F., C. R. Quance, S. D. Lawhon, T. P. Stuber, J. F. Edwards, T. A. Ficht, S. Robbe-Austerman, D. O'Callaghan and A. Keriell (2016). "A *Brucella* spp. Isolate from a Pac-Man Frog (*Ceratophrys ornata*) Reveals Characteristics Departing from Classical Brucellae." *Front Cell Infect Microbiol* 6: 116 DOI: 10.3389/fcimb.2016.00116.
- Stoffregen, C., S. C. Olsen, C. J. Wheeler, B. J. Bricker, M. V. Palmer, A. E. Jensen, S. M. Halling and D. P. Alt (2007). "Diagnostic characterization of a feral swine herd enzootically infected with *Brucella*." *J Vet Diagn Invest* 19: 227-237.
- Suárez-Esquivel, M., K. S. Baker, N. Ruiz-Villalobos, G. Hernandez-Mora, E. Barquero-Calvo, R. Gonzalez-Barrientos, A. Castillo-Zeledon, C. Jiménez-Rojas, C. Chacon-Diaz, A. Cloeckaert, E. Chaves-Olarte, N. R. Thomson, E. Moreno and C. Guzman-Verri (2017). "Brucella Genetic Variability in Wildlife Marine Mammals Populations Relates to Host Preference and Ocean Distribution." *Genome Biology and Evolution* 9(7): 1901-1912 DOI: 10.1093/gbe/evx137.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipinski and S. Kumar (2013). "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0." *Mol Biol Evol* 30(12): 2725-2729 DOI: 10.1093/molbev/mst197.
- Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing and B. Swaminathan (1995). "Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing." *Journal of Clinical Microbiology* 33(9): 2233-2239.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." *Nucleic Acids Research* 22(22): 4673-4680.
- Tsolis, R. M., R. Seshadri, R. L. Santos, F. J. Sangari, J. M. Lobo, M. F. de Jong, Q. Ren, G. Myers, L. M. Brinkac, W. C. Nelson, R. T. Deboy, S. Angiuoli, H. Khouri, G. Dimitrov, J. R. Robinson, S. Mulligan, R. L. Walker, P. E. Elzer, K. A. Hassan and I. T. Paulsen (2009). "Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism." *PLoS One* 4(5): e5519 DOI: 10.1371/journal.pone.0005519.
- Verges, J. M., B. Garin-Bastuji, M. Grayon and A. M. Mahé (1989). "La brucellose bovine à *Brucella melitensis* en France." *Annales de Recherches Vétérinaires* 20(1): 93-102.
- Wareth, G., F. Melzer, M. El-Diasty, G. Schmoock, E. Elbauomy, N. Abdel-Hamid, A. Sayour and H. Neubauer (2017). "Isolation of *Brucella abortus* from a Dog and a Cat Confirms their Biological Role in Re-emergence and Dissemination of Bovine Brucellosis on Dairy Farms." *Transbound Emerg Dis* 64(5): e27-e30 DOI: 10.1111/tbed.12535.
- Wattam, A. R., K. P. Williams, E. E. Snyder, N. F. Almeida, Jr., M. Shukla, A. W. Dickerman, O. R. Crasta, R. Kenyon, J. Lu, J. M. Shallom, H. Yoo, T. A. Ficht, R. M. Tsolis, C. Munk, R. Tapia, C. S. Han, J. C. Detter, D. Bruce, T. S. Brettin, B. W. Sobral, S. M. Boyle and J. C. Setubal (2009). "Analysis of ten *Brucella* genomes reveals evidence for horizontal gene transfer despite a preferred intracellular lifestyle." *J Bacteriol* 191(11): 3569-3579 DOI: 10.1128/JB.01767-08.

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author Contributions

VM and DOC conceived the study; CP obtained funding; MH and GG performed genomics analyses; MH and AK performed macrophage infection assays. MH, GG, CP and VM performed data interpretation; MH, DOC and VM wrote the paper. All authors read and approved the manuscript content.

Acknowledgments

MH was supported by a PhD fellowship the (CIFRE grant) French Direction Générale de l'Armement (DGA and IDVet). This work was supported by European Union Reference Laboratory for Brucellosis, INSERM, Université de Montpellier and Santé Publique France. The authors wish to express their gratitude to Maëlyls Kevin and Benoit Durand for critical and supportive comments.

Legend captions

Figure 1: Circular alignment representation of investigated *B. melitensis* bv3 genomes.

Genomes of seven clonal *Brucella melitensis* bv3 isolates were *de novo* assembled. BRIG alignment of investigated genomes and Ether against 16M are shown. Rings from inside to outside: GC-% of 16M, 16M (black), Ether (grey), *B. melitensis* bv3 isolated from small ruminants (n=4) (green), from bovine (n=2) (yellow) and from human (n=1) (red). Alignment of the *hisN* region flanking the unique SNP between seven isolates generated with ClustalW.

Figure 2: Macrophage infection assay with clonal *B. melitensis* bv3 isolates from different host-range. (A) Intracellular growth of *Brucella* isolates inside murine macrophages J774A.1. Each point is performed in triplicates from three independent experiments and represents the log₁₀ of

the mean $\pm$ SD CFU/well. (B) Adhesion/Invasion capacity of *Brucella* isolates. (C) *Brucella* multiplicity index. Isolates are grouped into three host-categories – bovine (n=2), human (n=1) and small ruminants (n=4)– and compared to the reference *B. melitensis* biovar 1str. 16M. Error bars denote standard errors. Statistical significance of each group was determined by Kruskal-Wallis test. * $p < 0.05$. Bov1/2= *B. melitensis* bv3 isolated from bovine, Human= *B. melitensis* bv3 isolated from human, SRum1/2/3/4= *B. melitensis* bv3 isolated from small ruminants.

Supplementary data

Table S1: Field *Brucella* isolates investigated in this study and reference strains from public databases.

Figure 1 Circular alignment representation of investigated *B. melitensis* bv3 genomes

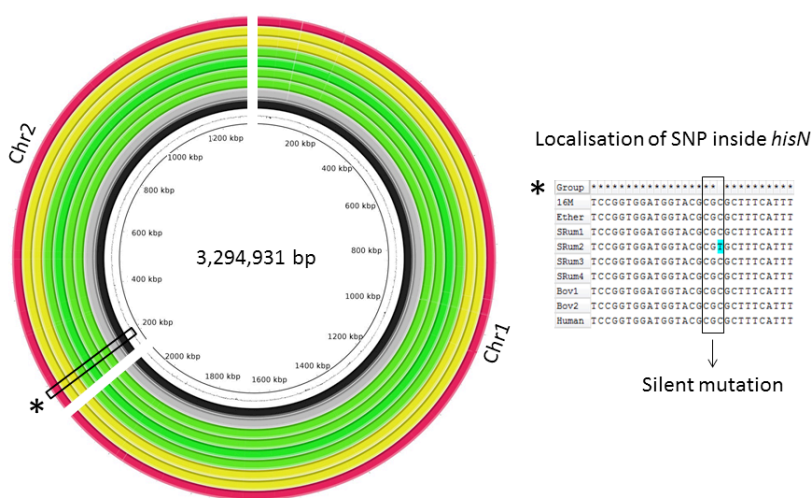
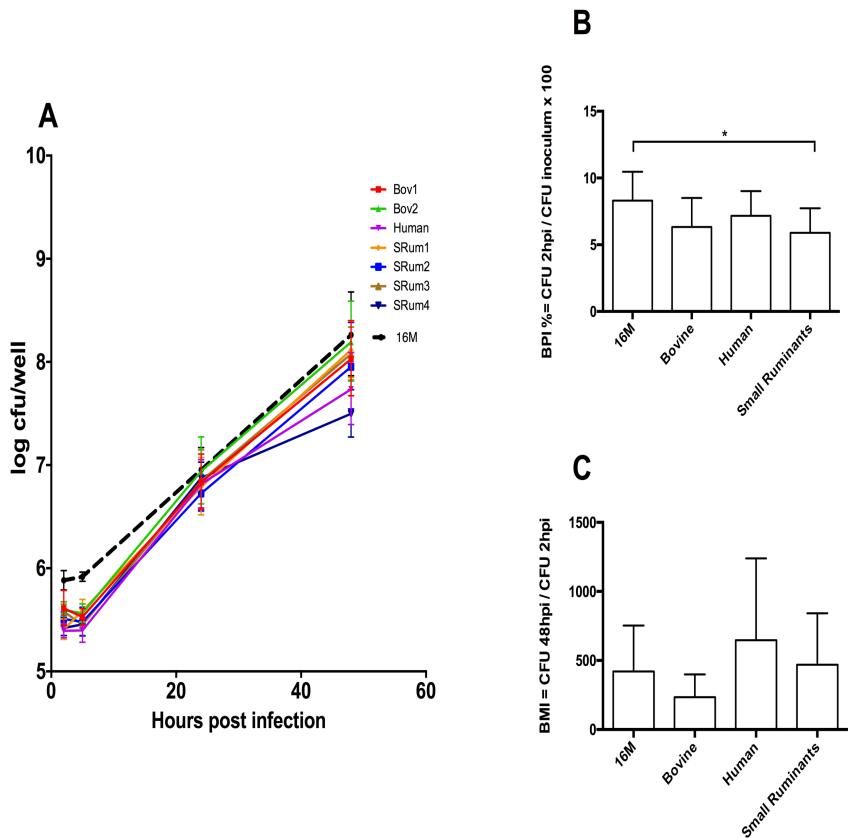


Figure 2: Macrophage infection assay with clonal *B. melitensis* bv3 isolates from different host-range



Supplementary dataTable S1: Field *Brucella* isolates investigated in this study and reference strains from public databases

No isolate	Id ANSES	Host	Organ	Year	Country	Depart ment	Location	Genus	Species	Biovar	Accession Number
Bov1	01-3016-5171	Bovine	Lymph node	2001	France	26	Ombrière (26400)	<i>Brucella</i>	<i>melitensis</i>	3	GCA_900417195
Bov2	00-2956-4	Bovine	NR	2000	France	26	Montmeyrans (26120)	<i>Brucella</i>	<i>melitensis</i>	3	GCA_900417205
Hum1	00-4216	Human	Blood	2000	France	26	Plan de Baix, Ombrière (26400)	<i>Brucella</i>	<i>melitensis</i>	3	GCA_900417215
SRum1	00-2529-3	Ovine / Caprine	Blood	2000	France	26	Venterol (26110)	<i>Brucella</i>	<i>melitensis</i>	3	GCA_900417225
SRum2	00-2782	Ovine	Vaginal swab	2000	France	26	Venterol (26110)	<i>Brucella</i>	<i>melitensis</i>	3	GCA_900417235
SRum3	00-3099-5734	Caprine	Lymph node	2000	France	26	Montmeyrans (26120)	<i>Brucella</i>	<i>melitensis</i>	3	GCA_900417245
SRum4	00-3099-5733	Ovine	Lymph node	2000	France	26	Montmeyrans (26120)	<i>Brucella</i>	<i>melitensis</i>	3	GCA_900417255
16M	Reference	Caprine		1950's	USA			<i>Brucella</i>	<i>melitensis</i>	1	NC_003317, NC_003318
Ether	Reference	Caprine		1961	Italy			<i>Brucella</i>	<i>melitensis</i>	3	NZ_CP007760, NZ_CP007761

PARTIE 3 : DISCUSSION GENERALE

A. **Biologie moléculaire au service de l'étude d'agent pathogène monophylétique : Intégrer la PCR IDBRU dans le processus global de diagnostic de la brucellose**

Actuellement, le diagnostic de la brucellose repose sur des outils de sérologie, la PCR et l'isolement de la bactérie (considéré comme méthode de référence). Les tests diagnostiques peuvent être appliqués à des prélèvements « *ante-mortem* » : le sang, le lait, les écouvillons vaginaux et préputiaux ; ou « *post-mortem* » : les organes internes et les ganglions.

La stratégie de contrôle de la brucellose dépend du contexte épidémiologique de la région concernée. En zone endémique, le but sera de contrôler la maladie, puis de l'éradiquer quand le nombre de cas diminue. Dans les faits, la sérologie est majoritairement utilisée dans ces régions. En zone indemne de brucellose, le contrôle est basé sur une surveillance des troupeaux en routine, pour vérifier l'apparition de nouveau cas autochtones ou importés. Les outils diagnostiques utilisés devront être adaptés à chaque contexte :

- Pour le contrôle et l'éradication de la maladie : les tests doivent être le plus sensible possible pour éviter les résultats faussement négatifs ;
- Pour la surveillance : les tests doivent être assez sensibles pour dépister un animal malade parmi de nombreux animaux sains, et surtout très spécifiques pour limiter l'obtention de résultats faussement positifs (valeur prédictives positives faibles).

Les outils de diagnostic et de typage phénotypiques de la brucellose sont bien établis, mais sont parfois compliqués à interpréter, nécessitent un personnel formé et des infrastructures lourdes (laboratoire de confinement de type 3). En parallèle, les techniques de diagnostic et de typage moléculaires s'implantent de plus en plus au sein des laboratoires de diagnostic. En effet, le rapport de l'EILA (Essai Inter-Laboratoire) du LRUE Brucellose (Laboratoire de Référence de l'Union Européenne) organisé en 2012 a mis en évidence que l'utilisation d'outils de diagnostic moléculaire a permis de pallier les éventuelles difficultés rencontrées lors des tests phénotypiques pour déterminer le genre ou l'espèce de *Brucella*. Néanmoins une grande diversité d'outils moléculaires utilisés pour le diagnostic a été notée, dont certains manquent encore de validation (Jay *et al.* 2013). Par ailleurs, une étude réalisée au Pakistan, pays endémique de brucellose, a conclu que la combinaison de deux tests (sérologie et PCR) vis-à-vis du diagnostic de la brucellose était intéressante. Néanmoins, la PCR seule ne pourrait pas servir de test de dépistage massif, principalement en raison de son coût et de la nécessité d'acheter un

thermocycleur (Akhtar *et al.* 2010). Le défaut de sensibilité des méthodes de diagnostic par PCR expliquerait la faible utilisation en région indemne ; d'autre part, le manque de moyens financier et matériel souvent retrouvé dans les régions endémiques est également un frein à l'implantation de la PCR, qui semblerait néanmoins être une bonne alternative à la sérologie.

Il est important de rappeler qu'au sein du genre *Brucella*, les classifications phénotypiques (biovar) et génotypiques (MLVA-16, SNPs) ne sont pas toujours concordantes (concordance limitée) : ces deux stratégies doivent être menées en parallèle dans le cadre des programmes de contrôle et d'éradication (Whatmore *et al.* 2016).

Dans cette thèse, un outil de diagnostic « universel » rapide et robuste de la brucellose par PCR en temps réel (PCR IDBRU) a été développé. Il permet un diagnostic du genre *Brucella*, de manière fiable (contrôles internes adaptés) et rapide. Une seconde partie a permis d'optimiser une méthode d'extraction d'ADN à partir de prélèvements de lait de ruminants. La méthode complète (extraction + PCR) permet ainsi d'obtenir un résultat en moins de 3 heures. Les résultats préliminaires issus de la comparaison de la méthode PCR IDBRU à la bactériologie à partir de lait vont dans le sens d'une meilleure sensibilité de la méthode IDBRU, pour une spécificité équivalente à l'isolement. Des analyses en cours au laboratoire montrent des résultats similaires à partir d'autres matrices, notamment les écouvillons (prélèvements *ante mortem*), et les nœuds lymphatiques (prélèvements règlementaires *post mortem*). Par ailleurs, notre PCR IDBRU a montré de meilleurs résultats que la PCR en place au laboratoire et recommandée dans le manuel de l'OIE (Bounaadja *et al.* 2009, OIE 2016), à partir de prélèvements de lait (cette étude), et d'autres types de prélèvements (analyses en cours au laboratoire). La sensibilité de la méthode IDBRU n'a pas pu être comparée à celle de la sérologie sur le terrain. Elle devra être déterminée par de futures recherches. Néanmoins, le manque de spécificité des tests sérologiques, et les résultats prometteurs de sensibilité de la méthode IDBRU pourraient conduire à combiner ou remplacer, dans certains cas précis (hors animaux mâles, races allaitantes), la sérologie par la PCR.

Ainsi, notre méthode IDBRU (extraction et PCR) est capable d'apporter une meilleure sensibilité que des PCR déjà décrites. Nous proposons un nouveau schéma global de la procédure conduisant au diagnostic de la brucellose chez les ruminants, en fonction du

contexte épidémiologique de la région (indemne ou endémique). Le but est d'intégrer la PCR IDBRU, en combinaison avec la sérologie et la culture, dans le cadre de la lutte contre la brucellose, et non pas de la substituer aux techniques de sérologie et de culture. Nous étudierons les possibilités d'utilisation de la méthode PCR à partir de prélèvements de lait, mais également à partir d'autres types de prélèvements, conscients de la nécessité d'analyses complémentaires plus poussées.

A.1. Utilisation de la PCR en zone indemne de brucellose chez les ruminants - Exemple de la France

➤ Contexte épidémiologique de la France

En France, depuis 1965 pour les bovins (Décret n°65-1166 du 24 décembre 1965) et 1998 pour les petits ruminants (Arrêté du 13 octobre 1998 fixant les mesures techniques et administratives relatives à la prophylaxie collective et à la police sanitaire de la brucellose ovine et caprine), les stratégies gouvernementales de contrôle/éradication de la brucellose sont basées sur :

- la surveillance/dépistage des troupeaux,
- la déclaration obligatoire des avortements (à partir d'un pour les bovins, et de 3 en moins de 7 jours pour les petits ruminants),
- l'interdiction de la vaccination (depuis 1997 chez les bovins, 2008 chez les petits ruminants), et
- la déclaration obligatoire de tous les cas de brucellose.

Cette stratégie a conduit à la reconnaissance, depuis 2005, du statut officiellement indemne de la France vis-vis de la brucellose bovine, et depuis 2015 du statut officiellement indemne de brucellose chez les petits ruminants (à l'exception d'un département). Le plan de surveillance est toujours en place, et a ainsi permis d'identifier des foyers de brucellose importés de même que des cas autochtones dans la faune sauvage.

➤ **Proposition d'intégration de la PCR IDBRU dans le schéma global de diagnostic de la brucellose chez les ruminants en zone indemne (Figure 24)**

Dans les zones indemnes de brucellose, que ce soit chez les bovins ou les petits ruminants, les valeurs prédictives positives des tests sérologiques sont très faibles : il est donc nécessaire d'utiliser des tests spécifiques pour limiter les faux positifs.

La surveillance de la brucellose s'articule autour de

- la surveillance prophylactique annuelle,
- la surveillance évènementielle liée aux avortements.

La surveillance prophylactique annuelle est actuellement réalisée par sérologie à partir de laits de tank ou de mélange de sérums par iELISA, ou encore à partir de sérums individuels testés par Rose Bengale et fixation du complément. La présence d'animaux excréteurs étant peu probable en zone indemne, la réalisation de PCR à partir de prélèvements de lait de tank n'apparaît pas être une méthode assez sensible pour la détection des individus infectés (*i.e.* un résultat négatif ne permettra pas d'exclure la présence d'animaux infectés).

Suite à une suspicion de brucellose par sérologie (issue de l'obtention de deux résultats sérologiques positifs à quelques semaines d'intervalle) ou par PCR, voici comment la procédure globale de diagnostic pourrait être améliorée avec la PCR développée dans le cadre de ce travail de thèse :

Option (1) : Associer la 3^{ème} sérologie (dite de confirmation) à la PCR (analyse *ante mortem* à partir de lait et/ou d'écouvillons). Une PCR individuelle à ce stade a pour avantage de pouvoir détecter les animaux excréteurs asymptomatiques ou les super-excréteurs (Capparelli *et al.* 2009), jouant un rôle majeur dans la propagation de la maladie. Ces animaux pourraient donc être éradiqués plus rapidement. Selon les cas de figure il serait possible de conclure :

- **Cas « sérologie de confirmation + PCR + » :** la PCR permet de confirmer des résultats de sérologie, en levant les doutes de faux positifs (PCR très spécifique par rapport à la sérologie). Par ailleurs, un résultat positif en PCR permettrait d'accélérer

le processus de diagnostic en imposant directement l'abattage individuel et la bactériologie.

- **Cas « sérologie de confirmation + PCR – »** : il peut s'agir d'un manque de sensibilité de la PCR, liée à l'intermittence de l'excrétion de la bactérie ou un défaut de la méthode. Dans ce cas il serait difficile de conclure et l'abattage de l'animal devrait tout de même être envisagé.
- **Cas « sérologie de confirmation – PCR + »** : cela peut refléter les cas d'animaux excréteurs asymptomatiques, sans réponse immunitaire détectable (cas des veaux contaminé verticalement *in utero*). Un abattage de l'individu pourrait être envisagé.
- **Cas « sérologie de confirmation – PCR – »** : résultat officiellement négatif. Les résultats de sérologie de dépistage étaient des faux positifs.

Option (2) Associer la PCR IDBRU à la culture comme test de confirmation *post portem*. Les résultats de PCR étant obtenus très rapidement par rapport à ceux de bactériologie, une conclusion préliminaire pourrait être rendue en cas de résultats PCR positif.

- **Cas « culture + PCR + »** : confirmation de brucellose, abattage du troupeau.
- **Cas « culture – PCR + »** : confirmation de brucellose, abattage du troupeau. Le résultat faussement négatif de la culture peut être lié à la faible fraction cultivable de *Brucella* spp. (faible charge initiale ou dégradation suite à une mauvaise conservation de l'échantillon).
- **Cas « culture + PCR – »** : confirmation de brucellose, abattage du troupeau. Le résultat faussement négatif de PCR peut être lié à la présence d'inhibiteurs de PCR.
- **Cas « culture – PCR – »** : résultat officiellement négatif.

Dans le cadre de la surveillance événementielle relative aux avortements chez les ruminants, la PCR pourrait être intégrée dès la première sérologie, à partir d'écouvillons vaginaux (**option (3)**). On pourrait distinguer les cas suivants :

- **Cas « sérologie + PCR + »** : résultat positif. Dans ce cas, la PCR permet de gagner plusieurs jours voire semaines par rapport à la procédure actuelle. Un dépistage des autres animaux du troupeau ou un abattage du troupeau serait à envisager.
- **Cas « sérologie + PCR - »** : une seconde sérologie de confirmation pourra être réalisée, comme dans la procédure en place. Le résultat de PCR sera à interpréter à la lumière des résultats finaux. Il peut en effet s'agir d'un faux négatif lié à une excrétion

intermittente de la bactérie, ou à un vrai négatif associé à une réaction sérologie faussement positive.

- **Cas « sérologie – PCR + »** : résultat positif. La PCR permet de gagner plusieurs jours voire semaines par rapport à la procédure actuelle. Un dépistage des autres animaux du troupeau ou un abattage du troupeau serait à envisager.
- **Cas « sérologie – PCR – »** : résultat officiellement négatif.

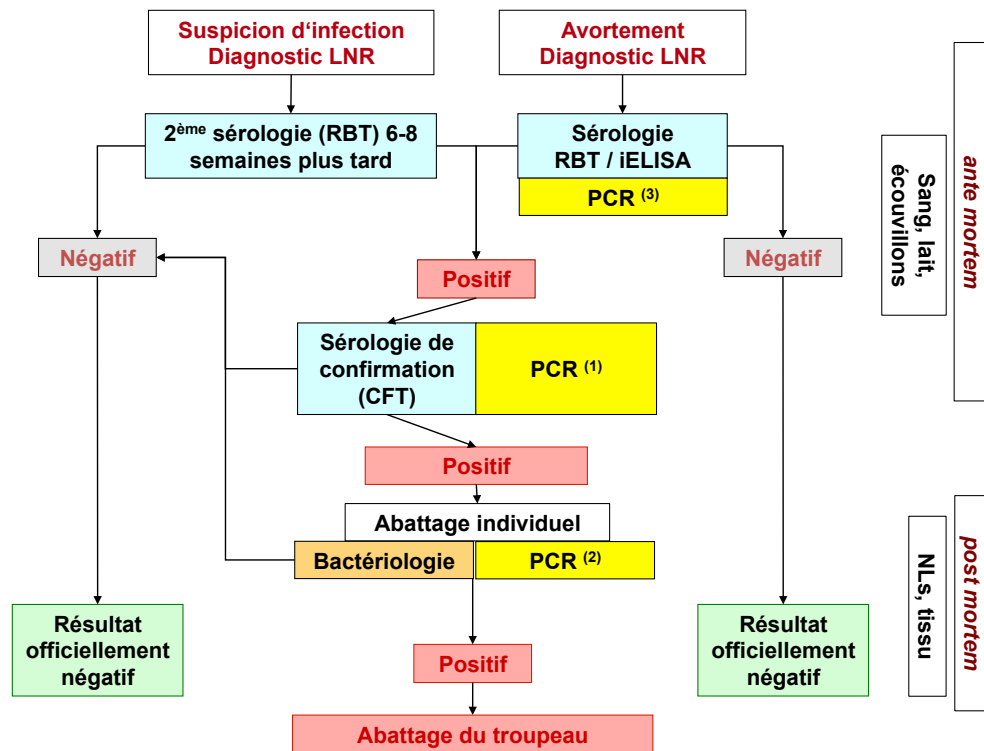


Figure 24 Proposition d'intégration de la PCR dans la procédure de diagnostic de la brucellose chez les ruminants en région indemne (exemple de la France)

Trois options d'intégration de la PCR dans ce schéma sont présentées :

(1) association à la sérologie de confirmation en cas de suspicion ou d'avortement ;

(2) association à la culture en test de confirmation *post mortem* ;

(3) association à la première sérologie en cas d'avortement.

En fond bleu : tests sérologiques ; en fond orange et jaune : diagnostic direct ; en jaune : PCR NLs : nœuds lymphatiques.

A.2. Utilisation de la PCR en zone endémique de brucellose

En zone endémique, il est indispensable de s'orienter vers des tests très sensibles afin de limiter les faux négatifs.

Dans le cadre de la surveillance prophylactique, la PCR pourrait être appliquée en combinaison avec la sérologie pour le dépistage à l'échelle individuelle et collective. Le

lait pourrait alors constituer une matrice intéressante permettant potentiellement de dépister précocement les troupeaux infectés. Des analyses sont néanmoins à envisager pour évaluer la sensibilité de PCR à partir de lait de troupeau vis-à-vis de la sérologie dans ces cas-là.

La PCR pourrait également être introduite à la suite d'une suspicion de brucellose (sérologie ou PCR positive) ou suite à un avortement, comme dans le contexte indemne de brucellose, la PCR pourrait être également réalisée en test de confirmation *ante mortem* et *post mortem* après abattage.

La méthode IDBRU pourrait permettre, à l'avenir, de simplifier la méthode globale de diagnostic de la brucellose. Cependant des études de validation et d'harmonisation de l'outil sont encore nécessaires. Le diagnostic précis de la brucellose est d'une grande importance pour le contrôle des épidémies, mais également pour des objectifs de recherche.

Comme précisé plus haut, l'isolement reste impératif pour de nombreuses études épidémiologiques et de pathogénicité. La qualité du matériel biologique et les conditions d'isolement sont des paramètres importants qui peuvent avoir une influence sur la qualité des résultats lors de la comparaison de souches en lien épidémiologique ou non (étude de spéciation, d'adaptation à un stress).

La plupart des espèces de *Brucella* sont considérées comme agent potentiel de bioterrorisme et comme MOT, en lien avec la très faible dose infectante et l'importance des signes cliniques chez l'Homme et les animaux. La réglementation associée à la manipulation et au stockage de souches de *Brucella* est donc très lourde, pouvant représenter un frein à de nombreuses études de recherche.

B. Importance de la sélection de la population bactérienne dans une étude comparative

Pour étudier les mécanismes d'adaptation au stress chez les bactéries pathogènes, la sélection de la population étudiée est un critère important. En effet, comme le soulignent

les études sur *E. coli*, l'adaptation à un nouvel environnement dépend de la fraction de cellules métaboliquement actives présentes lors de l'exposition des bactéries aux conditions défavorables, ainsi que de la charge bactérienne (Kim *et al.* 2014). La taille et l'hétérogénéité de la population étudiée sont des limites communes à toutes les études en bactériologie, qu'il est important de prendre en compte.

Par ailleurs, l'acte d'isolement et le choix d'une colonie sélectionnent déjà une population bactérienne. Dans un échantillon infecté, il pourrait y avoir d'autres populations dans un échantillon

Dans nos expériences, des souches étudiées de *B. melitensis* bv 3 ont été isolées à partir d'organes d'animaux infectés (OIE 2016)). Plusieurs colonies obtenues ont été contrôlées (critères phénotypiques) pour s'assurer de l'homogénéité de la population, considérée représentative de la souche infectante ayant provoqué une maladie chez l'animal.

Malgré ces biais de sélection de population bactérienne, de nombreuses études ont considérablement amélioré la compréhension des mécanismes globaux d'adaptation, par des expériences à partir de colonies bactériennes isolées sur des milieux gélosés sélectifs (Kim *et al.* 2014).

Le matériel génétique extrait de souches de terrain peut alors permettre, outre le diagnostic par PCR, la comparaison des génomes obtenus après séquençage.

C. Limite et complémentarité des outils permettant de comparer les génomes et des outils d'analyse fonctionnelle de virulence

Chaque outil de séquençage, bio-informatique d'analyse de génome, ou phénotypique d'étude de la virulence possède des limites qui leur sont propres. Ces limites peuvent aussi être liées à la faible diversité des génomes étudiés, entraînant des difficultés d'interprétation.

C.1. Séquençage et outils bio-informatiques d'analyse de génome

De plus en plus, les techniques de séquençage complet des génomes (WGS) se développent et deviennent abordables.

L'analyse de génome complet permet d'obtenir des informations de nature différente,

selon le traitement des données de séquençage : phylogénie, études des causes de la diversité observée. Les données brutes de séquençage subissent une étape de nettoyage (ou Trimming), les génomes sont assemblés par mapping, c'est à dire contre un génome de référence, ou par assemblage *de novo*, c'est-à-dire sans génome de référence.

Comme nous avons pu le constater lors de notre étude comparative de génomes complets de souches clonales de *B. melitensis* bv 3, la qualité des SNPs mis en évidence était différente selon la méthode d'assemblage des reads obtenus après le séquençage (par mapping ou *de novo*). L'assemblage par mapping permet d'obtenir des SNPs plus robustes et fiables que ceux mis en évidence lors de comparaisons de génomes assemblés *de novo*, principalement en raison de la différence de couverture de chaque reconstitution et de la puissance des filtres utilisés (Olson *et al.* 2015). Toutefois les résultats peuvent être biaisés selon le génome de référence choisi. Il est généralement admis que les études à l'échelle du génome de SNPs obtenus par mapping sont des outils robustes de haute résolution phylogénétique pour *Brucella* (Foster *et al.* 2009), ainsi que d'autres genres bactériens homogènes comme *Bacillus anthracis* (Girault *et al.* 2014).

L'étude pangénomique (c'est à dire comprenant le core génome et le génome accessoire) et l'analyse architecturale des génomes sont possibles à partir de la comparaison de génomes assemblés *de novo*. Néanmoins la fiabilité de l'assemblage *de novo* dépend des programmes utilisés et peut être biaisée par la présence de régions répétées et de séquences d'insertion. SPAdes (Bankevich *et al.* 2012), assembleur utilisé dans notre étude, limite la perte de séquences liée à l'assemblage, en comparaison à d'autres programmes comme Velvet (Olson *et al.* 2015).

Pour mieux caractériser les mutations observées, l'annotation des génomes est intéressante. Elle peut néanmoins être différente en fonction des méthodes et de la base de données utilisées, et ainsi conduire à une matrice de présence / absence de gènes erronée. Comme dans notre étude, la comparaison des 7 génomes clonaux assemblés *de novo* et annotés avec Prokka (Seemann 2014) a mis en évidence des gènes absents dans un ou plusieurs génomes, sans qu'aucune différence au niveau nucléotidique ne soit visible entre les séquences.

En conclusion, il n'y a pas d'homogénéisation ni de consensus au niveau des méthodes *in silico* utilisées pour comparer les génomes bactériens, ce qui entrave parfois la comparaison entre les publications. L'utilisation de bases de données différentes selon les

études conduit également à l'apparition de biais.

Il est également important de pouvoir compléter les résultats issus de comparaisons de génomes complets par des études phénotypiques incluant des modèles *in vitro* (vérification de SNPs par PCR, caractérisation de mutants pour certains gènes).

C.2. Modèles cellulaires pour l'étude de la pathogénicité de *Brucella* spp.

Les *Brucella* sont des bactéries intracellulaires facultatives qui peuvent survivre et se répliquer dans les cellules phagocytaires et non phagocytaires. Pour étudier la virulence *in vitro* de *Brucella*, le modèle d'infection de macrophages est le plus largement utilisé (majoritairement de souris et d'humain) (He 2012). Cependant d'autres modèles cellulaires ont également été publiés comme les cellules dendritiques, les polynucléaires neutrophiles, les trophoblastes, les cellules épithéliales (von Bargen *et al.* 2012) (voir Tableau 3 dans l'Introduction Générale). Ainsi, pour associer l'analyse fonctionnelle à nos études génomiques, nous avons effectué un test de virulence *in vitro* à l'aide d'un modèle d'infection de macrophages murins. Ce modèle ne nous a pas permis de mettre en évidence de différence de virulence entre les différents isolats de *B. melitensis* bv 3, en lien avec des séquences génomiques similaires. Néanmoins, ce modèle aurait-il été capable d'identifier des différences de virulence dans ce contexte ? En effet, les macrophages sont des lignées cellulaires peu spécifiques qui permettent une réplication bactérienne importante après infection. Par exemple, en étudiant l'activité de l'uréase, les infections de macrophages n'ont pas permis de mettre en évidence de différence entre les *Brucella* mutants pour les gènes codant l'activité de l'uréase et les souches parentales, contrairement au modèle d'infection de souris par voie orale (Sangari *et al.* 2007). De plus, les conditions environnementales « optimales » appliquées dans notre étude pendant l'infection cellulaire (+37 ° C, 5% de CO₂, nutriments de qualité) ne reflètent pas la pression environnementale *in vivo* et pourraient masquer d'éventuelles différences de capacité d'adaptation des souches de *Brucella* associées à l'hôte.

Bien que les modèles cellulaires ne parviennent pas à reproduire entièrement la complexité des interactions *in vivo* (Baumler and Fang 2013), d'autres études menées sur différentes lignées cellulaires plus spécifiques sont nécessaires. Cela permettrait d'améliorer la compréhension de l'adaptation d'agents pathogènes à différents hôtes, à

l'image des études déjà publiées sur les infections par *Brucella* de lignées cellulaires provenant de différentes espèces animales (humaines, souris, bovines ou ovines (von Bargen *et al.* 2012)) (voir Tableau 3).

De même, d'autres approches, telles que la protéomique et la transcriptomique, dans différentes conditions de croissance, pourraient compléter notre approche actuelle axée sur le modèle d'infection de macrophages et la comparaison de génomes. Par exemple, des puces à ADN complémentaires (cDNA microarrays) ont déjà été utilisées chez *Brucella* (Rossetti *et al.* 2009). Cette technique, combinée à l'infection de cellules *in vitro*, pourrait permettre de comparer l'expression des gènes de différentes souches de *Brucella* isolées à différents temps post-infection, permettant de mieux caractériser les phases d'entrée et de réplication dans la cellule.

Ainsi, de nombreux outils performants de comparaison de bactéries sont décrits, et ont été utilisés dans cette thèse afin d'aborder la question de l'adaptation à un hôte à court terme.

D. Notion d'adaptation à un stress et d'évolution chez *Brucella* spp.

Une partie de ce travail de thèse consistait à identifier les potentiels déterminants génétique et pathogénique d'adaptation à un stress de *Brucella* spp., une espèce génétiquement homogène.

L'origine évolutive et la base moléculaire de spécificité d'hôte chez les bactéries pathogènes demeurent des questions importantes à résoudre. En effet, l'évolution est un concept multifactoriel fondamental qui a façonné le génome de *Brucella* au cours de milliers et de millions d'années. L'échelle temporelle de l'adaptation à un hôte/écosystème inclut d'un côté des changements rapides (systèmes de régulation, système de réparation de l'ADN, systèmes de résistance à des conditions environnementales extrêmes), et de l'autre des processus complexes d'évolution et de spéciation (Ryall *et al.* 2012). Par conséquent, la compréhension des mécanismes d'adaptation, c'est-à-dire la capacité des bactéries à subir des modifications pour augmenter leur aptitude à réagir face à un stress, constitue une première étape importante dans l'approche globale de la question de l'évolution.

En effet, des études visant à élucider les mécanismes d'adaptation à court terme à un changement d'environnement ont déjà été menées sur des populations bactériennes multi-hôtes d'agents pathogènes autres que *Brucella* spp., par exemple *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (Kim *et al.* 2014, Weinert *et al.* 2015, Zorraquino *et al.* 2017). Le but étant de définir les propriétés adaptatives des agents pathogènes bactériens, pouvant être décrites en termes de changements dans les processus de régulation ou de mutations adaptatives (mutation ponctuelle ou transfert de gènes horizontal).

Dans notre étude, après avoir confirmé la clonalité des souches sélectionnées, nous avons considéré que nos conditions imitaient une infection expérimentale de différentes espèces hôtes par *B. melitensis* bv 3. Ainsi, nous avons tenté de trouver des marqueurs moléculaires de l'adaptation à court terme à un nouvel environnement, à savoir l'infection de différentes espèces hôtes, qui peut être considérée comme une condition stressante, comme décrit ci-dessus chez d'autres pathogènes. Nous avons conclu, après analyse des résultats, que *Brucella* ne nécessite pas de mutation pour s'adapter à un nouvel hôte mammifère. Il s'agit de la première étude publiée qui le prouve réellement.

Une des limites de cette étude est que nous n'avons pas (ou peu) d'informations relatives à la chronologie de l'évènement. Nous avons émis l'hypothèse que la période de temps (une année) sur laquelle les infections des 7 individus d'espèces différentes avaient eu lieu était négligeable.

Notre étude visait à élucider l'adaptation à un stress, le changement d'hôte. Néanmoins elle ne permet pas de s'intéresser à l'adaptation à l'hôte de manière globale. Nous ne pouvons pas conclure à une potentielle différence de comportement des souches liée à la persistance chez telle ou telle espèce animale. La persistance est-elle un facteur favorisant l'apparition de mutations adaptatives chez la bactérie ? La réalisation d'une infection expérimentale de différentes espèces animales à partir de la même souche initiale serait à envisager. Elle permettrait de comparer les souches isolées à différents temps post-infection. Une telle étude longitudinale pourrait permettre d'appréhender les questions de persistance et de chronicité au sein d'un hôte, qui restent questions des non élucidées chez *Brucella*.

Par ailleurs, nous ne pouvons pas exclure qu'une mutation de la souche infectante préalable à l'apparition de ce foyer, ait été responsable des résultats observés.

E. La notion de préférence d'hôte chez *Brucella* spp.

Plus généralement, la question de la préférence d'hôte chez *Brucella* est intéressante.

La spécificité d'hôte décrit l'adaptation d'une bactérie à un ou plusieurs hôtes. On décrit des microbes spécialistes (microbe sélectif capable de coloniser seulement un hôte (ou un groupe d'hôtes) défini, comme *Yersinia pestis*) et généralistes (microbe associé ou capable d'infecter un large panel d'hôtes, de manière peu sélective, comme *Helicobacter pylori*). La préférence d'hôte peut également se « mesurer » en termes de différence de pathogénicité entre hôtes d'espèces différentes : *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium entraîne une gastroentérite chez l'Homme et une fièvre typhoïde chez la souris (Kirzinger and Stavrinos 2012). L'infection de l'hôte de préférence comprend l'aptitude à coloniser et à se disséminer chez l'hôte, à échapper aux défenses initiales et au système immunitaire, à se répliquer et à se maintenir au sein de l'hôte, puis à se transmettre à un nouvel hôte (Whatmore 2009).

Chez *Brucella* spp., la préférence de l'hôte est une notion importante utilisée en épidémiologie pour classer les espèces du genre. Néanmoins, il s'agit d'une notion qui ne fait pas consensus, et certaines espèces de *Brucella*, anciennes et nouvellement décrites, ont été isolées de nombreuses espèces d'hôtes. Par exemple, *B. melitensis*, historiquement responsable de la maladie chez les petits ruminants, infecte également les bovins, les bouquetins, les buffles et les chameaux, et est l'un des agents causals les plus fréquents de la brucellose humaine.

Au sein du genre *Brucella*, depuis le développement des approches WGS, plusieurs études ont été menées pour tenter d'élucider les bases de la préférence d'hôte et de l'évolution des espèces. Elles incluent de larges panels de *Brucella* de différentes espèces, isolées d'espèces d'hôtes et de contextes épidémiologiques variés. Comme la plupart des *Brucella*, du moins celles incluses dans ce que nous concevons comme des espèces classiques, ont une homologie du génome proche de 100%, les facteurs qui ont rendu les espèces de *Brucella* adaptées à leur hôte préférentiel ne sont pas élucidés. Néanmoins, les principales découvertes suggèrent que la préférence de l'hôte pourrait s'expliquer par l'inactivation de gènes plutôt que par la délétion ou l'acquisition de gènes (Chain *et al.* 2005, Halling *et al.* 2005, Tsolis *et al.* 2009, Wattam *et al.* 2009). Les gènes de *Brucella*

affectant les régulateurs de la transcription et les protéines de la membrane externe joueraient un rôle important dans la spécificité de l'hôte (Chain *et al.* 2005). L'altération du génome par l'insertion de l'élément d'insertion IS711 ainsi que des SNPs conduisant à la pseudogénisation de voies métaboliques pourrait expliquer la variabilité génétique liée à la préférence d'hôte. Cette étude récente portait sur des souches de *Brucella* isolées de mammifères marins (Suárez-Esquivel *et al.* 2017).

L'étude des mécanismes d'adaptation à différents hôtes à court terme, comme ce qui a été réalisé dans une partie de cette thèse, constitue une première pierre à l'édifice de la compréhension globale des mécanismes de préférence d'hôtes. Des études plus larges, s'intéressant à de grands panels de souches isolées sur des périodes plus vastes à partir d'hôtes différents sont par ailleurs indispensables.

De plus, on peut se demander si des échelles plus fines que celle du SNPs, comme les méthylations ou des modifications post-traduction, pourraient avoir un impact sur la spécificité d'hôte.

F. Forte stabilité du génome de *Brucella* spp.

Un autre point soulevé dans ce travail de thèse abordait la stabilité des génomes de *Brucella* spp.

Brucella (taille moyenne du génome $\sim 3,3$ Mbp) est décrite comme un genre monophylétique, génétiquement homogène. De récentes études comparatives sur le génome ont permis d'identifier de 2 500 à 3 900 SNPs chez la même espèce, parmi les souches épidémiologiquement non apparentées, respectivement parmi les souches de *B. melitensis* (Tan *et al.* 2015, Pisarenko *et al.* 2018) et différents biovars de *B. suis* (Sankarasubramanian *et al.* 2017). Par ailleurs, le nombre de SNPs obtenus à partir de la comparaison de génomes de *Brucella* appartenant à des espèces différentes est plus élevé. Par exemple 6 241 SNPs ont été identifiés lorsque les génomes de *B. canis* ont été comparés à *B. melitensis* 16 M (Ferreira Vicente *et al.* 2018).

Nous avons proposé ici de déterminer les signatures génomiques parmi 7 isolats clonaux de *B. melitensis* bv 3 (contexte épidémiologique du même événement d'infection, génotypage MLVA-16) isolés à partir de différentes espèces d'hôtes. La transmission à un hôte hétérologue au lieu de transmission à un hôte spécifique implique-t-elle

davantage de mutations adaptatives chez *Brucella*? En accord avec des études antérieures, nos résultats ont montré un très faible taux de SNP (Foster *et al.* 2009, Pisarenko *et al.* 2018) chez *Brucella* spp. et ont confirmé la très forte stabilité du génome de *Brucella*.

Dans leur étude, Ke *et al.* (2012) ont infecté des souris BALB/c avec la souche *B. melitensis* 16M et comparé le génome (après séquençage complet) des bactéries inoculées avec celui des bactéries isolées à 1 (16M1w) et 13 (16M13w) semaines après l'infection. Les auteurs décrivent l'apparition de 11 SNPs en une semaine (16M vs 16M1w), et, étonnamment, de 5019 SNPs en une courte période de 13 semaines (16M vs 16M13w). Ils en ont conclu que *B. melitensis* pouvait subir de grandes mutations adaptatives lors d'une infection chronique.

Les résultats obtenus dans notre étude (2748 SNPs parmi 7 isolats étudiés et 16M appartenant à la même espèce, *B. melitensis*) sont conformes à ce qui est généralement décrit dans *Brucella*, mais ne concordent pas avec les résultats précédemment publiés par Ke *et al.* (2012).

Il aurait été intéressant de comparer nos résultats respectifs, néanmoins, la publication (annonce du génome) n'était pas suffisamment exhaustive. Nos résultats sont par ailleurs concordants avec ceux obtenus par Georgi *et al.* (2017), qui ont montré 100% d'identité nucléotidique entre des génomes de *B. melitensis* isolées à différents temps (de 7 à 69 jours) lors du suivi d'un patient atteint de brucellose (Georgi *et al.* 2017).

CONCLUSION GENERALE

La brucellose reste aujourd'hui une maladie de répartition mondiale. Les complications associées sont très débilantes chez l'Homme, et entraînent de lourdes pertes économiques. La maîtrise de la brucellose humaine repose sur le contrôle de la brucellose chez l'animal, réservoir de *Brucella* spp.. L'utilisation d'outils diagnostiques fiables, associée à des programmes de lutte établis par les autorités et adaptés au contexte épidémiologique (endémie, région indemne) ont montré leur efficacité au cours des 50 dernières années. Durant ce projet de thèse, nous avons développé une nouvelle méthode PCR en temps réel (IDBRU) permettant la détection de *Brucella* spp., incluant des contrôles internes robustes assurant la fiabilité des résultats fournis. Par ailleurs, la méthode d'extraction d'ADN à partir de prélèvements de lait a été optimisée à partir de kits commerciaux simples d'utilisation, offrant par ailleurs la possibilité d'automatisation. La méthode IDBRU permet d'obtenir des résultats de manière sécurisée pour le manipulateur, en moins de 3 heures, *versus* 10 jours pour l'isolement, méthode de référence. Par ailleurs, les performances de la méthode IDBRU indiquent une meilleure sensibilité que la détection par isolement, combinée une excellente spécificité diagnostique. Au regard de ces résultats, la méthode IDBRU apparaît comme un outil rapide et fiable diagnostic de la brucellose à partir de prélèvements de lait de ruminants, et plus performant que les méthodes PCR recommandées par l'OIE à ce jour. Néanmoins la validation de la méthode IDBRU à partir de prélèvements autre que le lait est nécessaire, ainsi que la comparaison avec les méthodes d'isolement et de sérologie dans différents contextes épidémiologiques.

Par ailleurs, la compréhension des mécanismes liés à la diversité des phénotypes et de pathogénicité observée entre les souches au sein de ce genre bactérien homogène génétiquement, est indispensable à l'élaboration de moyens de contrôle et de traitements de la brucellose chez l'animal et l'Homme.

Notre étude de souches clonales de *B. melitensis* bv 3 isolées d'hôtes appartenant à des espèces différentes a permis de confirmer la forte stabilité génomique de cette espèce. En effet, le genre *Brucella* est décrit comme clonal. Son évolution au fil des siècles reposerait sur la dérive génétique consécutive à des mutations et des réarrangements internes, plutôt qu'à des transferts horizontaux de gènes. Ce foyer mime une infection expérimentale d'hôtes d'espèces différentes, permettant ainsi d'étudier l'adaptation à un stress (le changement d'hôte) à une échelle de temps très courte. La comparaison des

génomomes de ces souches n'a pas permis de mettre en évidence de mutations qui auraient pu être attendues du fait de l'infection d'hôtes différents. Il s'agit de la première étude de terrain le mettant en évidence.

Néanmoins, de nombreux points restent non élucidés concernant la pathogénicité et la préférence d'hôte chez *Brucella*, en particulier sur les mécanismes liés à la chronicité et la persistance. Des études « omiques » couplées à des approches phénotypiques chez différentes espèces hôtes, alliant différentes conditions de culture, sont encore nécessaires pour ce genre génétiquement homogène.

REFERENCES

REFERENCES

- Abou-Eisha, A. M. (2000). "Brucellosis in camels and its relation to public health." *Assiut Veterinary Medical Journal* 44: 54-64.
- AFNOR (2015). NF U47-600-2. Méthodes d'analyse en santé animale - PCR (réaction de polymérisation en chaîne) - Partie 2 : exigences et recommandations pour le développement et la validation de la PCR en santé animale.
- Akhtar, R., Z. I. Chaudhry, A. R. Shakoori, M. U. Ahmad and A. Aslam (2010). "Comparative efficacy of conventional diagnostic methods and evaluation of polymerase chain reaction for the diagnosis of bovine brucellosis." *Vet World* 3(2): 53-56.
- Al-Ajlan, H. H., A. S. Ibrahim and A. A. Al-Salamah (2011). "Comparison of different PCR methods for detection of *Brucella* spp. in human blood samples." *Pol J Microbiol* 60(1): 27-33.
- Al Dahouk, S., P. L. Fleche, K. Nockler, I. Jacques, M. Grayon, H. C. Scholz, H. Tomaso, G. Vergnaud and H. Neubauer (2007). "Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis." *J Microbiol Methods* 69(1): 137-145 DOI: 10.1016/j.mimet.2006.12.015.
- Al Dahouk, S., R. M. Hagen, K. Nockler, H. Tomaso, M. Wittig, H. C. Scholz, G. Vergnaud and H. Neubauer (2005). "Failure of a short-term antibiotic therapy for human brucellosis using ciprofloxacin. A study on in vitro susceptibility of *Brucella* strains." *Chemotherapy* 51(6): 352-356 DOI: 10.1159/000088960.
- Al Dahouk, S., V. Jubier-Maurin, H. C. Scholz, H. Tomaso, W. Karges, H. Neubauer and S. Kohler (2008). "Quantitative analysis of the intramacrophagic *Brucella suis* proteome reveals metabolic adaptation to late stage of cellular infection." *Proteomics* 8(18): 3862-3870 DOI: 10.1002/pmic.200800026.
- Al Dahouk, S., H. Tomaso, E. Prenger-Berninghoff, W. D. Spletstoesser, H. C. Scholz and H. Neubauer (2005). "Identification of *brucella* species and biotypes using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)." *Crit Rev Microbiol* 31(4): 191-196 DOI: 10.1080/10408410500304041.
- Alton, G. G. (1985). "The epidemiology of *brucella melitensis* in sheep and goats." *CEC Seminars* 32: 187-196.
- Alton, G. G. (1988). *Techniques for the brucellosis laboratory*, Institut National de la Recherche Agronomique.
- Amin, A. S., M. E. Hamdy and A. K. Ibrahim (2001). "Detection of *Brucella melitensis* in semen using the polymerase chain reaction assay." *Vet Microbiol* 83(1): 37-44.
- Amoroso, M. G., C. Salzano, B. Cioffi, M. Napoletano, F. Garofalo, A. Guarino and G. Fusco (2011). "Validation of a Real-time PCR assay for fast and sensitive quantification of *Brucella* spp. in water buffalo milk." *Food Control* 22(8): 1466-1470 DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.03.003.
- Anderson, F. M. and K. B. Pedersen (1995). "Brucellosis: a case of natural infection of a cow with *Brucella suis*, biotype 2." *Dansk Veterinaertidsskrift* 78(8): 408.
- Aparicia, E. D. (2013). "Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus*." *Rev sci tech Off int Epiz* 32(1): 53-60.
- Arellano-Reynoso, B., N. Lapaque, S. Salcedo, G. Briones, A. E. Ciocchini, R. Ugalde, E. Moreno, I. Moriyon and J. P. Gorvel (2005). "Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival." *Nat Immunol* 6(6): 618-625 DOI: 10.1038/ni1202.
- Arellano-Reynoso, B., F. Suarez-Guemes, F. M. Estrada, F. Michel-GomezFlores, R. Hernandez-Castro, R. B. Acosta and E. Diaz-Aparicio (2013). "Isolation of a field strain of *Brucella abortus* from RB51-vaccinated- and brucellosis-seronegative bovine yearlings that calved normally." *Trop Anim Health Prod* 45(2): 695-697 DOI: 10.1007/s11250-012-0252-8.

REFERENCES

- Arenas, G. N., A. S. Staskevich, A. Aballay and L. S. Mayorga (2000). "Intracellular Trafficking of *Brucella abortus* in J774 Macrophages." *Infect Immun* 68(7): 4255-4263.
- Atluri, V. L., M. N. Xavier, M. F. de Jong, A. B. den Hartigh and R. M. Tsois (2011). "Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts." *Annu Rev Microbiol* 65: 523-541 DOI: 10.1146/annurev-micro-090110-102905.
- Baddour, M. M. and D. H. Alkhalifa (2008). "Evaluation of three polymerase chain reaction techniques for detection of *Brucella* DNA in peripheral human blood." *Can J Microbiol* 54(5): 352-357 DOI: 10.1139/w08-017.
- Baily, G. G., J. B. Krahn, B. S. Drasar and N. G. Stoker (1992). "Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification." *J Trop Med Hyg* 95(4): 271-275.
- Bang, B. (1897). "The etiology of epizootic abortion." *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 10(125).
- Bankevich, A., S. Nurk, D. Antipov, A. A. Gurevich, M. Dvorkin, A. S. Kulikov, V. M. Lesin, S. I. Nikolenko, S. Pham, A. D. Prjibelski, A. V. Pyshkin, A. V. Sirotkin, N. Vyahhi, G. Tesler, M. A. Alekseyev and P. A. Pevzner (2012). "SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing." *J Comput Biol* 19(5): 455-477 DOI: 10.1089/cmb.2012.0021.
- Barkallah, M., Y. Gharbi, S. Zormati, N. Karkouch, Z. Mallek, M. Gautier, R. Gdoura and I. Fendri (2017). "A mixed methods study of ruminant brucellosis in central-eastern Tunisia." *Trop Anim Health Prod* 49(1): 39-45 DOI: 10.1007/s11250-016-1155-x.
- Barkema, H. W., J. Van der Schans, Y. H. Schukken, A. L. De Gee, T. J. Lam and G. Benedictus (1997). "Effect of freezing on somatic cell count of quarter milk samples as determined by a Fossomatic electronic cell counter." *J Dairy Sci* 80(2): 422-426 DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(97)75953-8.
- Barquero-Calvo, E. (2007). "*Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection." *PLoS One* 2: e631, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0000631>.
- Baumler, A. and F. C. Fang (2013). "Host specificity of bacterial pathogens." *Cold Spring Harb Perspect Med* 3(12): a010041 DOI: 10.1101/cshperspect.a010041.
- Bickley, J., J. K. Short, D. G. McDowell and H. C. Parkes (1996). "Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions." *Applied Microbiology* 22: 153-158.
- Billard, E., J. Dornand and A. Gross (2007). "Interaction of *Brucella suis* and *Brucella abortus* rough strains with human dendritic cells." *Infect Immun* 75(12): 5916-5923 DOI: 10.1128/IAI.00931-07.
- Blasco, J. M., C. Marín, M. Jiménez de Bagués, M. Barberán, A. Hernández, L. Molina, J. Velasco, R. Díaz and I. Moriyón (1994). "Evaluation of allergic and serological tests for diagnosing *Brucella melitensis* infection in sheep." *J Clin Microbiol* 32(8): 1835-1840, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC263887/>.
- Blasco, J. M. and B. Molina-Flores (2011). "Control and eradication of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats." *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 27(1): 95-104 DOI: 10.1016/j.cvfa.2010.10.003.
- Blood, D. C. and J. A. Henderson (1974). *Veterinary medicine*. t. Ed, Bailliere Tindall.
- Bolotin, E. and R. Hershberg (2015). "Gene Loss Dominates As a Source of Genetic Variation within Clonal Pathogenic Bacterial Species." *Genome Biol Evol* 7(8): 2173-2187 DOI: 10.1093/gbe/evv135.

REFERENCES

- Boschiroli, M. L., S. Ouahrani-Bettache, V. Foulongne, S. Michaux-Charachon, G. Bourg, A. Allardet-Servent, C. Cazevieille, J. P. Liautard, M. Ramuz and D. O'Callaghan (2002). "The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(3): 1544–1549 DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.032514299>.
- Bounaadja, L., D. Albert, B. Chenais, S. Henault, M. S. Zygmunt, S. Poliak and B. Garin-Bastuji (2009). "Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: a comparative study of IS711, *bcs*31 and *per* target genes." *Vet Microbiol* 137(1-2): 156-164 DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.12.023.
- Boyd, H. and H. C. B. Reed (1961). "Investigations into the Incidence and Causes of Infertility in Dairy Cattle—Influence of Some Management Factors Affecting the Semen and Insemination Conditions." *British Veterinary Journal* 117(2): 74-86 DOI: 10.1016/s0007-1935(17)43803-6.
- Brandao, A. P., F. S. Oliveira, N. B. Carvalho, L. Q. Vieira, V. Azevedo, G. C. Macedo and S. C. Oliveira (2012). "Host susceptibility to *Brucella abortus* infection is more pronounced in IFN-gamma knockout than IL-12/beta2-microglobulin double-deficient mice." *Clin Dev Immunol* 2012: 589494 DOI: 10.1155/2012/589494.
- Brew, S. D., L. L. Perrett, J. A. Stack, A. P. MacMillan and N. J. Staunton (1999). "Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal." *Vet Rec* 144(17): 483.
- Bricker, B. J., D. R. Ewalt and S. M. Halling (2003). "Brucella 'HOOOF-Prints': strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs)." *BMC Microbiol* 3: 15 DOI: 10.1186/1471-2180-3-15.
- Bricker, B. J. and S. M. Halling (1994). "Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR." *J Clin Microbiol* 32(11): 2660-2666.
- Bricker, B. J. and S. M. Halling (1995). "Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51." *J Clin Microbiol* 33(6): 1640-1642, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC228233/>.
- Buddle, M. B. (1956). "Studies on *Brucella ovis* (nsp.), a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia." *Journal of Hygiene (London)* 54(3): 351-364 DOI: 10.1017/S0022172400044612
- Capparelli, R., M. Parlato, M. Iannaccone, S. Roperto, R. Marabelli, F. Roperto and D. Iannelli (2009). "Heterogeneous shedding of *Brucella abortus* in milk and its effect on the control of animal brucellosis." *J Appl Microbiol* 106(6): 2041-2047 DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04177.x.
- Carmichael, L. E. and D. W. Bruner (1968). "Characteristics of a newly-recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions." *The Cornell Veterinarian* 48(4): 579-592.
- Carpenter, C. M. (1926). "A comparison of strains of brucella abortus isolated from man with those from cattle." *J Infect Dis* 39(3): 215-219 DOI: 10.1093/infdis/39.3.215.
- Carvalho Neta, A. V., J. P. Mol, M. N. Xavier, T. A. Paixao, A. P. Lage and R. L. Santos (2010). "Pathogenesis of bovine brucellosis." *Vet J* 184(2): 146-155 DOI: 10.1016/j.tvjl.2009.04.010.
- Carvalho Neta, A. V., A. P. Stynen, T. A. Paixao, K. L. Miranda, F. L. Silva, C. M. Roux, R. M. Tsolis, R. E. Everts, H. A. Lewin, L. G. Adams, A. F. Carvalho, A. P. Lage and R. L. Santos (2008). "Modulation of the bovine trophoblastic innate immune response by *Brucella abortus*." *Infect Immun* 76(5): 1897-1907 DOI: 10.1128/IAI.01554-07.
- Casanas, M. C., M. I. Queipo-Ortuno, A. Rodriguez-Torres, A. Orduna, J. D. Colmenero and P. Morata (2001). "Specificity of a polymerase chain reaction assay of a target sequence on the

REFERENCES

- 31-kilodalton Brucella antigen DNA used to diagnose human brucellosis." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20(2): 127-131.
- Castaneda-Roldan, E. I., S. Ouahrani-Bettache, Z. Saldana, F. Avelino, M. A. Rendon, J. Dornand and J. A. Giron (2006). "Characterization of SP41, a surface protein of *Brucella* associated with adherence and invasion of host epithelial cells." *Cell Microbiol* 8(12): 1877-1887 DOI: 10.1111/j.1462-5822.2006.00754.x.
- Castaño, M. J. and J. Solera (2009). "Chronic Brucellosis and Persistence of *Brucella melitensis* DNA." *J Clin Microbiol* 47(7): 2084, <http://jcm.asm.org/content/47/7/2084.abstract>.
- CDC (2017). "Brucellosis reference guide: exposures, testing, and prevention." Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC. <https://www.cdc.gov/brucellosis/pdf/brucellosis-reference-guide.pdf>.
- Chain, P. S., D. J. Comerici, M. E. Tolmasky, F. W. Larimer, S. A. Malfatti, L. M. Vergez, F. Agüero, M. L. Land, R. A. Ugalde and E. Garcia (2005). "Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *Brucellae*." *Infect Immun* 73(12): 8353-8361 DOI: 10.1128/IAI.73.12.8353-8361.2005.
- Chen, F., X. Ding, Y. Ding, Z. Xiang, X. Li, D. Ghosh, G. G. Schurig, N. Sriranganathan, S. M. Boyle and Y. He (2011). "Proinflammatory caspase-2-mediated macrophage cell death induced by a rough attenuated *Brucella suis* strain." *Infect Immun* 79(6): 2460-2469 DOI: 10.1128/IAI.00050-11.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* 162(1): 156-159 DOI: 10.1006/abio.1987.9999.
- Ciftci, A., T. Ica, S. Savasan, B. Sareyyupoglu, M. Akan and K. S. Diker (2017). "Evaluation of PCR methods for detection of *Brucella* strains from culture and tissues." *Trop Anim Health Prod* 49(4): 755-763 DOI: 10.1007/s11250-017-1256-1.
- Cloekaert, A., J. M. Verger, M. Grayon and O. Grepinet (1995). "Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*." *Microbiology* 141 (Pt 9): 2111-2121 DOI: 10.1099/13500872-141-9-2111.
- Cloekaert, A., J. M. Verger, M. Grayon, J. Y. Paquet, B. Garin-Bastuji, G. Foster and J. Godfroid (2001). "Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus." *Microbes Infect* 3(9): 729-738.
- Cloekaert, A., N. Vizcaino, J. Y. Paquet, R. A. Bowden and P. H. Elzer (2002). "Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future." *Vet Microbiol* 90(1-4): 229-247.
- Cook, D. R. and J. W. Noble (1984). "Isolation of *Brucella suis* from cattle." *Australian Veterinary Journal* 61(8): 263-264 DOI: 10.1111/j.1751-0813.1984.tb15539.x.
- Corbel, M. J. (1987). "Brucella phages: Advances in the development of a reliable phage typing system for growth and non-smooth *Brucella* isolates." *Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie* 138(1): 70-75 DOI: 10.1016/0769-2609(87)90056-1.
- Corbel, M. J., Food and Agriculture Organization of the United Nations, W. H. Organization and W. O. f. A. Health (2006). *Brucellosis in humans and animals*.
- Cordes, D. O. and M. E. Carter (1979). "Persistence of *Brucella abortus* infection in six herds of cattle under brucellosis eradication." *N Z Vet J* 27(12): 255-259 DOI: 10.1080/00480169.1979.34666.
- Covert, J., A. J. Mathison, L. Eskra, M. Banai and G. Splitter (2009). "*Brucella melitensis*, *B. neotomae* and *B. ovis* elicit common and distinctive macrophage defense transcriptional responses." *Exp Biol Med* (Maywood) 234(12): 1450-1467 DOI: 10.3181/0904-RM-124.

REFERENCES

- Cremonesi, P., B. Castiglioni, G. Malferrari, I. Biunno, C. Vimercati, P. Moroni, S. Morandi and M. Luzzana (2006). "Technical note: Improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk." *J Dairy Sci* 89(1): 163-169 DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72080-X.
- Da Costa, M., J. P. Guillou, B. Garin-Bastuji, M. Thiebaud and G. Dubray (1996). "Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification." *J Appl Bacteriol* 81(3): 267-275.
- Dauphin, L. A., R. J. Hutchins, L. A. Bost and M. D. Bowen (2009). "Evaluation of automated and manual commercial DNA extraction methods for recovery of *Brucella* DNA from suspensions and spiked swabs." *J Clin Microbiol* 47(12): 3920-3926 DOI: 10.1128/JCM.01288-09.
- Davies, G. and A. Casey (1973). "The survival of *Brucella abortus* in milk and milk products." *Br Vet J* 129(4): 345-353.
- Dawook, H. A. (2008). "Brucellosis in Camels (*Camelus dromedarius*) in the south province of Jordan." *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 3(3): 623-626 DOI: 10.3844/ajabssp.2008.623.626.
- de Figueiredo, P., T. A. Ficht, A. Rice-Ficht, C. A. Rossetti and L. G. Adams (2015). "Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of *Brucella*-host interactions." *Am J Pathol* 185(6): 1505-1517 DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.03.003.
- De Miguel, M. J., C. M. Marin, P. M. Munoz, L. Dieste, M. J. Grillo and J. M. Blasco (2011). "Development of a selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* species." *J Clin Microbiol* 49(4): 1458-1463 DOI: 10.1128/jcm.02301-10.
- Dean, A. S., L. Crump, H. Greter, E. Schelling and J. Zinsstag (2012). "Global burden of human brucellosis: a systematic review of disease frequency." *PLoS Negl Trop Dis* 6(10): e1865 DOI: 10.1371/journal.pntd.0001865.
- Delpino, M. V., P. Barrionuevo, R. Scian, C. A. Fossati and P. C. Baldi (2010). "*Brucella*-infected hepatocytes mediate potentially tissue-damaging immune responses." *Journal of Hepatology* 53: 145-154.
- Delpino, M. V., C. A. Fossati and P. C. Baldi (2009). "Proinflammatory response of human osteoblastic cell lines and osteoblast-monocyte interaction upon infection with *Brucella* spp." *Infect Immun* 77(3): 984-995 DOI: 10.1128/IAI.01259-08.
- DelVecchio, V. G., V. Kapatral, R. J. Redkar, G. Patra, C. V. Mijer, T. Los, N. Ivanova, I. Anderson, A. Bhattacharyya, A. Lykidis, G. Reznik, L. Jablonski, N. Larsen, M. D'Souza, D. O'Callaghan, J. J. Letesson, R. Haselkorn, N. Kyrpides and R. A. Overbeek (2002). "The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*." *PNAS* 99(1): 443-448.
- Detilleux, P. G., B. L. Deyoe and N. F. Cheville (1990). "Penetration and Intracellular Growth of *Brucella abortus* in Nonphagocytic Cells In Vitro." *Infect Immun* 58(7): 2320-2328.
- Dibbern, A. G., B. G. Botaro, M. P. Viziack, L. F. Silva and M. V. Santos (2015). "Evaluation of methods of DNA extraction from *Staphylococcus aureus* in milk for use in real-time PCR." *Genet Mol Res* 14(1): 227-233 DOI: 10.4238/2015.January.16.6.
- Didenko, V. V. (2001). "DNA Probes Using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): Designs and Applications." *BioTechniques* 31(5): 1106-1121, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1941713/>.
- Doganay, M. and B. Aygen (2003). "Human brucellosis: an overview." *Int J Infect Dis* 7(3): 173-182 DOI: [https://doi.org/10.1016/S1201-9712\(03\)90049-X](https://doi.org/10.1016/S1201-9712(03)90049-X).

REFERENCES

- Ducrottoy, M. J., R. Conde-Alvarez, J. M. Blasco and I. Moriyon (2016). "A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis." *Vet Immunol Immunopathol* 171: 81-102 DOI: 10.1016/j.vetimm.2016.02.002.
- Ebadi, A. (1971). "Comparison of Various Serological Tests on the Milk of Sheep in Relation to the Isolation of *Brucella Melitensis*." *British Veterinary Journal* 127(3): 105-112 DOI: [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(17\)37682-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(17)37682-0).
- Edwards, S. J., A. McDiamid, R. S. Deropp and D. H. Mcleod (1946). "Immunity in cattle vaccinated with brucella abortus strain 19 and a note comparing this strain with 45/20." *Vet Rec* 58: 141-146.
- ESA. "Maladie abortives des ruminants, OSCAR (Observatoire et suivi des causes d'avortements chez les ruminants)." Plateforme d'épidémiosurveillance santé animale Retrieved 18 October 2018, from <https://www.plateforme-esa.fr/page/thematique-diagnostic-differentiel-des-avortements>.
- Eskra, L., A. Mathison and G. Splitter (2003). "Microarray Analysis of mRNA Levels from RAW264.7 Macrophages Infected with *Brucella abortus*." *Infect Immun* 71(3): 1125-1133 DOI: 10.1128/iai.71.3.1125-1133.2003.
- Evans, A. C. (1918). "Further studies on bacterium abortus and related bacteria: a comparison of bacterium abortus with bacterium bronchisepticus and with the organism that causes Malta fever." *J Infect Dis* 22: 580-593 DOI: 10.1093/infdis/22.6.580.
- Ewalt, D. R. and B. J. Bricker (2000). "Validation of the abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of *Brucella abortus* field strain isolates and the vaccine strains, 19 and RB51." *J Clin Microbiol* 38(8): 3085-3086.
- Ewalt, D. R., J. B. Payeur, J. C. Rhyhan and P. L. Geer (1997). "*Brucella suis* biovar 1 in naturally infected cattle: a bacteriological, serological, and histological study." *J Vet Diagn Invest* 9(4): 417-420 DOI: 10.1177/104063879700900414.
- Falenski, A., A. Mayer-Scholl, M. Filter, C. Gollner, B. Appel and K. Nockler (2011). "Survival of *Brucella* spp. in mineral water, milk and yogurt." *Int J Food Microbiol* 145(1): 326-330 DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.033.
- Fava, L. W., P. B. S. Serpa, I. C. Kulkamp-Guerreiro and A. T. Pinto (2013). "Evaluation of viscosity and particle size distribution of fresh, chilled and frozen milk of Lacaune ewes." *Small Ruminant Research* 113(1): 247-250 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.03.010>.
- Fekete, A., J. A. Bantle and S. M. Halling (1992). "Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues." *J Vet Diagn Invest* 4(1): 79-83 DOI: 10.1177/104063879200400118.
- Fekete, A., J. A. Bantle, S. M. Halling and M. R. Sanborn (1990). "Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction." *J Appl Bacteriol* 69(2): 216-227.
- Fernandez, A. G., M. C. Ferrero, M. S. Hielpos, C. A. Fossati and P. C. Baldi (2016). "Proinflammatory Response of Human Trophoblastic Cells to *Brucella abortus* Infection and upon Interactions with Infected Phagocytes." *Biol Reprod* 94(2): 48 DOI: 10.1095/biolreprod.115.131706.
- Ferreira Vicente, A., G. Girault, Y. Corde, M. Souza Ribeiro Mioni, L. Borges Keid, M. Jay, J. Megid and V. Mick (2018). "New insights into phylogeography of worldwide *Brucella canis* isolates by comparative genomics-based approaches: focus on Brazil." *BMC Genomics* 19(1): 636 DOI: 10.1186/s12864-018-5001-6.
- Ficht, T. A., S. W. Bearden, B. A. Sowa and H. Marquis (1990). "Genetic variation at the omp2 porin locus of the brucellae: species-specific markers." *Mol Microbiol* 4(7): 1135-1142.

REFERENCES

- Foster, G., B. S. Osterman, J. Godfroid, I. Jacques and A. Cloeckaert (2007). "Brucella ceti sp. nov. and Brucella pinnipedialis sp. nov. for Brucella strains with cetaceans and seals as their preferred hosts." *Int J Syst Evol Microbiol* 57(Pt 11): 2688-2693 DOI: 10.1099/ijs.0.65269-0.
- Foster, J. T., S. M. Beckstrom-Sternberg, T. Pearson, J. S. Beckstrom-Sternberg, P. S. Chain, F. F. Roberto, J. Hnath, T. Bretin and P. Keim (2009). "Whole-genome-based phylogeny and divergence of the genus Brucella." *J Bacteriol* 191(8): 2864-2870 DOI: 10.1128/JB.01581-08.
- Foster, J. T., L. B. Brice, S. M. Beckstrom-Sternberg, T. Pearson, W. D. Brown, D. M. Kiesling, C. A. Allen, C. M. Liu, J. Beckstrom-Sternberg, F. F. Roberto and P. Keim (2012). "Genotyping of *Brucella* species using clade specific SNPs." *BMC Microbiol* 12: 110 DOI: 10.1186/1471-2180-12-110.
- Franc, K. A., R. C. Krecek, B. N. Hasler and A. M. Arenas-Gamboa (2018). "Brucellosis remains a neglected disease in the developing world: a call for interdisciplinary action." *BMC Public Health* 18(1): 125 DOI: 10.1186/s12889-017-5016-y.
- Fretin, D., A. Fauconnier, S. Kohler, S. Halling, S. Leonard, C. Nijskens, J. Ferooz, P. Lestrade, R. M. Delrue, I. Danese, J. Vandenhoute, A. Tibor, X. DeBolle and J. J. Letesson (2005). "The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection." *Cell Microbiol* 7(5): 687-698 DOI: 10.1111/j.1462-5822.2005.00502.x.
- Fretin, D., A. M. Whatmore, S. Al Dahouk, H. Neubauer, B. Garin-Bastuji, D. Albert, M. Van Hessche, M. Menart, J. Godfroid, K. Walravens and P. Wattiau (2008). "Brucella suis identification and biovar typing by real-time PCR." *Vet Microbiol* 131(3-4): 376-385 DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.04.003.
- Furet, J. P., P. Quenee and P. Tailliez (2004). "Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR." *Int J Food Microbiol* 97(2): 197-207 DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.04.020.
- Galindo, R. C., P. M. Muñoz, M. J. de Miguel, C. M. Marin, J. Labairu, M. Revilla, J. M. Blasco, C. Gortazar and J. de la Fuente (2010). "Gene expression changes in spleens of the wildlife reservoir species, Eurasian wild boar (*Sus scrofa*), naturally infected with *Brucella suis* biovar 2." *Journal of Genetics and Genomics* 37(11): 725-736 DOI: 10.1016/s1673-8527(09)60090-4.
- Gallien, P., C. Dorn, G. Alban, C. Staak and D. Protz (1998). "Detection of *Brucella* species in organs of naturally infected cattle by polymerase chain reaction." *Vet Rec* 142(19): 512-514.
- Garcia-Yoldi, D., C. M. Marin, M. J. de Miguel, P. M. Munoz, J. L. Vizmanos and I. Lopez-Goni (2006). "Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1." *Clin Chem* 52(4): 779-781 DOI: 10.1373/clinchem.2005.062596.
- Garcia Samartino, C., M. V. Delpino, C. Pott Godoy, M. S. Di Genaro, K. A. Pasquevich, A. Zwerdling, P. Barrionuevo, P. Mathieu, J. Cassataro, F. Pitossi and G. H. Giambartolomei (2010). "Brucella abortus induces the secretion of proinflammatory mediators from glial cells leading to astrocyte apoptosis." *Am J Pathol* 176(3): 1323-1338 DOI: 10.2353/ajpath.2010.090503.
- Garin-Bastuji, B. (2011). Pathogens in Milk | *Brucella* spp. *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Second Edition). J. W. Fuquay. San Diego, Academic Press: 31-39.
- Garin-Bastuji, B., J. Hars, A. Drapeau, M. A. Cherfa, Y. Game, J. M. Le Horgne, S. Rautyreau, E. Maucci, J. J. Pasquier, M. Jay and V. Mick (2014). "Reemergence of *Brucella melitensis* in Wildlife, France." *Emerging Infectious Diseases* 20(9): 1570-1571 DOI: 10.3201/eid2009.131517.
- Gentilini, M. V., A. I. Pesce Viglietti, P. C. Arriola Benitez, A. E. Iglesias Molli, G. E. Cerrone, G. H. Giambartolomei and M. V. Delpino (2018). "Inhibition of Osteoblast Function by *Brucella abortus* is Reversed by Dehydroepiandrosterone and Involves ERK1/2 and Estrogen Receptor." *Front Immunol* 9: 88 DOI: 10.3389/fimmu.2018.00088.

REFERENCES

- Georgi, E., M. C. Walter, M. T. Pfalzgraf, B. H. Northoff, L. M. Holdt, H. C. Scholz, L. Zoeller, S. Zange and M. H. Antwerpen (2017). "Whole genome sequencing of *Brucella melitensis* isolated from 57 patients in Germany reveals high diversity in strains from Middle East." *PLoS One* 12(4): e0175425 DOI: 10.1371/journal.pone.0175425.
- Giraffa, G., L. Rossetti and E. Neviani (2000). "An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria." *J Microbiol Methods* 42(2): 175-184.
- Girault, G., Y. Blouin, G. Vergnaud and S. Derzelle (2014). "High-throughput sequencing of *Bacillus anthracis* in France: investigating genome diversity and population structure using whole-genome SNP discovery." *BMC Genomics* 15: 288-288 DOI: 10.1186/1471-2164-15-288.
- Godfroid, J., K. Nielsen and C. Saegerman (2010). "Diagnosis of Brucellosis in Livestock and Wildlife." *Croatian Medical Journal* 51(4): 296-305 DOI: 10.3325/cmj.2010.51.296.
- Gopaul, K. K., M. S. Koylass, C. J. Smith and A. M. Whatmore (2008). "Rapid identification of *Brucella* isolates to the species level by real time PCR based single nucleotide polymorphism (SNP) analysis." *BMC Microbiol* 8: 86 DOI: 10.1186/1471-2180-8-86.
- Gopaul, K. K., J. Sells, R. Lee, S. M. Beckstrom- Sternberg, J. T. Foster and A. M. Whatmore (2014). "Development and assessment of multiplex high resolution melting assay as a tool for rapid single-tube identification of five *Brucella* species." *BMC Research Notes* 7: 903 DOI: 10.1186/1756-0500-7-903.
- Grillo, M. J., M. Barberan and J. M. Blasco (1997). "Transmission of *Brucella melitensis* from sheep to lambs." *Vet Rec* 140(23): 602-605 DOI: 10.1136/vr.140.23.602.
- Gross, A., A. Terraza, S. Ouahrani-Bettache, J.-P. Liautard and J. Dornand (2000). "*In Vitro Brucella suis* Infection Prevents the Programmed Cell Death of Human Monocytic Cells." *Infect Immun* 68(1): 342-351.
- Guarino, A., L. Serpe, G. Fusco, A. Scaramuzzo and P. Gallo (2000). "Detection of *Brucella* species in buffalo whole blood by gene-specific PCR." *Vet Rec* 147(22): 634-636.
- Halling, S. M., B. D. Peterson-Burch, B. J. Bricker, R. L. Zuerner, Z. Qing, L. L. Li, V. Kapur, D. P. Alt and S. C. Olsen (2005). "Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*." *J Bacteriol* 187(8): 2715-2726.
- Halling, S. M., F. M. Tatum and B. J. Bricker (1993). "Sequence and characterization of an insertion sequence, IS711, from *Brucella ovis*." *Gene* 133(1): 123-127.
- Halling, S. M. and E. S. Zehr (1990). "Polymorphism in *Brucella* spp. due to highly repeated DNA." *J Bacteriol* 172(12): 6637-6640.
- Hamdy, M. E. and A. S. Amin (2002). "Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR." *Vet J* 163(3): 299-305.
- Hansel, C., K. Mertens, M. C. Elschner and F. Melzer (2015). "Novel real-time PCR detection assay for *Brucella suis*." *Vet Rec Open* 2(1): e000084 DOI: 10.1136/vetreco-2014-000084.
- He, Y. (2012). "Analyses of *Brucella* pathogenesis, host immunity, and vaccine targets using systems biology and bioinformatics." *Front Cell Infect Microbiol* 2: 2 DOI: 10.3389/fcimb.2012.00002.
- He, Y., S. Reichow, S. Ramamoorthy, X. Ding, R. Lathigra, J. C. Craig, B. W. Sobral, G. G. Schurig, N. Sriranganathan and S. M. Boyle (2006). "*Brucella melitensis* triggers time-dependent modulation of apoptosis and down-regulation of mitochondrion-associated gene expression in mouse macrophages." *Infect Immun* 74(9): 5035-5046 DOI: 10.1128/IAI.01998-05.

REFERENCES

- Heller, M. C., J. L. Watson, M. T. Blanchard, K. A. Jackson, J. L. Stott and R. M. Tsolis (2012). "Characterization of *Brucella abortus* infection of bovine monocyte-derived dendritic cells." *Vet Immunol Immunopathol* 149(3-4): 255-261 DOI: 10.1016/j.vetimm.2012.07.006.
- Herman, L. and H. De Ridder (1992). "Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction." *Applied and Environmental Microbiology* 58(6): 2099-2101, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC195734/>.
- Higgins, J. L., M. Gonzalez-Juarrero and R. A. Bowen (2017). "Evaluation of shedding, tissue burdens, and humoral immune response in goats after experimental challenge with the virulent *Brucella melitensis* strain 16M and the reduced virulence vaccine strain Rev. 1." *PLoS One* 12(10): e0185823 DOI: 10.1371/journal.pone.0185823.
- Hinic, V., I. Brodard, A. Thomann, Z. Cvetnic, P. V. Makaya, J. Frey and C. Abril (2008). "Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems." *J Microbiol Methods* 75(2): 375-378 DOI: 10.1016/j.mimet.2008.07.002.
- Hoorfar, J., B. Malorny, A. Abdulmawjood, N. Cook, M. Wagner and P. Fach (2004). "Practical Considerations in Design of Internal Amplification Controls for Diagnostic PCR Assay." *Clin Microbiol Rev* 42(5) DOI: 10.1128/JCM.42.5.1863-1868.2004.
- Hubáčková, M. and D. Ryšánek (2007). "Effects of Freezing Milk Samples on the Recovery of Alimentary Pathogens and Indicator Microorganisms." *Acta Veterinaria Brno* 76(2): 301-307 DOI: 10.2754/avb200776020301.
- Hughes, M. L. (1893). "The natural history of certain fevers occurring in the Mediterranean " *The Mediterranean Naturalist* 2(20): 299-314.
- Hull, N. C. and B. A. Schumaker (2018). "Comparisons of brucellosis between human and veterinary medicine." *Infect Ecol Epidemiol* 8(1): 1500846 DOI: 10.1080/20008686.2018.1500846.
- Ilhan, Z., H. Solmaz, A. Aksakal, T. Gulhan, I. H. Ekin and B. Boynukara (2007). "Comparison of PCR assay and bacteriological culture method for the detection of *Brucella melitensis* in stomach content samples of aborted sheep fetuses." *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 114(12): 460-464.
- Jay, M., S. Rautureau, V. Mick and B. Garin-Bastuji (2013). "Brucellose des ruminants : les foyers bovins de 2012 en France et en Belgique appellent à la vigilance." *Bulletin des GTV, Hors Série Avortement* 1.
- Jay, M., G. Le Carrou, M. A. Cherfa, V. Mick and B. Garin-Bastuji (2014). First *Brucella* bacteriology and molecular biology interlaboratory-proficiency trial organized in the EU. Brucellosis 2014 International Research Conference. Berlin, Germany. 9 September 2014. Poster.
- Jay, M., V. Mick and B. Garin-Bastuji (2013). IDENTIFICATION AND TYPING OF BRUCELLA STRAINS: 2012 PROFICIENCY TESTING. European Reference Lab for Brucellosis, INTERLABORATORY PROFICIENCY TEST FINAL REPORT
- Jouve, G. P. (1952). *Melitococcie ovine et caprine* Thèse Vétérinaire.
- Kampfer, P., D. M. Citron, E. J. Goldstein and H. C. Scholz (2007). "Difficulty in the identification and differentiation of clinically relevant *Ochrobactrum* species." *J Med Microbiol* 56(Pt 11): 1571-1573 DOI: 10.1099/jmm.0.47350-0.
- Keim, P., M. N. Van Ert, T. Pearson, A. J. Vogler, L. Y. Huynh and D. M. Wagner (2004). "Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales." *Infect Genet Evol* 4(3): 205-213 DOI: 10.1016/j.meegid.2004.02.005.
- Keleher, L. L. and J. A. Skyberg (2016). "Activation of bovine neutrophils by *Brucella* spp." *Vet Immunol Immunopathol* 177: 1-6 DOI: 10.1016/j.vetimm.2016.05.011.

REFERENCES

- Kenyon, A. J., R. Jenness and R. K. Anderson (1966). "Role of milk immunoglobulins in fat globule clustering and the ring test phenomenon." *J Dairy Sci* 49(9): 1144-1148 DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(66)88037-2.
- Keppie, J., A. E. Williams, K. Witt and H. Smith (1965). "The Role of Erythritol in the Tissue Localization of the Brucellae." *British Journal of Experimental Pathology* 46(1): 104-108, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2093692/>.
- Kim, C. H., M. Khan, D. E. Morin, W. L. Hurley, D. N. Tripathy, M. Kehrli, Jr., A. O. Oluoch and I. Kakoma (2001). "Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus* nuc gene in bovine milk." *J Dairy Sci* 84(1): 74-83 DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74454-2.
- Kim, D. H., J. J. Lim, J. J. Lee, D. G. Kim, H. J. Lee, W. Min, K. D. Kim, H. H. Chang, M. H. Rhee, M. Watarai and S. Kim (2012). "Identification of genes contributing to the intracellular replication of *Brucella abortus* within HeLa and RAW 264.7 cells." *Vet Microbiol* 158(3-4): 322-328 DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.02.019.
- Kim, H. J., H. Jeong, S. Hwang, M.-S. Lee, Y.-J. Lee, D.-W. Lee and S. J. Lee (2014). "Short-term differential adaptation to anaerobic stress via genomic mutations by *Escherichia coli* strains K-12 and B lacking alcohol dehydrogenase." *Frontiers in Microbiology* 5: 476 DOI: 10.3389/fmicb.2014.00476.
- Kirzinger, M. W. and J. Stavrinos (2012). "Host specificity determinants as a genetic continuum." *Trends Microbiol* 20(2): 88-93 DOI: 10.1016/j.tim.2011.11.006.
- Koschak, M. S., O. Fennema, C. H. Amundson and J. Y. Lee (1981). "Protein Stability of Frozen Milk as Influenced by Storage Temperature and Ultrafiltration." *Journal of Food Science* 46(4): 1211-1217 DOI: 10.1111/j.1365-2621.1981.tb03025.x.
- Kubista, M., J. M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonak, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjoberg, B. Sjogreen, L. Strombom, A. Stahlberg and N. Zoric (2006). "The real-time polymerase chain reaction." *Mol Aspects Med* 27(2-3): 95-125 DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.007.
- Lacerda, T. L., S. P. Salcedo and J. P. Gorvel (2013). "Brucella T4SS: the VIP pass inside host cells." *Curr Opin Microbiol* 16(1): 45-51 DOI: 10.1016/j.mib.2012.11.005.
- Lamontagne, J., A. Forest, E. Marazzo, F. Denis, H. Butler, J. F. Michaud, L. Boucher, I. Pedro, A. Villeneuve, D. Sitnikov, K. Trudel, N. Nassif, D. Boudjelti, F. Tomaki, E. Chaves-Olarte, C. Guzman-Verri, S. Brunet, A. Cote-Martin, J. Hunter, E. Moreno and E. Paramithiotis (2009). "Intracellular adaptation of *Brucella abortus*." *J Proteome Res* 8(3): 1594-1609 DOI: 10.1021/pr800978p.
- Lapaque, N., I. Moriyon, E. Moreno and J. P. Gorvel (2005). "Brucella lipopolysaccharide acts as a virulence factor." *Curr Opin Microbiol* 8(1): 60-66 DOI: 10.1016/j.mib.2004.12.003.
- Larsen, A. K., J. Godfroid and I. H. Nymo (2016). "Brucella pinnipedialis in hooded seal (*Cystophora cristata*) primary epithelial cells." *Acta Vet Scand* 58: 9 DOI: 10.1186/s13028-016-0188-5.
- Larsen, A. K., I. H. Nymo, P. Boysen, M. Tryland and J. Godfroid (2013). "Entry and elimination of marine mammal *Brucella* spp. by hooded seal (*Cystophora cristata*) alveolar macrophages in vitro." *PLoS One* 8(7): e70186 DOI: 10.1371/journal.pone.0070186.
- Le Fleche, P., I. Jacques, M. Grayon, S. Al Dahouk, P. Bouchon, F. Denoeud, K. Nockler, H. Neubauer, L. A. Guilloteau and G. Vergnaud (2006). "Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay." *BMC Microbiol* 6: 9 DOI: 10.1186/1471-2180-6-9.
- Leal-Klevezas, D. S., A. Lopez-Merino and J. P. Martinez-Soriano (1995). "Molecular detection of *Brucella* spp.: rapid identification of *B. abortus* biovar I using PCR." *Arch Med Res* 26(3): 263-267.

REFERENCES

- Leal-Klevezas, D. S., I. O. Martinez-Vazquez, J. Garcia-Cantu, A. Lopez-Merino and J. P. Martinez-Soriano (2000). "Use of polymerase chain reaction to detect *Brucella abortus* biovar 1 in infected goats." *Vet Microbiol* 75(1): 91-97.
- Leal-Klevezas, D. S., I. O. Martinez-Vazquez, A. Lopez-Merino and J. P. Martinez-Soriano (1995). "Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals." *J Clin Microbiol* 33(12): 3087-3090.
- Leyla, G., G. Kadri and O. Umran (2003). "Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples." *Vet Microbiol* 93(1): 53-61.
- Lindahl-Rajala, E., T. Hoffman, D. Fretin, J. Godfroid, N. Sattarov, S. Boqvist, A. Lundkvist and U. Magnusson (2017). "Detection and characterization of *Brucella* spp. in bovine milk in small-scale urban and peri-urban farming in Tajikistan." *PLoS Negl Trop Dis* 11(3): e0005367 DOI: 10.1371/journal.pntd.0005367.
- Longo, M., K. Mallardo, S. Montagnaro, L. De Martino, S. Gallo, G. Fusco, G. Galiero, A. Guarino, U. Pagnini and G. Iovane (2009). "Shedding of *Brucella abortus* rough mutant strain RB51 in milk of water buffalo (*Bubalus bubalis*)." *Prev Vet Med* 90(1-2): 113-118 DOI: 10.1016/j.prevetmed.2009.03.007.
- Lopez-Goni, I., D. Garcia-Yoldi, C. M. Marin, M. J. de Miguel, E. Barquero-Calvo, C. Guzman-Verri, D. Albert and B. Garin-Bastuji (2011). "New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*." *Vet Microbiol* 154(1-2): 152-155 DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.06.035.
- Lopez-Goni, I., D. Garcia-Yoldi, C. M. Marin, M. J. de Miguel, P. M. Munoz, J. M. Blasco, I. Jacques, M. Grayon, A. Cloeckaert, A. C. Ferreira, R. Cardoso, M. I. Correa de Sa, K. Walravens, D. Albert and B. Garin-Bastuji (2008). "Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains." *J Clin Microbiol* 46(10): 3484-3487 DOI: 10.1128/JCM.00837-08.
- Macedo, A. A., E. A. Costa, A. P. Silva, T. A. Paixao and R. L. Santos (2013). "Monocyte-derived macrophages from Zebu (*Bos taurus indicus*) are more efficient to control *Brucella abortus* intracellular survival than macrophages from European cattle (*Bos taurus taurus*)." *Vet Immunol Immunopathol* 151(3-4): 294-302 DOI: 10.1016/j.vetimm.2012.12.001.
- Macedo, A. A., A. P. Silva, J. P. Mol, L. F. Costa, L. N. Garcia, M. S. Araujo, O. A. Martins Filho, T. A. Paixao and R. L. Santos (2015). "The abcEDCBA-Encoded ABC Transporter and the virB Operon-Encoded Type IV Secretion System of *Brucella ovis* Are Critical for Intracellular Trafficking and Survival in Ovine Monocyte-Derived Macrophages." *PLoS One* 10(9): e0138131 DOI: 10.1371/journal.pone.0138131.
- Macedo, G. C., D. M. Magnani, N. B. Carvalho, O. Bruna-Romero, R. T. Gazzinelli and S. C. Oliveira (2008). "Central Role of MyD88-Dependent Dendritic Cell Maturation and Proinflammatory Cytokine Production to Control *Brucella abortus* Infection." *The Journal of Immunology* 180(2): 1080-1087 DOI: 10.4049/jimmunol.180.2.1080.
- Majidzadeh, K., A. Mohseni and M. Soleimani (2014). "Construction and Evaluation of a Novel Internal Positive Control (IPC) for Detection of *Coxiella burnetii* by PCR." *Jundishapur J Microbiol* 7(1): e8849 DOI: 10.5812/jjm.8849.
- Mancilla, M., M. Ulloa, I. Lopez-Goni, I. Moriyon and A. Maria Zarraga (2011). "Identification of new IS711 insertion sites in *Brucella abortus* field isolates." *BMC Microbiol* 11: 176 DOI: 10.1186/1471-2180-11-176.
- Manterola, L., A. Tejero-Garces, A. Ficapal, G. Shopayeva, J. M. Blasco, C. M. Marin and I. Lopez-Goni (2003). "Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams." *Vet Microbiol* 92(1-2): 65-72.

REFERENCES

- Manthei, C. A. and R. W. Carter (1950). "Persistence of *Brucella Abortus* infection in cattle." *Am J Vet Res* 11(39): 173-180.
- Marianelli, C., A. Martucciello, M. Tarantino, R. Vecchio, G. Iovane and G. Galiero (2008). "Evaluation of molecular methods for the detection of *Brucella* species in water buffalo milk." *J Dairy Sci* 91(10): 3779-3786 DOI: 10.3168/jds.2008-1233.
- Martin-Martin, A. I., N. Vizcaino and L. Fernandez-Lago (2010). "Cholesterol, ganglioside GM1 and class A scavenger receptor contribute to infection by *Brucella ovis* and *Brucella canis* in murine macrophages." *Microbes Infect* 12(3): 246-251 DOI: 10.1016/j.micinf.2009.12.008.
- Mayer-Scholl, A., A. Draeger, C. Gollner, H. C. Scholz and K. Nockler (2010). "Advancement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described *Brucella* species." *J Microbiol Methods* 80(1): 112-114 DOI: 10.1016/j.mimet.2009.10.015.
- McDonald, W. L., R. Jamaludin, G. Mackereth, M. Hansen, S. Humphrey, P. Short, T. Taylor, J. Swingle, C. E. Dawson, A. M. Whatmore, E. Stubberfield, L. L. Perrett and G. Simmons (2006). "Characterization of a *Brucella* sp. strain as a marine-mammal type despite isolation from a patient with spinal osteomyelitis in New Zealand." *J Clin Microbiol* 44(12): 4363-4370 DOI: 10.1128/jcm.00680-06.
- Meador, V. P. and B. L. Deyoe (1986). "Experimentally induced *Brucella abortus* infection in pregnant goats." *Am J Vet Res* 47(11): 2337-2342.
- Meador, V. P., B. L. Deyoe and N. F. Cheville (1989). "Pathogenesis of *Brucella abortus* infection of the mammary gland and supramammary lymph node of the goat." *Vet Pathol* 26(5): 357-368 DOI: 10.1177/030098588902600501.
- Megid, J., L. A. Mathias and C. A. Robles (2010). "Clinical Manifestations of Brucellosis in Domestic Animals and Humans." *The Open Veterinary Science Journal* 4: 119-126.
- Mellado, M., A. M. Garcia, B. Arellano-Reynoso, E. Diaz-Aparicio and J. E. Garcia (2014). "Milk yield and reproductive performance of brucellosis-vaccinated but seropositive Holstein cows." *Trop Anim Health Prod* 46(2): 391-397 DOI: 10.1007/s11250-013-0502-4.
- Memish, Z. A. and H. H. Balkhy (2004). "Brucellosis and International Travel." *Journal of Travel Medicine* 11(1): 49-55.
- Meyer, F. and E. B. Shaw (1920). "A Comparison of the Morphologic, Cultural and Biochemical Characteristics of *B. Abortus* and *B. Melitensis*: Studies on the Genus *Brucella* Nov. Gen. I." *J Infect Dis* 27(3): 173-184 DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/27.3.173>.
- Miranda, K. L., F. P. Poester, E. M. Dorneles, T. M. Resende, A. K. Vaz, S. M. Ferraz and A. P. Lage (2016). "*Brucella abortus* RB51 in milk of vaccinated adult cattle." *Acta Trop* 160: 58-61 DOI: 10.1016/j.actatropica.2016.04.012.
- Moreno, E., A. Cloeckert and I. Moriyon (2002). "*Brucella* evolution and taxonomy." *Vet Microbiol* 90(1-4): 209-227.
- Moreno, E. and J. P. Gorvel (2004). Invasion, intracellular trafficking and replication of *Brucella* organisms in professional and nonprofessional phagocytes. *Brucella: Molecular and cellular biology*. L.-G. I. Moriyon I, Horizon Bioscience, Norwich, UK: 287-312.
- Morgan, W. T. and A. McDiamid (1960). "The excretion of *Brucella abortus* in the milk of experimentally infected cattle." *Res Vet Sci* 1: 53-56.
- Murdough, P. A., K. E. Deitz and J. W. Pankey (1996). "Effects of freezing on the viability of nine pathogens from quarters with subclinical mastitis." *J Dairy Sci* 79(2): 334-336 DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(96)76368-3.
- Newby, D. T., T. L. Hadfield and F. F. Roberto (2003). "Real-time PCR detection of *Brucella abortus*: a comparative study of SYBR green I, 5'-exonuclease, and hybridization probe assays." *Appl Environ Microbiol* 69(8): 4753-4759.

REFERENCES

- Nicoletti, P. (1980). "The epidemiology of bovine brucellosis." *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine* 24: 69-98.
- Ning, P., K. Guo, L. Xu, R. Xu, C. Zhang, Y. Cheng, H. Cui, W. Liu, Q. Lv, W. Cao and Y. Zhang (2012). "Short communication: evaluation of *Brucella* infection of cows by PCR detection of *Brucella* DNA in raw milk." *J Dairy Sci* 95(9): 4863-4867 DOI: 10.3168/jds.2012-5600.
- O'Callaghan, D. and A. M. Whatmore (2011). "Brucella genomics as we enter the multi-genome era." *Brief Funct Genomics* 10(6): 334-341 DOI: 10.1093/bfgp/elr026.
- O'Leary, S., M. Sheahan and T. Sweeney (2006). "Brucella abortus detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows." *Res Vet Sci* 81(2): 170-176 DOI: 10.1016/j.rvsc.2005.12.001.
- Ocampo-Sosa, A. A. and J. M. Garcia-Lobo (2008). "Demonstration of IS711 transposition in *Brucella ovis* and *Brucella pinnipedialis*." *BMC Microbiol* 8: 17 DOI: 10.1186/1471-2180-8-17.
- Ohtsuki, R., K. Kawamoto, Y. Kato, M. M. Shah, T. Ezaki and S. I. Makino (2008). "Rapid detection of *Brucella* spp. by the loop-mediated isothermal amplification method." *J Appl Microbiol* 104(6): 1815-1823 DOI: 10.1111/j.1365-2672.2008.03732.x.
- OIE. (2016). "Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*)(Infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*)." *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, from http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.01.04_BRUCELLOSIS.pdf.
- Olson, N. D., S. P. Lund, R. E. Colman, J. T. Foster, J. W. Sahl, J. M. Schupp, P. Keim, J. B. Morrow, M. L. Salit and J. M. Zook (2015). "Best practices for evaluating single nucleotide variant calling methods for microbial genomics." *Front Genet* 6: 235 DOI: 10.3389/fgene.2015.00235.
- Oswald, N. "Ethanol Precipitation of DNA and RNA: How it works." from <http://bitesizebio.com/253/the-basics-how-ethanol-precipitation-of-dna-and-rna-works/>.
- Ouahrani-Bettache, S., M. P. Soubrier and J. P. Liautard (1996). "IS6501-anchored PCR for the detection and identification of *Brucella* species and strains." *J Appl Bacteriol* 81(2): 154-160.
- Ouahrani, S., S. Michaux, J. Sri Widada, G. Bourg, R. Tournebize, M. Ramuz and J. P. Liautard (1993). "Identification and sequence analysis of IS6501, an insertion sequence in *Brucella* spp.: relationship between genomic structure and the number of IS6501 copies." *Journal of General Microbiology* 139: 3265-3273.
- Pacheco, W. A., M. E. Genovez, C. R. Pozzi, L. M. P. Silva, S. S. Azevedo, C. C. Did, R. M. Piatti, E. S. Pinheiro, V. Castro, S. Miyashiro and M. L. Gambarini (2012). "Excretion of *Brucella abortus* vaccine B19 strain during e reproductive cycle in dairy cows." *Braz J Microbiol*: 594-601.
- Pappas, G., P. Papadimitriou, N. Akritidis, L. Christou and E. V. Tsianos (2006). "The new global map of human brucellosis." *The Lancet Infectious Diseases* 6(2): 91-99 DOI: 10.1016/s1473-3099(06)70382-6.
- Pat, K. B. and B. Panigrahi (1965). "Comparative study of Abortus Bang Ringprobe test and serum agglutination test in cows and buffaloes: a preliminary report." *Indian Vet J* 42(10): 748-750.
- Paulsen, I. T., R. Seshadri, K. E. Nelson, J. A. Eisen, J. F. Heidelberg, T. D. Read, R. J. Dodson, L. Umayam, L. M. Brinkac, M. J. Beanan, S. C. Daugherty, R. T. Deboy, A. S. Durkin, J. F. Kolonay, R. Madupu, W. C. Nelson, B. Ayodeji, K. Margaret, J. Shetty, J. Malek, S. Van Aken, S. Riedmuller, H. Tettelin, S. R. Gill, O. White, S. L. Salzberg, D. L. Hoover, L. E.

REFERENCES

- Lindler, S. Halling, S. M. Boyle and C. M. Fraser (2002). "The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts." PNAS 99(20).
- Perdrix, J. and C. Chirol (1973). "La détection des vaches excrétrices de "Brucella" dans le lait." Bulletin de la Societe des Sciences Veterinaires de Lyon 75(3): 161-162.
- Perdrix, J. and C. Chirol (1975). "Les vaches excrétrices de « Brucella » dans le lait." Bulletin de la Societe des Sciences Veterinaires de Lyon 77(6): 371-376.
- Perry, M. B. and D. R. Bundle (1990). "Lipopolysaccharide antigens and carbohydrates of Brucella." Advances in Brucellosis Research, Texas A and M University Press: 76-88.
- Pesce Viglietti, A. I., P. C. Arriola Benitez, M. V. Gentilini, L. N. Velasquez, C. A. Fossati, G. H. Giambartolomei and M. V. Delpino (2016). "Brucella abortus Invasion of Osteocytes Modulates Connexin 43 and Integrin Expression and Induces Osteoclastogenesis via Receptor Activator of NF-kappaB Ligand and Tumor Necrosis Factor Alpha Secretion." Infect Immun 84(1): 11-20 DOI: 10.1128/IAI.01049-15.
- Philippon, A., G. Renoux, M. Plommet, N. Bosseray, J. Marly and R. Borde (1970). "BRUCELLOSE BOVINE EXPERIMENTALE. III Ecrétion vaginale de *Brucella abortus* avant et après la mise bas." Annales de Recherches Vétérinaires, INRA Editions 1(2): 215-224.
- Philippon, A., G. Renouy, M. Plommet and N. Bosseray (1971). "BRUCELLOSE BOVINE EXPÉRIMENTALE. V. - EXCRÉTION DE " BRUCELLA ABORTUS " PAR LE COLOSTRUM ET LE LAIT." Annales de Recherches Vétérinaires, INRA Editions 2(1): 59-67.
- Pionzio, A. M. and B. R. McCord (2014). "The effect of internal control sequence and length on the response to PCR inhibition in real-time PCR quantitation." Forensic Sci Int Genet 9: 55-60 DOI: 10.1016/j.fsigen.2013.10.010.
- Pisarenko, S. V., D. A. Kovalev, A. S. Volynkina, D. G. Ponomarenko, D. V. Rusanova, N. V. Zharinova, A. A. Khachaturova, L. E. Tokareva, I. G. Khvoynova and A. N. Kulichenko (2018). "Global evolution and phylogeography of Brucella melitensis strains." BMC Genomics 19: 353 DOI: 10.1186/s12864-018-4762-2.
- Plommet, M., G. Renoux, A. Philippon, J. Gestin and R. Fensterbank (1971). "[Congenital transmission of bovine brucellosis from one generation to another]." Bull Acad Vet Fr 44(1): 53-59.
- Poester, F. P., L. Samartino and R. L. Santos (2013). "Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock." Rev sci tech Off int Epiz 32(1): 105-115.
- Ponsart, C. and M. Maurin (2018). Brucella. 3ème édition du Précis de Bactériologie clinique. E. ESKA. 80: 1244-1254.
- Porte, F., A. Naroeni, S. Ouahrani-Bettache and J. P. Liautard (2003). "Role of the Brucella suis Lipopolysaccharide O Antigen in Phagosomal Genesis and in Inhibition of Phagosome-Lysosome Fusion in Murine Macrophages." Infect Immun 71(3): 1481-1490 DOI: 10.1128/iai.71.3.1481-1490.2003.
- Powell, H. A., C. M. Gooding, S. D. Garrett, B. M. Lund and R. A. McKee (1994). "Proteinase inhibition of the detection of Listeria monocytogenes in milk using the polymerase chain reaction." Letters in Applied Microbiology 18(1): 59-61 DOI: 10.1111/j.1472-765X.1994.tb00802.x.
- Price, R. E., J. W. Templeton and L. G. Adams (1990). "Survival of smooth, rough and transposon mutant strains of *Brucella abortus* in bovine mammary macrophages." Vet Immunol Immunopathol 26: 353-365.

REFERENCES

- Probert, W. S., K. N. Schrader, N. Y. Khuong, S. L. Bystrom and M. H. Graves (2004). "Real-Time Multiplex PCR Assay for Detection of *Brucella* spp., *B. abortus* and *B. melitensis*." *J Clin Microbiol* 42(3): 1290-1293 DOI: 10.1128/JCM.42.3.1290-1293.2004.
- Quigley, L., O. O'Sullivan, T. P. Beresford, R. Paul Ross, G. F. Fitzgerald and P. D. Cotter (2012). "A comparison of methods used to extract bacterial DNA from raw milk and raw milk cheese." *J Appl Microbiol* 113(1): 96-105 DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05294.x.
- Rankin, J. E. (1965). "BRUCELLA ABORTUS IN BULLS: A STUDY OF TWELVE NATURALLY-INFECTED CASES." *Vet Rec* 77: 132-135.
- Ratushna, V. G., D. M. Sturgill, S. Ramamoorthy, S. A. Reichow, Y. He, R. Lathigra, N. Sriranganathan, S. M. Halling, S. M. Boyle and C. J. Gibas (2006). "Molecular targets for rapid identification of *Brucella* spp." *BMC Microbiol* 6: 13 DOI: 10.1186/1471-2180-6-13.
- Ray, W. C., R. R. Brown, D. A. Stringfellow, P. R. Schnurrenberger, C. M. Scanlan and A. I. Swann (1988). "Bovine brucellosis: an investigation of latency in progeny of culture-positive cows." *J Am Vet Med Assoc* 192(2): 182-186.
- Redkar, R., S. Rose, B. Bricker and V. DelVecchio (2001). "Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*." *Mol Cell Probes* 15(1): 43-52 DOI: 10.1006/mcpr.2000.0338.
- Renoux, G. (1961). "RUCELLOSE CAPRINE. I. - BACTÉRIOLOGIE ET SÉROLOGIE D'UN TROUPEAU DE CHÈVRES OBSERVÉ PENDANT DEUX ANS ET DEMI." *Annales de zootechnie, INRA/EDP Sciences* 10(4): 233-277.
- Rijpens, N. P., G. Jannes, M. Van Asbroeck, R. Rossau and L. M. Herman (1996). "Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes." *Appl Environ Microbiol* 62(5): 1683-1688.
- Rodríguez-Lázaro, D., L. López-Enríquez, A. A. Ocampo-Sosa, P. Muñoz, J. M. Blasco, C. Marín and M. Hernández (2017). "Evaluation of *eryC* as a Molecular Marker for the Quantitative Detection of *Brucella* Spp. by Real-Time PCR in Food Samples." *Food Analytical Methods* 10(5): 1148-1155 DOI: 10.1007/s12161-017-0822-5.
- Roguinsky, M., R. Fensterbank, A. Philippon, J. M. Verger, N. Bosseray, M. Ducelliez and R. Borde (1972). "INFLUENCE DE L'INFECTION BRUCELLIQUE DE LA MAMELLE SUR LA TENUEUR EN CELLULES DU LAIT." *Annales de Recherches Vétérinaires* 3(3): 449-457.
- Rolfe, D. C. and W. E. Sykes (1987). "Monitoring of dairy herds for *Brucella abortus* infection when prevalence is low." *Aust Vet J* 64(4): 97-100.
- Romero, C., C. Gamazo, M. Pardo and I. López-Goñi (1995). "Specific detection of *Brucella* DNA by PCR." *J Clin Microbiol* 33(3): 615-617, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC227999/>.
- Romero, C. and I. Lopez-Goñi (1999). "Improved Method for Purification of Bacterial DNA from Bovine Milk for Detection of *Brucella* spp. by PCR." *Applied and Environmental Microbiology* 65(8): 3735-3737, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91561/>.
- Romero, C., M. Pardo, M. J. Grillo, R. Diaz, J. M. Blasco and I. Lopez-Goni (1995). "Evaluation of PCR and indirect enzyme-linked immunosorbent assay on milk samples for diagnosis of brucellosis in dairy cattle." *J Clin Microbiol* 33(12): 3198-3200.
- Rossetti, C. A., C. L. Galindo, R. E. Everts, H. A. Lewin, H. R. Garner and L. G. Adams (2011). "Comparative analysis of the early transcriptome of *Brucella abortus*--infected monocyte-derived macrophages from cattle naturally resistant or susceptible to brucellosis." *Res Vet Sci* 91(1): 40-51 DOI: 10.1016/j.rvsc.2010.09.002.
- Rossetti, C. A., C. L. Galindo, H. R. Garner and L. G. Adams (2011). "Transcriptional profile of the intracellular pathogen *Brucella melitensis* following HeLa cells infection." *Microb Pathog* 51(5): 338-344 DOI: 10.1016/j.micpath.2011.07.006.

REFERENCES

- Rossetti, C. A., C. L. Galindo, S. D. Lawhon, H. R. Garner and L. G. Adams (2009). "Brucella melitensis global gene expression study provides novel information on growth phase-specific gene regulation with potential insights for understanding Brucella: host initial interactions." *BMC Microbiol* 9: 81 DOI: 10.1186/1471-2180-9-81.
- Roux, C. M., H. G. Rolan, R. L. Santos, P. D. Beremand, T. L. Thomas, L. G. Adams and R. M. Tsolis (2007). "Brucella requires a functional Type IV secretion system to elicit innate immune responses in mice." *Cell Microbiol* 9(7): 1851-1869 DOI: 10.1111/j.1462-5822.2007.00922.x.
- Ryall, B., G. Eydallin and T. Ferenci (2012). "Culture history and population heterogeneity as determinants of bacterial adaptation: the adaptomics of a single environmental transition." *Microbiol Mol Biol Rev* 76(3): 597-625 DOI: 10.1128/MMBR.05028-11.
- Salcedo, S. P., N. Chevrier, T. L. Lacerda, A. Ben Amara, S. Gerart, V. A. Gorvel, C. de Chastellier, J. M. Blasco, J. L. Mege and J. P. Gorvel (2013). "Pathogenic brucellae replicate in human trophoblasts." *J Infect Dis* 207(7): 1075-1083 DOI: 10.1093/infdis/jit007.
- Salcedo, S. P., M. I. Marchesini, H. Lelouard, E. Fugier, G. Jolly, S. Balor, A. Muller, N. Lapaque, O. Demaria, L. Alexopoulou, D. J. Commerci, R. A. Ugalde, P. Pierre and J. P. Gorvel (2008). "Brucella control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1." *PLoS Pathog* 4(2): e21 DOI: 10.1371/journal.ppat.0040021.
- Samartino, L. E. and F. M. Enright (1996). "Brucella abortus differs in the multiplication within bovine chorioallantoic membrane explants from early and late gestation." *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 19(1): 55-63 DOI: [https://doi.org/10.1016/0147-9571\(95\)00018-6](https://doi.org/10.1016/0147-9571(95)00018-6).
- Sanchez, A., C. FernÁNdez, A. Contreras, C. Luengo and J. Rubert (2002). "Effect of intramammary infection by Staphylococcus caprae on somatic cell counts and milk composition in goats." *Journal of Dairy Research* 69(2): 325-328 DOI: 10.1017/S0022029902005496.
- Sangari, F. J., J. M. Garcia-Lobo and J. Aguero (1994). "The Brucella abortus vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes." *FEMS Microbiol Lett* 121(3): 337-342.
- Sangari, F. J., A. Seoane, M. C. Rodriguez, J. Aguero and J. M. Garcia Lobo (2007). "Characterization of the urease operon of Brucella abortus and assessment of its role in virulence of the bacterium." *Infect Immun* 75(2): 774-780 DOI: 10.1128/IAI.01244-06.
- Sankarasubramanian, J., U. S. Vishnu, P. Gunasekaran and J. Rajendhran (2017). "Identification of genetic variants of Brucella spp. through genome-wide association studies." *Infect Genet Evol* 56: 92-98 DOI: 10.1016/j.meegid.2017.11.016.
- Schmidt, J. (1901). Familie Bacteriaceae. Bakterierne: naturhistorisk Grundlag for det bakteriologiske Studium. W. F. K. M. P. Schmidt J: 248-296.
- Schoenaers, F. (1976). "Eléments du diagnostic de la brucellose bovine." *Annales de Médecine Vétérinaire* 120: 5-8.
- Scholz, H. C., M. Banai, A. Cloeckert, P. Kämpfer and A. M. Whatmore (2018). Brucella. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*: 1-38.
- Scholz, H. C., Z. Hubalek, I. Sedlacek, G. Vergnaud, H. Tomaso, S. Al Dahouk, F. Melzer, P. Kämpfer, H. Neubauer, A. Cloeckert, M. Maquart, M. S. Zygmunt, A. M. Whatmore, E. Falsen, P. Bahn, C. Gollner, M. Pfeffer, B. Huber, H. J. Busse and K. Nockler (2008). "Brucella microti sp. nov., isolated from the common vole Microtus arvalis." *Int J Syst Evol Microbiol* 58(Pt 2): 375-382 DOI: 10.1099/ijs.0.65356-0.
- Scholz, H. C., K. Nockler, C. Gollner, P. Bahn, G. Vergnaud, H. Tomaso, S. Al Dahouk, P. Kämpfer, A. Cloeckert, M. Maquart, M. S. Zygmunt, A. M. Whatmore, M. Pfeffer, B. Huber,

REFERENCES

- H. J. Busse and B. K. De (2010). "Brucella inopinata sp. nov., isolated from a breast implant infection." *Int J Syst Evol Microbiol* 60(Pt 4): 801-808 DOI: 10.1099/ijss.0.011148-0.
- Scholz, H. C., M. Pfeffer, A. Witte, H. Neubauer, S. Al Dahouk, U. Wernery and H. Tomaso (2008). "Specific detection and differentiation of *Ochrobactrum anthropi*, *Ochrobactrum intermedium* and *Brucella* spp. by a multi-primer PCR that targets the *recA* gene." *J Med Microbiol* 57(Pt 1): 64-71 DOI: 10.1099/jmm.0.47507-0.
- Scholz, H. C., S. Revilla-Fernandez, S. Al Dahouk, J. A. Hammerl, M. S. Zygmunt, A. Cloeckert, M. Koylass, A. M. Whatmore, J. Blom, G. Vergnaud, A. Witte, K. Aistleitner and E. Hofer (2016). "Brucella vulpis sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*)." *Int J Syst Evol Microbiol* 66(5): 2090-2098 DOI: 10.1099/ijsem.0.000998.
- Scholz, H. C. and G. Vergnaud (2013). "Molecular characterization of *Brucella* species." *Rev sci tech Off int Epiz* 31(1): 149-162.
- Schrader, C., A. Schielke, L. Ellerbroek and R. Johne (2012). "PCR inhibitors - occurrence, properties and removal." *J Appl Microbiol* 113(5): 1014-1026 DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x.
- Schukken, Y. H., F. J. Grommers, D. van de Geer and A. Brand (1989). "Incidence of clinical mastitis on farms with low somatic cell counts in bulk milk." *Vet Rec* 125(3): 60-63.
- Scian, R., P. Barrionuevo, C. A. Fossati, G. H. Giambartolomei and M. V. Delpino (2012). "Brucella abortus invasion of osteoblasts inhibits bone formation." *Infect Immun* 80(7): 2333-2345 DOI: 10.1128/IAI.00208-12.
- Seemann, T. (2014). "Prokka: rapid prokaryotic genome annotation." *Bioinformatics* 30(14): 2068-2069 DOI: 10.1093/bioinformatics/btu153.
- Seleem, M. N., S. M. Boyle and N. Sriranganathan (2008). "Brucella: a pathogen without classic virulence genes." *Vet Microbiol* 129(1-2): 1-14 DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.11.023.
- Serpe, L., P. Gallo, N. Fidanza, A. Scaramuzza and D. Fenizia (1999). "Single-step method for rapid detection of *Brucella* spp. in soft cheese by gene-specific polymerase chain reaction." *J Dairy Res* 66(2): 313-317.
- Shakerian, A., P. Deo, E. Rahimi, A. Shahjavan and F. Khamesipour (2016). "Molecular detection of *Brucella melitensis* in sheep and goat milk in Iran." *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 15(5) DOI: 10.4314/tjpr.v15i5.3.
- Shimi, A. and A. H. Tabatabayi (1981). "Pathological, bacteriological and serological responses of ewes experimentally infected with *Brucella melitensis*." *Bulletin de l'Office International des Epizooties* 93: 1411-1422.
- Sidor, I. F., J. L. Dunn, G. J. Tsongalis, J. Carlson and S. Frasca, Jr. (2013). "A multiplex real-time polymerase chain reaction assay with two internal controls for the detection of *Brucella* species in tissues, blood, and feces from marine mammals." *J Vet Diagn Invest* 25(1): 72-81 DOI: 10.1177/1040638712470945.
- Skendros, P. and P. Boura (2013). "Immunity to brucellosis." *Rev Sci Tech* 32(1): 137-147.
- Sohn, A. H., W. S. Probert, C. A. Glaser, N. Gupta, A. W. Bollen, J. D. Wong, E. M. Grace and W. C. McDonald (2003). "Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp." *Emerg Infect Dis* 9(4): 485-488 DOI: 10.3201/eid0904.020576.
- Sreevatsan, S., J. B. Bookout, F. Ringpis, V. S. Perumaalla, T. A. Ficht, L. G. Adams, S. D. Hagius, P. H. Elzer, B. J. Bricker, G. K. Kumar, M. Rajasekhar, S. Isloor and R. R. Barathur (2000). "A multiplex approach to molecular detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* infection in cattle." *J Clin Microbiol* 38(7): 2602-2610.

REFERENCES

- Stack, J. A., M. Harrison and L. L. Perrett (2002). "Evaluation of a selective medium for *Brucella* isolation using natamycin." *J Appl Microbiol* 92(4): 724-728 DOI: 10.1046/j.1365-2672.2002.01595.x.
- Stoenner, H. G. and D. B. Lackman (1957). "A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotoma lepida* Thomas." *American Journal of Veterinary Research* 18(69): 947-957.
- Suárez-Esquivel, M., K. S. Baker, N. Ruiz-Villalobos, G. Hernandez-Mora, E. Barquero-Calvo, R. Gonzalez-Barrientos, A. Castillo-Zeledon, C. Jiménez-Rojas, C. Chacon-Diaz, A. Cloeckaert, E. Chaves-Olarte, N. R. Thomson, E. Moreno and C. Guzman-Verri (2017). "*Brucella* Genetic Variability in Wildlife Marine Mammals Populations Relates to Host Preference and Ocean Distribution." *Genome Biology and Evolution* 9(7): 1901-1912 DOI: 10.1093/gbe/evx137.
- Szulowski, K., W. Iwaniak, M. Weiner and J. Zlotnicka (2013). "Characteristics of *Brucella* strains isolated from animals in Poland." *Pol J Vet Sci* 16(4): 757-758.
- Taleski, V., L. Zerva, T. Kantardjiev, Z. Cvetnic, M. Erski-Biljic, B. Nikolovski, J. Bosnjakovski, V. Katalinic-Jankovic, A. Panteliadou, S. Stojkoski and T. Kirandziski (2002). "An overview of the epidemiology and epizootology of brucellosis in selected countries of Central and Southeast Europe." *Vet Microbiol* 90(1-4): 147-155.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar (2013). "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0." *Mol Biol Evol* 30(12): 2725-2729 DOI: 10.1093/molbev/mst197.
- Tan, K. K., Y. C. Tan, L. Y. Chang, K. W. Lee, S. S. Nore, W. Y. Yee, M. N. Mat Isa, F. L. Jafar, C. C. Hoh and S. AbuBakar (2015). "Full genome SNP-based phylogenetic analysis reveals the origin and global spread of *Brucella melitensis*." *BMC Genomics* 16: 93 DOI: 10.1186/s12864-015-1294-x.
- Teske, S. S., Y. Huang, S. B. Tamrakar, T. A. Bartrand, M. H. Weir and C. N. Haas (2011). "Animal and human dose-response models for *Brucella* species." *Risk Anal* 31(10): 1576-1596 DOI: 10.1111/j.1539-6924.2011.01602.x.
- Tiller, R. V., J. E. Gee, M. A. Frace, T. K. Taylor, J. C. Setubal, A. R. Hoffmaster and B. K. De (2010). "Characterization of Novel *Brucella* Strains Originating from Wild Native Rodent Species in North Queensland, Australia." *Applied and Environmental Microbiology* 76(17): 5837-5845 DOI: 10.1128/AEM.00620-10.
- Tittarelli, M., M. Di Ventura, F. De Massis, M. Scacchia, A. Giovannini, D. Nannini and V. Caporale (2005). "The persistence of *Brucella melitensis* in experimentally infected ewes through three reproductive cycles." *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52(9): 403-409 DOI: 10.1111/j.1439-0450.2005.00885.x.
- Traum, J. (1914). "Report of the Chief of the Bureau of Animal Industry. Washington: United States Department of Agriculture (USDA)."
- Traxler, R. M., M. W. Lehman, E. A. Bosserman, M. A. Guerra and T. L. Smith (2013). "A literature review of laboratory-acquired brucellosis." *J Clin Microbiol* 51(9): 3055-3062 DOI: 10.1128/JCM.00135-13.
- Tsolis, R. M., R. Seshadri, R. L. Santos, F. J. Sangari, J. M. Lobo, M. F. de Jong, Q. Ren, G. Myers, L. M. Brinkac, W. C. Nelson, R. T. Deboy, S. Angiuoli, H. Khouri, G. Dimitrov, J. R. Robinson, S. Mulligan, R. L. Walker, P. E. Elzer, K. A. Hassan and I. T. Paulsen (2009). "Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism." *PLoS One* 4(5): e5519 DOI: 10.1371/journal.pone.0005519.
- Tuon, F. F., R. B. Gondolfo and N. Cerchiari (2017). "Human-to-human transmission of *Brucella* - a systematic review." *Trop Med Int Health* 22(5): 539-546 DOI: 10.1111/tmi.12856.

REFERENCES

- Unno, H., M. Inada, A. Nakamura, M. Hashimoto, K. Ito, K. Hashimoto, M. Nikaido, T. Hayashi, E. Hata, K. Katsuda, Y. Kiku, Y. Tagawa and K. Kawai (2015). "Improved rapid and efficient method for *Staphylococcus aureus* DNA extraction from milk for identification of mastitis pathogens." *J Vet Med Sci* 77(8): 1007-1009 DOI: 10.1292/jvms.14-0159.
- Untergasser, A., I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B. C. Faircloth, M. Remm and S. G. Rozen (2012). "Primer3--new capabilities and interfaces." *Nucleic Acids Res* 40(15): e115 DOI: 10.1093/nar/gks596.
- Uzal, F. A., L. Samartino, G. Schurig, A. Carraso, K. Nielsen, R. F. Cabrera and H. R. Taddeo (2000). "Effect of Vaccination with *Brucella abortus* Strain RB51 on Heifers and Pregnant Cattle." *Vet Res Communications* 24: 143-151.
- van Belkum, A., S. Scherer, L. van Alphen and H. Verbrugh (1998). "Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes." *Microbiol Mol Biol Rev* 62(2): 275-293.
- Vanzini, V. R., N. P. Aguirre, B. S. Valentini, S. Torioni de Echaide, C. I. Lugaresi, M. D. Marchesino and K. Nielsen (2001). "Comparison of an indirect ELISA with the *Brucella* milk ring test for detection of antibodies to *Brucella abortus* in bulk milk samples." *Vet Microbiol* 82(1): 55-60.
- Vemulapalli, R., J. R. McQuiston, G. G. Schurig, N. Sriranganathan, S. M. Halling and S. M. Boyle (1999). "Identification of an IS711 element interrupting the *wboA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains." *Clin Diagn Lab Immunol* 6(5): 760-764.
- Verger, J. M., F. Grimont, P. A. D. Grimont and M. Grayon (1985). "*Brucella*, a monospecific genus as shown by desoxyribonucleic acid hybridization." *International Journal of Systematic Bacteriology* 35(3): 292-295 DOI: 10.1099/00207713-35-3-292.
- Vizcaino, N., J. M. Verger, M. Grayon, M. S. Zygmunt and A. Cloeckert (1997). "DNA polymorphism at the *omp-31* locus of *Brucella* spp.: evidence for a large deletion in *Brucella abortus*, and other species-specific markers." *Microbiology* 143 (Pt 9): 2913-2921 DOI: 10.1099/00221287-143-9-2913.
- von Bargen, K., J. P. Gorvel and S. P. Salcedo (2012). "Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle." *FEMS Microbiol Rev* 36(3): 533-562 DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00334.x.
- Voutsinas, L. P., M. C. Katsiari, C. P. Pappas and H. Mallatou (1995). "Production of brined soft cheese from frozen ultrafiltered sheep's milk. Part 2 compositional, physicochemical, microbiological and organoleptic properties of cheese." *Food Chemistry* 52(3): 235-247 DOI: [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)92818-5](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)92818-5).
- Wang, M., N. Qureshi, N. Soeurt and G. Splitter (2001). "High levels of nitric oxide production decrease early but increase late survival of *Brucella abortus* in macrophages." *Microb Pathog* 31(5): 221-230 DOI: 10.1006/mpat.2001.0463.
- Wattam, A. R., J. T. Foster, S. P. Mane, S. M. Beckstrom-Sternberg, J. M. Beckstrom-Sternberg, A. W. Dickerman, P. Keim, T. Pearson, M. Shukla, D. V. Ward, K. P. Williams, B. W. Sobral, R. M. Tsolis, A. M. Whatmore and D. O'Callaghan (2014). "Comparative phylogenomics and evolution of the *Brucellae* reveal a path to virulence." *J Bacteriol* 196(5): 920-930 DOI: 10.1128/JB.01091-13.
- Wattam, A. R., K. P. Williams, E. E. Snyder, N. F. Almeida, Jr., M. Shukla, A. W. Dickerman, O. R. Crasta, R. Kenyon, J. Lu, J. M. Shallom, H. Yoo, T. A. Ficht, R. M. Tsolis, C. Munk, R. Tapia, C. S. Han, J. C. Detter, D. Bruce, T. S. Brettin, B. W. Sobral, S. M. Boyle and J. C. Setubal (2009). "Analysis of ten *Brucella* genomes reveals evidence for horizontal gene transfer despite a preferred intracellular lifestyle." *J Bacteriol* 191(11): 3569-3579 DOI: 10.1128/JB.01767-08.

REFERENCES

- Wayne, L. G., D. J. Brenner, R. R. Colwell, P. A. D. Grimont, O. Kandler, M. I. Krichevsky, L. H. Moore, W. E. C. Moore, R. G. E. Murray, E. Stackebrandt, M. P. Starr and H. G. Truper (1987). "Report of the ad hoc committee on the reconciliation of approaches to bacterial systematics." *Int J Syst Evol Microbiol* 37: 463-464.
- Weinert, L. A., R. R. Chaudhuri, J. Wang, S. E. Peters, J. Corander, T. Jombart, A. Baig, K. J. Howell, M. Vehkala, N. Välimäki, D. Harris, T. T. B. Chieu, N. Van Vinh Chau, J. Campbell, C. Schultsz, J. Parkhill, S. D. Bentley, P. R. Langford, A. N. Rycroft, B. W. Wren, J. Farrar, S. Baker, N. T. Hoa, M. T. G. Holden, A. W. Tucker, D. J. Maskell, B. R. T. Consortium, J. T. Bossé, Y. Li, G. A. Maglennon, D. Matthews, J. Cuccui and V. Terra (2015). "Genomic signatures of human and animal disease in the zoonotic pathogen *Streptococcus suis*." *Nature Communications* 6: 6740 DOI: 10.1038/ncomms7740
<https://www.nature.com/articles/ncomms7740#supplementary-information>.
- Wendorff, W. L. (2001). "Freezing Qualities of Raw Ovine Milk for Further Processing." *Journal of Dairy Science* 84: E74-E78 DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(01)70200-7.
- Whatmore, A. M. (2009). "Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens." *Infect Genet Evol* 9(6): 1168-1184 DOI: 10.1016/j.meegid.2009.07.001.
- Whatmore, A. M., N. Davison, A. Cloeckaert, S. Al Dahouk, M. S. Zygmunt, S. D. Brew, L. L. Perrett, M. S. Koylass, G. Vergnaud, C. Quance, H. C. Scholz, E. J. Dick, Jr., G. Hubbard and N. E. Schlabritz-Loutsevitch (2014). "*Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.)." *Int J Syst Evol Microbiol* 64(Pt 12): 4120-4128 DOI: 10.1099/ijs.0.065482-0.
- Whatmore, A. M., C. Dawson, P. Groussaud, M. S. Koylass, A. King, S. J. Shankster, A. H. Sohn, W. S. Probert and W. L. McDonald (2008). "Marine Mammal *Brucella* Genotype Associated with Zoonotic Infection." *Emerging Infectious Diseases* 14(3): 517-518 DOI: 10.3201/eid1403.070829.
- Whatmore, A. M., M. S. Koylass, J. Muchowski, J. Edwards-Smallbone, K. K. Gopaul and L. L. Perrett (2016). "Extended Multilocus Sequence Analysis to Describe the Global Population Structure of the Genus *Brucella*: Phylogeography and Relationship to Biovars." *Frontiers in Microbiology* 7: 2049 DOI: 10.3389/fmicb.2016.02049.
- Whatmore, A. M., L. L. Perrett and A. P. MacMillan (2007). "Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing." *BMC Microbiology* 7(1): 34 DOI: 10.1186/1471-2180-7-34.
- Whatmore, A. M., S. J. Shankster, L. L. Perrett, T. J. Murphy, S. D. Brew, R. E. Thirlwall, S. J. Cutler and A. P. MacMillan (2006). "Identification and characterization of variable-number tandem-repeat markers for typing of *Brucella* spp." *J Clin Microbiol* 44(6): 1982-1993 DOI: 10.1128/jcm.02039-05.
- Wikipedia. "TaqMan." Retrieved 30 october 2017 from <https://fr.wikipedia.org/wiki/TaqMan>.
- Wyatt, H. V. (2013). "Lessons from the history of brucellosis." *Rev sci tech Off int Epiz* 32(1): 17-25.
- Xavier, M. N., T. A. Paixao, A. B. den Hartigh, R. M. Tsois and R. L. Santos (2010). "Pathogenesis of *Brucella* spp." *The Open Veterinary Science Journal* 4: 109-118.
- Xavier, M. N., T. A. Paixao, F. P. Poester, A. P. Lage and R. L. Santos (2009). "Pathological, immunohistochemical and bacteriological study of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*." *J Comp Pathol* 140(2-3): 149-157 DOI: 10.1016/j.jcpa.2008.10.004.
- Xavier, M. N., M. G. Winter, A. M. Spees, K. Nguyen, V. L. Atluri, T. M. Silva, A. J. Baumler, W. Muller, R. L. Santos and R. M. Tsois (2013). "CD4+ T cell-derived IL-10 promotes

REFERENCES

- Brucella abortus* persistence via modulation of macrophage function." PLoS Pathog 9(6): e1003454 DOI: 10.1371/journal.ppat.1003454.
- Yanagi, M. and K. Yamasato (1993). "Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer." FEMS Microbiol Lett 107(1): 115-120.
- Yang, X., Y. Li, J. Zang, Y. Li, P. Bie, Y. Lu and Q. Wu (2016). "Analysis of pan-genome to identify the core genes and essential genes of *Brucella* spp." Mol Genet Genomics 291(2): 905-912 DOI: 10.1007/s00438-015-1154-z.
- Zamanian, M., G. R. Hashemi Tabar, M. Rad and A. Haghparast (2015). "Evaluation of different primers for detection of *Brucella* in human and animal serum samples by using PCR method." Arch Iran Med 18(1): 44-50 DOI: 0151801/aim.0011.
- Zorraquino, V., M. Kim, N. Rai and I. Tagkopoulos (2017). "The Genetic and Transcriptional Basis of Short and Long Term Adaptation across Multiple Stresses in *Escherichia coli*." Mol Biol Evol 34(3): 707-717 DOI: 10.1093/molbev/msw269.
- Zowghi, E., A. Ebadi and B. Mohseni (1990). "Isolation of *Brucella* organisms from the milk of seronegative cows." Rev Sci Tech 9(4): 1175-1178.
- Zundel, E., J. M. Verger, M. Grayon and R. Michel (1992). "Conjunctival vaccination of pregnant ewes and goats with *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine: safety and serological responses." Ann Rech Vet 23(2): 177-188.
- Zwerdling, A., M. V. Delpino, K. A. Pasquevich, P. Barrionuevo, J. Cassataro, C. Garcia Samartino and G. H. Giambartolomei (2009). "*Brucella abortus* activates human neutrophils." Microbes Infect 11(6-7): 689-697 DOI: 10.1016/j.micinf.2009.04.010.

ANNEXES

Annexe 1 :**Détection du genre *Brucella* par PCR conventionnelle et en temps réel**

C: PCR conventionnelle, RT: PCR en temps réel, BHQ : Black Hole Quencher, FAM : 6-carboxyfluorescein phosphoramidite, FLSN : fluorescéine, MGB : Minor Groove Binding, NHQ : Non Fluorescent Quencher, TAMRA : 5-carboxytetramethylrhodamine

Gène	Amorces Sens (F), Antisens (R) et Sonde	Référence	Taille	Type de PCR
<i>bcs31</i>	F : B4 tggctcgggtgccaatatcaa R : B5 cgcgcttgcctttcaggtctg	Baily <i>et al.</i> 1992	224 bp	C
<i>bcs31</i>	F : Bruc887: tttatgatggcaagggaaggtgg R : Bruc1457: cactatcgagcttgatgagctgc	Da Costa <i>et al.</i> 1996	594 bp	C
<i>bcs31</i>	F : gggcaaggtggaagattt R : cggcaagggtcgggtgtt	Serpe <i>et al.</i> 1999	440 bp	C
<i>bcs31</i>	F : gctcgggtgccaatatcaatgc R : gggtaaacgctcgccagaag FAM-aaatcttccacctgcccctgccatca-BHQ1	Probert <i>et al.</i> 2004		RT
<i>bcs31</i>	F : BCSP1163 tctttgtggcggtctatcc R : BCSP1199 ccgttcgagatggccagtt BCSPTq FAM-acgggagcaatct-MGB-NFQ	Bounaadja <i>et al.</i> 2009	178 bp	RT
<i>bcs31</i>	F : Mbm1 atcgttctgaagcctac R : Mbm2 aaataccgttcgagatgg MbmTq FAM-atatcaaggctgaacacctgaagc-TAMRA	Sohrabi <i>et al.</i> 2014	166 bp	RT
IS711	F : IS313: ctgctgatacgcggactgtgaa R : IS639: ggaacgtgttgattgacctgat	Hénault <i>et al.</i> 2000	350 bp	C
IS711	F : gcttgaagcttgcggacagt R : ggctaccgtgcgaat FAM-aagccaacacccggccattatggt-TAMRA	Hinic <i>et al.</i> 2008	63 bp	RT
IS711	F : IS421 cgctcgcgcggtggat R : IS511 ctgaagcttgcggacagtcacc ISTq FAM-acgaccaagctgcatgctgtgtcgtatg-TAMRA	Bounaadja <i>et al.</i> 2009	178 bp	RT
IS711	F : IS711_S ttgtcgatgctatggcctac, R : IS711_R ggcaatgaaggcccttaagt Sonde d'hybridation : IS711_FL gaagcttgcggacagtcaccataat-FLSN IS711_LC LC-Red640-gccgggtgttgctttattcg(P)	Tomaso <i>et al.</i> 2010		RT
IS711	F : gagaataaagccaacacccg R : gatggacgaaacccacgaat	Ning <i>et al.</i> 2012	317 bp	C
IS6901	F: ISP1 ggtgttaagagagac R : ISP2 gacgatagcgttcaactg	Ouahrani-Bethach <i>et al.</i> 1996		C
<i>per</i>	F : bruc1: cggtttatgtgactctctcg R : bruc5: cagtattctcgtgtaggcgaagta	Bogdanovich <i>et al.</i> 2004	367 bp	C
<i>per</i>	F : Per525 gtttagttcttgggaacaagacaa R : Per575 gagattgcgcgctagca PerTq FAM-tacgaccggtgaaggcgggatgmgb-NFQ	Bounaadja <i>et al.</i> 2009	68 bp	RT
<i>omp2</i>	JPF gcgctcaggctgccgacgcaa JPR accagccattgcggtcggtta	Leal-Klevezas <i>et al.</i> 1995	123 bp	C
<i>omp31</i>	31ter/sd F : cattcaggacaattcccgcc R : tgacagacttttccgcaaa	Vizcaino <i>et al.</i> 1997	881 bp	C
ARNs16S spacer	LiPA	Rijpens <i>et al.</i> 1996		C
ARNr16S	F : Ba148-167 tgtaataaccgtatgtgctt R : Ba928-948 taaccgacgacgggatgtcaa	Herman, De Ridder 1992	800 bp	C
ARNr16S	F4 tcgagcgcgcgcaagg R2 aaccatagtgtctccactaa	Romero <i>et al.</i> 1995a	905 bp	C
<i>eryC</i>	BruITAF cgcagtttgcaatttcaccta BruITAR cgatggcgatcttgataagtct BruITAP FAM-atttcgatgatccggcgccg-NFQ	Rodriguez-Lazaro <i>et al.</i> 2017	75 pb	RT

Annexe 2 :

Liste des souches incluses dans l'étude d'optimisation de la PCR (Chapitre I)

^(a) ATCC, American Type Culture Collection (USA); NCTC, National Collection of Type Cultures (UK); EDQM, European Directorate for the Quality of Medicines (Strasbourg, France) ; CIP, Collection de l'Institut Pasteur (Paris, France) ; LMG, Laboratory of Microbiology Gent Bacteria Collection (University of Gent, Belgium) ; BCCM, Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (University of Gent, Belgium), ANSES LSAn, Laboratoire de Santé Animale Unité Zoonoses Bactériennes (Maisons-Alfort, France), DM-UN, Departamento de Microbiología-Universidad de Navarra (Pamplona, Spain).

Souche	Référence ^(a)	Source
<i>Brucella</i> spp.		
<i>B. melitensis</i> 1 16M	ATCC 23456	ANSES, LSAn
<i>B. melitensis</i> 1 Rev1	EDQM souche de référence	ANSES, LSAn
<i>B. melitensis</i> 1 53h38		ANSES, LSAn
<i>B. melitensis</i> 2 63/9	ATCC 23457	ANSES, LSAn
<i>B. melitensis</i> 3 Ether	ATCC 23458	ANSES, LSAn
<i>B. melitensis</i> B115		ANSES, LSAn
<i>B. abortus</i> 1 544	ATCC 23448	ANSES, LSAn
<i>B. abortus</i> 1 S19		ANSES, LSAn
<i>B. abortus</i> RB51		ANSES, LSAn
<i>B. abortus</i> 2 86/8/59	ATCC 23449	ANSES, LSAn
<i>B. abortus</i> 3 Tulya	ATCC 23450	ANSES, LSAn
<i>B. abortus</i> 4 292	ATCC 23451	ANSES, LSAn
<i>B. abortus</i> 5 B3196	ATCC 23452	ANSES, LSAn
<i>B. abortus</i> 6 870	ATCC 23453	ANSES, LSAn
<i>B. abortus</i> 9 C68	ATCC 23455	ANSES, LSAn
<i>B. suis</i> 1 1330	ATCC 23444	ANSES, LSAn
<i>B. suis</i> 2 Thomsen	ATCC 23445	ANSES, LSAn
<i>B. suis</i> 3 686	ATCC 23446	ANSES, LSAn
<i>B. suis</i> 4 40	ATCC 23447	ANSES, LSAn
<i>B. suis</i> 5 513	NCTC 11996	ANSES, LSAn
<i>B. neotomae</i> 5K33	ATCC 23459	ANSES, LSAn
<i>B. canis</i> RM 6/66	ATCC 23365	ANSES, LSAn
<i>B. pinnipedialis</i>	NCTC 12890	ANSES, LSAn
<i>B. ovis</i> 63/290	ATCC 25840	ANSES, LSAn
<i>B. ceti</i>	NCTC 12891	ANSES, LSAn

ANNEXES

Bactéries présentant des réactions croisées en sérologie		
<i>Escherichia coli</i> O157: H7	Field strain	ANSES, LSAI
<i>Pasteurella multocida</i>	NCTC 12177	ANSES, LSA ⁿ
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Urbana N	Field strain	ANSES, LSAI
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	Field strain	ANSES, LSAI
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	NCTC 11174	ANSES, LSA ⁿ
Bactéries proches phylogénétiquement		
<i>Ochrobactrum anthropi</i> LMG 3306	LMG 3306	DM-UN
<i>Ochrobactrum anthropi</i> LMG 3331 (dilué au 1/4)	LMG3331	BCCM
<i>Ochrobactrum aintermedium</i> LMG 3301	LMG3301	BCCM
Agents causals d'avortement chez les ruminants		
<i>Candida albicans</i>	Field strain	ANSES, LSA ⁿ
<i>Listeria innocua</i>	Field strain	ANSES, LSA ⁿ
<i>Listeria monocytogenes</i>	NCTC 7973	ANSES, LSA ⁿ
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Arbotusovis	Field strain	ANSES, LSA ⁿ
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	ATCC 29833	ANSES, LSA ⁿ
Autres		
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Field strain	ANSES, LSA ⁿ
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Field strain	ANSES, LSA ⁿ
<i>Bacillus brevis</i>	Field strain	ANSES, LSAI
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	ANSES, LSA ⁿ
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	CIP:A 34	ANSES, LSA ⁿ
<i>Brevibacillus</i> sp.	Field strain	ANSES, LSAI
<i>Citrobacter freundii</i>	Field strain	ANSES, LSA ⁿ
<i>Corynebacterium bovis</i>	Field strain	ANSES, LSA ⁿ
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> (ovis)	CIP: 102968 T	ANSES, LSA ⁿ
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Field strain	ANSES, LSA ⁿ
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433	ANSES, LSA ⁿ
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Field strain	ANSES, LSA ⁿ
<i>Listeria ivanovii</i>	Field strain	ANSES, LSA ⁿ
<i>Listeria seeligeri</i>	Field strain	ANSES, LSA ⁿ
<i>Listeria welshimeri</i>	Field strain	ANSES, LSA ⁿ
<i>Proteus mirabilis</i>	CIP 103181	ANSES, LSA ⁿ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	ANSES, LSA ⁿ
<i>Rhodococcus equi</i>	Field strain	ANSES, LSA ⁿ

ANNEXES

<i>Salmonella</i> <i>bodjonegoro</i>	Field strain	ANSES, LSA _n
<i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i>	NCTC 12484	ANSES, LSA _n
<i>Serratia</i> <i>marcescens</i>	Field strain	ANSES, LSA _n
<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	ATCC 6538	ANSES, LSA _n
<i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i>	Field strain	ANSES, LSA _n
<i>Staphylococcus</i> <i>haemolyticus</i>	Field strain	ANSES, LSA _n
<i>Streptococcus</i> <i>agalactiae</i>	Field strain	ANSES, LSA _I
<i>Streptococcus</i> <i>bovis</i>	Field strain	ANSES, LSA _n
<i>Streptococcus</i> <i>dysgalactiae</i>	Field strain	ANSES, LSA _I
<i>Streptococcus</i> <i>equi</i> subsp. <i>Equi</i>	Field strain	ANSES, LSA _n
<i>Streptococcus</i> <i>equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	Field strain	ANSES, LSA _n
<i>Streptococcus</i> <i>equisimilis</i>	Field strain	ANSES, LSA _n
<i>Streptococcus</i> <i>faecium</i>	Field strain	ANSES, LSA _n
<i>Streptococcus</i> <i>pneumoniae</i>	Field strain	ANSES, LSA _n
<i>Streptococcus</i> <i>pyogenes</i>	Field strain	ANSES, LSA _n
<i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i> O: 47	Field strain	ANSES, LSA _n

Annexe 3 :

Résultats de PCR et de culture de prélèvements de lait de vaches prélevés en Chine
(Chapitre I)

	Lait					Crème	Surnageant	Culot
	PCR en temps réel				Culture	PCR en temps réel		
	IDBRU	IS711-ref	bcp31	per		IDBRU	IDBRU	IDBRU
1	34,4	37,2	45,0	45,0	-	31,4	45,0	45,0
2	33,2	37,7	45,0	45,0	-	33,0	45,0	33,7
3	30,8	33,9	35,2	33,5	-	28,9	34,6	33,0
4	39,4	38,3	45,0	45,0	-	32,8	45,0	45,0
5	45,0	45,0	45,0	45,0	-	36,8	45,0	45,0
6	34,8	38,5	45,0	45,0	-	32,9	45,0	34,9
7	31,0	35,0	45,0	34,7	-	31,2	45,0	45,0
8	34,2	37,3	45,0	45,0	-	30,9	36,1	32,2
9	32,5	33,6	34,1	33,4	<i>B. abortus</i> 3	31,0	35,0	32,7
10	37,6	45,0	45,0	45,0	<i>B. abortus</i> 3	45,0	45,0	45,0
11	45,0	45,0	45,0	45,0	<i>B. abortus</i> 3	39,1	45,0	45,0
12	33,5	34,9	36,1	33,7	<i>B. abortus</i> 3	35,1	35,7	33,6
13	34,3	36,3	45,0	34,8	-	32,4	33,3	34,2
14	31,7	33,8	34,0	32,4	<i>B. abortus</i> 3	30,6	34,8	32,0
15	33,4	35,2	36,1	34,8	<i>B. abortus</i> 3	31,9	45,0	33,2
16	45,0	45,0	45,0	45,0	-	32,8	45,0	33,5
17	45,0	45,0	45,0	45,0	<i>B. abortus</i> 3	37,3	45,0	45,0
18	31,9	38,4	37,0	35,9	<i>B. melitensis</i> 3	31,4	35,9	45,0
19	34,3	45,0	45,0	45,0	<i>B. melitensis</i> 3	33,9	37,3	45,0
Total	15/19	13/19	6/19	8/19		18/19	8/19	10/19

Annexe 4 :

Revue en cours de préparation

Brucella in milk and dairy products

Marion Holzapfel, Maryne Jay, Claire Ponsart, Virginie Mick

Introduction

1. Human brucellosis and epidemiology
2. Animal brucellosis and excretion of *Brucella* in milk
 - 2.1. Cattle
 - 2.1.1. Pathogenicity
 - 2.1.2. Excretion in milk
 - 2.2. Small ruminants
 - 2.2.1. Pathogenicity
 - 2.2.2. Excretion in milk
 - 2.3. Buffaloes
 - 2.3.1. Pathogenicity
 - 2.3.2. Excretion in milk
 - 2.4. Camelids
 - 2.5. Other species
3. Survival of *Brucella* in milk and dairy products
 - 3.1. Presence of *Brucella* in naturally infected milk and dairy products
 - 3.2. Impact of changes of properties of the milk during dairy products' fabrication on *Brucella* survival
 - 3.2.1. Different protocols of artificially inoculation of milk and dairy products
 - 3.2.2. Effects dairy product production on *Brucella* survival *in vitro*
 - 3.2.2.1. Effect of fat concentration
 - 3.2.2.2. Effect of pH on survival of *Brucella*
 - 3.2.2.3. Effect of a_w on survival of *Brucella*
 - 3.2.2.4. Effect of ripening temperature
 - 3.2.2.5. Difference of survival between strains
 - 3.2.2.6. Importance of pasteurization

References

Introduction

Bacteria of the genus of *Brucella* are the causal agent of brucellosis, one of the most important zoonotic diseases worldwide. *Brucella* spp. are capable of causing disease in a variety of animal species, including humans. Approximately 500000 human cases are reported each year in the world. Despite being controlled in many developed countries, the disease remains endemic in many parts of the world like Mediterranean countries, Central Asia, Central and South America, the Middle East are considered (Pappas *et al.* 2006).

In human, brucellosis is rarely fatal but can be severely debilitating and lead to weakness, fever, arthritis, osteomyelitis, endocarditis, and meningoencephalitis. In animals it causes chronic infection with abortion and orchitis in cattle and small ruminants leading to decrease of production rate and fertility. In most countries brucellosis is a notifiable disease and lead to international restriction on animal movement and trade, which cause high economic loss.

Although eradication and control programs exist, brucellosis remains a public health issue due to the challenge of diagnostic, as there are no specific clinical features and *Brucella* spp. have slow growth rate in blood culture.

Brucella spp. are Gram-negative non-motile coccobacilli, facultative intracellular, belonging to the alpha2-Proteobacteriaceae family, and able to persist and replicate in phagocytic (macrophages, dendritic cells) and non-phagocytic (example: trophoblastic cells) cells. Analyses of the genotype of *Brucella* species highlight more than 94% genetic similarity within the 3,3 Mb genome. Despite this very low genetic variability, *Brucella* genus is divided in 12 species according to phenotype (biochemical characteristics, antigens specificities, phage sensitivity...) and host preference (but can infect heterogeneous hosts). Indeed, historically, *B. abortus* is normally associated with cattle, *B. melitensis* with sheep and goats, *B. suis* with swine, *B. canis* with dogs, *B. ovis* in sheep, *B. neotomae* with desert rats, *B. microti* with rodents, *B. pinnipedialis* and *B. ceti* with marine mammals, *B. vulpis* with foxes, *B. inopinata* from mammary implant, *B. papionis* with baboon (Buddle 1956; Stoenner and Lackman 1957; Carmichael and Bruner 1968; Foster *et al.* 2007; Scholz *et al.* 2008, Scholz *et al.* 2010; Whatmore *et al.* 2014, Scholz *et al.* 2016). Some species are divided in biovars: 7 biovars are described in *B. abortus*, 3 biovars in *B. melitensis* and 5 biovars in *B. suis*.

Brucella share close relationship with saprophytic soil bacteria (genus *Ochrobactrum*, occasionally infects humans), plant associated bacteria (*Rhizobium* sp.) and plant pathogens (*Agrobacterium* sp.).

Human get infected by direct contact with aborted fetuses, placentas...with mucosae or damaged skin, or by inhalation of aerosols. But the most important route of contamination is indirect by ingesting contaminated raw milk or unpasteurized dairy products. Indeed, once infected, animals excrete the bacteria in the milk. As numerous Gram-negative non-spore-forming bacteria, *Brucella* spp. are killed by pasteurization of the milk. Nevertheless, in several parts of the world, milk from cattle, small ruminants, camel or water buffaloes is consumed raw, or transformed in cheese without heating treatment. The milk as source of infection of brucellosis was discovered decades ago, but the mechanisms of shedding of the *Brucella* sp. in the milk and the persistence in the mammary gland of animals is still not well described.

The aim of this review is to describe the pathogenicity of *Brucella* spp. In animals regarding the shedding in milk, and to summarize publications studying the survival of *Brucella* spp. in dairy products.

1. Human brucellosis and epidemiology

Within the zoonotic *Brucella* spp., *B. melitensis*, *B. suis* biovar 1, 3 and 4, *B. abortus* are considered as the most virulent for humans, with a few organisms (10 to 100) being sufficient to cause a debilitating chronic infection (Corbel 2006). *B. melitensis* seems responsible for more than 70 % of human brucellosis cases, reaching 90 % in some areas (Corbel, 1997) (Memish and Balkhy 2004), followed by *B. suis* (~25%) and *B. abortus* (~5%) (Doganay and Aygen 2003). Moreno and colleagues hypothesized the selection of the most prevalent virulent *Brucella* strains by the domestication of animals (Moreno *et al.* 2014). Furthermore, few human infections due to marine mammal *Brucella* species (*B. ceti* et *B. pinnipedialis*) and *B. canis*, causative agent for canine brucellosis, have been also diagnosed. In addition, *B. inopinata* has been isolated from a breast implant.

Human brucellosis is described all around the world, with some endemic areas. The global burden of human brucellosis remains enormous: the World Health Organization (WHO) estimates that the infection causes more than 500,000 infections per year worldwide (Pappas *et al.*, 2006). The observed incidence in the endemic areas can range from <0.03 to >200 per 100,000 population. Nevertheless, if human brucellosis is a certifiable disease in most of the countries, official reports do not exactly reflect the

number of persons affected every year (clinical polymorphism, political management...) and WHO considers that the real incidence of this disease is 10 - 25 times superior to the notified (WHO). Most cases of human brucellosis in non-endemic developed countries result from dairy products imported from endemic areas or from patients who import the disease. Some autochthonous cases are caused by reactivation of bacteria remaining from the initial infection or by relapse months to years after therapy (due to the failure to complete the treatment) and also by exposition of certain professional groups (breeders, veterinarians, staffs of laboratory and slaughterhouses).

Brucellosis in human is a “flu-like” disease with insidious, protean clinical manifestations. Brucellosis is responsible of acute and chronic forms, and asymptomatic forms are also described. Acute febrile illness can become chronically debilitating disease with severe complications. Clinical differences between *Brucella* species are difficult to determine, some consider that there is no difference in clinical signs (Dokuzoguz *et al.* 2005). The incubation period is difficult to determine in humans but has been estimated at five days to three months (OIE 2016). Clinical-cases studies describe fever as the most common feature, then osteoarticular involvement (sacroiliitis, spondylitis, peripheral arthritis, and osteomyelitis), genitourinary complications, neurological findings (peripheral neuropathies, meningoencephalitis, cranial nerves compromise...), endocarditis, mucocutaneous manifestations, pulmonary manifestations (Franco *et al.* 2007).

Human can contract the disease by direct contact of *Brucella* with mucosae or skin, by inhalation or ingestion of contaminated products. According to the literature, the consumption of *Brucella*-contaminated unpasteurized milk and dairy product is one of the main ways of contamination of human. Numerous epidemiological studies report contamination by *B. melitensis* and *B. abortus* from ingestion of contaminated milk and dairy product from infected sheep, goat, cattle, buffaloes and camel. In Mexico, considered as an enzootic area, in 1997, 84 % of human infections were due to consumption of contaminated dairy products, especially cheeses (fresh cheese) made from sheep and goat raw milk (Zuñiga-Estreda *et al.* 2005). In France, a no-endemic country, the imported human cases (80-90 % of total cases) are related to consumption of contaminated milk and dairy products (60 %), to no- professional (35 %) and occupational (5 %) animal contacts (INVS). Cheese is often incriminated (38 %) (Leclerc *et al.*, 2002). Human to human transmission is rare. Nevertheless, rare cases of vertical transmission of *Brucella* (Giannacopoulos *et al.* 2002, Palanduz *et al.* 2000), transmission

via breastmilk (Barroso Espadero *et al.* 1998, Celebi *et al.* 2007) via blood transfusion (Al-Kharfy 2001, Doganay *et al.* 2001), and via sexual route (Ruben *et al.* 1991) are described. Humans are considered as dead-end hosts for *Brucella* species, and they nearly always acquire the disease from animal sources.

Some authors consider *Brucella* as an enteropathogen, and several studies highlight the importance of colonization of digestive during human infection. Virulence factor such as urease may be important for the passage through gastrointestinal tract. Peyer's patches could be port of entry to cross epithelial barriers (studies on mice and calves infected with *B. abortus*) (Rossetti *et al.* 2013), and M-cells could be one route of dissemination from mucosal surfaces. Dendritic cells may also transport *Brucella* across mucosal surfaces (studies in mice ligated ileal loop and *B. abortus*) (Paixao *et al.* 2009). Nevertheless, those findings are well debated, as *Brucella* sp. are described to be killed at low pH (Corbel 2006). If *Brucella* present in dairy products colonize oral mucosae or intestine mucosae after ingestion by human is not established yet.

Treatment of choice for human brucellosis consists of combination antibiotic therapy for long periods of at least 6 weeks. Early diagnostic and antibiotics treatment can greatly reduce the clinical signs and clear the bacteria. Nevertheless in many cases effective diagnostic and/or treatment are not available or not adequately used which can explain that brucellosis is still a medical problem (Corbel 2006).

The occurrence of human brucellosis depends largely on the animal reservoir. For preventing human brucellosis, efficient approach is control and elimination of the animal infection. In many developed countries, animal brucellosis management allowed a decrease of human cases. Eradication programs against brucellosis, based on various strategies (vaccination and/or testing and slaughter of infected animals) allowed halting the disease in several countries. In France, even when 800 cases have been reported in 1970, less than 50 new human cases have been notified in 2005 (INVS).

2. Animal brucellosis and excretion of *Brucella* in milk

2.1. Cattle

2.1.1. Pathogenicity

The bovine brucellosis is a major worldwide zoonosis, mainly caused by *B. abortus*, and more rarely *B. melitensis*, rather specific of goats and sheep (OIE, 2016). Occasionally, natural infection in cattle by *B. suis* biovar 1 and 3 is reported (Ewalt *et al.* 1997, Jaý *et al.* GTV 2013), Available literature data concern essentially the *B. abortus* infection in dairy cows, but some authors suggest an extrapolation to other *Brucella* species in pathogenesis and clinical symptoms (Verger, 1985).

Brucella species are facultative intracellular Gram-negative bacteria, with an important tropism for reproductive and mammary tissues (udder, uterus, lymphoid organs), especially for the pregnant reproductive tract of domestic animals (Poester *et al.*, 2013). The incubation period varies with the species and stage of gestation at infection. Brucellosis is responsible of abortion during the last trimester of pregnancy (5th-8th month) (Megid *et al.*, 2010) (Carvalho Neta *et al.*, 2010). The incubation period is longer in animals infected early during the gestation (Center for Food Security and Public Health, 2007). Cows may also give birth to stillborn or weak calves. Once infected, cows usually abort only once, and then subsequent pregnancies come to term, but animals still shed *Brucella* in milk and vaginal secretions. In dairy cattle, brucellosis is responsible of decreased milk production, increased somatic cell count in milk (Carvalho Neta *et al.* 2010). Brucellosis may also lead to mild to moderate mastitis, resulting in intermittent shedding of bacteria in the milk. (Xavier *et al.* 2009). On the other hand, some studies did not report any differences in reproductive performance between seropositive and negative animals within *B. abortus*-infected herds, nor detrimental effect on milk yield in high milk-yielding Holstein cows in infected herd (Boyd and Reed 1960) (Mellado *et al.* 2014). This could depend on the chronic *versus* acute form of brucellosis. Calves infected early remain serologically negative, with no sign of disease until adulthood, but heifers with latent asymptomatic infection may abort or give birth to infected calves during their first pregnancy (Nicoletti 1980) (Aparicio 2013). In bulls the disease can be responsible of lesions of orchitis evolving in chronic orchitis and fibrosis of testicular parenchyma, leading to infertility.

Bacteria are shed in milk and vaginal secretion, especially during abortion or calving. The main sources of infection are aborted fetuses, fetal membranes and uterine secretions after parturition. Indeed, highly colonized placenta can contain up to 10^{13} CFU/g of tissue (Letesson *et al.* 2017). Moreover, asymptomatic individuals may shed *Brucella*; contaminated tissues may then not be suspected as so. Contact of contaminated tissues with skin, conjunctiva and respiratory mucosa are important route of infection. But the main route of entry is oral by ingestion of food or water contaminated, by licking the uterine discharges and the calves of infected cows, but also through breastmilk and suckling of colostrum (Carvalho Neta *et al.* 2010). Calves also become infected vertically, with 60-70% of the fetuses born to infected mothers that can carry the infection (Plommet *et al.* 1973). Brucellosis is not considered as venereal disease, but cases of infection via artificial insemination are described (Rankin 1965).

Following contact of *Brucella* with nasal or digestive mucosae, three steps are critical for a successful infection development (Ganière, 2004) (Poester *et al.*, 2013). Firstly, the microorganisms are drained into the lymph nodes, close by the entry port, where the bacteria multiply. Next few days in several weeks, the second step is the dissemination of the bacteria by lymphatic system and bloodstream through the host. The lymph circulation is the major mechanism of dissemination in cattle, whereas the bovine bacteraemia remains fleeting and silent, with a positive blood culture difficult to observe. At this stage, the disease is considered as asymptomatic. The third step consists in localisation in target sites (lymphatic tissues (lymph nodes, genital and mammary tissues), mammary gland, placenta of pregnant cow, testes and appendices, synovial bursas, particular joints...) and multiplication of *Brucella*. This stage is symptomatic, with particular clinical signs of an acute brucellosis. The localisation in certain tissues (gravid uterus, udder, male reproductive organs) leads the excretion of *Brucella* and shedding in milk and uterine discharges and in the environment.

Tropism of *B. abortus* for reproductive tracts could be link to high concentration of erythriol and steroid hormones in pregnant uterus of cows. Indeed erythriol can be metabolized as source of carbon. However, the causal effect of erythriol utilization and tropism to the gravid uterus has not been definitively established. This “genital tropism” is described in animal (orchitis, epididymitis and infertility in males, and abortion and sterility in females) and also in human (epididymo-orchitis and can infect the placenta even if abortion is rare) (Letesson *et al.* 2017). Within the host, *Brucella* genus occupies both professional phagocytes (macrophages, dendritic cells) and non-professional cells

(placental trophoblasts, epithelial cells) (Moreno and Gorvel, 2004) (Jubier-Maurin *et al.*, 2004), but favours phagocytic cells as macrophages. Key events in the *Brucella* infection process are entry and early survival stages inside macrophages to evade the immune system, as well targeting to the endoplasmic reticulum, site of *Brucella* replicative niche. Natural resistance against brucellosis in cattle is thought to be associated with the ability of macrophages to inhibit the intracellular growth of *B. abortus*, based on polymorphisms of gene *NRAMP1* (Campbell *et al.* 1994, Barthel *et al.* 2001). The exact mechanisms of resistance are however not found, and Paixao *et al.* 2007 demonstrated no correlation between *NRAMP1* 3'UTR and natural resistance in cattle.

Information concerning seroconversion delay are obtained from experimentally infected cows, as in natural infection the date of contamination is often not known. In experimental condition, antibodies have been detected as soon as 10-15 days post infection. But Schoenars 1976 reported that antibodies are detectable late after infection (up to 5 months). Heifers infected as calves may seroconvert only at the first parturition (Plommet *et al.* 1971). Antibodies may remain during whole life. Detection of antibody is not always correlated with excretion of bacteria. Indeed, studies report seronegative cows shedding *Brucella* in their milk (Zwongi *et al.* 1990) (Arellano-Reynoso *et al.* 2013).

2.1.2. Excretion in milk

Distribution of *Brucella* was studied in naturally and experimentally infected cattle. Several epidemiological studies describe shedding of *B. melitensis* (Verger 1985), *B. abortus* in milk of cattle (Zowghi *et al.* 1990). *B. suis* VBI22 has been isolated from bovine milk once (Tae *et al.* 2012). Prevalence of cows shedding *Brucella* in milk are reported in several countries, for example 24% in Syria (Al Mariri *et al.* 2015), 10% in Tunisia (Barkallah *et al.* 2017), 3.3% in Iran (Ebrahimi *et al.* 2013), 50% in Egypt (Hamdy and Amin 2002), 10.3% in Tajikistan (Lindahl-Rajala *et al.* 2017), 5.3% in Uganda (Mugizi *et al.* 2015).

Excretion of *Brucella* in milk is irregular in time and intensity (Edwards *et al.*, 1946) (Morgan and McDiarmid, 1960) (Schoenaers, 1976). Following natural infection, cows excrete around 1.10^2 cfu/mL, but variation around 10^6 CFU/mL of milk are reported after experimental infection (see table). Amount of *B. abortus* eliminated in the milk from cows harboring *Brucella* in the udder is very variable, but higher concentrations are described soon after abortion (Carpenter 1924). The number of bacteria discharged in the

milk of infected cows may be only a general index to the exact number of living organisms present in a sample.

Contamination of colostrum is often more important and more frequent than milk (Morgan and McDiarmid 1960). With experimental infection of *B. abortus* to lactating cows (intra conjunctival route, $1,6.10^7$ *B. abortus* 544), Philippon and colleagues describe 91% of cows shedding *Brucella* in colostrum. *Brucella* spp. were isolated in colostrum from all or just 1 quarter (Philippon *et al.* 1971). According to Manthei and Carter, excretion in colostrum is more frequent than in vaginal secretion in cows with normal parturition and during subsequent gestations (Manthei and Carter 1950). Thus, isolation of *Brucella* from infected cows could be more efficient with colostrum than milk. (Schoenaers 1976)

Reference	Animal species	Excretion (UFC/ ml)			Method	Infection	
		milk	Fat layer and pellet	Fat layer	Bactériologie	Experimental	Natural
Philippon <i>et al.</i> (1971)	Cattle (<i>Bos taurus</i>)		5-5x10 ²		Bacteriology	X	
Saegerman <i>et al.</i> (2010)		10 ³			Bacteriology	X	
Carpenter et Boak (1928)		1,5 10 ⁵			Bacteriology	X	
		0,2-5 10 ²			Bacteriology		X
Perdrix et Chirol (1975)				10-10 ²	Bacteriology		X
O'Leary <i>et al.</i> (2006)		2 10 ² -2 10 ⁴			Bacteriology		X

Table 1: Excretion of *Brucella* in cattle milk, from Garin-Bastuji

Excretion of *Brucella* spp. from the mammary gland can occur throughout lactation but is most frequent in colostrum and during late lactation (Morgan and MacDiarmid 1960), and soon after parturition (Carpenter 1924). Moreover, shedding in milk might be important and persistent, during whole lactation cycle, and often during several lactations (Perdrix and Chirol 1975).

Barkallah *et al.* 2017 studied the excretion of *Brucella* in cattle and sheep in Tunisia (PCR and culture) found a statistically significant association between vaginal and milk shedding for ruminants, and concluded that there is no dominant route of bacterial

shedding. Abortion did not allow predicting about intensity or frequency of *Brucella* shedding in milk and colostrum (Philippon *et al.* 1971).

B. abortus may lead to mild to moderate interstitial mastitis resulting in intermittent shedding of the pathogen in the milk (Xavier *et al.* 2009). Some experimental infection of cattle with *B. abortus* observed that shedding of bacteria in milk was not associated with mastitis (Philippon *et al.* 1971). Roguinski *et al.* in 1972 published results of an experimental infection of 30 lactating cows at 5-6 months of pregnancy (12.10^6 *B. abortus* 544). They observed 5 cows shedding constantly *Brucella* in milk from 4 quarters until the end of the study (6 months post infection), while others shed *Brucella* in only one quarter. Some cows also shed *Brucella* intermittently in one or more quarter. In this study, number of somatic cells was proportionally linked to number of *Brucella* in milk, probably sign of mastitis.

In cattle infected with *B. abortus*, *Brucella* are mostly found in supramammary lymph node, mammary gland and uterus (Corbel 2006) (Xavier *et al.* 2009). Mammary gland is one of the most important target organs during brucellosis, even more with *B. melitensis* than *B. abortus* (Verger 1985). Corner in 1987 showed that mammary lymph node is the most frequently infected tissues after experimental (2.10^7 *B. abortus* biovar 1 in the conjunctival sac, at 6 months pregnancy) and natural infection of cows. In another study, *Brucella* were recovered in supramammary lymph node of cattle infected with *B. abortus* with no organisms in the udder, meaning that lymph node can be infected independently of the udder (Fensterbank 1987). *B. abortus* are localized intracellularly in macrophages of parenchyma and milk, and in acinar *lumina* of the mammary gland (Xavier *et al.* 2009).

Detection of antibodies and *Brucella* in milk at the same time is frequent, but serology results do not predict the importance of the shedding. In their study Perdrix and Chirol in 1973 described 20 to 25% of seropositive cows shedding *Brucella* in milk. They observed that cows excreting *Brucella* in milk were rarely seronegative. On the other hand, Zowgi *et al.* in 1990 found 2% of positive milk samples from seronegative cows in herds in Iran. Lindahl-Rajala *et al.* in 2017 found 13.7% of seropositive cows (out of 564 lactating cows) and all with positive result of PCR (*IS711* based real-time PCR from milk samples), and 11.8% of seronegative cows also positive by PCR. Those findings highlight the importance of latent carriers of *Brucella*.

Excretion of vaccinal strains is also described. In a study with 14 free-brucellosis Holstein cows from 3 to 9 years old, vaccinated with B19 from 3 to 8 months, all animals were seronegative and no *Brucella* were isolated by culture, but DNA of *B. abortus* B19 was detected by PCR in 5.7% of 210 milk samples, sampled during a whole reproductive cycle (from estrus synchronization, artificial insemination, pregnancy and parturition) (Pacheco *et al.* 2012). Miyashiro and colleagues showed that 19.3% of 132 samples of cheese presented positive results by PCR (with no isolation by culture) among which 81% identified as *B. abortus* B19 vaccinal strain (Miyashiro *et al.* 2007). Adult cows vaccinated 2 or 3 times with 10^9 CFU of RB51 vaccine strain shed bacteria in the milk up to 69 days post vaccination (Uzal *et al.* 2000). Some authors consider that shedding of RB51 may be favorable to herd immunity since oral immunization with RB51 has been demonstrated to induce protective immunity in mice and cattle (Uzal *et al.* 2000). Miranda *et al.* 2016 studied the excretion of RB51 in milk of vaccinated adult cattle, and showed that no *B. abortus* was isolated (PCR and culture) from milk sampled during 9 weeks from cows vaccinated with subcutaneously $1.3 \cdot 10^{10}$ CFU of *B. abortus* RB51, 30–60 days after parturition. They concluded that the public health hazard associated with vaccinal strain RB51 in milk is very low.

2.2. Small ruminants

2.2.1. Pathogenicity

B. melitensis is the major causal agent of brucellosis in small ruminants. Historically, *B. melitensis* biovar 1 is predominant in Latin America (Lucero *et al.* 2008), while biovar 2 is predominant in the Middle East together with biovar 3, which is also more common in European and African Mediterranean countries, Eurasia, and China (Musallam *et al.* 2016, Sun *et al.* 2016). *B. abortus* (Leal-Klevesas *et al.* 2000, Ali *et al.* 2015, Wareth *et al.* 2015) is also associated with infection in sheep and goats, and often in link to close contact with *B. abortus* infected cattle. Rossetti *et al.* consider however, that these individuals don't sustain the infection in the herd (Rossetti *et al.* 2017). *B. suis* as causal agent in small ruminants was once documented (Bhaskar *et al.* 1998).

In pathological and epidemiological terms, *B. melitensis* infection in small ruminants is similar to *B. abortus* infection in cattle (Aparicio *et al.* 2013). Major route of contamination is through contact with mucosae of respiratory tract and digestive tract. A

small proportion of lambs can be born infected *in utero*, but the majority of *B. melitensis* latent infections are probably acquired through colostrum or milk (Grillo *et al.* 1997).

If infection occurs during pregnancy, bacteremia often causes invasion of the uterus, and at the same time lymph nodes and various organs like udder and spleen. During this first stage of infection, the main clinical sign is abortion. However, other clinical signs can be observed (orchitis, epididymitis, hygroma, arthritis, metritis, mastitis ...). However, some animals limit the infection and / or they can become chronic asymptomatic and potential shedders. Ewes and goats often present asymptomatic infections, 20 times more often than evolving brucellosis (Gasse *et al.* 1963)

Generally, there is no abortion if the female is infected at the end of pregnancy. The second stage is characterized by the elimination of *Brucella* or, more frequently, by persistent infection in the mammary gland and supramammary lymph nodes (Fensterbank, 1987) with constant or intermittent excretion of bacteria in milk and vaginal secretions. Animals usually abort once, at half the first third of gestation, but some *Brucella* can remain and during the following gestations, be excreted in the fluids and discharged. Female can also give birth normally.

The proportion of newly infected females varies. The percentage of lambing in a herd can reach 40%. Females born in an infected environment and subsequently infected generally abort less than others. This explains the high level of abortions in recently infected herds and the relatively low frequency in herds where the infection is enzootic. Ewes have natural tendency to get rid of the infection within 6 months, but it is thought that 20% of infected animal remain latent carrier of *Brucella* during long times. (Roux, 1979)

Renoux described a delay of 3 to 5 weeks between infection and apparition of antibodies in the blood, and in numerous cases significant titer of agglutination or complement fixation are achieved only after months (Renoux, 1961).

2.2.2. Excretion in milk

Udder is the preferred organ of *B. melitensis*. Numbers of bacteria that are discharged in the milk are around 4.10^3 to 2.10^6 cfu/mL of milk. Shedding can be continuous or intermittent, from one or 2 quarters (Jouve, 1952). After experimental infection of ewes with *Brucella abortus* IV injection (10^8 - 10^9 CFU/goat), concentrations of *Brucella* were as high as 3.10^8 CFU/ml of mammary secretion (Meador *et al.* 1989). In the same experiment, concentration of *Brucella* excreted in milk of non-nursing goats increased

from weeks 1 to 3, peaked at 3 to 4 weeks at 10^8 CFU/ml milk, while in nursing goats shedding was intermittent, from 20 to 570 CFU/ml (Meador *et al.* 1989 (2)).

Asymptomatic animals shedding bacteria in milk are reported (Jouve, 1952). Clinical signs of mastitis are usually not detectable in naturally infected goats, but *B. melitensis* may cause inflammation of mammary gland and lead to reduce milk production (Xavier *et al.* 2010).

Experimental infection of pregnant and post-partum goats with *B. abortus* (IV) leads to inflammatory changes with more important lesions in mammary gland yielded high number of *Brucella* (Meador *et al.* 1989), but gross lesions were not found.

After experimental infection excretion may last months after infection, and during at least 3 subsequent lactations (Grillo *et al.* 1997).

Bacteria in milk of seronegative sheep and goats are reported (Jouve, 1952). In a study, out of 2735 samples of milk 68 MRT-positive and 6 MRT-negative milk samples from aborting sheep were found to be positive on culture (Ebadi, 1971)

About two third of *B. melitensis* infections of pregnant ewes lead to infection of the udder and excretion of the bacteria in milk during subsequent lactation (Xavier *et al.* 2010). The failure to nurse or release milk enhances localization and replication of *B. abortus* in mammary glands of goats after parturition (Meador *et al.* 1989 (2)). Meador *et al.* in 1989 hypothesized that the causes of persistence in the udder is link to combined abilities of *Brucella* and milk to interfere with phagocytic cell bactericidal mechanisms (Meador *et al.* 1989). Lysosome from bovine macrophages could lack myeloperoxidase during lactating period (which is one of the best bactericidal mechanisms of neutrophils to kill *Brucella*). Indeed, the antibacterial properties attributed to Myeloperoxidase are only relevant during the dry period, whereas they were found to be completely inhibited with lactation, mainly due to milk proteins (Alnakip 2014). The mammary gland cells could have lower activity than blood and alveolar cells, probably due to milk components (Bielefeldt Ohmann and Babiuk, 1984).

In experimental infection of post-partum or pregnant goats with *B. abortus* 1ml IV dose 10^8 or 10^9 CFU/goat, *Brucella* are located in mammary gland. Initially *Brucella* are few and only inside phagocytes, then macrophages become full of bacteria and number of neutrophils increase. *Brucella* are then found in ducts and alveoli. In sedimented milk

Brucella are found in macrophages, neutrophils and few squamous epithelial cells. Macrophages (and neutrophils) are believed to have a crucial role in the transport of *Brucella* from systemic circulation into mammary glands and milk secretions, and in the intracellular replication in alveoli and ducts (Meador *et al.* 1989).

Vaccinal strain excretion in milk has been reported in small ruminants. Indeed, *Brucella abortus* strain 19 (B19) was isolated from milk of seropositive goat in Ecuador (Ron-Roman *et al.* 2017).

2.3. Buffaloes (*Bubalus bubalis*)

2.3.1. Pathogenicity

Buffaloes belong to *Bovidae* family (as cattle *Bos Taurus*). They are originated from Asia, and occupy an economically important place in the livestock industry in many parts of the world, as in Italy where water buffaloes allow production of soft cheese called Mozzarella di Bufala. The main etiological agent for water buffaloes is *Brucella abortus* biovar 1 (Fosgate *et al.* 2002, Megid *et al.* 2005), but *B. abortus* 3, 5 and 6, *B. melitensis* 3 have been identified in Italy, and recently *B. abortus* biovar 5 was isolated in Argentina from an aborted buffalo fetus (Di Giannatale *et al.* 2008) (Martinez *et al.* 2014).

Infection can occur *in utero*. Calves born from seropositive buffalo cows in an infected herd are more likely to become seropositive compared to calves born from seronegative cows (Akhtar & Mirza 1995, Sousa *et al.* 2015a). Buffaloes can also get infected by consumption of contaminated milk, through contact with contaminated tissues.

Clinical signs of brucellosis in buffaloes are comparable to those in cattle. Brucellosis is responsible of reduction of fertility, birth of weak calves, and abortion usually after 5 months gestation as in cattle, but also earlier in gestation (Das *et al.* 1990). The infection is also often asymptomatic. Buffaloes could be more resistant to infection than cattle.

It was published that in the water buffalo, the resistance to *B. abortus* infection is associated with the gene *Nramp1* (Borriello *et al.* 2006).

2.3.2. Excretion in milk

B. abortus can be excreted in milk intermittently in cattle (Sreevatsan *et al.*, 2000) and other animal species including buffaloes (Blasco *et al.*, 1994). The prevalence of water

buffaloes excreting *Brucella* in milk is quite studied, for example: 40% of buffaloes suspected to be infected in Egypt (Abd Al-Azeem *et al.* 2012), 30% in herds with history of brucellosis and detection with PCR in Italy (Amoroso *et al.* 2011).

Capparelli *et al.* applied the concept of super-shedders, used in SARS classification, to *Brucella*. Milk from 500 buffaloes living in endemic areas was tested by bacteriology and PCR. They described 80% of non-shedders, 14.6% of low shedders ($<10^3$ CFU/ml of milk), 2.4% of intermittent low shedders, and some high shedders ($>10^4$ CFU/ml), 52 to 60% of seropositivity. According to the authors, the majority of buffaloes excrete *B. abortus* at low rate, but some excrete persistently at a high rate, called super-shedders (Capparelli *et al.* 2009)

Excretion in milk of vaccine strain was studied after inoculation of RB51 to adults water buffaloes already vaccinated before (subcutaneously, triple dose than what is recommended for cattle), with bacteriology and PCR. RB51 was isolated from milk samples only during the first week post-vaccination while RB51 DNA was detected during the first week till the fourth week post-vaccination only in water buffaloes vaccinated as adults (Longo *et al.* 2009).

As buffalo raw milk is widely consumed and often transformed in cheese, further studies regarding excretion of *Brucella* from the udder are needed.

2.4. Camelids

Camelidae family is composed of 2 species: two-humped Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) and the one-humped Arabian camel or dromedary (*Camelus dromedarius*)

Camels are highly susceptible to *B. abortus* and *B. melitensis*, but present only few clinical signs in contrast to those in cattle (Gwida *et al.* 2012). The seroprevalence of brucellosis in camel can reach 40% in some areas, which is a risk for human health and also can increase the spread of infection through uncontrolled trade of asymptomatic animals (Sprague *et al.* 2012). Frequent traveling of camels through different countries in the Arabian Peninsula could constitute a transmission risk across borders. Camels seem to become infected from small ruminants and cattle, as according to several studies of isolation of *Brucella* from cattle, they can be infected by the same *Brucella* species.

Consumption of camel milk is common in the Middle East and Horn of Africa, and human brucellosis cases due to consumption of contaminated camel milk are reported (Rhodes *et al.* 2016, Mousa *et al.* 1988, Shimol *et al.* 2012). Camel's milk possesses

superior storage life than other milk, because of high content of proteins inhibiting bacteria (Farah et al. 2004). It is also thought to have medicinal properties (Seifu 2007) and an aphrodisiac effect in part of Ethiopia ([Knoess, 1984](#)).

Isolation of *Brucella* from camel's milk is also described (Dawood 2008, Gameel *et al.* 1993, Abou-Eisha 2000 Hamdy and Amin 2002). There is no study about characterization and mechanisms of shedding of *Brucella* in camel's milk, or tropism to the udder. Nevertheless, camel could have an important role in brucellosis epidemiology by spreading the disease in several countries.

2.5. Other species

Brucellosis in pigs is often caused by *Brucella suis*. There is no hard evidence of shedding *Brucella* in sow's milk, but piglets can become infected by ingesting their mother's milk as the bacterium is shed in the milk of infected sows (Alton 1990). As pig's milk is not consumed, it does not represent an issue concerning contamination of human or other animals.

Horses (*Equus caballus*) and donkey (*Equus asinus*) are susceptible to *Brucella*. Brucellosis is mainly responsible of inflammation of supraspinous and supra-atlantal bursa ("fistulous withers", and "poll evil"), arthritis, intermittent lameness and lethargy (Megid et al. 2010). Although milk from horse and donkey are consumed in some countries, it has never been associated with human contamination. To our knowledge excretion of *Brucella* in horse and donkey's milk has never been reported.

Isolation of *B. ceti* from milk of dolphin (*Stenella coeruleoalba*) was reported once, and could be source of infection for newborn or human in close contact (Hernandez-Mora et al. 2008).

3. Survival of *Brucella* in milk and dairy products

3.1. Presence of *Brucella* in naturally infected milk and dairy products

Milk is suitable medium for growth of many bacterial species, including pathogens. As mentioned above, some outbreaks of human brucellosis are related to consumption of raw milk and cheeses contaminated with *B. abortus* and *B. melitensis* following excretion of these bacteria in milk of contaminated animals. *Brucella* spp. have been isolated from milk, cheese, yogurt, cream, butter and ice cream from milk of different origin (Flores-Castro and Baer, 1980). To understand the real impact of unpasteurized dairy product in brucellosis epidemiology, several studies looked for the survival rate of *Brucella* in naturally contaminated milk and dairy products. For example, Samaha in 2008 showed that *B. melitensis* bv 3 in naturally infected milk survived 5 days at 4°C and 9 days when kept at -20°C. In Kareish cheese (Egyptian fresh cheese from cow's milk) manufactured from naturally infected raw milk, *Brucella* survived 2 days when kept at 4°C and 4 days at room temperature (Samaha 2008).

In fresh white cheese from Iran, produced from raw goat and sheep's milk naturally contaminated, *B. melitensis* bv1 was found in average 2120 organisms/g of cheese. Number of *Brucella* decreases until 9th week when no *Brucella* could be isolated, while pH values remained between 5-7,6 (Sabbaghian 1975). In this study, a seasonal fluctuation of infected cheese is described and correlated with the seasonal distribution of human brucellosis cases of the country, highlighting the importance of indirect contamination via consumption of cheese.

It is difficult to exactly describe the survival rate of *Brucella* in dairy product as the initial load and the storage conditions are not precisely known. Thus numerous experiments are conducted with artificially inoculated milk and cheese to understand the behavior of *Brucella* spp. during changes of properties of the milk.

3.2. Impact of changes of properties of the milk during dairy products' fabrication on *Brucella* survival

Cheese is derived from milk after coagulation of the milk protein casein. After coagulation, or curdling step, solid curds and liquid whey are separated and solids are pressed, and then ripened. Some have molds on the rind. There are hundreds of types of

cheese, different by origin of milk, temperature treatment, fat content, bacteria and mold, and aging.

Each process includes different factors which may impact the survival of pathogens in cheese (Temperature, decrease of pH, decrease of ax and humidity, salinity), added to the difference of sensitivity from strain to strain.

3.2.1. Different protocols of artificially inoculation of milk and dairy products

As incubation period of brucellosis may last from few days to several weeks, it often needs long epidemiological investigations to incriminate milk or cheese as the source of infection. Moreover isolation of pathogens from food (including dairy products) is more difficult than from medical samples as bacterial load is often lower and exposure to stressful conditions during processing and storage might lead to difficult growth start. In Table 2 are listed some experiments conducted with artificially contaminated milk followed by specific cheese proceeding. According to the type of study, authors were able to highlight the importance of different factors regarding survival of *Brucella* during cheese or yogurt making.

Nevertheless, it is sometimes difficult to compare data as numerous factors are unique to each experiment. For example, while some experiments are conducted with inoculation of the raw milk, some other inoculated directly *Brucella* in cheese. The strain and the initial load are also often different. Moreover, the measure of *Brucella* spp. survival rate is not always calibrated, indeed some experiments include enrichment steps and some don't, and different methods of quantification are used like plating on different agar medium, inoculation to Guinea pigs or quantitative PCR.

Comparison of artificially inoculated dairy product with naturally infected ones is also tricky. Indeed, the degree of contamination occurring naturally is not exactly known, but suspected no to be as high as concentration used in experimentally infected milk. Moreover, *Brucella* spp. are considered as bio-terrorism agent in numerous countries and must be handled in BSL-3 facilities. So, it is very complicated to reproduce the exact environment needed to produce specific cheese, including specific flora or percentage of humidity present in ripening cellar. Furthermore, field strains may be more adapted to cheese process than laboratory cultures more often used in experiments.

Product	<i>Brucella</i> spp.	Strain	Bacterial load	Process	Lactic flora	Quantification method	Reference
Milk	<i>B. abortus</i>	5532, 5549, 80 (milk), H-1 (human)	$1,45.10^6$ cfu/ml				Carpenter and Boak, 1924
Whey (cheddar)	<i>B. abortus</i>		10^6 to 10^7 cfu/ml				Davies and Casey, 1973
TSB, pasteurized milk, yogurt, soft cheese, buttermilk	<i>B. melitensis</i>	Human isolate	10^8 cfu/ml				El-Daher <i>et al.</i> , 1990
Skimmed milk 12%	<i>B. abortus</i>	544	10^5 cfu/ml and 10^8 cfu/ml	Fermentation yaourt	<i>Streptococcus salivarius thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii bulgaricus</i>		Zuñiga-Estrada <i>et al.</i> , 2005
milk	<i>B. melitensis</i>	Biovar 3	2.10^7 cfu/ml	Kareish cheese and yogurt	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> and <i>Streptococcus thermophilus</i>	20ml milk, sediment-cream plating and inoculation to Guinea pigs	Samaha 2008
milk	<i>B. melitensis</i>	16M	5.10^9 cfu/ml	Goat milk cheese	<i>Lactococcus lactis lactis</i> , <i>L. lactis cremoris</i>	10g of cheese or 10ml milk, plating on Farell medium	Mendez-Gonzalez <i>et al.</i> , 2011
UHT milk, raw milk, certified raw milk, yogurt, mineral water	<i>B. abortus</i> bv1	1119-3	5.10^7 cfu/ml			Plating 100ul on Farell medium	Falenski <i>et al.</i> , 2011
	<i>B. melitensis</i>	16M					
Milk, cheese	<i>B. neotomae</i>		10^6 cfu/ml or 10^7 cfu/g			qPCR	Lusk <i>et al.</i> , 2013
raw cow's milk	<i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i>	NCTC 10863 and 16M	10^4 cfu/ml and 10^6 cfu/ml	Afyon Tulum cheese		25g of cheese, plating in Farell medium after enrichment	Kara and Akkaya 2015
Raw and pasteurized milk	<i>B. abortus</i>	2308	6.10^8 cfu/ml (fresh cheese) or 12.10^8 cfu/ml (ripened cheese)	Elaboration of fresh or ripened cheese	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> and <i>Lactococcus cremoris</i> starter cultures	10g of cheese or 10ml of milk plating on Farell medium	Santiago-Rodriguez <i>et al.</i> 2015

Table 2: Experiment of artificially inoculated milk regarding survival of *Brucella* spp. during dairy products proceeding

3.2.2. Effects dairy product production on *Brucella* survival *in vitro*

In experimentally infected raw milk isolation of *B. melitensis* was possible until day 7 at 4°C and day 10 at -20°C with an inoculation load of 2.10^7 CFU/ml (Samaha 2008). *B.*

abortus survived more than 7 days in raw milk (cattle) at 4°C with a load of $3 \cdot 10^7$ CFU/ml at the beginning (Santiago-Rodriguez et al. 2015). In whey inoculated with 10^6 - 10^7 CFU/ml of *B. abortus*, at room temperature, pH and bacterial load decrease until day 4 (pH from 5.9 to 4, bacterial load $8.8 \cdot 10^6$ to $6.8 \cdot 10^3$ CFU/ml) with no survival after. *B. abortus* is able to survive up to 10 days in yogurt when stored at 4°C at the end of the fermentation period (pH= 4.0) (Zuñiga-Estrada et al., 2005). Diaz-Cinco et al., 2000, described survival during the process of fabrication of “Mexican-style” white soft cheese during 21 days. But in another study, *B. melitensis* was recovered even from fresh cheese conserved at 4°C after 8 weeks of elaboration (Abdallah et al., 2007). In ripened goat cheese *Brucella* spp. survive up to 3 months (Clasessens and Ring, 1996) (Roux 1979). Vaccinal strain *B. melitensis* Rev1 survives up to 21 days in ripened goat cheese (Ozturk et Ring, 1996). Table 3 records some important results about survival of *Brucella* spp. in different type of milk and dairy products.

Despite Carpenter and Boak do not observe replication of *B. abortus* in milk nor cream (Carpenter and Boak, 1924), recent studies demonstrated the contrary. In UHT milk, inoculation of $5 \cdot 10^7$ CFU/ml *B. abortus* allowed the survival of the bacteria up to 87 days with a phase of growth until day 46 and then concentration remain at $6.7 \cdot 10^8$ CFU/ml, pH remaining around 6.9 during all the experiment, highlighting the capacity of *Brucella* to replicate in milk artificially inoculated with small amount of *Brucella* (Falenski et al. 2011). Nevertheless, *B. melitensis* seem not replicating in cheese (Mendez-Gonzalez et al., 2011).

As mentioned above, it is important to consider the bacterial load inoculated at the beginning of the experiments, indeed *B. abortus* was not isolated after 10 days when inoculated at 10^5 CFU/ml while it was recorded until day 22 when inoculation dose reaches 10^8 cfu/ml (Zuñiga-Estrada et al., 2005).

The growth of different strain of *Brucella* in various concentration of fat, pH and a_w at different temperatures was investigated.

3.2.2.1. Effect of fat concentration

The effect of fat concentration on the survival of *Brucella* in dairy product is not elucidated. In a study with experimentally inoculated yogurt with $5 \cdot 10^7$ CFU/ml of *B. abortus*, *Brucella* did not survive after 2 days, 3 days and 5 days when fat content was 10% 1.5% and 3.5% respectively (with pH remaining constant around 4.2) (Falenski et al.

2011), while Salem *et al.* 1977 concluded its experiments of inoculated cheese with different concentrations of fat, that fat content could lead to longer survival of the pathogen. In cream, *B. abortus* survived up to 8 days, and in butter up to 81 days.

3.2.2.2. Effect of pH on survival of *Brucella*

During cheese fabrication, pH varies: milk pH is 7, then usually pH decreases to 4 during curdling, and remains around 4 or increases to 5 during ripening (goat's milk in Mendez-Gonzales *et al.* 2011, cow's milk in Santiago-Rodriguez *et al.* 2015). In yogurt, pH is around 3-4 (initial pH > 4, then decreases < 4 within 48h and < 3 within 72h) and cheese 4-6.

Brucella spp. is known to possess constitutive mechanisms for osmoregulation, active during exposure to acid conditions (Hernandez-Castro *et al.* 2003). Low pH is considered as a stressful condition which is frequently faced by *Brucella* during intracellular life cycle and extracellular environment. *B. abortus* in PBS and citric acid survive at least 8 days at pH 4, with little to no change of viability between pH 4.5 and 7, but bacteria are killed within 3 days at pH 3 (Davies and Casey 1973). Fernandez-Escartin and Garcia 2001 suggest that the optimum pH for *Brucella* survival is 6.6-7.4, with maximum pH 8.7 and minimum pH 5.8.

Changes in the pH in milk and dairy products affect *B. abortus* and *B. melitensis* survival; pH of dairy products plays a critical role in the survival and growth of *Brucella* spp. (El Daher *et al.*, 1990, Samaha 2008).

As described above *Brucella* should be killed at very low pH. Indeed, some studies compare of survival of *B. melitensis* inoculated in milk, yogurt or *Brucella* broth when pH decreases. *Brucella* spp. are reported to survive for more than 4 weeks in specific broth at a pH ≥ 5.5 , but not in a pH < 4. Concentration of *Brucella* inoculated in yogurt at 10^8 CFU/ml, decreases to $3.5 \cdot 10^2$ CFU/ml at 48h, and is not detectable anymore at 72h. In soft cheese, behavior of *Brucella* spp. is the same as in yogurt (pH of soft cheese decreases from 6.15-6.8 to 4.9-5.5 within 48h and below 4 within 72h) (El Daher *et al.*, 1990). However in several studies, *Brucella* are still isolated in cheese made from artificially inoculated milk with low pH below. Indeed, *B. abortus* was able to survive for up to 22 days in fermented milk, during storage when milk was inoculated with 10^8 CFU/ml, in spite of the low pH values (3.8 to 4), (Kara and Akkaya 2015, Ozturk and Nazli 1996; Dincoglu 2002, Zuniga-Estrada *et al.* 2005).

Presence of lactic acid bacteria (used in the manufacture of fermented products), which produce lactic acid, contribute to inhibit the growth of pathogens as *S. aureus* et *Listeria monocytogenes* and *Brucella* spp..

The degree of acidification depends on the ambient temperature. With summer temperatures, the whey (bovine) maintains its temperature, thus falling of the pH and death of *Brucella*. In winter, little effect on pH, hence survival of *Brucella* (Davies and Casey, 1973).

3.2.2.3. Effect of a_w on survival of *Brucella*

Reduced a_w (water activity) is used to control microbial growth in foods. The ripening time leads to decrease of survival of *Brucella* in cheese. Decrease of a_w may influence viability of *B. melitensis* in ripening cheese at 24°C (Mendez-Gonzalez et al. 2011). *Brucella* and *E. coli* seem able to survive with a_w value lower than 0.89 (Montville and Mathews 2011). Beside, *B. melitensis* appears not to multiply in cheese, but the higher the water content (water activity) in cheese is, the longer the survival time can be expected. During the traditional cheese manufacture process, *B. melitensis* has the ability to survive low temperatures and sublethal levels of pH (5) and a_w (0.90) at 24°C, but the synergy between low a_w , low pH, and ripening periods of at least 20 days appeared sufficient to ensure *Brucella*-free products (Mendez-Gonzalez et al. 2011). It has been proposed that at pH 4, the persistence of the bacterium is not affected when a_w is higher than 0.90 (Shadbolt et al., 2001; Zuniga-Estrada et al., 2005)

3.2.2.4. Effect of ripening temperature

The ripening temperatures (4°C and 24°C) had a statistically significant correlation with the survival of *B. abortus* and *B. melitensis* inoculated in raw milk ($p < 0.01$), and bacteria seem to survive longer at 4°C (Santiago-Rodriguez et al. 2015, Mendez-Gonzalez et al. 2011).

3.2.2.5. Difference of survival between strains

B. abortus appears to survive longer than *B. melitensis* in inoculated UHT milk (Falenski et al. 2011, Guerra 1957). In yogurt made from buffalo's milk containing 7.5% fat, *B. abortus* survived at 4 °C for 30 days while *B. melitensis* did so for 20 days (Ghoniem

1972). On the other side, *B. abortus* strains 5 and 68 survived in cream at 2°C 118 and 100 days respectively while *B. melitensis* strain 185 and 63/9 survived 122 and 100 days respectively. In another study, culture strains of *B. abortus* (5532 and 5549) on one hand, bovine strain (strain 80) and human strain (H-1) of *B. abortus* on the other hand inoculated into cream, survived 8 days and 10 days respectively (Carpenter and Boak 1924). Moreover, Plommet *et al.* observed that *B. abortus* appeared more susceptible in vivo than experimentally (Plommet *et al.*, 1988). Survival appears to be different between species and strain belonging to the same species.

When milk is inoculated with small quantities of bacteria, *Brucella* multiplies and persists. Interestingly growth rates were greater when inoculation load was smaller (5.10^3 CFU/ml) (Falenski et al. 2011).

3.2.2.6. Importance of pasteurization

As many Gram-negative non spore-forming bacteria, *B. abortus* is killed in milk after pasteurization (heating 71.7°C during 15sec). At low concentrations in liquid media, *Brucella* spp. are quite sensitive to heat. Thus, suspensions diluted in milk are easily inactivated by pasteurization (high-temperature short-time or flash methods) or by prolonged bubbling (10 min) (Davies and Casey, 1973). As mentioned above, survival of *Brucella* in milk and dairy products depends on type and age of the product (cream, yogurt, cheese...), moisture, temperature, pH, salinity, bacterial load and other microorganisms present, and storage conditions (Mendez-Gonzalez et al. 2011). Some *Brucella* spp. could survive despite decreases of pH and a_w or increases of salinity during cheese proceeding, even after long ripening step. Pasteurization of milk before consuming or cheese proceeding is the most appropriate method to avoid human contamination in brucellosis endemic areas.

ANNEXES

<i>Brucella species</i>		Product	Survival time	Temperature (°C)	pH
<i>B. abortus</i>	Milk	-	5-15 sec	71,7	4,0
		-	<9h	38	
		-	24 h	25-37	
		Raw	< 4 days	5-8	3,8-4,0
		Fermented	<23 days	4	
		UHT	10 months	20	
		-	18 months	0	
	Whey	-	< 4 days	17-24	5,9
		-	>6 days	5	
	Cream	-	8-10 days	8	
		-	6 weeks	4	
	Ice cream	-	30 days	0	
	Butter	-	< 192 days	8	
	Yoghurt	-	1 day	3	3,6
		10% fat	< 2 days	5	4,2-4,3
		1,5% fat	< 3 days	5	4,2-4,3
		3,5% fat	< 5 days	5	4,2-4,3
		-	<10 days	4	<4,0
		buffalo 7,5% fat	< 30 days	4	
	Cheese	Camembert	<21 days		
		various	6-57 days		
		Cheddar	6 months		
<i>B. melitensis</i>	milk	Pasteurized	<24 hours	25-37	< 4,0
		UHT	10 months	20	
	Buttermilk	-	< 4 h		
	Cream	-	4 weeks	4	
	yoghurt	yoghurt	< 72 h		
		buffalo yoghurt 7,5% fat	< 20 days	4	
	Cheese	soft white cheese	< 72 h		
		Feta	4-16 days		
		Roquefort	< 20 days		
		ripened goat cheese	> 20 days	24°C	
		Erythrean	44 days		
		White	1-8 weeks		>4,0
		Pecorino	<90 days		
		ripened goat cheese	< 90 days		
		Cheese: various	15-100 days		
<i>B. abortus & B. melitensis</i>	Cheese	Roquefort	20-60 days		

Table 3: Survival of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in milk and dairy products

References

- Abd Al Azeem et al. 2012
 Abdallah et al. 2007
 Abou-Eisha 2000
 Akhtar & Mirza 1995
 Al-Kharfy 2001,
 Alexander and Cheville 1981
 Alnakip 2014
 Alton 1990
 Alton 1994
 Aparicio 2013
 Barroso Espadero et al. 1998
 Bhaskar et al. 1998
 Bielefeldt Ohmann and Babiuk 1984
 Borriello et al. 2006
 Boyd and Reed 1960
 Braude 1951
 Campbell et al. 1994, Barthel et al. 2001
 Capparelli et al. 2009
 Carmichael and Bruner 1968
 Carpenter 1924
 Carvalho Neta et al. 2010
 Celebi et al. 2007
 Corbel 2006
 Corner 1987
 Das et al. 1990
 Davies and Casey 1973
 Dawood 2008,
 deFigueiredo 2015
 Denny 1973
 Di Giannatale et al. 2008
 Diaz-Cinco *et al.* 2000
 Dincoglu 2002
 Doganay et al. 2001
 Dokuzoguz et al. 2005
 Ebadi, 1971
 El Daher *et al.*, 1990
 Ewalt et al. 1997
 Falenski et al. 2011
 Fensterbank 1987
 Fosgate et al. 2002
 Foster et al. 2007
 Franco et al. 2007
 Fulton 1941
 Gameel et al. 1993
 Gasse et al. 1963
 Ghoniem 1972
 Giannacopoulos et al. 2002
 Grillo et al. 1997
 Guerra 1957
 Gwida et al. 2012
 Hamdy and Amin 2002
 Hernandez-Castro et al. 2003
 Hernandez-Mora et al. 2008
 Jouve, 1952
 Knoess, 1984
 Lapraik et al. 1975
 Leclerc *et al.*, 2002
 Leech et al. 1964
 Letesson et al. 2017

Lindahl-Rajala et al. 2017
Longo et al. 2009
Manthei and Carter 1950
Martinez et al. 2014
Meador et al. 1989
Meador et al. 1989 (2)
Megid et al. 2005
Mellado et al. 2014
Mendez-Gonzalez et al. 2011
Miranda et al. 2016
Miyashiro et al. 2007
Montville and Mathews 2011
Moreno et al. 2014
Morgan et al. 1860
Mousa et al. 1988
Musallam et al. 2016
Nicoletti 1980
O’Leary et al. 2006
Ozturk and Nazli 1996
Pacheco et al. 2012
Paixao et al. 2007
Palanduz et al. 2000
Pappas et al. 2006
Perdrix and Chirol 1975
Philippon et al. 1971
Plommet et al. 1973
Rankin 1965
Ray et al. 1988
Renoux, 1961
Rhodes et al. 2016
Roguinski et al. 1972
Ron-Roman et al. 2017
Rossetti et al. 2013
Roux 1979
Ruben et al. 1991
Sabbaghian 1975
Samaha 2008
Santiago-Rodriguez et al. 2015
Schoenaers 1976
Scholz et al. 2008,
Scholz et al. 2010
Scholz et al. 2016
Seifu 2007
Shimol et al. 2012
Sousa et al. 2017
Sprague et al. 2012
Stoenner and Lackman 1957
Sun et al. 2016
Tae et al. 2012
Uzal et al. 2000
Verger 1985
Wareth et al. 2015
Whatmore et al. 2014
Wilesmith 1978
Xavier et al. 2010
Zowghi 1990
Zuñiga-Estrada et al. 2005

Annexe 5 :

Mode opératoire ID Gene TM Brucella spp Triplex, IDVet, France

ID Gene™ Brucella spp Triplex

Ref: IDBRU-50 / IDBRU-100
50 / 100 tests



Système de détection Qualitatif

de *Brucella spp* par PCR en temps réel
Matrices : Écouillons cervicaux, vaginaux et placentaires, lait, organes et tissus

Usage *in vitro*



IDvet Genetics, 310, rue Louis Pasteur - Grabels - FRANCE
Tél: + 33 (0)4 67 41 49 33 - Fax: + 33 (0)4 67 45 36 95
www.id-vet.com - E-mail: info@id-vet.com

Informations générales

• Caractéristiques

Le kit **ID Gene™ Brucella spp** (IDBRU) est un système de détection par PCR en temps réel, qui permet l'amplification d'une séquence cible du génome de *Brucella spp*, agent pathogène responsable de la Brucellose. Il s'agit d'un **système Triplex qualitatif**, qui permet pour chaque échantillon, l'amplification simultanée de l'ADN de *Brucella spp*, d'un témoin interne endogène et d'un témoin interne exogène. Le kit IDBRU contient un témoin positif d'amplification (PLS-BRU) et un témoin non cible exogène (NTPC-BRU) qui doit être ajouté à chaque échantillon avant l'étape d'extraction. Le NTPC-BRU permet d'évaluer l'efficacité de l'extraction et de détecter la présence d'inhibiteurs de la PCR.

Ce kit est utilisable sur des écouillons cervicaux, vaginaux et/ou placentaires, organes ou tissus et sur matrice lait.

• Composition du kit et conditions de stockage

Le kit IDBRU contient les réactifs présentés dans le tableau ci-dessous.

Référence	Composant	Volume	Description
PLS-BRU	Plasmide	50 µl (bouchon bleu)	Acide nucléique synthétique titré contenant la séquence cible de <i>Brucella spp</i>
NTPC-BRU	Témoin Positif Non Cible exogène	2200 µl 1 flacon	Bactérie non pathogène, mime de la cible. Pastille lyophilisée à reprendre dans 2200 µl d'eau distillée ou Nuclease-free.
ARM-BRU	Mélange Réactionnel d'amplification (bouchon blanc)	400 µl 1 ou 2 tubes	Mélange réactionnel contenant la Taq polymérase et les oligonucotides pour la détection de <i>Brucella spp</i> et des témoins positifs non cibles endogènes et exogènes.

Tous ces composants sont à conserver à 5 -10°C. Il est recommandé de préparer des aliquotes (minimum 100 µl) afin d'éviter plus de 3 cycles de congélation/décongélation.

• Matériel nécessaire mais non fourni dans le kit

Le matériel utilisé doit être de qualité adaptée à la biologie moléculaire.

Instrument d'amplification :

Thermocycleur Temps Réel permettant de lire les fluorophores suivants: FAM, HEX ou VIC et Cy5.
Exemples de thermocycleurs compatibles: CFX96™, Chromo4™ (Biorad), LC9480 I, LC9480 II, LC986 Roche, AB97500 and Rotor-Gene Q (Qiagen). Veuillez nous contacter pour l'utilisation d'autres thermocycleurs.

Consommables :

- Pipettes de précision capables de délivrer des volumes de 1 µl à 1000 µl
- Pointes Nuclease-free à litières
- Tubes 1,5 ml
- Plaques PCR 96 puits, barrettes ou microtubes PCR de qualité optique compatibles avec le thermocycleur utilisé et films adhésifs ou bouchons adaptés

Réactifs :

- Eau distillée ou Nuclease-free

Remarques et précautions d'emploi

Le matériel utilisé contenant moins de 0,1% de substances dangereuses ou cancérogènes, les fiches de données de sécurité (FDS) ne sont pas exigées. Cependant, il est recommandé de prendre les précautions appropriées avec tout produit biochimique et de porter des équipements adaptés.

Contrôles d'extraction et d'amplification

Le nombre de témoins à analyser selon le type de PCR est décrit dans le tableau ci-dessous :

Témoins positifs

Le kit d'amplification IDBRU contient les témoins positifs suivants :

- **Témoin Positif Non Cible exosome (NTPC-BRU) :**

Ce témoin permet d'évaluer l'efficacité de l'extraction d'un échantillon et de mettre en évidence la présence d'inhibiteurs de l'étape d'amplification.

Il est ajouté à tous les échantillons, y compris les témoins, avant extraction.

- **Témoin Positif Non Cible endogène (NTPCeu) :**

Ce témoin est présent de manière constitutionnelle dans les cellules de l'échantillon testé. Il permet de valider la lyse cellulaire et l'amplification du gène non cible. Il permet également de valider la présence de cellules et donne une indication sur l'état du prélèvement. Ce témoin peut indiquer la présence d'inhibiteurs de la phase d'amplification.

- **Plasmide BRU (PLS-BRU) :**

Ce témoin est composé d'une séquence cible d'ADN synthétique calibré en copesul. Il permet de valider l'amplification de la séquence d'ADN cible.

Témoins négatifs

- **Témoin négatif d'extraction (NEC) :**

Il est conseillé d'inclure un témoin négatif d'extraction NEC à chaque cycle d'analyse. Ce témoin est préparé et extrait de la même manière que les échantillons à tester mais il ne contient pas d'ADN de la cible *Brucella spp.* Le volume occupé par l'échantillon peut être remplacé par une matrice négative ou de l'eau Nuclease-free.

- **Témoin négatif d'amplification (NAC) :**

Ce témoin correspond au dépli de 8 µl de mélange réactionnel d'amplification (ARM-BRU) et 5 µl d'eau Nuclease-free. Il est inclus dans chaque cycle d'analyse et permet de contrôler l'absence de contaminant étiré.

Mode opératoire

Extraction de l'ADN bactérien

L'ADN de *Brucella spp.* doit être extrait des échantillons avant d'être amplifié par PCR en temps réel.

IDvet Genetix recommande, au choix, une gamme de kits d'extraction validés selon la norme NF U47-600 :

Description	Nom du produit	Code produit
Système d'extraction en billes magnétiques	ID Gene™ Mag Universal Extraction Kit	MAG132/MAG384
	ID Gene™ Mag Fast Extraction Kit	MAGFAST384
Système d'extraction en colonnes	ID Gene™ Spin Universal Extraction Kit	SPIN50/SPIN250

Note : Veuillez contacter sales@idvetgenetix.com si d'autres systèmes d'extraction non validés selon la norme NF U47-600 sont utilisés.

Extraction des témoins

Le volume de prise d'essai pour l'extraction du témoin est décrit dans le tableau ci-dessous.

Important :

- Le volume indiqué est valable quel que soit le système d'extraction utilisé.
- Le témoin doit être extrait en même temps que les échantillons à tester.

Témoin	Volume
NTPC-BRU	20 µl à ajouter au NEC et à chaque échantillon

Note : Si le NEC est préparé avec une matrice négative, se reporter à la notice du kit d'extraction correspondant pour la préparation de ce témoin.

Préparation de la réaction d'amplification par PCR en temps réel

1. Préparer un plan d'analyse des échantillons et contrôles, en prenant soin si possible d'éloigner le contrôle positif (PLS-BRU) des autres échantillons.
2. Décongeler le kit IDBRU idéalement à +5°C (+ 3°C) (protocole adapté réfrigéré ou autre) ou à température ambiante (+21°C ± 5°C) s'il est utilisé dès que la décongélation est complète.
3. Homogénéiser le tube ARM-BRU (vortex) et le centrifuger brièvement.
4. Distribuer 8 µl d'ARM-BRU par puits (barrette ou microplaque adaptée au thermocycleur utilisé)
5. Ajouter dans le mix réactionnel :
 - 5 µl d'ADN extrait de chaque échantillon à analyser
 - 5 µl du PLS-BRU

- 5 µl d'extrait de NEC
 - 5 µl d'eau Nuclease-free (NAC)
6. Couvrir la plaque ou les barrettes avec un film adhésif ou des bouchons adaptés.

Programmation de la phase d'amplification

1. Programmer sur le thermocycleur la lecture des détecteurs suivants pour chacun des puits à analyser :

Cible	Canal de lecture	Quencher
Séquence spécifique de <i>Brucella spp.</i>	FAM	non fluorescent
Séquence spécifique des cellules bactériennes	VIC/HEX	non fluorescent (compatible VIC/HEX)
Séquence spécifique du même bactérien (NTPC-BRU)	CYS	non fluorescent

Note : Pour les appareils nécessitant une référence interne, le mélange réactionnel d'amplification IDBRU contient du ROX.

2. Choisir parmi les 2 programmes d'amplification validés par IDvet Genetix :
 - Un programme classique qui permet de réaliser les PCR de différents fournisseurs lors d'une même séance.
 - Ou un programme rapide.

Les étapes pour chaque programme sont décrites dans le tableau ci-après :

	Programme d'amplification classique	Programme d'amplification rapide	Nombre de cycles
(1) Activation de la polymérase	10 min à 95°C	2 min à 95°C	1
(2) Dénaturation de l'ADN / Elongation	15 secondes 95°C 60 secondes 60°C	10 secondes 95°C 30 secondes 60°C	40

Note : La lecture de la fluorescence est réalisée à la fin de la phase d'élongation à 60°C.

3. Sélectionner un volume final de 12 µl par PCR.

4. Si différents volumes sont combinés lors d'une même séance, indiquer au thermocycleur le plus grand volume de la plaque.

Placer la plaque dans le thermocycleur et lancer le programme.

Validation et interprétation des résultats

Validation de l'essai

L'interprétation des résultats est réalisée à l'aide des valeurs de Cq (Quantification cycle) aussi nommé C_t (Threshold cycle) de chaque échantillon obtenu pour chacun des détecteurs. Le test est validé selon les critères suivants : **si l'un des critères n'est pas atteint, l'analyse ne peut pas être interprétée de manière fiable.**

Contrôles	Ajout du NTPC-BRU	Résultats attendus	Critère d'acceptabilité
PLS-BRU	-	Détecté en FAM	Présence d'une courbe caractéristique
NEC	+	Détecté en VIC/HEX et CYS si utilisation d'eau matrice négative	Se référer à la valeur de Cq indiquée sur la notice de contrôle qualité du lot correspondant. Pour le signal VIC/HEX, présence d'une valeur de Cq comprise dans la fourchette de contrôle qualité du lot correspondant
NAC	-	Aucune détection	Pour le signal VIC/HEX, présence d'une courbe caractéristique

Se référer aux valeurs des différents points de gamme indiquées dans la fiche de Contrôle Qualité du lot utilisé pour le test. Note : Le témoin interne endogène peut potentiellement ne pas être amplifié dans la matrice fécale. Dans ce cas de figure, le témoin n'est pas interprétable.

• Proposition d'interprétation des résultats QUALITATIFS

Pour chaque échantillon analysé, les résultats peuvent être interprétés selon les propositions suivantes :

Type d'analyse	Echantillon	Signal BRU	Signal NTPC-BRU	Interprétation
Qualitative	Individuel	Détecté	Détecté ou Non détecté	L'échantillon est considéré comme Positif pour la Brucellose
		Non Détecté	Détecté	L'échantillon est considéré comme Négatif pour la Brucellose
		Non Détecté	Non Détecté ou Cq NTPC-BRU > Cq _{lim} +3	Réaction PCR inhibée

Echantillons non valides :

- Si le NTPCen n'est pas détecté, un problème est survenu lors du dépôt ou de l'extraction de l'échantillon. Dans ce cas, répéter l'analyse à partir de la phase d'extraction de l'échantillon.
- Si le NTPC-BRU n'est pas détecté mais que l'échantillon présente un signal d'amplification pour la cible *Brucella spp.* dans ce cas l'échantillon est considéré comme positif.
- Si Cq $\text{moyenne} > \text{Cq}_{\text{lim}} + 3$ ou que l'échantillon ne présente pas de signal d'amplification pour la cible *Brucella spp.* la réaction est inhibée. Dans ce cas, l'échantillon doit être testé de nouveau en suivant la procédure ci-dessous.

Procédure à suivre en cas de réaction PCR inhibée :

1. Diluer l'extrait d'ADN au 10^{ème} dans de l'eau Nucléase-free.
2. Répéter la réaction d'amplification sur 5 µl d'ADN dilué.
3. Si le NTPC-BRU est détecté, le résultat peut être interprété selon le tableau ci-dessus.
4. Si le NTPC-BRU n'est pas détecté, l'échantillon est à extraire de nouveau, ou le résultat est rendu interprétable.

Support technique et documentation

Pour toutes questions ou support technique, veuillez nous contacter à l'adresse suivante : SUPPORT.brucellose@id-vet.com
Pour toutes autres informations, visiter le site www.id-vet.com

Annexe 6 : Liste des communications effectuées durant le doctorat

Communications orales :

Holzapfel M, Girault G, Ponsart C, Keriél A, O’Callaghan D, Mick V. “**Brucellosis outbreak in different host in France in 2000**”. Journée des Doctorants ABIES, 26-27 avril 2017, Paris

Holzapfel M, Laffont M, Grewis L, Pourquier P, Ponsart C. “**Optimized Real-Time PCR assay for detection of *Brucella* spp. in milk from cattle and small ruminant**”. Congrès WAVLD (World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians), 7-10 juin 2017, Sorrento (Italie)

Holzapfel M, Girault G, Ponsart C, Keriél A, O’Callaghan D, Mick V. “**Characterization of *Brucella melitensis* biovar 3 field strains isolated from an outbreak involving different host species: what about host preference in *Brucella* ?**” Congrès « International Brucellosis Society Meeting », 2-3 décembre 2017, Chicago (IL, USA)

Holzapfel M, Girault G, Ponsart C, Keriél A, O’Callaghan D, Mick V. “**Characterization of *Brucella melitensis* biovar 3 field strains isolated from an outbreak involving different host species: what about host preference in *Brucella* ?**” DEBUG un club de DEbats autour de la BioinformatiqUe et la Génomique de l’ANSES, Décembre 2017, Maisons Alfort (France)

Communication écrite :

Holzapfel M, Laffont M, Grewis L, Pourquier P, Ponsart C. “**Optimized Real-Time PCR assay for detection of *Brucella* spp. in milk from cattle and small ruminants**”. Congrès « International Brucellosis Society Meeting » 2-3 décembre 2017, Chicago (IL, USA)

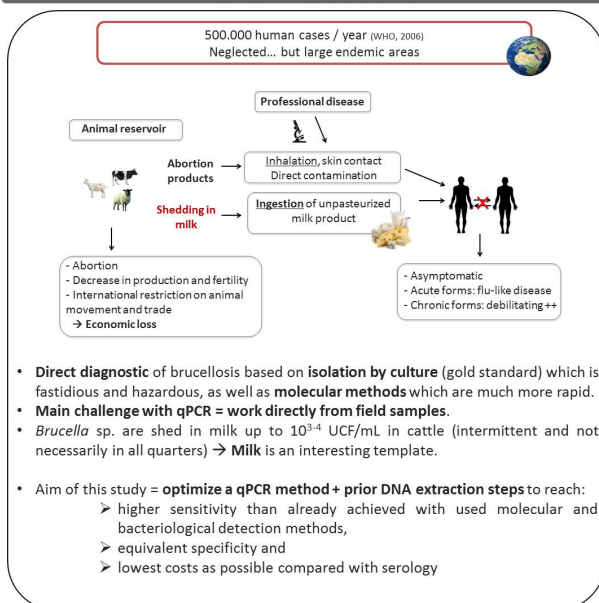
Optimized Real-Time PCR assay for detection of *Brucella* spp. in milk from cattle and small ruminants

Marion Holzapfel^{1,2}, Mathieu Laffont², Lise Grewis², Philippe Pourquier², Claire Ponsart¹

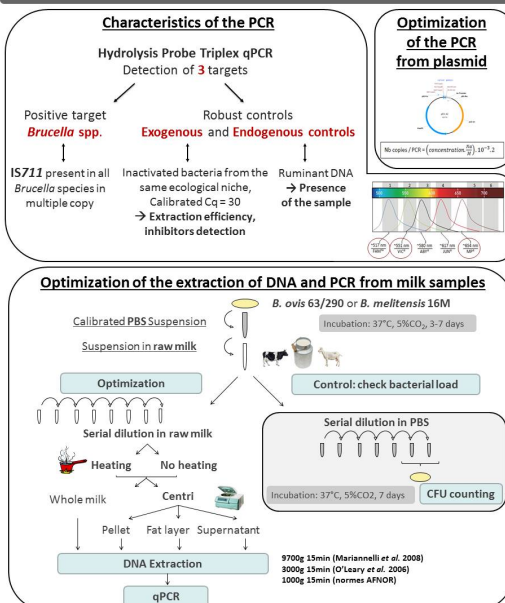
¹Paris-Est University/ANSES, EU/OIE/FAO & National Reference Laboratory for Animal Brucellosis, Animal Health Laboratory, Maisons-Alfort, France,

²Innovative Diagnostics IDvet Genetics, Montpellier, France

INTRODUCTION AND OBJECTIVES

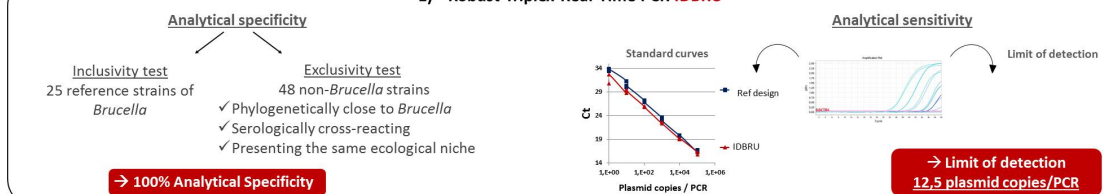


MATERIALS AND METHODS

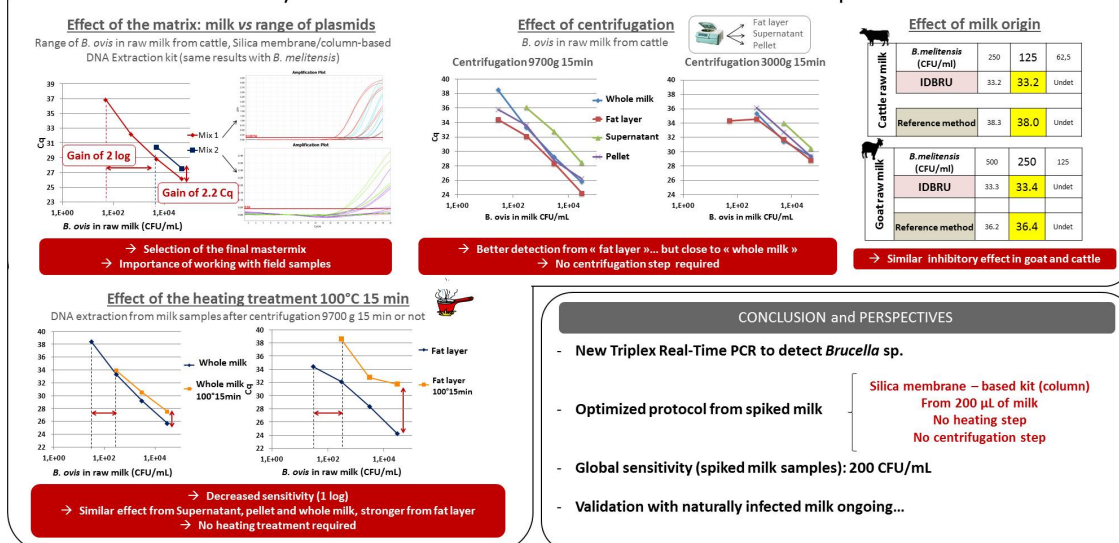


RESULTS – *Brucella* Triplex Real-Time PCR Assay

1) Robust Triplex Real-Time PCR IDBRU



2) Characteristics of the whole method « extraction + PCR » from milk samples



CONCLUSION and PERSPECTIVES

- New Triplex Real-Time PCR to detect *Brucella* sp.
- Optimized protocol from spiked milk
 - Silica membrane – based kit (column)
 - From 200 µL of milk
 - No heating step
 - No centrifugation step
- Global sensitivity (spiked milk samples): 200 CFU/mL
- Validation with naturally infected milk ongoing...