

BACTÉRIOLOGIE

Isolation et identification au Sénégal d'un antigène soluble immunogène de *Clostridium chauvoei*, agent du charbon symptomatique des bovins.

M.B. Mbengue

Institut sénégalais de recherches agricoles. Laboratoire national de l'élevage et de recherches vétérinaires. BP 2057, Dakar Hann, Sénégal. E-mail : mbenguem@hotmail.com

Courte note n° 3101. "Bactériologie". Reçue le 19 avril 2007. Accepté le 2 octobre 2007.

Summary: Isolation and identification in Senegal of the most immunogenic protein soluble antigen of a *Clostridium chauvoei* strain.

Clostridium chauvoei is the pathogenic agent for blackleg, a toxoinfection disease in bovine and small ruminants, always lethal and involving considerable economic losses. Some bacteriological, biochemical, immunological studies permitted to isolate, identify the major soluble antigenic protein of this bacteria. It's a protein fragment of 70 kDa weight, the 19 fraction, excreted by the bacteria in a suitable culture medium. The 19 fraction of extracellular medium leads to antibodies production on guinea pigs revealed by the ELISA/antibody test.

**protein antigen
immunogenicity
Clostridium chauvoei
blackleg
cattle**

Introduction

Clostridium chauvoei est une bactérie à la fois tellurique, anaérobie stricte et sporogène. Elle est à l'origine du charbon symptomatique, maladie toxi-infectieuse mortelle des ruminants, dont le pouvoir pathogène est dû essentiellement à son exotoxine et à ses enzymes. Cette bactérie a un pouvoir antigénique multiforme dû à l'existence d'un antigène somatique O thermostable, commun à toutes les souches et ayant un pouvoir vaccinant, d'antigènes flagellaires H thermolabiles, d'une exotoxine létale et d'enzymes toutes antigéniques, mais d'immunogénicité variable (3). La prévention de la maladie repose sur la vaccination à l'aide d'un vaccin inactivé, adjuvé et univalent, la protection immunitaire étant suscitée principalement par les antigènes du corps bactérien, somatiques et flagellaires et secondairement par les toxines et antigènes extracellulaires (5). Les vaccins conventionnels présentant des insuffisances, notamment le manque de spécificité, les recherches s'orientent de plus en plus vers la mise au point de vaccins recombinants.

Le travail présenté a pour objet d'identifier, d'isoler et de caractériser l'antigène soluble protéique le plus immunogène, d'une souche de *Clostridium chauvoei* utilisée au Sénégal pour la production de vaccin contre le charbon symptomatique.

Matériels et méthodes d'étude

La souche bactérienne est *Cl. chauvoei* d'origine malgache, le milieu de culture est un milieu VFG (milieu viande foie glucosé à base de trypticase). L'expérience est menée sur des cobayes et des souris. La culture de 48 heures du germe en milieu liquide anaérobie sous 5 % de CO₂ est centrifugée à 12000 g pendant 30 minutes. Le surnageant contenant les protéines excrétées constitue le compartiment extracellulaire (CE). Le culot est lavé, soumis aux ultrasons, puis centrifugé et le deuxième surnageant contenant les protéines non ou par-

**antigène protéique
immunogénicité
Clostridium chauvoei
charbon symptomatique
bovin**

tiellement excrétées constitue le compartiment intracellulaire (CI). Le culot renfermant les particules solides constitue le corps bactérien (CB), conservé à -20 °C. Ces fractions sont soumises à l'électrophorèse.

L'activité biologique des protéines totales et des fractions protéiques est étudiée sur des souris et des cobayes inoculés (S/C de 200 µl de souches détoxifiées ou non au formol avec 5 % CaCl₂) qui sont suivis et visités toutes les heures.

Les cobayes font l'objet de prise de sang pour une étude de la cinétique des anticorps dont le titre est déterminé par ELISA/anticorps et reçoivent la dose d'épreuve 14 jours après.

Résultats et discussions

La souche étudiée correspond à *Clostridium chauvoei*, de par ses caractères culturels, morphologiques et biochimiques (3).

Protéines extracellulaires

Vingt et une fractions protéiques, dont 16 seulement présentent un intérêt en fonction de leurs densités optiques (DO) à 595 nm.

Protéines intracellulaires

Deux fractions seulement apparaissent, la 2a (12) et la 2b (14).

Protéines liées au corps bactérien

Deux fractions 3a (12) et 3b (15) dans le compartiment CB non dissocié et une fraction significative (3 ad) dans le CB dissocié. Le gradient de DO ainsi observé du CI au CE à travers le CB, illustre le mécanisme physiologique de la sécrétion à l'excrétion et l'on note que les substances synthétisées sont

en quantités plus importantes dans le CE que dans le CI, lorsque ces substances sont à localisation mixte.

Ces résultats corroborent les observations faites par ALOUF et RAYNAUD (1) sur le fait que les exoprotéines sont excrétées dès leur synthèse sans lyse bactérienne évidente, avec une concentration intracellulaire qui, sans être rigoureusement nulle, est cependant très faible à tout moment de la croissance et ne représente que 3 à 5 % de la quantité libérée à l'extérieur (1).

Activité biologique des protéines totales et des fractions protéiques

Les résultats rapportés montrent que les protéines totales sont toutes toxiques et létales sur les souris blanches.

Étude immunologique des fractions protéiques

Les résultats sont rapportés sur les tableaux I, II et III

Ils montrent que les fractions 8, 9, 13 et 16 non toxiques du CE ne sont pas protectrices, traitées ou non au formol, donc non immunogènes et que les fractions 19 et 21, non toxiques aussi, sont immunogènes, traitées ou non au formol. Les fractions 3 et 7 toxiques sont immunogènes après détoxification. La fraction 2a du CI, non toxique, est immunogène, traitée ou non au formol, la fraction 2b toxique est immunogène après détoxification. Les fractions protéiques, 3a, 3b et 3ad non toxiques du CB, sont immunogènes.

Cinétique des anticorps par ELISA anticorps des fractions immunisantes ciblées

Fractions protéiques exocellulaires

Les résultats témoignent d'une production croissante d'anticorps avec le temps. Les titres sont élevés, comparés au seuil de positivité (0,100). Un maximum a été obtenu avec le sérum de l'animal ayant reçu la fraction 3 ou la fraction 19, ce qui vient corroborer les observations de MATTAR *et al.* sur le fait que les protéines exocellulaires offrent une immunité de haute portée même à faible dose (4).

Fractions protéiques endocellulaires

Ces résultats montrent que les animaux ayant reçu les fractions 2a et 2b ont dû développer un bon pouvoir protecteur avec des titres élevés en anticorps (supérieur ou égal à une valeur en DO de 0,300).

Fractions protéiques liées au corps bactérien

Ces résultats montrent que les animaux ayant reçu les fractions 3a et 3b ont développé une bonne réaction immunitaire qui s'est avérée beaucoup plus importante pour ceux ayant reçu la fraction 3a dissociée du corps bactérien. L'immunité conférée par les antigènes flagellaires (protéines du corps bactérien) est plus faible que celle des protéines exocellulaires selon les travaux de KIJIMA *et al.* (2).

Conclusion

Les études d'immunité généralement menées sur *Clostridium chauvoei* font état d'une protection essentiellement conférée par les anticorps dirigés contre les antigènes cellulaires, notamment somatiques et flagellaires; celle conférée par des anticorps dont la synthèse est suscitée par les toxines et enzymes bactériennes étant considérée comme

Tableau I.

Immunisation des cobayes à l'aide des fractions protéiques exocellulaires. <i>Immunization of guinea pigs with exocellular protein fractions.</i>						
fractions protéiques inoculées	fractions protéiques non détoxifiées			fractions protéiques détoxifiées		
	t.inno	t.épr	observation	t.inno	t.épr	observation
3	M		3 toxique	S	S	3 protège si elle est détoxifiée
7	M		7 toxique	S	S	7 protège si elle est détoxifiée
8	S	M		S	M	
9	S	M		S	M	
13	S	M		S	M	
16	S	M		S	M	
19	S	S	19 non toxique	S	S	19 protège détoxifiée ou non
21	S	S	21 non toxique	S	S	21 protège détoxifiée ou non
T (mc)	S	M		S	M	

Tableau II.

Immunisation des cobayes à l'aide des fractions protéiques endocellulaires. <i>Immunization of guinea pigs with endocellular protein fractions.</i>						
fractions protéiques inoculées	fractions protéiques non détoxifiées			fractions protéiques détoxifiées		
	t.inno	t.épr	observation	t.inno	t.épr	observation
2a	S	S	non toxique	S	S	non toxique
2b	M		toxique	S	S	immunogène toxique et immunogène
T (mc)	S	M		S	M	

Tableau III.

Immunisation des cobayes à l'aide des fractions protéiques du corps bactérien. <i>Immunization of guinea pigs with protein fractions of the bacterial body.</i>			
fraction protéique inoculée	test d'innocuité	test d'épreuve	observations
3a	s	s	liée mais immunogène
3ad	s	s	liée mais immunogène
3b	s	s	liée mais immunogène
T (m.c)	s	M	

Légende des 3 tableaux : M = mort; S = survivant; T = témoin; mc = milieu de culture; t.inno = test d'innocuité; t.épr = test d'épreuve

de peu d'importance. En dehors du fait que ces derniers antigènes contribuent de manière évidente au processus de protection des animaux contre le charbon symptomatique, l'intérêt à leur accorder devient primordial lorsqu'on cherche à identifier la protéine bactérienne la plus immunogène, considérée isolément dans une optique de mise au point d'un vaccin recombinant ciblant un gène et son produit de nature obligatoirement protéique. De ce point de vue, il existe bien une protéine bactérienne, la protéine 19, secrétée et excrétée dans le milieu de vie, apte à induire une immunité partielle de niveau appréciable.

Références bibliographiques

1. ALOUF JE & RAYNAUD M – 1971, Isolation and purification of bacteria toxins proteins (119-182). In: AIL SJ, KADIS S & MONTIE TC (Eds), *Bacterial toxins*, Vol. 1 – New York, Academic press.
2. KIJIMA-TANAKA M, NAKAMURA M, NAGAMINE N, TAKAHASHI T, AOKI A & TAMURA Y – Protection of mice against *Clostridium chauvoei* infection by anti-idiotypic antibody to a monoclonal antibody to flagella. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1994, **8**, 183-187.
3. LE MINOR J & VERON M – 1989 – *Bactériologie médicale* – 2^e édition, Paris.
4. MATTAR MA, CORTINAS TI & STEFANINI AM – Extracellular proteins of *Clostridium chauvoei* are protective in a mouse model. *Acta Vet Hung*, 2007, **55**, 159-170.
5. SIRARD JC, WEBER M, DUFLOT E, POPOFF MR & MOCK M – A recombinant *Bacillus anthracis* strain producing the *Clostridium perfringens* I_b component induces protection against iota toxins, *Infect Immune*, 1997, **65**, 2029-2033.