

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication : **2 873 386**  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **04 08136**

⑤1 Int Cl<sup>8</sup> : C 12 N 1/06 (2006.01), A 61 K 39/05, A 61 P 31/04,  
C 12 R 1/15 // C 07 K 14/34

①2

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 22.07.04.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 27.01.06 Bulletin 06/04.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Ce dernier n'a pas été  
établi à la date de publication de la demande.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : AGENCE FRANCAISE DE SECURITE  
SANITAIRE DES ALIMENTS AFSSA — FR.

⑦2 Inventeur(s) : TAOUJI SAID, CAUCHARD JULIEN et  
BALLET JEAN JACQUES.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤4 COMPOSITION VACCINALE CONTRE LE RHODOCOCCUS EQUI.

⑤7 L'invention a pour objet un procédé de préparation d'un extrait antigénique soluble obtenu à partir de Rhodococcus equi, comprenant une étape de solubilisation des membranes desdites bactéries par mise en contact de ces bactéries avec une solution d'extraction contenant un détergent non ionique de type ester d'acide gras polyoxyéthylénique de sorbitanne. L'invention a également pour objet un extrait antigénique soluble susceptible d'être obtenu à partir du procédé de préparation, ledit extrait comprenant des antigènes membranaires de Rhodococcus equi en solution dans la solution d'extraction. L'invention a finalement pour objet une composition comprenant l'extrait antigénique soluble à titre de médicament, comprenant de préférence un adjuvant de type nanoparticulaire ou émulsion huile-dans-eau, et l'utilisation de l'extrait antigénique soluble pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter une infection par Rhodococcus equi chez un mammifère.

FR 2 873 386 - A1



L'invention a pour objet un procédé de préparation d'un extrait antigénique soluble obtenu à partir de *Rhodococcus equi*, comprenant une étape de solubilisation des membranes desdites bactéries par mise en contact de ces bactéries avec une solution d'extraction contenant un détergent non ionique de type ester d'acide gras polyoxyéthylénique de sorbitanne. L'invention a également pour objet un extrait antigénique soluble susceptible d'être obtenu à partir du procédé de préparation, ledit extrait comprenant des antigènes membranaires de *Rhodococcus equi* en solution dans la solution d'extraction. L'invention a finalement pour objet une composition comprenant l'extrait antigénique soluble à titre de médicament, comprenant de préférence un adjuvant de type nanoparticulaire ou émulsion huile-dans-eau, et l'utilisation de l'extrait antigénique soluble pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter une rhodococcose induite par *Rhodococcus equi* chez un mammifère.

*Rhodococcus equi* (ou *R. equi*) est à l'origine de bronchopneumonies pyogranulomateuses ou d'autres formes cliniques plus rares (digestives, ostéo-articulaires) chez le poulain. Le taux de morbidité varie de 5 à 17 % dans les différentes régions d'élevage du monde, et le taux de létalité de 40 à 80 %. En Normandie, les infections à *Rhodococcus equi* représentent environ 10 % des causes de mortalité chez les poulains âgés de 24 heures à 6 mois, avec des variations annuelles liées aux conditions climatiques (15 % en 1988) et 70 % des cas de bronchopneumonie chez les animaux âgés de 1 à 6 mois.

Actuellement, on ne dispose pas de moyens de prophylaxie médicale efficaces. La bactérie est présente dans le sol des paddocks et pâtures et la transmission se fait surtout par inhalation de poussières contaminées issues de l'environnement. La maladie se développe de façon insidieuse et ne se manifeste cliniquement que lorsque les lésions pulmonaires sont déjà très avancées de sorte que les traitements antibiotiques adaptés (association érythromycine- rifampicine) sont souvent mis en œuvre trop tardivement pour sauver les poulains. De surcroît, ces traitements antibiotiques sont coûteux.

La bactérie *Rhodococcus equi* est un véritable fléau économique du fait de la mortalité qu'elle provoque, mais aussi en raison des conséquences pour la carrière du cheval et du coût élevé du traitement. Le caractère insidieux de la maladie et l'apparition de souches résistantes font de la prévention par l'élaboration d'un vaccin efficace, une priorité dans la lutte contre la pathologie.

Le portage est particulièrement important dans l'intestin des chevaux notamment dans l'intestin des poulains chez lesquels le développement insuffisant de la flore anaérobie favorise la multiplication. Certains auteurs considèrent même que *Rhodococcus equi* est un hôte normal du tube digestif des équidés. Le germe survit dans le sol et il peut se multiplier dans les excréments. Cette contamination du milieu extérieur semble proportionnelle à la densité des équidés et elle est très importante dans les élevages entretenant des chevaux depuis de nombreuses années.

Des infections à *Rhodococcus equi* ont été décrites chez d'autres espèces animales : chez les bovins et les porcins, *Rhodococcus equi* est principalement isolé de nœuds lymphatiques normaux ou de nœuds lymphatiques présentant des lésions évoquant la tuberculose. A l'abattoir, l'existence de ces adénites conduit à des confusions avec la tuberculose. Chez les bovins, *Rhodococcus equi* est également responsable de pyomètres et de pneumonies. Chez les porcelets, le germe peut être à l'origine de la formation d'abcès de la cavité orale à l'origine d'une anorexie. Chez la chèvre, on note la formation d'abcès pulmonaires, spléniques ou hépatiques pouvant évoquer des infections à *Corynebacterium pseudotuberculosis*. La formation d'abcès peut s'accompagner du développement d'ostéomyélites vertébrales. Chez les ovins, quelques cas de pneumonies ainsi que des avortements et des mortalités néonatales ont été décrits. Chez le chat, *Rhodococcus equi* provoque des adénites des nœuds lymphatiques du médiastin antérieur et des nœuds lymphatiques mésentériques, des abcès sous-cutanés et des infections de plaies. Des cas d'infection humaine à *Rhodococcus equi* ont même été décrits. Le plus souvent, cette bactérie est isolée chez des patients immunodéprimés (infections par le virus HIV, traitements immunosuppresseurs...).

Les bactéries *Rhodococcus equi* appartiennent au genre *Rhodococcus*, dans la classe des *Actinobacteria*, sous-classe des *Actinobacteridae*, ordre des *Actinomycetales*, sous-ordre des *Corynebacterineae*, famille des *Nocardiaceae*. Le terme *Corynebacterium equi* est parfois également utilisé pour désigner les bactéries *Rhodococcus equi*.

*Rhodococcus equi* est une bactérie intracellulaire facultative Gram positive, inhibant la fusion phagosome-lysosome et capable de survivre et de se multiplier dans les cellules phagocytaires. Les facteurs de virulence ne sont pas parfaitement connus mais ils semblent être liés à la capsule, à la synthèse de l' "equi factor", aux acides mycoliques, à des protéines de poids moléculaires 15-17 kDa et à une protéine de 20 kDa.

Plus particulièrement, les protéines de surface de 15 à 17 kDa (ou protéines Vap pour « virulence-associated protein ») sont codées par des gènes *vap* portés par des plasmides de 85 à de 90 kb. L'analyse des fragments de restriction permet de reconnaître au moins 10 plasmides distincts dont la distribution est liée à l'origine géographique des souches. En France, les souches virulentes possèdent un plasmide de 85 kb de type I ou un plasmide de 87 kb de type I ou un plasmide de 85 kb de type II qui n'a été retrouvé que chez des souches françaises. Ces plasmides ne sont présents que chez les souches virulentes et les souches curées de leurs plasmides survivent moins longtemps dans les phagocytes et sont moins pathogènes pour la souris ou pour le cheval. Les 7 gènes *vap* identifiés (*vapA*, *vapC*, *vapD*, *vapE*, *vapF*, *vapG* et *vapH*), sont situés sur un îlot de pathogénicité et ils codent pour des protéines de surface, indispensables à la survie dans les macrophages, exprimées à pH acide et à 37 °C mais non à 30 °C. La séquence du gène *vapA* apparaît très bien conservée si bien qu'un test PCR amplifiant ce gène permet un diagnostic des souches virulentes. Chez l'homme, les souches isolées de patients immunodéprimés ne possèdent pas toutes un tel plasmide ce qui contraste avec les souches isolées des poulains malades qui renferment toutes un plasmide porteur de gènes *vap*. Il est donc probable qu'un état d'immunodépression puisse permettre la persistance de souches même peu virulentes.

Actuellement, aucun vaccin commercial visant à prévenir le développement de la maladie n'est disponible dans le monde. Des plasmas hyper-immuns sont commercialisés à l'étranger (Grande-Bretagne, Etats-Unis) mais ne possèdent pas d'autorisation de mise sur le marché en France. De plus, leur efficacité est controversée. Les éleveurs français ont parfois recours à des autovaccins produits à partir de souches bactériennes locales. Cette situation justifie largement l'intérêt du développement commercial d'un vaccin, qui puisse être par exemple administré aux juments gravides.

Prescott *et al.* (Am J Vet Res. 1997 Apr;58(4):356-9) ont utilisé comme antigène une fraction riche en protéines VapA. La vaccination suscite la production d'immunoglobulines G (IgG) douées de propriétés opsonisantes si bien que le plasma des animaux vaccinés peut protéger des poulains contre une infection expérimentale. Toutefois, la vaccination des mères suivie d'une vaccination des poulains n'entraîne aucune protection et pourrait même augmenter la gravité des infections.

Les résultats obtenus par Becú *et al.* (Vet Microbiol. 1997 Jun 16;56(3-4):193-204), en utilisant un surnageant de culture contenant les protéines VapA et l' "equi factor", montrent que la vaccination des juments protège les poulains par l'intermédiaire des anticorps colostraux mais que la vaccination des poulains est inefficace.

L'utilisation de souches inactivées conduit à des résultats variables selon les études. Toutefois, pour Varga *et al.* (Vet Microbiol. 1997 Jun 16;56(3-4):205-12), la vaccination des poulains (2 ou 3 injections pratiquées entre l'âge de 3 et de 7 semaines) confère une protection.

La séquence amino-acide de la protéine VapA a été publiée en 1995 (Tan *et al.*, Can J Vet Res. 1995 Jan;59(1):51-9). Deux épitopes de cette protéine, à savoir l'épitope N15Y correspondant aux résidus 65 à 78 de la protéine VapA mature (Vanniasinkam *et al.*, J Clin Microbiol. 2001 Apr;39(4):1633-7) et V20S correspondant aux résidus 146 à 160 de la protéine VapA (Taouji *et al.*, FEMS Immunol Med Microbiol. 2002 Dec 13;34(4):299-306) ont été désignés comme

présentant un potentiel en tant que vaccins contre *R. equi*. En outre, l'article publié le 26 février 2003 par les Haras Nationaux (« *Immunisation de juments gravides contre des antigènes de R. equi : évaluation de la réponse immunitaire et du transfert passif dans différents élevages normands* », Cauchard *et al.*) décrit un  
5 vaccin composé d'extraits antigéniques d'une souche virulente de *R. equi* (85Fp<sup>+</sup>) associé à un adjuvant à base de nanoparticules (MONTANIDE IMS3012<sup>®</sup>). Toutefois, ce vaccin induit des réactions inflammatoires au niveau du site de l'injection.

Il est donc nécessaire d'obtenir une amélioration tant qualitative que quantitative  
10 de la protection passive conférée au poulain par le colostrum. Les inventeurs ont ainsi pu mettre au point un nouveau vaccin qui induit une immunité durable contre *R. equi*, qui est mieux toléré par les sujets auxquels le vaccin a été administré avec moins de réactions inflammatoires secondaires, et qui est simple à préparer.

15 Ceci est justement l'objet de la présente invention.

Ainsi, selon un premier aspect, l'invention a pour objet un procédé de préparation d'un extrait antigénique soluble, obtenu à partir de bactéries *Rhodococcus equi*, caractérisé en ce que ledit procédé comprend les étapes suivantes :

- 20 a) La solubilisation des membranes desdites bactéries par mise en contact de ces bactéries avec une solution d'extraction contenant un détergent non ionique de type ester d'acide gras polyoxyéthylénique de sorbitane, et  
b) La récupération de l'extrait antigénique solubilisé à l'étape a).

25 Les informations relatives à *Rhodococcus equi*, à savoir la systématique, les caractères bactériologiques, l'habitat et le pouvoir pathogène, le pouvoir pathogène chez le cheval, chez les autres espèces animales ou chez l'homme, les facteurs de pathogénicité, le diagnostic bactériologique et sérologique, la sensibilité aux antibiotiques et la prophylaxie sont largement décrits dans le dictionnaire de bactériologie vétérinaire disponible sur le Web à l'adresse  
30 <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/garde.html>.

Les bactéries *R. equi* utilisées dans le procédé selon l'invention sont obtenues par culture dans un milieu et en conditions appropriés pour la réalisation de l'invention ; de préférence, lesdites bactéries sont en suspension dans le milieu de culture (« bactéries humides »). Sans s'y limiter, on peut citer comme exemple de milieu de culture approprié le milieu cœur-cervelle (BHI pour « Brain Heart Infusion ») à un pH entre 5 et 7, de préférence entre 6 et 7, et de manière particulièrement préférée de 6,5. Les conditions de culture appropriées sont de manière générale la température ambiante, de préférence 37 °C, sous agitation, par exemple 150 rpm (révolutions par minute), pendant un à plusieurs jours, de préférence pendant 48 à 72 heures, de sorte que lesdites bactéries soient en phase exponentielle de croissance.

Dans le milieu de culture approprié, lesdites bactéries peuvent être issues d'une même souche ou de souches différentes, les bactéries de souches différentes étant, dans ce dernier cas, en mélange dans le milieu.

Toutes les souches *R. equi* peuvent être utilisées pour la réalisation de la présente invention. Comme exemple de souches *R. equi* on peut citer, sans toutefois s'y limiter, les souches ATCC33701, ATCC6939, ATCC2572, et la souche 85F déposée à la CNCM (Collection Nationale de Culture de Micro-organismes, Institut Pasteur, France) le 2 juillet 2004 sous le numéro I-3250.

Toutes les souches *R. equi* possédant un plasmide de virulence peuvent être utilisées dans le cadre de la présente invention. Néanmoins, n'importe quelle souche de *R. equi*, curée de son plasmide ou naturellement dépourvue, à laquelle on ajoute un vecteur d'expression contenant un ou plusieurs gènes de l'îlot de pathogénicité du plasmide naturel, peut également être utilisée dans le cadre de la présente invention.

Afin de récupérer un extrait antigénique soluble à partir de *R. equi*, on solubilise les membranes de ces bactéries par mise en contact desdites bactéries, qui peuvent se trouver en suspension, dans une solution d'extraction contenant un ester d'acide gras polyoxyéthylénique de sorbitanne, qui est un détergent non ionique (toutefois, il est à noter que l'extrait antigénique de *R. equi* obtenu est susceptible de contenir des antigènes de *R. equi* autres que des antigènes membranaires). Ce type de détergent non ionique est notamment décrit dans l'ouvrage « *Handbook of*

*pharmaceutical excipients* », 2<sup>ème</sup> édition, « A joint publication of the American Pharmaceutical Association and the Royal Pharmaceutical Society of Great Britain », The Pharmaceutical Press, Edité par A. WADE et P.J. WELLER, 1994.

Comme exemples d'esters d'acide gras polyoxyéthyléniques de sorbitanne qui peuvent être utilisés à l'étape a) de solubilisation des membranes des bactéries *R. equi* du procédé selon l'invention on peut citer, sans toutefois s'y limiter, les composés suivants, disponibles dans le commerce :

- le monolaurate polyoxyéthylénique 20 de sorbitanne, également dénommé polysorbate 20, ou Tween 20<sup>®</sup> (AMRESCO, Solon, OH),
- 10 - le monolaurate polyoxyéthylénique (4) de sorbitanne, également dénommé polysorbate 21, ou Tween 21<sup>®</sup>,
- le monopalmitate polyoxyéthylénique 20 de sorbitanne, également dénommé polysorbate 40, ou Tween 40<sup>®</sup>,
- le monostéarate polyoxyéthylénique 20 de sorbitanne, également dénommé polysorbate 60, ou Tween 60<sup>®</sup>,
- 15 - le monostéarate polyoxyéthylénique (4) de sorbitanne, également dénommé polysorbate 61, ou Tween 61<sup>®</sup>,
- le tristéarate polyoxyéthylénique 20 de sorbitanne, également dénommé polysorbate 65, ou Tween 65<sup>®</sup>,
- 20 - le monooléate polyoxyéthylénique 20 de sorbitanne, également dénommé polysorbate 80, ou Tween 80<sup>®</sup>,
- le monooléate polyoxyéthylénique (5) de sorbitanne, également dénommé polysorbate 81, ou Tween 81<sup>®</sup>,
- le trioléate polyoxyéthylénique 20 de sorbitanne, également dénommé polysorbate 85, ou Tween 85<sup>®</sup>, et
- 25 - le monoisostéarate polyoxyéthylénique 20 de sorbitanne également dénommé polysorbate 120.

Les fournisseurs de ces esters d'acide gras polyoxyéthylénique de sorbitanne sont connus de l'homme de l'art (SIGMA, AMRESCO, etc...).

30 Selon un mode de réalisation particulier, l'ester d'acide gras polyoxyéthylénique de sorbitanne est choisi parmi le monolaurate polyoxyéthylénique 20 de sorbitanne, le monopalmitate polyoxyéthylénique 20 de sorbitanne, le

monostéarate polyoxyéthylénique 20 de sorbitanne, et le monooléate polyoxyéthylénique 20 de sorbitanne.

Selon un mode de réalisation particulièrement préféré, l'ester d'acide gras polyoxyéthylénique de sorbitanne est le monolaurate polyoxyéthylénique 20 de sorbitanne.

De préférence, le procédé de préparation selon la présente invention est caractérisé en ce que ledit détergent non ionique est à une concentration comprise entre 0,01 % et 5 % dans ladite solution d'extraction.

De manière particulièrement préférée, la concentration du détergent non ionique est de 0,1 % dans ladite solution d'extraction.

De préférence, à l'étape a) de solubilisation du procédé de préparation selon la présente invention, la mise en contact des bactéries avec le tampon d'extraction est réalisée à une proportion de 1 ml à 20 ml dudit tampon par gramme de bactéries humides. De manière toute préférée, cette proportion est de 5 ml dudit tampon par gramme de bactéries humides.

On entend désigner par bactéries humides des bactéries en suspension dans un milieu liquide.

Selon un autre mode de réalisation particulier, le procédé de préparation selon la présente invention est caractérisé en ce que les bactéries *Rhodococcus equi* sont de souche choisie parmi les souches ATCC33701, ATCC6939, ATCC2572, et la souche 85F déposée à la CNCM le 2 juillet 2004 sous le numéro I-3250.

De manière particulièrement préférée, les bactéries *Rhodococcus equi* sont de souche 85F déposée à la CNCM le 2 juillet 2004 sous le numéro I-3250.

Selon encore un autre mode de réalisation, le procédé de préparation selon la présente invention est caractérisé en ce que lesdites bactéries se présentent sous la forme d'un culot bactérien obtenu après centrifugation, avant l'étape a).

Cette étape de centrifugation a pour intérêt d'éliminer les impuretés de sorte à récupérer uniquement les cellules bactériennes. Des méthodes autres que la centrifugation, bien connues de l'homme de l'art, peuvent également être utilisées dans cet objectif.

Les bactéries se présentant sous la forme d'un culot bactérien sont obtenues par centrifugation dans des conditions appropriées, connues de l'homme de l'art. De

préférence, la centrifugation permettant d'obtenir le culot bactérien avant l'étape a) est réalisée à une vitesse comprise entre 1000 g et 50000 g, de préférence 10000 g, pendant une période de 1 mn à 45 mn, de préférence 20 mn, de préférence à une température comprise entre 1 °C et 6 °C, de préférence 4 °C.

5 De préférence, on procède à au moins un lavage du culot bactérien dans un tampon de lavage approprié, avant l'étape a).

L'homme de l'art connaît les tampons de lavage appropriés pour le lavage du culot bactérien. De préférence, on utilise des tampons Tris acétate à une concentration et un pH appropriés, par exemple à une concentration de 10 mM ou 10 25 mM, par exemple à un pH compris entre 7 et 8, de préférence à un pH de 7,5. De préférence, lesdits tampons de lavage sont filtrés (par exemple en utilisant un filtre de 0,2 µm, ...).

De manière encore préférée, on effectue deux lavages successifs du culot bactérien obtenu après centrifugation dans un tampon Tris acétate 10 mM de pH 7 à 8, 15 suivis d'un troisième lavage dans un tampon Tris acétate 25 mM de pH 7,5.

De préférence, l'étape a) de solubilisation est réalisée sous agitation, à une température comprise dans la gamme allant de 20 à 40 °C, de manière particulièrement préférée 37 °C, pendant une période de 30 à 150 mn, de manière particulièrement préférée pendant 90 mn, de préférence en présence de 20 microbilles.

L'étape b) de récupération de l'extrait antigénique solubilisé à l'étape a) peut être réalisée selon diverses techniques appropriées, telles que notamment la centrifugation, la filtration, la chromatographie.

Selon un mode particulier de réalisation, le procédé de préparation selon la présente invention est caractérisé en ce qu'à l'étape b) on centrifuge le produit 25 obtenu à l'étape a), et on récupère le surnageant de centrifugation contenant ledit extrait antigénique solubilisé.

La centrifugation à l'étape b) du produit obtenu à l'étape a) est réalisée dans des conditions appropriées, connues de l'homme de l'art. De préférence, cette 30 centrifugation est réalisée à une vitesse comprise entre 10000 g et 150000 g, de préférence 100000 g, pendant une période de 10 mn à 120 mn, de préférence pendant 60 mn, à une température comprise entre 1 et 6 °C, de préférence à 4 °C.

De manière encore préférée, le surnageant de centrifugation contenant ledit extrait antigénique solubilisé est conservé à une température comprise entre 1 et 6 °C, de préférence à 4 °C.

5 De manière particulièrement préférée, le procédé de préparation selon l'invention est caractérisé en ce que les bactéries *Rhodococcus equi* sont de souche 85F déposée à la CNCM le 2 juillet 2004 sous le numéro I-3250, et en ce que l'ester d'acide gras polyoxyéthylénique de sorbitanne est le monolaurate polyoxyéthylénique 20 de sorbitanne.

10 Selon un deuxième aspect, la présente invention a pour objet un procédé de préparation d'un extrait antigénique soluble, obtenu à partir de bactéries *Rhodococcus equi* de souche 85F déposée à la CNCM le 2 juillet 2004 sous le numéro I-3250, caractérisé en ce que ledit procédé comprend les étapes suivantes :

- 15 - L'obtention d'un culot bactérien par centrifugation desdites bactéries *Rhodococcus equi* en suspension à une vitesse de 10000 g, pendant 20 mn, de préférence à une température de 4 °C,
- Deux lavages successifs du culot bactérien obtenu dans un tampon Tris acétate 10 mM de pH 7 à 8, suivis d'un troisième lavage dans un tampon Tris acétate 25 mM de pH 7,5,
- 20 - La solubilisation des membranes bactériennes du culot bactérien lavé par mise en contact dudit culot avec une solution d'extraction contenant du monolaurate polyoxyéthylénique 20 de sorbitanne à une concentration de 0,1 % v/v dans ladite solution d'extraction, la proportion bactéries / tampon d'extraction étant de 5 ml/g de bactéries humides, ladite solubilisation étant réalisée sous
- 25 agitation pendant 90 mn à une température comprise entre 35 et 40 °C, de préférence en présence de microbilles, et
- On centrifuge le produit obtenu à l'étape précédente à 100000 g pendant 1 heure, de préférence à 4 °C, et on récupère le surnageant de centrifugation contenant ledit extrait antigénique solubilisé.

30 Les bactéries *R. equi* utilisées dans le procédé selon l'invention sont obtenues par culture dans un milieu et en conditions appropriés pour la réalisation de l'invention ; de préférence, lesdites bactéries sont en suspension dans le milieu de

culture. Sans s'y limiter, on peut citer comme exemple de milieu de culture approprié le milieu cœur-cerveau (BHI pour « Brain Heart Infusion ») à un pH entre 5 et 7, de préférence entre 6 et 7, et de manière particulièrement préférée de 6,5. Les conditions de culture appropriées sont de manière générale la température

5 ambiante, de préférence 37 °C, sous agitation, par exemple 150 rpm, pendant un à plusieurs jours, de préférence pendant 12 à 72 heures, de sorte que lesdites bactéries soient en phase exponentielle de croissance.

Lors de l'étape de solubilisation, les microbilles peuvent être utilisées afin de « casser » les bactéries. On pourra utiliser par exemple des billes de verre de 150 à

10 212 µm de diamètre (SIGMA, Lyon, France).

Selon un troisième aspect, l'invention a pour objet un extrait antigénique soluble de bactéries *Rhodococcus equi*, susceptible d'être obtenu à partir du procédé selon la présente invention, caractérisé en ce que ledit extrait comprend des antigènes

15 membranaires de *R. equi* en solution dans une solution d'extraction contenant un détergent non ionique de type ester d'acide gras polyoxyéthylénique de sorbitanne.

Selon un mode de réalisation particulier, l'extrait antigénique soluble de bactéries *Rhodococcus equi* selon l'invention est obtenu à partir du procédé de préparation

20 selon la présente invention.

Selon un autre mode de réalisation particulier, l'extrait antigénique soluble de bactéries *Rhodococcus equi* selon l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend des antigènes membranaires de *R. equi* en solution dans une solution contenant un

25 détergent non ionique de type ester d'acide gras polyoxyéthylénique de sorbitanne.

Les antigènes membranaires de *R. equi* compris dans l'extrait antigénique soluble selon l'invention peuvent être issus d'une même souche *R. equi* ou de souches *R. equi* différentes, les bactéries *R. equi* de souches différentes étant, dans ce dernier cas, en mélange dans le milieu. Toutes les souches *R. equi* peuvent être utilisées

30 pour la réalisation de la présente invention. Comme exemple de souches *R. equi* on peut citer, sans toutefois s'y limiter, les souches

ATCC33701, ATCC6939, ATCC2572, et la souche 85F déposée à la CNCM le 2 juillet 2004 sous le numéro I-3250, cette dernière étant particulièrement préférée.

Comme cela a déjà été dit précédemment, toutes les souches *R. equi* possédant un plasmide de virulence peuvent être utilisées dans le cadre de la présente invention.

5 Néanmoins, n'importe quelle souche de *R. equi*, curée de son plasmide ou naturellement dépourvue, à laquelle on ajoute un vecteur d'expression contenant un ou plusieurs gènes de l'îlot de pathogénicité du plasmide naturel, peut également être utilisée dans le cadre de la présente invention.

10 De préférence, l'extrait antigénique soluble de bactéries *Rhodococcus equi* selon l'invention est caractérisé en ce que l'ester d'acide gras polyoxyéthylénique de sorbitanne est choisi parmi le monolaurate polyoxyéthylénique 20 de sorbitanne, le monopalmitate polyoxyéthylénique 20 de sorbitanne, le monostéarate polyoxyéthylénique 20 de sorbitanne, et le monooléate polyoxyéthylénique 20 de sorbitanne.

15 De manière particulièrement préférée, l'extrait antigénique soluble de bactéries *Rhodococcus equi* selon l'invention est caractérisé en ce que l'ester d'acide gras polyoxyéthylénique de sorbitanne est le monolaurate polyoxyéthylénique 20 de sorbitanne.

20 De préférence, l'extrait antigénique soluble de bactéries *Rhodococcus equi* selon l'invention est caractérisé en ce que ledit détergent non ionique est à une concentration comprise entre 0,01 % et 5 % dans ladite solution d'extraction.

De manière particulièrement préférée, l'extrait antigénique soluble de bactéries *Rhodococcus equi* selon l'invention est caractérisé en ce que la concentration du détergent non ionique est de 0,1 % dans ladite solution d'extraction.

25 De manière préférée entre toutes, l'extrait antigénique soluble selon l'invention est caractérisé en ce que les bactéries *Rhodococcus equi* sont de souche 85F déposée à la CNCM le 2 juillet 2004 sous le numéro I-3250, et en ce que l'ester d'acide gras polyoxyéthylénique de sorbitanne est le monolaurate polyoxyéthylénique 20 de sorbitanne.

30

Selon un quatrième aspect, l'invention a pour objet une composition comprenant l'extrait antigénique soluble selon la présente invention, à titre de médicament.

De préférence, la composition selon l'invention à titre de médicament comprend en outre des adjuvants de l'immunité ; ces adjuvants peuvent être de tous types connus de l'homme de l'art, dans la mesure où, lorsqu'ils sont mélangés à une quantité efficace de l'extrait antigénique soluble selon la présente invention, ceux-ci permettent d'augmenter le pouvoir antigénique de la composition et de favoriser une réaction immunitaire supérieure.

De préférence, la composition selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle contient en outre un adjuvant de l'immunité de type nanoparticulaire ou de type émulsion huile-dans-eau.

Comme exemples d'adjuvants de l'immunité de type émulsion huile-dans-eau on peut citer les adjuvants pour vaccins donnant une émulsion huile-dans-eau et contenant une huile non minérale. De tels adjuvants, très bien tolérés, sont adaptés pour induire une immunité à court terme, avec une réponse à médiation humorale. De préférence, l'adjuvant donnant une émulsion huile-dans-eau et contenant une huile non minérale est l'adjuvant MONTANIDE ISA 35<sup>®</sup> (SEPPIC, Paris, France). De manière générale, cet adjuvant MONTANIDE ISA 35<sup>®</sup> contient de l'ester de glycérol, du squalane et de l'anhydromannitol éther octodecenoate, de préférence dans les proportions suivantes : ester de glycérol : 50 %, squalane : 10 % et anhydromannitol éther octodecenoate : 40 %.

On peut également citer, mais sans s'y limiter, les adjuvants de type émulsion huile-dans-eau suivants :

- la composition adjuvante décrite dans la demande de brevet internationale publiée le 11 novembre 1999 sous le numéro WO 99/56776 ( RIBI ImmunoChem Research Inc.), qui est une émulsion huile-dans-eau stable comprenant une huile métabolisable, un ou plusieurs tensio-actifs, un antioxydant et un composé pour rendre l'émulsion isotonique ;
- les émulsions huile-dans-eau submicroniques décrites dans la demande de brevet internationale publiée le 24 juin 1999 sous le numéro WO 99/30737 (CHIRON Corp.), relative à des compositions vaccinales comprenant d'une part des microparticules biodégradables avec des antigènes inclus ou adsorbés, d'autre part de telles émulsions huile-dans-eau submicroniques ;

- la composition adjuvante pour vaccins comprenant une huile métabolisable et un agent émulsifiant, dans laquelle l'huile et l'agent émulsifiant sont présents sous la forme d'une émulsion huile-dans-eau (gouttelettes d'huile d'un diamètre d'environ 1 micron), telle que décrite dans la demande de brevet internationale publiée le 13 décembre 1990 sous le numéro WO 90/14837 (CHIRON Corp.) ; et
- l'adjuvant pour vaccins polysaccharidiques comprenant un système émulsion huile-dans-eau contenant une huile non biodégradable hydrocarbonée légère ou une huile biodégradable et un détersif, ainsi qu'une endotoxine détoxifiée, tel que décrit dans le brevet américain publié le 7 février 1989 sous le numéro US 4,803,070 (RIBI ImmunoChem Research Inc.).

Comme exemples d'adjuvants de l'immunité de type nanoparticulaire on peut citer les adjuvants pour vaccins à base de nanoparticules liquides associées à un immunostimulant ayant le statut GRAS. De tels adjuvants, bien tolérés, sont basés sur un nouveau concept regroupant les propriétés adjuvantes des nanoparticules et d'un nouvel immunostimulant. De préférence, l'adjuvant à base de nanoparticules liquides associées à un immunostimulant ayant le statut GRAS est l'adjuvant MONTANIDE IMS 301x<sup>®</sup> (SEPPIC, Paris, France), de manière particulièrement préférée le MONTANIDE IMS 3012<sup>®</sup>. De manière générale, cet adjuvant MONTANIDE IMS 3012<sup>®</sup> contient de l'huile de maïs modifiée, une solution de tampon salé et un conservateur, de préférence dans les proportions suivantes : huile de maïs modifiée : 10 %, solution de tampon salé : 89,99 % et conservateur : 0,01 %.

On peut également citer, mais sans s'y limiter, les adjuvants de type nanoparticulaire suivants :

- les petites particules (diamètre moyen : 200 nm) utilisées notamment pour l'administration d'agents biologiquement actifs, décrites dans la demande de brevet internationale publiée le 23 octobre 2003 sous le numéro WO 03/087021 (société GENESEGUES). De telles particules comprennent un agent biologiquement actif tel que notamment un adjuvant, un tensio-actif, et un polymère soluble en solution aqueuse ;

- la composition solide adjuvante de vaccin sous forme de poudre ou de granules comprenant un support solide injectable sur lequel un liquide est capable d'être absorbé, adsorbé, imprégné ou ancré, décrite dans la demande de brevet internationale publiée le 5 décembre 2002 sous le numéro WO 02/096386 (société SEPPIC) ;  
5
- les adjuvants pour vaccins du type nanoparticules lipidiques solides décrits dans les demandes de brevet internationales WO 00/71077 (publiée le 30 novembre 2000 – société PHARMASOL), WO 00/71154 – (publiée le 30 novembre 2000 – société PHARMASOL), et dans l'article Müller et al. (Eur J Pharm Biopharm 2000 Jul ; 50(1) :161-77 – cf. paragraphe 12, page 13) ;  
10
- les adjuvants phase solide du type sels métalliques, notamment le gel d'hydroxyde d'aluminium (ALHYDROGEL), décrits dans la demande de brevet internationale publiée le 11 mai 2000 sous le numéro WO 00/25812 (LEES Andrew). De tels adjuvants sont décrits comme étant utilisés dans une méthode de préparation de vaccins conjugués ;  
15
- la formulation liquide comprenant une phase discontinue de microparticules dans une phase continue liquide non aqueuse, décrite dans la demande de brevet internationale publiée le 24 septembre 1998 sous le numéro WO 98/41188 (EASTBRIDGE Limited). Les microparticules décrites contiennent des sucres pulvérisés portant au moins un produit biomoléculaire tel qu'un médicament ou d'autres ingrédients actifs biologiquement tels qu'une protéine, un anticorps ou une enzyme. Une telle formulation peut être utilisée comme vaccin ;  
20
- les nanoparticules de diamant à surface modifiée comme véhicules d'administration d'antigènes (adjuvants) décrites dans Kossovsky et al., Bioconjug Chem 1995 Sep-Oct ; 6(5) :507-11 ; et  
25
- les particules microsphériques constituées d'une matrice continue d'un polymère biodégradable, laquelle matrice contient notamment un immunogène adsorbé sur un adjuvant de sel d'aluminium (hydroxyde d'aluminium, phosphate d'aluminium...), décrites dans la demande de brevet internationale publiée le 21 juillet 1994 sous le numéro WO 94/15636 (société CSL Limited).  
30

Selon un mode de réalisation particulier, la composition selon l'invention est obtenue par mélange de l'extrait antigénique soluble selon l'invention avec l'adjuvant de l'immunité, de préférence l'adjuvant de l'immunité de type nanoparticulaire, sous agitation douce, pendant une période de 1 mn à 5 heures, de préférence 10 mn, à une température comprise entre 1 et 6 °C, de préférence 4 °C. De préférence, avant le mélange de l'extrait antigénique soluble avec l'adjuvant de l'immunité, ledit extrait antigénique soluble est préalablement dilué à une concentration comprise entre 0,5 et 10 mg/ml dans le tampon d'extraction ou tout autre tampon connu de l'homme de l'art permettant de conserver les propriétés structurelles et de solubilité des protéines. Il existe de nombreux tampons de compositions différentes pour diluer les protéines qui peuvent être utilisés en l'espèce. De manière encore préférée, l'extrait antigénique soluble est dilué à une concentration de 1 mg/ml. De manière optionnelle, la dilution de l'extrait antigénique soluble est suivie d'une étape de filtration ou de toute autre méthode permettant de conserver des conditions stériles.

De manière particulièrement préférée, la composition selon l'invention est caractérisée en ce que l'adjuvant de l'immunité de type nanoparticulaire est l'adjuvant MONTANIDE IMS 3012<sup>®</sup>.

De manière préférée entre toutes, la composition selon l'invention contient 50 % de l'extrait antigénique soluble et 50 % de l'adjuvant nanoparticulaire MONTANIDE IMS 3012<sup>®</sup>.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la composition selon la présente invention est caractérisée en ce que l'adjuvant de l'immunité de type émulsion huile-dans-eau est l'adjuvant MONTANIDE ISA 35<sup>®</sup>.

De préférence, la composition selon l'invention contient 75 % de l'extrait antigénique soluble et 25 % de l'adjuvant émulsion huile-dans-eau MONTANIDE ISA 35<sup>®</sup>.

Selon un cinquième aspect, l'invention a pour objet l'utilisation d'un extrait antigénique soluble selon la présente invention, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter une infection par *R. equi* chez un mammifère. De préférence, le mammifère est un équidé.

Les infections par *R. equi* chez les mammifères sont à l'origine de diverses maladies, notamment des maladies du système respiratoire. Comme exemples de maladies induites par *R. equi* on peut citer, mais sans s'y limiter, chez le poulain, une bronchopneumonie pyo-granulomateuse, une entérocolite et une typhlite  
5 ulcératives multifocales souvent associées à des adénites suppurées des nœuds lymphatiques mésentériques et coliques, une arthrite, une ostéomyélite septique et plus rarement, une lymphangite, myosite et cellulite suppurées, et des abcès sous-cutanés.

Chez le cheval adulte, la maladie est sporadique et se traduit par des adénopathies  
10 pulmonaires ou coliques, des plaies infectées ; la bactérie a été également isolée sur des fœtus équinés lors d'avortements.

Des infections à *Rhodococcus equi* ont été décrites dans d'autres espèces de mammifères (bovins, porcins, ovins, caprins, lamas, chiens, chats ...) pour lesquelles, de façon générale, l'expression clinique de la maladie reste rare. Dans  
15 la plupart des cas, les lésions observées sont des adénopathies, suppurées ou non ; les pneumonies sont exceptionnelles mais ont été rapportées, entre autres, chez le mouton, la chèvre et le lama.

En revanche, chez l'homme, comme chez le poulain, la pneumonie est la manifestation clinique prédominante des infections à *Rhodococcus equi*.

Ainsi, de préférence, l'utilisation selon la présente invention est caractérisée en ce  
20 que l'infection par *R. equi* induit une maladie du système respiratoire, notamment une pneumonie.

De manière encore préférée, l'utilisation selon la présente invention est caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend en outre un  
25 adjuvant de l'immunité.

De manière encore préférée, l'adjuvant de l'immunité est de type nanoparticulaire ou de type émulsion huile-dans-eau.

De manière particulièrement préférée, l'utilisation selon la présente invention est caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend en outre un  
30 adjuvant de l'immunité de type nanoparticulaire qui est l'adjuvant MONTANIDE IMS 3012®.

De manière préférée entre toutes, l'utilisation selon la présente invention est caractérisée en ce que la composition pharmaceutique contient 50 % de l'extrait antigénique soluble et 50 % de l'adjuvant nanoparticulaire MONTANIDE IMS 3012<sup>®</sup>.

5 Selon un autre mode de réalisation, l'utilisation selon la présente invention est caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend en outre un adjuvant de l'immunité de type émulsion huile-dans-eau qui est l'adjuvant MONTANIDE ISA 35<sup>®</sup>.

De préférence, la composition pharmaceutique contient 75 % de l'extrait antigénique soluble et 25 % de l'adjuvant émulsion huile-dans-eau MONTANIDE  
10 ISA 35<sup>®</sup>.

La composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter une infection par *R. equi* peut être administrée selon tout mode approprié chez un mammifère, de préférence un équidé.

15 De préférence, l'utilisation selon la présente invention est caractérisée en ce que la composition pharmaceutique est administrée audit mammifère par voie intramusculaire ou sous-cutanée.

Selon un mode réalisation particulier, l'utilisation selon la présente invention est caractérisée en ce que le mammifère est choisi parmi l'homme et les mammifères  
20 non humains, tels que les bovins, les porcins, les ovins, la chèvre, le chat. De préférence, le mammifère est un équidé, tel que notamment le cheval.

De préférence, ladite composition pharmaceutique est administrée au poulain après la naissance, de préférence en 1 à 4 prises en fonction du degré de contamination de l'environnement.

25 De manière particulièrement préférée, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce que la composition pharmaceutique est destinée à la prévention ou au traitement pré-natal d'un poulain en gestation, ladite composition pharmaceutique étant administrée à la jument gravide. De préférence, ladite composition pharmaceutique est administrée en 1 à 4 prises en fonction du degré  
30 de contamination de l'environnement.

Les légendes des figures et exemples qui suivent sont destinées à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

### LEGENDE DES FIGURES

5

**Figure 1 :** Niveaux d'IgG anti-*R. equi* chez les juments immunisées avec des antigènes contenant la protéine VapA (Groupe 1), les juments immunisées avec des bactéries *R. equi* entières tuées (Groupe 2) et les juments témoins. Les taux d'IgG ont été déterminés par méthode ELISA. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (UA) + 1 erreur standard. Signification statistique des différences entre les Groupes 1 (▲), 2 (●) et témoin (■) :

10

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

**Figure 2 :** Mise en évidence par western-blot des anticorps sériques anti-VapA.

15

La technique illustre la liaison des anticorps contenus dans les sérums testés à la bande de 15 KDa correspondant à VapA.

VapA = anticorps polyclonal de lapin anti-VapA (flèche)

A = couple jument - poulain (groupe témoin)

B = couple jument - poulain (groupe 1)

20

C = couple jument - poulain, transfert significatif d'anticorps (groupe 2)

D = couple jument - poulain, absence de transfert d'anticorps (groupe 2)

1 = sérums des juments avant immunisation

2 = sérums des juments 45 jours après immunisation

3 = sérums des poulains 30 jours après la naissance

25

**Figure 3 :** Cinétiques des IgG anti-*R. equi* chez les poulains issus des juments immunisées avec des antigènes contenant la protéine VapA (Groupe 1, « G1 »), des juments immunisées avec des bactéries *R. equi* entières tuées (Groupe 2, « G2 ») et des juments témoins (groupe témoin « GT », poulains sains « G<sub>sains</sub> », poulains atteints de rhodococcose « G<sub>rhodoc</sub> »). Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (UA) + 1 erreur standard selon le nombre de jours après la

30

naissance. Signification statistique des différences : \*  $p < 5\%$ , \*\*  $p < 1\%$ , \*\*\*  $p < 1\%$ .

5 **Figure 4** : Opsonisation de *R. equi* par les polynucléaires neutrophiles des juments  
et des poulains, témoins (□) groupe 2 (▨) et groupe 1 (■). Les résultats sont  
exprimés en nombre de bactéries adhérentes pour 200 polynucléaires neutrophiles.  
Les sérums ont été testés avant la première immunisation (Jour 0) et après la  
seconde immunisation (jour 45) pour les juments, 30 jours après la naissance pour  
les poulains. Signification statistique des différences : \*  $p < 5\%$ , \*\*  $p < 1\%$ , \*\*\*  
10  $p < 1\%$ .

## EXEMPLES

15 **EXEMPLE 1 : PROTOCOLE DE PREPARATION VACCINALE ANTI-R.  
EQUI DESTINEE AUX JUMENTS GRAVIDES (EXTRACTION DES  
ANTIGENES AU TRITON)**

L'objectif de cet exemple est d'évaluer l'effet de l'immunisation d'une jument  
grave par un vaccin potentiel contenant VapA associée à un adjuvant  
20 nanoparticulaire, sur les niveaux d'IgG spécifiques et d'activité opsonisante  
sérique, transmis au poulain via le colostrum, et sur la survenue de pneumonie à *R.  
equi*.

### 1. Matériels et méthodes

25

#### **1.1 Préparation des antigènes de *Rhodococcus equi***

La solution purifiée de protéines de *R. equi* contenant Vap A a été préparée à  
partir de la souche 85F et caractérisée par western-blot. Une injection était  
composée de 1 mg de protéines dilué dans 0,5 ml de tampon tris acétate, pH 8,5,  
2% Triton X-100 (Sigma, St Quentin Fallavier, France), associé à 0,5 ml  
d'adjuvant aqueux nanoparticulaire (IMS 3012, Laboratoires SEPPIC, Castres,  
France). Les animaux témoins ont reçu la même solution sans les protéines. Les

juments du groupe 2 ont été immunisées avec une solution saline contenant  $1.10^9$  bactéries fixées, provenant d'une culture à partir d'un prélèvement de poulain mort de rhodococcose dans un des haras de l'étude.

### 1.2 Animaux

5 Quarante-huit juments gravides (26 Trotteur-Français, 16 Pur-Sang anglais et 6 poneys, de 11 ans d'âge moyen avec un intervalle de 5 à 17 ans) dont les dates de terme s'étalaient de janvier à juillet 2002 ont été incluses dans l'étude. Elles étaient stationnées dans 3 haras atteints de façon enzootique par la maladie et situés dans 2 départements bas-normands (Calvados et Orne). Chaque jument était restée dans le même élevage au moins 6 mois avant son terme et 6 mois après le poulinage.

10 Dix-sept des 48 poulinières avaient été immunisées 3 fois au cours de la gestation précédente avec des bactéries *R. equi* entières tuées et les autres chevaux n'avaient jamais fait l'objet d'une immunisation contre *R. equi*. Les juments devant être immunisées dans le cadre de l'étude ont été divisées en 2 groupes : le groupe 1 (24 juments) était constitué de juments recevant des antigènes contenant la protéine VapA et le groupe 2 (8 juments) de juments recevant la bactérie totale tuée (autovaccin). L'immunisation a été pratiquée par injection intra-musculaire dans l'encolure.

Les animaux ayant reçu l'autovaccin au cours de la gestation précédente se répartissaient en 9/24 dans le groupe 1 et 8/8 dans le groupe 2.

20 Les animaux du groupe témoin (15 juments) étaient associés par paire avec ceux du groupe 1 selon les dates de terme. Les nombres de poulains inclus dans l'étude étaient de respectivement 23, 7 et 13 dans les groupes 1, 2 et témoin, en raison d'un cas de mortinatalité lié à une dystocie dans le groupe 1 et d'une interruption du suivi dans les 3 autres cas.

25

### 1.3 Protocole d'immunisation

Les injections ont été administrées à 9, 6 et 3 semaines avant la date présumée de terme dans les groupes 1 et témoin et à 6, 3 et 1 mois avant la date présumée de terme dans le groupe 2.

Après immunisation, les sérums ont été prélevés chaque semaine jusqu'au terme, excepté chez 22 poulinières pour lesquelles la dernière prise de sang n'a pu être effectuée en raison d'un poulinage avant terme. Les poulains ont été prélevés à la naissance, après la prise colostrale (c'est-à-dire à 24 heures de vie) et à 30 et 45 jours d'âge. Du colostrum a été recueilli à la naissance. Ces échantillons ont été conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'au moment de l'analyse.

#### 1.4 Détection des IgG anti-*Rhodococcus equi*

Les IgG ont été dosées par méthode ELISA. Les plaques 96 puits (Nalge Nunc, Rochester, NY, USA) ont été coatées ( $1\mu\text{g/puits}$ ) avec la solution de protéines contenant VapA (Cf 1.1) diluées dans du PBS une nuit à  $4^{\circ}\text{C}$ , puis lavées trois fois avec du PBS, 0,05% v/v Tween 20, (PBST), et saturées avec du tampon PBS, 1% BSA une nuit à  $4^{\circ}\text{C}$ , puis lavées trois fois. Les sérums ont été ajoutés en triplicata à trois dilutions (1/100, 1/1000, 1/50000) et incubés à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant une heure. Après trois lavages au PBST, l'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de cheval couplé à la peroxydase (1/1600, laboratoires Bethyl, Montgomery, TX, USA) a été incubé pendant une heure à  $37^{\circ}\text{C}$ . Après trois lavages,  $100\mu\text{l}$  de TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) prêt à l'emploi (Uptima, Interchim, Montluçon, France) ont été déposés et incubés pendant 20 min à température ambiante. La réaction a été stoppée par l'addition d' $\text{H}_3\text{PO}_4$  1M. La densité optique a été lue à 415 nm sur un spectromètre automatique. La valeur de DO retenue a été déterminée en soustrayant la moyenne des DO des puits de contrôle à la moyenne des DO des sérums expérimentaux. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (moyenne des DO pour la dilution 1/1000, et des DO 1/100 et 1/50000 extrapolées à 1/1000). La limite de détection a été déterminée expérimentalement par western-blot avec un sérum dépourvu d'anticorps dirigés contre *Rhodococcus equi*.

#### 1.5 Western blot

La solution de protéines contenant VapA a migré sur un gel SDS-PAGE à 12%. Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant 90 min à 90 Volts. Les membranes ont été bloquées pendant une nuit à  $4^{\circ}\text{C}$  dans une solution de TBS-T contenant 5% de BSA puis lavées trois fois avec du TBS-T

(« Tris buffer saline » ou tampon salé, connu de l'homme de l'art, associé à du Tween). La présence des bandes de VapA de 15 Kda a été contrôlée avec un anticorps polyclonal de lapin anti-VapA (1/2000) préparé par immunisation avec des peptides VapA et révélée (1/30000) par des anticorps secondaires de chèvre anti-IgG de lapin couplés à la phosphatase alcaline (Sigma, St Quentin Fallavier, France). Les IgG de cheval fixées aux antigènes de *R. equi* après incubation pendant 1 heure à 37°C et trois lavages ont été révélées par un anticorps secondaire (1/5000) de chèvre anti-IgG de cheval couplé à la phosphatase alcaline (Bethyl, Montluçon, France). Après trois lavages avec la solution de TBS-T, la révélation a été marquée par l'ajout de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/p-nitro blue tetrazolium (Uptima, Interchim, Montluçon, France). La réaction a été stoppée par l'addition d'eau.

#### **1.6. Evaluation des capacités opsonisantes des sérums**

Il s'agissait de compter le nombre de *R. equi* phagocytées par les polynucléaires neutrophiles d'un cheval adulte cliniquement sain. Les échantillons sanguins fraîchement prélevés dont les érythrocytes ont été lysés (Hybrimax, Sigma), ont été centrifugés (200g, 10 min, température ambiante). Le culot cellulaire a été resuspendu dans une solution de Hanks. Les cellules ont été incubées pendant 20 min avec des bactéries issues d'une culture exponentielle de 85F en présence des sérums non décomplémentés à tester, puis fixées pendant 5 min dans une solution de glutaraldéhyde à 0,5% et colorées au Giemsa. Le nombre de bactéries fixées sur 200 polynucléaires neutrophiles a été compté indépendamment par deux personnes (microscope à immersion, 1000 X). Les contrôles étaient dépourvus de sérum de cheval.

#### **1.7 Suivi clinique**

Chez les juments, les réactions inflammatoires locales au site d'injection ont été notées.

- 5 Les cas d'infection à *R. equi* chez les poulains au cours des premiers 6 mois de vie ont été également enregistrés après confirmation par isolement bactérien à partir de liquide de lavage trachéal, de sang et de fèces.

### 1.8 Analyses statistiques

Chaque fois qu'ils s'y prêtaient, les résultats ont été exprimés par une moyenne  $\pm$  une erreur standard.

5 L'influence de l'immunisation des juments sur les taux d'IgG colostrales, la proportion de juments possédant des anti-corps anti-VapA dans les différents groupes et la comparaison de la prévalence de la maladie chez les poulains des 3 groupes ont été analysées par ANOVA, test de  $\chi^2$  et test exact de Fisher, respectivement (logiciel Statview 5.0).

10 Les effets de l'immunisation des juments sur la cinétique des IgG spécifiques chez les poulains ont été étudiés grâce à un modèle linéaire (procédure GLM, logiciel SAS 8.2).

## 2. Résultats

### 15 **2.1 Taux d'IgG sériques dirigées contre *R. equi* chez les juments gestantes avant et après immunisation**

Les niveaux d'IgG déterminés par ELISA avant immunisation étaient significativement plus élevés dans le groupe 2 que dans les 2 autres groupes (Figure 1).

20 Chez 3 juments du groupe 1, une inflammation significative a été observée au site d'injection et a disparu en 24-48 heures.

Après injection de la préparation antigénique contenant VapA, les taux d'IgG spécifiques ont augmenté entre J0 et J7 puis ont atteint un plateau qui s'est maintenu jusqu'à J56.

25 A partir du 7<sup>ème</sup> jour, les niveaux d'anticorps du groupe 1 étaient significativement plus élevés que dans les 2 autres groupes.

La présence d'IgG anti-VapA a été détectée par immunoblots comme indiqué dans la figure 2.

30 Comme cela était prévisible, le ratio d'animaux possédant des anticorps spécifiques avant immunisation était supérieur dans le groupe 2 relativement au groupe 1 du fait d'antécédents d'immunisation (Tableau 1). Tous les animaux du groupe témoin sauf un étaient dépourvus d'anticorps détectables anti-VapA.

L'immunisation avec des antigènes contenant VapA a entraîné la présence d'IgG anti-*R. equi* chez 23 juments sur 24 dans le groupe 1, quel que soit leur statut avant immunisation, ratio plus élevé que dans le groupe 2 ( $p < 0,01$ ). La plupart des poulains du groupe 1 montraient des anticorps spécifiques sériques à 30 jours après la naissance et ceci avec une fréquence plus élevée que dans le groupe 2 ( $p < 0,0001$ ) qui ne différait que légèrement de celle des poulains du groupe témoin ( $p = 0,04$ ).

**Tableau 1** : Nombre d'animaux possédant des anticorps dirigés contre Vap A détectés par western-blot chez les juments avant/après immunisation et les poulains.

	Juments JO	Juments J45*	Poulains J30**
Groupe 1	8/24	23/24	22/23
Groupe 2	6/8	7/8	4/7
Témoins	1/15	2/15	4/13

Les résultats sont exprimés en ratio du nombre d'animaux possédant des anticorps anti-*R. equi* détectés par western-blot sur le nombre d'animaux dans le groupe correspondant.

\* Après immunisation

\*\* Après la naissance

## 2.2 Mesure des anticorps colostraux

Les IgG dosées par ELISA étaient significativement plus abondantes dans le colostrum des juments du groupe 1 (moyenne 2,124 UA  $\pm$  0,035) et du groupe 2 (moyenne 1,928  $\pm$  0,160) que chez les juments témoins (moyenne 1  $\pm$  0,147) ( $p < 0,0001$  et  $p = 0,0005$ , respectivement) bien qu'aucune différence significative n'ait été observée entre les 2 lots immunisés ( $p > 0,05$ ).

### 2.3 Cinétique des IgG sériques anti-*R. equi* post-immunisation chez les poulains

Les résultats sont détaillés dans la figure 3. A la naissance, des IgG sériques anti-*R. equi* détectables par ELISA n'ont été mises en évidence chez aucun des poulains (nouveaux-nés).

Après la prise colostrale, les poulains de 24 heures ont montré des taux d'anticorps anti-*R. equi* voisins de ceux de leur mère ( $p > 0,05$  ; donnée non présentée). Les poulains du groupe 1 présentaient des niveaux d'anticorps plus élevés que dans le groupe 2 ( $p < 0,05$ ) qui n'étaient pas différents de ceux du groupe témoin ( $p > 0,05$ ).

Les taux moyens d'anticorps du groupe 1 ont décliné progressivement entre J1 et J45 demeurant cependant plus élevés que ceux du groupe témoin à la naissance alors que les valeurs restaient stables dans le groupe 2. Le niveau moyen d'anticorps a augmenté à J45 dans le groupe témoin car 4 poulains ont développé une pneumonie à *R. equi* confirmée. Cependant, aucune différence significative avec les valeurs initiales n'était observée dans ce groupe en excluant les poulains atteints de pneumonie ( $p > 0,05$ ).

### 2.4 La préparation antigénique contenant la protéine VapA et non pas celle constituée de bactéries *R. equi* totales augmente significativement l'activité opsonisante sérique chez les juments et les poulains

Le 45<sup>ème</sup> jour après immunisation, l'activité opsonisante sérique était plus élevée chez les poulinières du groupe 1 (nombre moyen de bactéries adhérentes pour 200 polynucléaires neutrophiles :  $238,6 \pm 30,6$  Figure 4) que chez celles du groupe 2 et du groupe témoin (respectivement  $p < 0,001$  et  $p < 0,01$ ) ; ces 2 derniers groupes ne différaient d'ailleurs pas pour ce critère ( $p > 0,05$ ). Cette activité a été transmise aux poulains ; en effet, les poulains du groupe 1 montraient un nombre moyen de bactéries adhérentes pour 200 polynucléaires neutrophiles ( $91,48 \pm 11$ ) plus élevé que les poulains du groupe 2 et du groupe témoin (respectivement  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ ) (Figure 4).

### 2.5 Survenue de pneumonie à *R. equi* chez les poulains témoins et issus de juments immunisées



A. **Préparation des doses vaccinales (injection intra-musculaire, 1 ml)**

Adjuvant : IMS 3012 (SEPPIC, France)

Antigène : solution antigénique S1 diluée à 1 mg/ml puis filtrée (0,22 µm)

5 L'adjuvant et l'antigène sont mélangés (vol : vol) puis le mélange est agité doucement pendant 10 mn à 4°C.

Toutes les manipulations sont effectuées en conditions stériles.

Contrôle qualité : bactériologique

10 **EXEMPLE 3 COMPARATIF : EFFET SURPRENANT DU TWEEN-20 PAR RAPPORT AU TRITON DANS LA PREPARATION DES EXTRAITS ANTIGENIQUES**

15 - 24 juments immunisées avec l'adjuvant IMS3012 associé à la préparation antigénique

- 16 juments témoins ayant reçu l'adjuvant IMS3012 sans la préparation antigénique

Les juments des deux lots ont reçu 3 injections (2 lors de poulinage précoce).

20 Après l'apparition de réactions inflammatoires, aussi bien au niveau du poitrail que de l'encolure, l'hypothèse a été émise que la préparation antigénique pouvait être à l'origine des réactions. Il a été décidé de modifier la préparation des extraits antigéniques en remplaçant comme détergeant le triton par le Tween-20. Les résultats observés sont rapportés dans le tableau ci-dessous.

<b>Lot de juments</b>	<b>Nombre de juments</b>	<b>Doses injectées</b>	<b>Nombre de réactions avec le triton</b>	<b>Nombre de réactions avec le Tween 20</b>
<b>Immunisées</b>	24	63 (41 triton/22 Tween-20)	3 importantes 4 bénignes	0
<b>Témoins</b>	16	45 (32 triton/13 Tween-20)	0	0

## Revendications

1. Procédé de préparation d'un extrait antigénique soluble, obtenu à partir  
5 de bactéries *Rhodococcus equi*, caractérisé en ce que ledit procédé comprend les  
étapes suivantes :
- a) La solubilisation des membranes desdites bactéries par mise en contact de ces  
bactéries avec une solution d'extraction contenant un détergent non ionique de  
type ester d'acide gras polyoxyéthylénique de sorbitanne, et  
10 b) La récupération de l'extrait antigénique solubilisé à l'étape a).
2. Procédé de préparation selon la revendication 1, caractérisé en ce que  
l'ester d'acide gras polyoxyéthylénique de sorbitanne est choisi parmi le  
monolaurate polyoxyéthylénique 20 de sorbitanne, le monopalmitate  
15 polyoxyéthylénique 20 de sorbitanne, le monostéarate polyoxyéthylénique 20 de  
sorbitanne, et le monooléate polyoxyéthylénique 20 de sorbitanne.
3. Procédé de préparation selon la revendication 2, caractérisé en ce que  
l'ester d'acide gras polyoxyéthylénique de sorbitanne est le monolaurate  
20 polyoxyéthylénique 20 de sorbitanne.
4. Procédé de préparation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé  
en ce que ledit détergent non ionique est à une concentration comprise entre 0,01  
% et 5 % volume à volume (v/v) dans ladite solution d'extraction.  
25
5. Procédé de préparation selon la revendication 4, caractérisé en ce que la  
concentration du détergent non ionique est de 0,1 % v/v dans ladite solution  
d'extraction.
- 30 6. Procédé de préparation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé  
en ce qu'à l'étape a) de solubilisation, la mise en contact des bactéries avec le

tampon d'extraction est réalisée à une proportion de 5ml dudit tampon par gramme de bactéries humides.

5 7. Procédé de préparation selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que les bactéries *Rhodococcus equi* sont de souche choisie parmi les souches ATCC33701, ATCC6939, ATCC2572, et la souche 85F déposée à la CNCM le 2 juillet 2004 sous le numéro I-3250.

10 8. Procédé de préparation selon la revendication 7, caractérisé en ce que les bactéries *Rhodococcus equi* sont de souche 85F déposée à la CNCM le 2 juillet 2004 sous le numéro I-3250.

15 9. Procédé de préparation selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que lesdites bactéries se présentent sous la forme d'un culot bactérien obtenu après centrifugation, avant l'étape a).

20 10. Procédé de préparation selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'on procède à au moins un lavage du culot bactérien dans un tampon de lavage approprié, avant l'étape a).

11. Procédé de préparation selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'à l'étape b) on centrifuge le produit obtenu à l'étape a), et on récupère le surnageant de centrifugation contenant ledit extrait antigénique solubilisé.

25 12. Procédé de préparation selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que les bactéries *Rhodococcus equi* sont de souche 85F déposée à la CNCM le 2 juillet 2004 sous le numéro I-3250, et en ce que l'ester d'acide gras polyoxyéthylénique de sorbitanne est le monolaurate polyoxyéthylénique 20 de sorbitanne.

30 13. Procédé de préparation d'un extrait antigénique soluble, obtenu à partir de bactéries *Rhodococcus equi* de souche 85F déposée à la CNCM le 2 juillet

2004 sous le numéro I-3250, caractérisé en ce que ledit procédé comprend les étapes suivantes :

- 5 - L'obtention d'un culot bactérien par centrifugation des dites bactéries *Rhodococcus equi* en suspension à une vitesse de 10000 g, pendant 20 mn, de préférence à une température de 4 °C,
- Deux lavages successifs du culot bactérien obtenu dans un tampon Tris acétate 10 mM de pH 7 à 8, suivis d'un troisième lavage dans un tampon Tris acétate 25 mM de pH 7,5,
- 10 - La solubilisation des membranes bactériennes du culot bactérien lavé par mise en contact dudit culot avec une solution d'extraction contenant du monolaurate polyoxyéthylénique 20 de sorbitanne à une concentration de 0,1 % (v/v) dans ladite solution d'extraction, la proportion bactéries / tampon d'extraction étant de 5 ml dudit tampon par gramme de bactéries humides, ladite solubilisation étant réalisée sous agitation pendant 90 mn à une température comprise entre  
15 35 et 40 °C, et
- On centrifuge le produit obtenu à l'étape précédente à 100000 g pendant 1 heure, de préférence à 4 °C, et on récupère le surnageant de centrifugation contenant ledit extrait antigénique solubilisé.

20 14. Extrait antigénique soluble de bactéries *Rhodococcus equi*, susceptible d'être obtenu à partir du procédé selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que ledit extrait comprend des antigènes membranaires de *R. equi* en solution dans une solution d'extraction contenant un détergent non ionique de type ester d'acide gras polyoxyéthylénique de sorbitanne.

25 15. Extrait antigénique soluble selon la revendication 14, caractérisé en ce que les bactéries *Rhodococcus equi* sont de souche 85F déposée à la CNCM le 2 juillet 2004 sous le numéro I-3250, et en ce que l'ester d'acide gras polyoxyéthylénique de sorbitanne est le monolaurate polyoxyéthylénique 20 de  
30 sorbitanne.

16. Composition comprenant l'extrait antigénique soluble selon la revendication 14 ou 15, à titre de médicament.
- 5 17. Composition selon la revendication 16, caractérisée en ce qu'elle contient en outre un adjuvant de l'immunité de type nanoparticulaire ou de type émulsion huile-dans-eau.
- 10 18. Composition selon la revendication 17, caractérisée en ce que l'adjuvant de l'immunité de type nanoparticulaire est le MONTANIDE IMS 3012<sup>®</sup>.
- 15 19. Composition selon la revendication 18, caractérisée en ce qu'elle contient 50 % de l'extrait antigénique soluble et 50 % de l'adjuvant nanoparticulaire MONTANIDE IMS 3012<sup>®</sup>.
- 20 20. Composition selon la revendication 17, caractérisée en ce que l'adjuvant de l'immunité de type émulsion huile-dans-eau est le MONTANIDE ISA 35<sup>®</sup>.
- 25 21. Composition selon la revendication 20, caractérisée en ce qu'elle contient 75 % de l'extrait antigénique soluble et 25 % de l'adjuvant émulsion huile-dans-eau MONTANIDE ISA35<sup>®</sup>.
- 30 22. Utilisation d'un extrait antigénique soluble selon la revendication 14 ou 15, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter une infection par *R. equi* chez un mammifère.
23. Utilisation selon la revendication 22, caractérisée en ce que le mammifère est un équidé.
24. Utilisation selon la revendication 22 ou 23, caractérisée en ce que l'infection par *R. equi* induit une maladie du système respiratoire, notamment une pneumonie.

25. Utilisation selon l'une des revendications 22 à 24, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend en outre un adjuvant tel que défini dans les revendications 17 à 21.
- 5 26. Utilisation selon l'une des revendications 22 à 25, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique est administrée audit mammifère par voie intramusculaire ou sous-cutanée.
- 10 27. Utilisation selon l'une des revendications 22 à 25 pour la prévention ou le traitement pré-natal d'un poulain en gestation, ladite composition pharmaceutique étant administrée à la jument gravide.

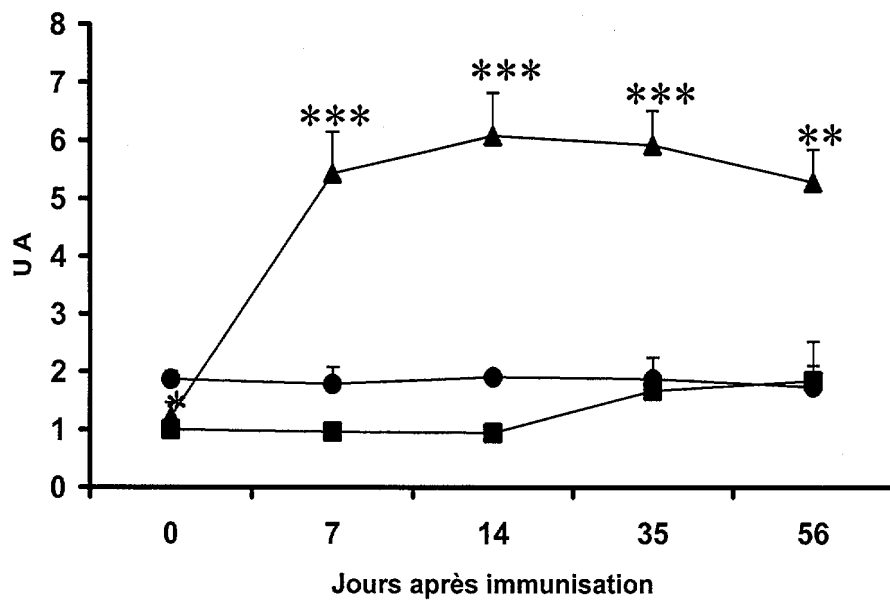


Figure 1

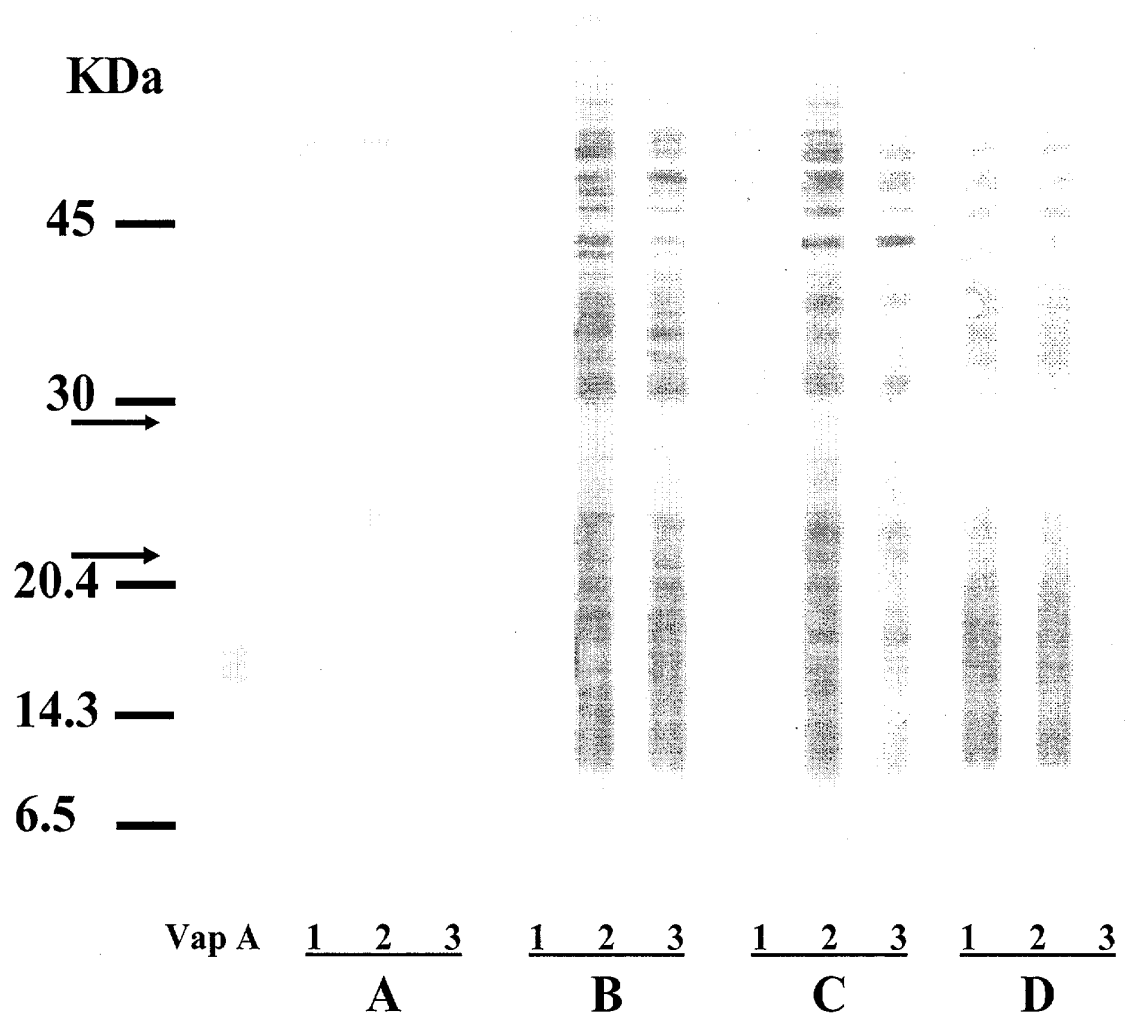


Figure 2

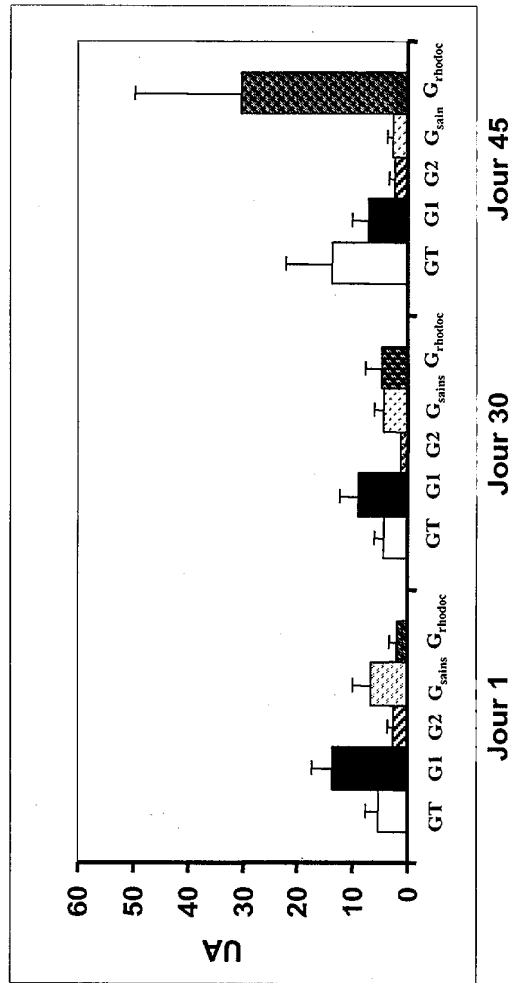


Figure 3

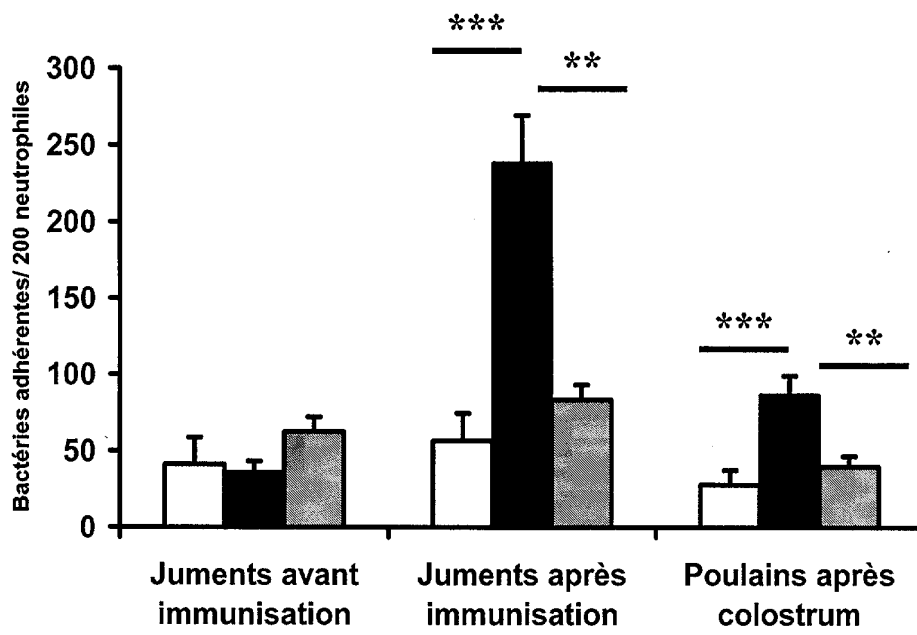


Figure 4



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 651912  
FR 0408136

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	TAKAI S ET AL: "IMMUNOGLOBULIN AND SPECIFIC ANTIBODY RESPONSES TO RHODOCOCCUS-EQUI CORYNEBACTERIUM-EQUI INFECTION IN FOALS AS MEASURED BY ELISA" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 23, no. 5, 1986, pages 943-947, XP009044357 ISSN: 0095-1137	1-7, 9-11,14	C12N1/06 A61K39/05 A61P31/04
Y	* page 944, colonne de gauche, ligne 4 - ligne 15 *	8,12,13, 15-27	
X	HIGUCHI T ET AL: "Clinical evaluation of the serodiagnostic value to enzyme-linked immunosorbent assay for Rhodococcus equi infection in foals" EQUINE VETERINARY JOURNAL, vol. 29, no. 4, 1997, pages 274-278, XP009044356 ISSN: 0425-1644	1-7, 9-11,14	
Y	* paragraphe intitulé "ELISA" page 275*	8,12,13, 15-27	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
Y	CA 2 125 426 A1 (UNIVERSITY OF GUELPH) 9 décembre 1995 (1995-12-09) * page 14, ligne 20 - ligne 34 * * page 15, ligne 23 - page 16, ligne 5 * * page 20, ligne 1 - ligne 33; exemples 2,5 *	16-27	A61K
	----- -/--		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
1 mars 2005		Loubradou, G	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

1  
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 651912  
FR 0408136

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y	BENOIT STEPHANIE ET AL: "H2O2, which causes macrophage-related stress, triggers induction of expression of virulence-associated plasmid determinants in Rhodococcus equi" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 70, no. 7, juillet 2002 (2002-07), pages 3768-3776, XP002319577 ISSN: 0019-9567 * page 3769, colonne de gauche, paragraphe intitulé "Bacterial strains and growth conditions" *	8,12,13, 15	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
Y	BENOIT STEPHANIE ET AL: "Induction of vap genes encoded by the virulence plasmid of Rhodococcus equi during acid tolerance response" RESEARCH IN MICROBIOLOGY, vol. 152, no. 5, juin 2001 (2001-06), pages 439-449, XP002319578 ISSN: 0923-2508 * page 440, colonne de gauche, dernier alinéa *	8,12,13, 15	
D,A	TAN C ET AL: "MOLECULAR CHARACTERIZATION OF A LIPID-MODIFIED VIRULENCE-ASSOCIATED PROTEIN OF RHODOCOCCUS EQUI AND ITS POTENTIAL IN PROTECTIVE IMMUNITY" CANADIAN JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH, XX, XX, vol. 59, no. 1, janvier 1995 (1995-01), pages 51-59, XP002913907 * le document en entier *	-/--	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
1 mars 2005		Loubradou, G	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

1  
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**  
établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 651912  
FR 0408136

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	TAOUJI S ET AL: "Immunogenecity of synthetic peptides representing linear B-cell epitopes of VapA of Rhodococcus equi" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 22, no. 9-10, 12 mars 2004 (2004-03-12), pages 1114-1123, XP004493373 ISSN: 0264-410X * abrégé *		
D,A	PRESCOTT J F ET AL: "USE OF RHODOCOCCLUS EQUI VIRULENCE-ASSOCIATED PROTEIN FOR IMMUNIZATION OF FOALS AGAINST R EQUI PNEUMONIA" AMERICAN JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH, XX, XX, vol. 58, no. 4, avril 1997 (1997-04), pages 356-359, XP002913906 ISSN: 0002-9645 * le document en entier *		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
D,A	BECU T ET AL: "IMMUNOPROPHYLAXIS OF RHODOCOCCLUS EQUI PNEUMONIA IN FOALS" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 56, no. 3/4, 16 juin 1997 (1997-06-16), pages 193-204, XP002913901 ISSN: 0095-1137 * le document en entier *		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
1 mars 2005		Loubradou, G	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>	

1  
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0408136 FA 651912**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **01-03-2005**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
CA 2125426	A1	09-12-1995	AUCUN
-----			