



L'IMMUNITÉ ANTI-BRUCELLA TRANSFÉRÉE PAR SÉRUM IMMUN ET L'IMMUNITÉ TRANSFÉRÉE PAR LES LYMPHOCYTES SPLÉNIQUES NE S'ADDITIONNENT PAS

M. Plommet, Isabelle Hue, Anne-Marie Plommet

► To cite this version:

M. Plommet, Isabelle Hue, Anne-Marie Plommet. L'IMMUNITÉ ANTI-BRUCELLA TRANSFÉRÉE PAR SÉRUM IMMUN ET L'IMMUNITÉ TRANSFÉRÉE PAR LES LYMPHOCYTES SPLÉNIQUES NE S'ADDITIONNENT PAS. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 1986, 17 (2), pp.169-175. hal-00901645

HAL Id: hal-00901645

<https://hal.science/hal-00901645>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

L'IMMUNITÉ ANTI-BRUCELLA TRANSFÉRÉE PAR SÉRUM IMMUN ET L'IMMUNITÉ TRANSFÉRÉE PAR LES LYMPHOCYTES SPLÉNIQUES NE S'ADDITIONNENT PAS

M. PLOMMET, Isabelle HUE et Anne-Marie PLOMMET

Station de Pathologie de la Reproduction, INRA, Centre de Tours-Nouzilly, 37380 Nouzilly, France.

Summary

ANTI-BRUCELLA CELL-MEDIATED AND ANTIBODY-MEDIATED IMMUNITY INTERACT WITH EACH OTHER WITHOUT ADDITIVE EFFECT. — Immune serum and spleen cells from mice vaccinated with a cell-wall fraction (PG) from *Brucella* were previously shown to transfer a good protection to mice against a virulent *Brucella* challenge. This protection estimated by spleen and liver time-course infection was similar to that afforded by vaccination. In present experiments, DBA/2 mice were first transferred with either 1) immune serum from infected mice, 2) splenic cells from mice intravenously vaccinated with PG fraction 28 days previously, 3) or both immune serum and splenic cells. In this case, the serum was either injected before the challenge, as were the splenic cells, or 2 days after it in order to reduce the lowering effect of the serum on level of initial colonization of the spleen. The transferred mice were then intravenously challenged with the virulent strain *B. abortus* 544 and liver and spleen counts were performed on groups of five mice weekly up to six weeks. Immune serum and splenic cells from vaccinated mice were again shown to strongly reduce the time-course of splenic infection. However addition of both effects was observed for a short time only two and three weeks post-challenge and only when the serum was injected after the challenge. In contrast, no additive or even an antagonistic effect was observed after the 21st day. Liver infection was not notably modified by both immune serum or splenic cells (except increment of initial colonisation by serum) until the 21st day when both helped reduce the course of infection. However again no additive effect was observed. On the contrary, splenic cells antagonized the immune serum effect. Additive and antagonistic effects are discussed from the view point of 1) the macrophage as an effector cell, 2) induction and regulation of immune response, either transferred or induced by the infection itself.

L'immunité anti-brucellique peut être transférée à la souris aussi bien par voie passive à l'aide de certains sérums immuns (Plommet et Plommet, 1983) que par voie adoptive à l'aide de cellules lymphoïdes spléniques ou ganglionnaires sensibilisées (Pavlov *et al.*, 1982 ; Plommet *et al.*, 1985). L'immunisation des souris donneuses peut être obtenue aussi bien par infection, virulente ou vaccinale, que par vaccination à l'aide de fractions

bactériennes purifiées. Ainsi la fraction PG, constituée de la paroi cellulaire à laquelle sont liées des protéines immunogènes (Dubray et Bézard, 1980) induit chez la souris des anticorps hautement protecteurs d'une part, des lymphocytes sensibilisés susceptibles de transférer une bonne immunité d'autre part. La fraction lipopolysaccharidique (LPS) membranaire induit des anticorps ayant une certaine activité protectrice (Plommet et Plommet,

1983) mais ne sensibilise pas les lymphocytes spléniques (résultats personnels).

L'immunité vaccinale, c'est-à-dire celle préexistante à l'épreuve, peut ainsi mettre en œuvre l'un, l'autre ou les deux effecteurs de l'immunité selon le type de vaccin utilisé. On attend bien naturellement une meilleure immunité des vaccins agissant simultanément sur les deux voies.

En utilisant, comme précédemment, les infections spléniques et hépatiques de souris éprouvées par voie veineuse comme critères de l'immunité, nous montrons que l'immunité humorale, transférée par un sérum anti-infectieux, et l'immunité cellulaire transférée par les cellules spléniques de souris vaccinées par la fraction PG n'additionnent pas leurs effets, sauf transitoirement. Au contraire le transfert de cellules réduit l'expression de l'immunité humorale par un vraisemblable effet de rétroaction sur l'induction de l'immunité due à l'infection elle-même.

Matériel et Méthodes

Plan expérimental

Des souris DBA/2 «receveuses» ont reçu par voie veineuse (i) soit 0,1 ml d'un immun sérum anti-infectieux (ii) soit des cellules spléniques de souris vaccinées 28 jours auparavant par la fraction PG administrée par voie veineuse (iii) soit immun sérum et cellules spléniques (iiii) soit enfin du sérum ou des cellules spléniques de souris non vaccinées. Les souris ont alors été éprouvées par injection intraveineuse (iv) de 2×10^5 CFU de la souche virulente *Brucella abortus* 544 (Bosseray et Plommet, 1983). Des groupes de 5 souris de chaque lot de transfert ont alors été sacrifiées à intervalle de 7 jours après épreuve pour énumération des *Brucella* dans la rate et, pour certains lots au moins, dans le foie.

Deux expériences successives ont été faites. Dans la première (B.50), limitée à 28 jours, les souris ont reçu successivement du sérum, des cellules puis, aussitôt après, l'inoculation d'épreuve. Dans la seconde (B.53), l'observation a été prolongée jusqu'au 42^e jour, et une variante (B.53b) a été ajoutée : des lots additionnels ont été ajoutés, dans lesquels le sérum a été injecté 48 h après les cellules et l'inoculum. Cette modalité réduit l'effet du sérum par suppression de l'effet initial du sérum sur la colonisation du foie et de la rate. Cet effet peut, par son importance, masquer les effets tardifs du sérum et des cellules analysées dans ce travail.

Souris, sérum, inoculum

Les souris donneuses et receveuses sont de la lignée consanguine DBA/2, fournie par le CESAL (Orléans). Elles sont utilisées à l'âge de 7 semaines environ. Les souris sont introduites dans l'animalerie à air conditionné de la Station environ 2 semaines avant l'expérience. Elles sont nourries et abreuvées *ad libitum*.

Les sérums normaux et anti-*Brucella* ont été produits sur souris CD-1 (Charles River, Elbeuf) par ponction cardiaque de souris normales ou inoculées 3 mois aupa-

ravant par la souche virulente *B. abortus* 544. Les sérums ont été conservés à -20°C .

L'inoculum standard *B. abortus* 544 a été préparé comme indiqué précédemment (Bosseray et Plommet, 1983) et utilisé directement à partir de l'ampoule lyophilisée. Chaque inoculum, titré exactement après épreuve, contenait $2,0$ à $2,2 \times 10^5$ bactéries pour chacune des expériences.

Fraction PG

La préparation de cette fraction a été décrite par ailleurs (Bosseray et Plommet, 1980). En bref, une suspension de *Brucella* de la souche vaccinale 19 est tuée par la chaleur (65°C , 1 h), broyée à l'aide de billes de verre dans un «desintegrator Braun». Les parois cellulaires résultant du broyage sont traitées par le dodécylsulfate de sodium à 40 g/l bouillant, lavées et lyophilisées. La poudre constitue la fraction elle-même, qui est utilisée en suspension fine dans une solution tamponnée. Elle est injectée par voie veineuse, dans 0,2 ml, à la dose de 25 (B.50) ou 100 μg (B.53) par souris.

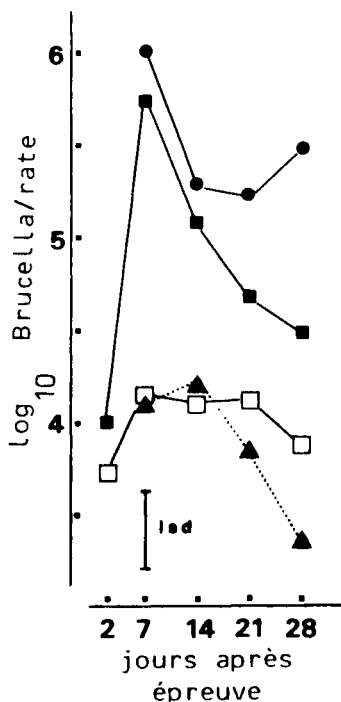


Fig. 1 — Cinétique (B.50) de l'infection splénique de souris ayant reçu, avant l'épreuve, 1. du sérum et des cellules spléniques normales (●), 2. du sérum normal et des cellules de souris vaccinées (■), 3. du sérum immun et des cellules normales (▲), 4. du sérum immun et des cellules de souris vaccinées par la fraction PG (□).

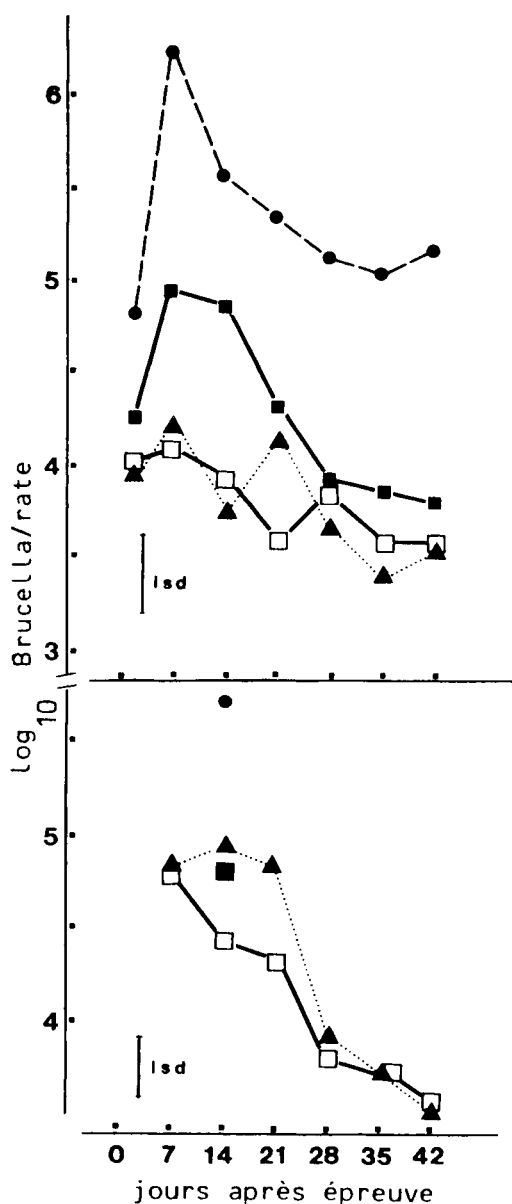


Fig. 2 — Cinétique (B.53) de l'infection splénique de souris ayant reçu 1. sérum et cellules spléniques normales (●), 2. sérum normal et cellules de souris vaccinées (■), 3. sérum immun et cellules normales (▲), 4. sérum immun et cellules de souris vaccinées (□).

Haut : sérum et cellules transférées avant épreuve.
Bas : cellules transférées avant, sérum transféré 2 jours après épreuve.

Transfert des cellules spléniques

Les rates des souris vaccinées ou témoins ont été prélevées immédiatement après sacrifice des souris par dislocation cervicale, placées dans du milieu de Earle (Bio-Mérieux, Marcy-L'Étoile) additionné de 3 % de sérum de veau fœtal (Gibco, Painley, Angleterre) et d'héparine (30 U/ml). Les rates sont alors dilacérées, puis passées au travers d'une grille en acier inoxydable de manière à récolter les cellules séparées. Sept rates sont ainsi récoltées dans 12 ml de milieu.

La suspension (12 ou 24 ml) est alors placée dans boîte pour culture de tissus (Nuclon, A/S Nunc, Roskilde, Danemark) incubée à 37 °C dans une atmosphère de CO₂ à 5 % pendant 2 h. Les cellules non adhérentes, essentiellement les lymphocytes, sont alors remises en suspension par une légère agitation, prélevées, filtrées sur compresse de coton et lavées par centrifugation lente (250 g) en milieu de Earle. Elles sont alors diluées de manière à ce que chaque souris reçoive 0,4 ml de la suspension par voie veineuse, dans un délai de 1 h environ.

Chaque lot de donneuses comprenait 7 souris, dont les cellules ont été transférées à 5 receveuses, soit approximativement 1×10^6 cellules par souris. Ce nombre a été déterminé par mesure directe sous le microscope pour chaque essai. Dans ces conditions, plus de 95 % des cellules sont viables au moment du transfert par le test d'exclusion du colorant Trypan bleu.

Énumération des *Brucella* des organes

Les souris sont sacrifiées par élévation cervicale, par groupe de 5, aux dates prévues. Rates et foies sont alors prélevés aseptiquement, et traités individuellement. Ces organes sont pesés, broyés dans un appareil en verre dans 9 fois leur volume de solution saline tamponnée de manière à obtenir une suspension homogène. Cette suspension est alors étalée (0,2 ml) sur 2 boîtes de milieu Trypticase Soy Agar (Bio-Mérieux), puis diluée à nouveau et ensemencée de la même manière jusqu'à la dilution appropriée. Les boîtes sont alors incubées pendant 5 jours en atmosphère à 10 % de CO₂, puis les colonies de *Brucella* dénombrées. Le nombre des bactéries (CFU) est calculé par organe et exprimé par le log₁₀ de ce nombre. On compte 1 colonie sur 1 boîte si aucune colonie n'est retrouvée.

Statistiques

Les expériences ont été prévues selon des plans factoriels, et analysées par analyse de variance (Lison, 1958). Les plus petites différences significatives entre lots expérimentaux (lsd 0.05) ont été calculées et représentées sur les figures.

Résultats

L'évolution des infections spléniques des souris des expériences B.50 et B.53 est donnée sur les figures 1 et 2.

1. Influence de l'immun sérum sur l'évolution des infections spléniques et hépatiques

La comparaison des courbes des lots témoins et

des lots ayant reçu le sérum immun avant épreuve montre que :

— l'infection splénique est dès l'origine inférieure dans les lots sérum immun par réduction de la colonisation initiale (fig. 1 et 2). Elle est ensuite fortement limitée dans les mêmes lots, de environ 2 log, jusqu'à la fin de l'observation,

— l'infection hépatique est initialement augmentée par le sérum immun (différence significative au jour 7), celui-ci provoquant une colonisation préférentielle du foie (fig. 3). Par la suite, le sérum immun favorise la décroissance de l'infection, en particulier à partir du 21^e jour,

— lorsque le sérum immun est administré 2 jours après l'épreuve intraveineuse, c'est-à-dire après que la colonisation initiale ait eu lieu (fig. 2 bas), l'effet du sérum est encore très évident. Il aboutit à une différence de 1 log de 14^e jour, qui augmente encore par la suite (comparaison avec la courbe témoin de la partie haute de la figure).

Nous avons décrit et discuté ces faits précédemment (Plommet et Plommet, 1983).

2. Influence du transfert des cellules spléniques immunes sur l'évolution des infections spléniques et hépatiques

La comparaison des courbes des lots témoins (ayant reçu du sérum et des cellules normales, 1,7 et $1,2 \times 10^8$ cellules par souris pour les expériences B.50 et B.53 respectivement) et celles des lots ayant reçu les cellules immunes ($2,2$ et $1,6 \times 10^8$ cellules respectivement) montre une limitation de la colonisation de la rate, mise en évidence dès le 2^e et le 7^e jour, puis un effet très net sur l'évolution ultérieure de l'infection. L'infection hépatique n'est d'abord pas modifiée. Elle est ensuite très réduite par les cellules immunes à partir du 21^e jour.

Globalement, l'effet du transfert des cellules spléniques sur le niveau de l'infection est inférieur à celui du sérum immun. Il diffère entre les deux expériences probablement en raison des doses de vaccin utilisées : 25 et 100 μ g respectivement.

3. Non additivité des effets des cellules et du sérum immun

La comparaison des différentes courbes d'évolution des infections spléniques et hépatiques montre à l'évidence que le fait de transférer à la fois du sérum immun et des cellules spléniques sensibilisées n'augmente pas l'immunité transférée par le sérum seul.

Bien au contraire, il apparaît que l'évolution de l'infection peut être à terme moins favorable quand le sérum est utilisé seul (fig. 1, la différence entre les courbes sérum immun seul et sérum immun et cellules immunes est significative,

$P = 0,02$, le 28^e jour; fig. 3, la différence est significative, $P = 0,05$ le 24^e jour). A tout le moins, le transfert de cellules n'ajoute rien à celui du sérum (fig. 2).

On pouvait toutefois craindre que le considérable effet initial du sérum sur la colonisation splénique masque, dans les premiers temps, l'addition des deux effets. En injectant le sérum 2 jours après les cellules et l'épreuve, on montre que les effets dus au sérum et aux cellules s'ajoutent, en

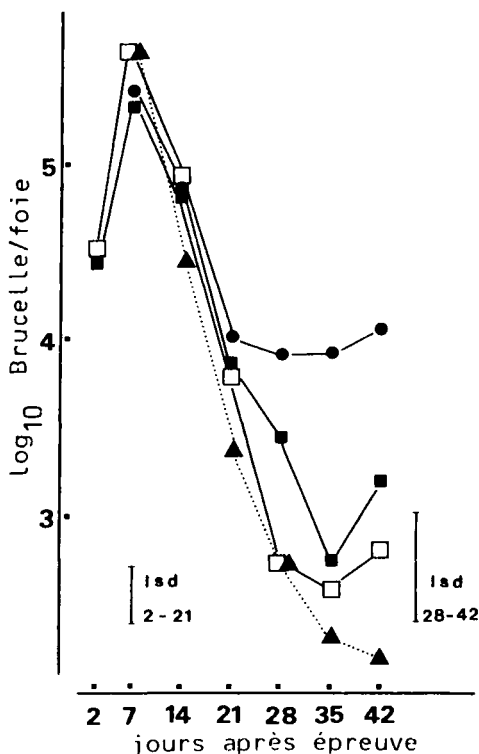


Fig. 3 — Cinétique (B.50 et B.53) de l'infection hépatique de souris ayant reçu avant l'épreuve intraveineuse 1. sérum normal et cellules spléniques normales (●), 2. sérum normal et cellules de souris vaccinées (■), 3. sérum immun et cellules normales (▲), 4. sérum immun et cellules de souris vaccinées (□).

Les données 2-21 jours sont de l'expérience B.50 (fig. 1); les données 35-42 de l'expérience B.53 (fig. 2) et les données 28 jours regroupent celles des deux expériences.

effet, pour un temps. On voit sur la figure 2 que la différence entre les courbes sérum immun seul et sérum plus cellules immunes est hautement significative ($P < 0,01$) aux jours 14 et 21. Puis l'effet dû aux cellules disparaît.

Discussion

L'inoculation par voie veineuse à la souris de *Brucella* virulentes provoque une colonisation très rapide du foie et de la rate, ces deux organes retenant la plus grande part de l'inoculum (Plommet et Plommet, 1983). Les *Brucella* se multiplient alors très rapidement dans une première phase jusqu'à ce que l'activation du système immunitaire par l'infection entraîne, dans une 2^e phase la régression de l'infection dans ces deux organes (MacKanness, 1964). L'inversion de la courbe exprimant cette évolution a lieu selon les lignées de souris de 7 à 21 jours après l'inoculation et ne dépend pas de la dose de l'inoculum (Plommet et Plommet, 1983). La régression de la 2^e phase est ensuite ou bien interrompue ou bien très ralentie, avec évolution lente soit vers la chronicité soit vers la guérison (Bosserey *et al.*, 1982). Cette différence est liée à des facteurs génétiques multiples (Ho et Cheers, 1982).

La vaccination des souris par vaccin vivant ou par certains vaccins tués préalablement à l'inoculation, modifie cette évolution par l'enclenchement immédiat des mécanismes de défense, ce qui limite la colonisation de la rate, réduit ou supprime totalement la multiplication bactérienne dans les organes et accélère la guérison (Plommet et Plommet, 1984). Nous avons entrepris l'analyse des facteurs de cette immunité, qui superpose l'immunité vaccinale préexistante à l'inoculation et l'immunité déclenchée (ou rappelée) par l'infection elle-même.

Nous avons montré précédemment que les anticorps jouent un rôle considérable dans l'immunité vaccinale. Les immuns sérums d'infection et les sérums dirigés contre la fraction PG :

1. trappent les bactéries circulantes à l'intérieur des ganglions lymphatiques et/ou dans le foie où elles sont activement détruites, réduisant d'autant la colonisation de la rate (Plommet et Plommet, 1983) et des autres organes cibles, en particulier le placenta (Bosserey, 1983).

2. accélèrent de manière considérable la régression de l'infection dans le foie et la rate (Plommet et Plommet, 1983).

L'immunité peut d'autre part être transférée d'une manière adoptive par les lymphocytes spléniques de souris donneuses vaccinées à des souris receveuses. Pavlov *et al.* (1982) ont montré en effet que les lymphocytes Thy-1+Ly-1+2+ de

souris CBA vaccinées par la souche vaccinale *B. abortus* 19 conféraient une bonne immunité aux souris éprouvées par la même souche 19. Nous avons de notre côté montré que les cellules spléniques ou ganglionnaires de souris vaccinées par la fraction PG conféraient une bonne immunité à l'égard de la souche virulente *B. abortus* 544 (Plommet *et al.*, 1985). Les cellules impliquées dans cette immunité sont des lymphocytes T d'une part, B d'autre part (Plommet et Plommet, à paraître).

Puisque les deux effecteurs de l'immunité, humoral et cellulaire, apportent chacun de leur côté une large contribution à l'immunité vaccinale, la question se posait de savoir si et comment ces deux effecteurs réagissent l'un sur l'autre. Plus précisément, y a-t-il une addition des effets, ce qui donnerait une immunité totale plus forte — et par conséquent une orientation pour la mise au point de vaccin(s) plus efficace(s). Sans entrer dans des analyses compliquées d'interaction, il ressort à l'évidence de nos résultats :

- 1) qu'un effet d'addition existe bien, mais qu'il est faible et de courte durée. Il faut se placer dans des conditions expérimentales particulières pour le mettre en évidence, par exemple en limitant l'effet du sérum en l'injectant après l'épreuve,

- 2) que dans nos conditions expérimentales, définies en particulier par un sérum et des modalités de vaccination et de transfert des cellules spléniques, les cellules immunes n'ajoutent rien, ou même réduisent, à terme (28 jours et au-delà) l'immunité telle qu'elle est exprimée par les niveaux des infections splénique et hépatique.

Ce résultat est un peu inattendu : le macrophage est considéré comme la cellule cible privilégiée des *Brucella* en même temps que l'effecteur principal de l'immunité (MacKanness, 1984 ; North, 1978 ; Ralston et Elberg, 1971a et b, Cheers et Pagram, 1979). Or ce macrophage peut être activé par les deux voies, cellulaire par le lymphocyte T sensibilisé, et humorale par certains anticorps dirigés contre les constituants de la paroi bactérienne (Ralston et Elberg, 1971a et b). Que les deux voies de l'activation touchent les mêmes populations ou des populations différentes de macrophages, on pouvait attendre un effet globalement additif de leur mise en œuvre simultanée. Or cet effet reste restreint à la rate et limité dans le temps, comme si l'activation, qu'elle soit par l'une ou l'autre voie, butait sur un seuil qui ne peut être dépassé. Les niveaux de réponse sont en effet assez proches dans tous les systèmes. Il y a certes des différences entre les lots sérum immun et cellules immunes administrés séparément en faveur des lots sérum, mais cette comparaison n'exprime que les modalités du transfert, titre et dose du sérum et nombre de cellules.

Mais au-delà de l'expression de l'immunité, limitée par la capacité du macrophage à répondre à deux stimulations à la fois, il faut aussi et surtout examiner l'effet des transferts sur l'induction de l'immunité. Il faut en effet remarquer que si l'immunité transférée par le sérum et dans une moindre mesure par les lymphocytes T s'exprime immédiatement dans la rate, ce n'est pas le cas dans le foie. L'expression de l'immunité dans le foie est dans un premier temps à peu près similaire dans tous les groupes, à la notable exception de l'effet du sérum sur l'élévation du niveau initial de colonisation. C'est donc bien l'infection elle-même qui déclenche la réaction immunitaire aboutissant à la bactériolyse accélérée du 7^e au 21^e jour. Au cours de cette période, le sérum apporte un petit plus, mais les lymphocytes n'ajoutent rien. Il faut attendre l'arrêt de la bactériolyse observé sur les témoins, qui a lieu dans notre modèle le 21^e jour, pour mesurer les effets du sérum et des lymphocytes transférés 21 jours plus tôt. Ces deux facteurs retardent (ou suppriment) le phénomène de suppression qui est considéré comme responsable de l'interruption de la décroissance. L'activation des macrophages

mesurée par la capacité de l'organisme à maîtriser une infection surajoutée (*Listeria*) est en effet forte pendant la phase descendante de l'infection brucellique, puis disparaît concomitamment avec l'installation de la phase en plateau (MacKanness, 1964; Cheers et Pagram, 1979; Cheers *et al.*, 1980; Plommet et Plommet, 1984). On peut probablement admettre que le sérum «protège» les macrophages hépatiques leur permettant de garder une activité normale. Les lymphocytes sensibilisés de leur côté agiraient sur la réponse immunitaire elle-même, en retardant l'apparition de cellules suppressives, mais aussi en diminuant ou modifiant la réponse humorale, qui doit normalement prendre le relai au fur et à mesure de l'épuisement du sérum immun transféré. Le phénomène central serait ainsi celui de la régulation de la réponse immunitaire à l'infection par les cellules transférées et/ou par la vaccination elle-même.

Reçu, le 8 juillet 1985

Accepté, le 15 octobre 1985

Résumé

Il a été antérieurement montré que le transfert de sérum immun d'une part, de cellules spléniques de souris vaccinées par la fraction de paroi bactérienne PG d'autre part confère à la souris receveuse une immunité anti-Brucellique analogue à celle conférée par la vaccination. Dans le présent travail, des souris DBA/2 ont reçu soit un sérum immun de souris infectées, soit les cellules spléniques de souris vaccinées 28 jours auparavant par injection intraveineuse de 50 µg de la fraction PG, soit enfin du sérum et des cellules. Les souris ont été ensuite éprouvées par injection intraveineuse d'une souche virulente de *Brucella abortus*, puis autopsiées par groupes de 5 de manière à établir par numération bactérienne la cinétique des infections splénique et hépatique. Dans une expérience, le sérum a été administré 2 jours après le transfert des cellules et l'épreuve, de manière à supprimer l'effet d'abaissement du niveau de la colonisation initiale de la rate par le sérum. Sérum immun et lymphocytes spléniques de souris vaccinées réduisent très fortement et durablement le niveau de l'infection splénique dès le 2^e jour après l'épreuve. Ils n'ont pas d'effet additif, sauf marginalement entre le 14^e et 21^e jour, quand l'effet du sérum est globalement réduit par l'administration différée après l'épreuve. Au contraire, un effet d'antagonisme se manifeste après le 21^e jour. Dans le foie, sérum et cellules n'ont dans un premier temps pas d'effets notables. C'est seulement à partir du 21^e jour que les effets se manifestent par la décroissance de l'infection. L'antagonisme des cellules transférées sur l'effet du sérum est là aussi significatif après le 35^e jour. Absence d'effet additif et antagonisme sont discutés en terme 1) d'effecteur, 2) d'induction et de régulation de l'immunité quelle soit transférée ou induite par l'infection.

Références

- BOSSERAY N., 1983. Vaccine and serum-mediated protection against a mouse placental *Brucella* infection. *Br. J. Exp. Pathol.*, **64**, 617-625.
- BOSSERAY N., PLOMMET M., 1980. Antagonism between two immunogens extracted from *Brucella* (cell wall peptidoglycan and lipopolysaccharide fractions) and inactivity of the Brucellin allergen in immunization of the mouse. *Ann. Microbiol.*, **131A**, 157-169.

- BOSSERAY N., PLOMMET M., 1983. A laboratory reference vaccine to titrate immunogenic activity of anti-*Brucella* vaccines in mice. *Ann. Rech. Vét.*, **14**, 163-168.
- BOSSERAY N., PLOMMET M., DE RYCKE J., 1982. Évolution de l'infection de la souris par *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* et *Brucella suis* vers l'état chronique et la guérison. *Ann. Rech. Vét.*, **13**, 153-161.
- CHEERS C., PAVLOV H., RIGLAR C., MADRASO E., 1980. Macrophage activation during experimental murine Brucellosis. 3. Do macrophages exert feedback control during brucellosis? *Cell. Immunol.*, **49**, 168-177.
- CHEERS C., PAGRAM F., 1979. Macrophage activation during experimental murine Brucellosis: a basis for chronic infection. *Infect. Immun.*, **23**, 197-205.
- DUBRAY G., BEZARD G., 1980. Isolation of three *Brucella abortus* cell-wall antigens protective in murine experimental Brucellosis. *Ann. Rech. Vét.*, **11**, 367-373.
- HO M., CHEERS C., 1982. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection. 4. Genetic and cellular basis of resistance to chronic infection with *Brucella abortus*. *J. Infect. Dis.*, **146**, 381-387.
- LISON L., 1958. *Statistique appliquée à la Biologie Expérimentale*. p. 155-189, Gauthier-Villars, Paris.
- MACKANESS G.B., 1964. The immunological basis of acquired cellular resistance. *J. Exp. Med.*, **120**, 105-120.
- NORTH R., 1978. The concept of activated macrophages. *J. Immunol.*, **121**, 806-809.
- PAVLOV H., HOGARTH M., MCKENZIE I.F.C., CHEERS C., 1982. *In vivo* and *in vitro* effects of monoclonal antibody to Ly antigens on immunity to infection. *Cell. Immunol.*, **71**, 127-138.
- PLOMMET M., PLOMMET A.M., HUE I., 1985. Immune mechanisms in Brucellosis. Commission of the European Communities. In: J.M. Verger, M. Plommet (eds), *Brucella melitensis*, Martinus Nijhoff, Dordrecht, for the CEC, 205-214.
- PLOMMET M., PLOMMET A.M., 1981. Évolution de l'infection splénique de souris de quatre lignées, inoculées par voie veineuse, par trois doses de *Brucella abortus*. *Ann. Rech. Vét.*, **12**, 345-351.
- PLOMMET M., PLOMMET A.M., 1983. Immune serum-mediated effects on Brucellosis evolution in mice. *Infect. Immun.*, **41**, 97-105.
- PLOMMET M., PLOMMET A.M., 1984. Effet des sérums immuns sur l'évolution de la brucellose expérimentale de la souris. *Develop. Biol. Standard*, **66**, 271-281.
- RALSTON D.J., ELBERG S.S., 1971a. Serum-mediated immune cellular responses to *Brucella melitensis*. 7. The separation and assay of serum globulins responsible for macrophage stimulation and *Brucella* inhibition. *J. Infect. Dis.*, **123**, 507-518.
- RALSTON D.J., ELBERG S.S., 1971b. The cell-wall as the antigenic site for antibodies stimulating ingestion (MSF) and inhibition (BIF) of *Brucella* in macrophages from normal and immune animals. *Br. J. Exp. Pathol.*, **52**, 130-137.