

***Salmonella abortusovis*, souche Rv6, véhicule vaccinal pour les ovins et les caprins**

A. BOURGOGNE (1), R. SANCHIS (1), M. HOFNUNG (2), M. PÉPIN (1)

(1) CNEVA SOPHIA ANTIPOLIS, Laboratoire de Pathologie des Petits Ruminants et des Abeilles
BP 111, 06902 Sophia Antipolis cedex

(2) Institut Pasteur, 28, rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15

RÉSUMÉ – *Salmonella abortusovis*, souche Rv6 (*Sao* Rv6), développée par l'INRA Nouzilly, est une souche de virulence atténuée, utilisée depuis 10 ans pour protéger les brebis contre la salmonellose abortive. Notre idée est de développer, en utilisant cette souche *Sao* Rv6, un nouveau véhicule vaccinal pour les petits ruminants. Pour cloner des antigènes, nous avons testé 5 systèmes d'expression dans la souche *Sao* Rv6 ; tous ces plasmides portent la "Maltose Binding Protein" (MBP) comme marqueur. Les 5 *Sao* recombinantes obtenues expriment la MBP *in vitro*, mais à des niveaux variables. Ces plasmides ne changent pas les caractéristiques bactériologique et biochimique des recombinants. Cependant, après immunisation de souris, seule *Sao* Rv6-pNTE a induit une réponse humorale anti MBP. Ce plasmide (pNTE) a été retenu pour la suite des expériences chez le mouton et pour les clonages. Les derniers résultats ont montré une réponse immunitaire des moutons vis-à-vis de la MBP. Le clonage de fragments des protéines gag de l'AECV (Arthrite-Encéphalite Caprine à Virus) a été entrepris : l'immunogénicité des fragments sera vérifiée chez la souris avant de tester les clones recombinants chez le mouton.

***Salmonella abortusovis*, strain Rv6, vaccinal vehicle in sheep and goats**

A. BOURGOGNE (1), R. SANCHIS (1), M. HOFNUNG (2), M. PÉPIN (1)

(1) CNEVA Sophia Antipolis, Laboratoire de Pathologie des Petits Ruminants et des Abeilles
BP 111, 06902 Sophia Antipolis cedex

SUMMARY – *Salmonella abortusovis*, strain Rv6 (*Sao* Rv6), developed by INRA Nouzilly, is a live attenuated vaccine, used since 10 years to protect ewes against abortive salmonellosis. Our aim is to develop, by using the strain *Sao* Rv6, a new vaccinal vehicle for small ruminants. Five expression systems were tested in *Sao* Rv6; all these plasmids carried Maltose Binding Protein (MBP) as marker. The five *Sao* recombinant expressed MBP *in vitro* at various levels. These plasmids did not modify the bacteriological and biochemical characteristics of recombinant bacteria. After immunization, only mice inoculated with *Sao* Rv6-pNTE developed a serum antibody response to MBP. The pNTE plasmid was selected to continue experiences in sheep and to clone antigens. The last results showed that sheep developed an antibody response against MBP. The cloning of fragments from gag proteins of CAEV (Caprine Arthritis-Encephalitis Virus) was undertaken : the immunogenicity of fragments will be checked in mice before testing the recombinant bacteria in sheep.

INTRODUCTION

Salmonella abortusovis, (*Sao*), un sérotype adapté aux petits ruminants, est une des causes majeures d'avortement chez les brebis. Pardon *et al* (1990), à l'INRA de Nouzilly, au début des années 80, ont mis au point une souche atténuée vaccinale : *Sao* Rv6, efficace dans les conditions expérimentales et naturelles. Un vaccin contenant cette souche est disponible depuis 1984 : Salmovis™ (Rhône-Mérieux, France).

Une nouvelle classe de vaccins appelée véhicules vaccinaux semble très prometteuse : le principe est d'utiliser une bactérie ou un virus comme porteur d'un antigène pour vacciner contre cet antigène. Ces véhicules ont été étudiés pour présenter des antigènes provenant de virus, de bactéries ou même de parasites. Les salmonelles peuvent ainsi constituer d'excellents véhicules bactériens en induisant une réponse humorale et cellulaire (Charbit *et al*, 1993).

A partir de cette idée, nous avons testé la faisabilité d'utiliser la souche *Sao* Rv6 comme véhicule vaccinal chez les petits ruminants. Dans une première phase, nous avons sélectionné un système d'expression. Au cours de la deuxième phase, nous avons cloné des fragments des protéines gag de l'AECV (arthrite-encéphalite caprine à virus = lentivirus) et inoculé ces recombinants chez la souris afin de déterminer l'immunogénicité des clones avant de les tester chez le mouton et la chèvre.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Le Pr. Hofnung (Institut Pasteur, Paris) nous a fourni les 5 plasmides utilisés dans cette expérience (Duplay *et al*, 1987). L'utilisation de la souche *Sao* Rv6 a été autorisée par l'INRA et Rhône-Mérieux.

1.1. EXPÉRIENCES *IN VITRO* ET CHEZ LA SOURIS

Après le transfert des plasmides dans *Sao* Rv6, la sélection des clones positifs a été faite par analyse des profils de

digestion des plasmides. Des tests biochimiques ont aussi été réalisés. La persistance *in vitro* des plasmides pour chaque clone a été mesurée.

Les souches recombinantes ont été inoculées par voie intrapéritoneale à des souris OF1 de 7 semaines. Des prises de sang hebdomadaires ainsi que des autopsies ont été réalisées.

1.2. EXPÉRIENCE CHEZ LE MOUTON

Les moutons, des mérinos croisés âgés de 7 mois, ont été inoculés, par voie sous-cutanée, avec la souche *Sao* Rv6 avec ou sans plasmide ou avec la protéine MBP purifiée. Les animaux ont été suivis bactériologiquement et sérologiquement pendant 3 mois (Berthon *et al*, 1994).

1.3. CLONAGE DES FRAGMENTS DE PROTÉINES GAG ET TEST DES CLONES *IN VIVO* CHEZ LA SOURIS

Grâce à des amorces de PCR, les protéines gag (p14, p17 et p25) de l'AECV ont été décomposées en fragments de 70 acides aminés environ. Ces mêmes amorces ont permis l'insertion des fragments dans le gène de la MBP en position 133 ou 303 afin de constituer des protéines chimériques (Martineau *et al*, 1992).

Les 7 *Sao* Rv6 recombinantes ont été inoculées à des groupes différents de 5 souris BALB/C (6 à 8 semaines). Les souris ont été suivies sérologiquement pendant 3 mois. Des sérologies anti-(i)-salmonelle, (ii)-MBP et (iii)-protéine gag ont été effectuées.

2. RÉSULTATS

2.1. EXPÉRIENCES *IN VITRO* ET CHEZ LA SOURIS

Après le transfert des plasmides dans *Sao* Rv6, l'expression de la protéine MBP a été vérifiée, puis quantifiée. L'inoculation des recombinants *Sao* chez la souris a permis de sélectionner un système d'expression, le pNTE, grâce aux résultats résumés dans le tableau 1.

Tableau 1
Résultats *in vitro* et *in vivo* chez la souris : sélection du plasmide pNTE comme vecteur d'expression

Plasmide	<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i> chez la souris			
	Persistance	Expression	Persistance	Anti-Salmonella	Anti-MBP	Numération ^(a)
pNTE	+	+++	++	++	+++	+
pPD _{140RI}	+	+	++	++	-	+
ITM ₁₃₃	+++	+/-	+	++	-	+
PNX	-	+/-	-	++	-	+
pTZ	-	+/-	-	++	-	+

(a) Les numérations ont été réalisées après sur le foie et la rate autopsie à J7, J14 et J28.

2.2. EXPÉRIENCE CHEZ LE MOUTON

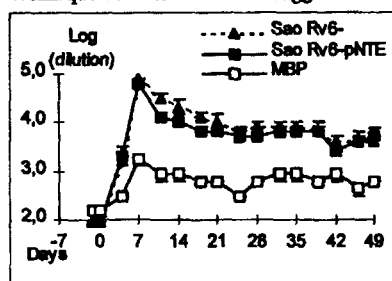
Les contrôles bactériologiques, ainsi que le contrôle sérologique anti-*Salmonella* (figure 1A), chez les animaux inoculés ont montré que le comportement de *Sao* Rv6 avec ou sans plasmide n'était pas modifié. Les animaux inoculés avec la souche *Sao* Rv6-pNTE, ont développé une bonne réponse anticorps contre la MBP (figure 1B).

2.3. RÉSULTATS DU CLONAGE DES FRAGMENTS GAG ET INOCULATION À LA SOURIS

Les 3 protéines gag ont été divisées en 8 fragments et les fragments ont été insérés en position 133 ou 303 de la MBP. Sept constructions ont été obtenues (tableau 2). Les 7 recombinants expriment correctement la MBP, mais dans 4 cas, il n'a pas été possible de révéler l'insert de 70 acides aminés provenant des protéines gag par Western blot alors que la séquence était correcte. Des résultats préliminaires ont montré une bonne réponse anti-*Salmonella* et anti-MBP chez la souris BALB/C.

Figure 1
Dosage de la réponse humorale chez les moutons

A/ Dosage de la réponse anti-*Salmonella* par la technique de référence : la séroagglutination



B/ Réponse anti-MBP révélée par ELISA

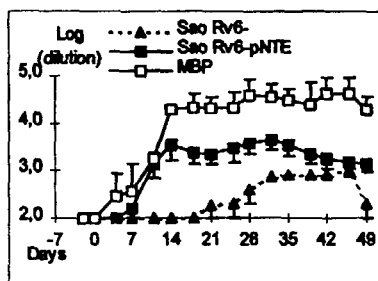


Tableau 2
Sélection des clones exprimant la MBP chimérique

Clones	Position	Fragment gag	Clones + en PCR	Western Blot		Séquence
				Anti-MBP	Anti-AECV	
145	133	14	5	+	?	Vérifiée
15D	133	25D	4	+	+	...
37A	303	17A	1	+	?	Vérifiée
37B	303	17B	1	+	?	Vérifiée
37C	303	17C	1	+	?	Vérifiée
35B	303	25B	1	+	+	...
35D	303	25D	2	+	+	...

(-): résultat négatif par cette technique, (+): résultat positif, (?) n'a pu être mesuré par cette technique

3. DISCUSSION

La première phase du projet cherchait à démontrer la faisabilité d'utiliser la souche de *Sao Rv6* comme véhicule pour un antigène-test. Les résultats obtenus *in vitro* et chez la souris permettent de conclure que *Sao Rv6* peut servir de véhicule pour la MBP grâce au vecteur d'expression pNTE. En outre, les résultats obtenus chez les moutons ont été comparables aux résultats « souris », ce qui permet d'inclure une étape de sélection chez la souris pour la phase 2 du projet. Cette deuxième phase consiste à cloner des fragments

des protéines gag dans le plasmide et à tester les recombinants chez la souris (expérience en cours). Cette expérience doit permettre de déterminer les clones les plus immunogènes avant de les tester chez le mouton et la chèvre.

CONCLUSION

La première étape a permis de sélectionner un système d'expression plasmidique compatible avec *Sao Rv6* et de valider l'idée d'utiliser *Sao Rv6* comme antigène les protéines gag du virus de l'AECV.

RÉFÉRENCES

- BERTHON P., GOHIN I., LANTIER F., OLIVIER M., 1994. VET. Immunol. Immunopathol. 41:275-294.
- CHARBIT A., MARTINEAU P., RONCO J., LECLERC C., LO-MAN R., MICHEL V., O'CALLAGHAN D., HOFNUNG M., 1993. Vaccine 11:1221-1228.
- DUPLAY, P., SZMELCMAN S., BEDOUELLE H., HOFNUNG M., 1987. J. Mol. Biol. 194:663-673.
- MARTINEAU P., GUILLET J.G., LECLERC C., HOFNUNG M., 1992. Gene 113:35-46.
- PARDON P., MARLY J., LANTIER F., SANCHIS R., 1990. Ann. Rech. Vet 21:57-67.

