1

# Biotechnologie des moyens de diagnostic et de prévention des maladies animales

J. BLANCOU

Office International des Epizooties, Paris, France.

Avant de décrire l'apport de la biotechnologie au diagnostic et à la prévention des maladies animales, il convient de bien définir le terme "biotechnologie" et ses limites.

Si de nombreuses définitions ont été données, selon que l'on accepte le terme au sens large, ou qu'on le restreint aux seules manipulations génétiques, nous nous référerons ici à celles adoptées lors de la 58<sup>e</sup> Session générale de l'Office International des Epizooties [1]: "L'application pratique de l'ensemble de nos connaissances en biologie, microbiologie ou biologie moléculaire à l'accroissement des potentialités des animaux ou à l'accroissement de leur résistance aux agressions du milieu où ils vivent."

Car les biotechnologies sont rarement issues d'une seule discipline ou d'une seule découverte mais, au contraire, de l'application simultanée de ces découvertes en vue de résoudre un problème précis.

On peut, ensuite, distinguer parmi ces méthodes biotechnologiques celles qui s'appliquent au diagnostic des maladies animales, à la prévention de ces maladies ou à un traitement.

## Diagnostic des maladies animales

Deux méthodes peuvent être employées selon que l'on veut effectuer un diagnostic direct ou indirect.

## Diagnostic direct

Aux méthodes traditionnelles qui mettaient en évidence l'agent pathogène par sa morphologie, ses caractères culturaux ou pathogènes, ou sa réaction vis-à-vis des sérums (polyclonaux) d'animaux vaccinés ou convalescents, vont se substituer des méthodes plus précises :

## Les anticorps monoclonaux

Produits à partir d'une seule cellule immunitaire de souris, rendue "immortelle" par fusion avec une cellule cancéreuse, ces anticorps ont l'avantage de n'être dirigés que contre une fraction antigénique très précise (épitope) de l'agent pathogène. Cela permet de reconnaître des variants antigéniques et d'effectuer ainsi des surveillances épidémiologiques très fines, de remonter la trace d'une infection, ou encore de distinguer les souches sauvages des souches vaccinales, etc.

## Les tests immuno-enzymatiques

Ils permettent de visualiser les réactions antigènes-anticorps, mieux que les anciennes techniques d'agglutination directe ou indirecte, de précipitation, de fixation du complément, etc. Ces divers avantages tiennent à la fixation (spontanée) de l'antigène ou de l'anticorps sur un support plastique solide, au déclenchement d'une réaction colorée suite à la dégradation d'un substrat par une enzyme couplée à l'anticorps et à la possibilité de quantifier cette réaction par un spectrophotomètre, éventuellement couplé à un ordinateur.

Le succès de ces méthodes, et notamment celle du test *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) ne cessera de se développer car ses variantes sont multiples (ELISA bloquant, ELISA sandwich, ELISA indirect, etc.), et l'immunocapture de l'antigène lui donne une très grande spécificité.

Les tests utilisant la digestion par des enzymes bactériennes puis leur repérage par des anticorps marqués (*Western blot*) seront aussi très utilisés.

## Test d'hybridation : les sondes nucléiques

Ce test, basé sur la reconnaissance, par un acide nucléique (connu : sonde) d'un acide nucléique complémentaire inconnu, permet de détecter la présence du génome d'un agent pathogène dans un prélèvement suspect. Si le génome est, préalablement, digéré par des enzymes bactériennes, cela permet une identification encore plus précise (Southern blot).

## Test d'amplification : la polymerase chain reaction

Cette technique permet d'amplifier la réplication des parties caractéristiques du génome d'un agent pathogène, grâce à l'emploi d'amorces choisies dans ces parties, puis de repérer le génome ainsi amplifié à l'aide de sondes nucléiques.

## Diagnostic indirect

Ce diagnostic est basé, non plus sur la détection de l'agent pathogène lui-même, mais sur celle des traces qu'il a laissées dans l'organisme au contact des cellules immunitaires sécrétant des anticorps (immunité humorale) ou non (immunité cellulaire).

Ce diagnostic utilise l'outil biotechnologique pour repérer, soit les anticorps naturels (par capture ou compétition avec des anticorps monoclonaux), le plus souvent par des tests immuno-enzymatiques ou par recombinaison génétique avec l'antigène, soit les cellules sensibilisées par l'antigène.

## Prévention des maladies animales

Deux stratégies sont possibles pour prévenir la maladie chez les animaux, qui toutes deux peuvent tirer profit des progrès de la biotechnologie : immuniser activement les animaux en les vaccinant, ou sélectionner leur capacité de résistance naturelle (génétique) à la maladie.

## Immunisation active des animaux

Elle peut être assurée par l'administration de vaccins rendus plus purs et plus efficaces par les méthodes de la biotechnologie.

Parmi ces vaccins, on peut citer:

## Les vaccins vivants

Ils utilisent des souches de microbes modifiées non plus empiriquement comme par le passé (par passages sur animaux ou cellules) mais par mutations génétiques induites puis sélectionnées. L'induction peut être assurée par des produits chimiques, par la température (mutants froids ou chauds), par des anticorps monoclonaux, etc. Certains de ces vaccins, obtenus par délétion des gènes les plus dangereux, ont l'avantage d'être bien connus et de permettre la distinction entre anticorps post-vaccinaux et post-infectieux. Le plus utilisé de ces vaccins est celui de la maladie d'Aujeszky, obtenu par délétion des glycoprotéines gx et gl.

#### Les vaccins recombinants

Ils sont obtenus par introduction des acides nucléiques codant pour la fraction immunogène d'un agent pathogène dans le génome d'un "vecteur" vivant (cellules, levures, bactéries, virus...). Ce dernier, en se multipliant chez l'animal vacciné, entraîne la production d'anticorps contre lui, mais aussi contre la fraction immunogène qu'il exprime. Le plus utilisé de ces vaccins est celui de la rage, produit par le virus de la vaccine.

On peut aussi utiliser le recombinant après inactivation, ce qui permet d'obtenir de grandes quantités d'antigènes, pur, *in vitro*. C'est la production de ces antigènes dans les bactéries *Escherichia coli*, les levures ou les bacculovirus qui est la plus étudiée, quoique encore peu utilisée.

## Les vaccins sous-unitaires

Ils consistent en une (des) simple(s) fraction(s) antigénique(s) colorée(s) de l'agent pathogène, ce qui assure une innocuité totale. Souvent peu immunogène(s), cette (ou ces) fraction(s) est (sont) additionnée(s) d'adjuvants de l'immunité, soit chimiques, soit biochimiques (liposomes, ISCOM).

## Les vaccins synthétiques

Les déterminants antigéniques choisis sont obtenus par synthèse *in vitro*, généralement celle de peptides couplés à des protéines "porteuses" et additionnés d'adjuvant de l'immunité. C'est le vaccin chimique purifié idéal, déjà rêvé par Louis Pasteur il y a un siècle, mais encore loin de pouvoir concurrencer les vaccins produits par des cellules vivantes.

## Les vaccins anti-idiotypes

L'anticorps étant l'image interne de l'antigène, les anti-corps devraient pouvoir se comporter comme des antigènes d'une innocuité parfaite. Malheureusement, leur pouvoir immunogène reste très faible, surtout lors de la primo-vaccination.

## Les vaccins génétiques

L'insertion, dans le génome d'un animal, de l'acide nucléique codant pour un agent pathogène devrait permettre à cet animal de résister, ultérieurement, à cet agent.

## Augmentation de la résistance naturelle

La nature, aidée par les éleveurs, a depuis longtemps avantagé la survie des animaux génétiquement plus résistant aux maladies. Certains des gènes de ces résistances ayant pu être identifiés, il est théoriquement possible de les transférer à des animaux pour les rendre résistants.

Selon que le gène est transféré dans les cellules somatiques ou germinales de cet animal, la résistance sera individuelle ou transmissible (héritable) d'une génération à l'autre.

C'est surtout dans le domaine de la résistance aux parasites (contre lesquels il est très difficile de vacciner) que cette recherche est actuellement développée, mais aussi pour développer la résistance à certaines maladies à virus (ex : maladie de Marek).

## Traitement des maladies animales

Si l'une des premières applications de la biotechnologie a été la production, par culture *in vitro*, de champignons producteurs d'antibiotiques, les recherches ultérieures de traitements plus efficaces et plus sûrs des maladies animales ont été nombreuses. Les premiers ont concerné l'emploi des anticorps monoclonaux, qui ont l'avantage sur les anciens sérums thérapeutiques d'être purs et spécifiques. Leur production, longtemps obligatoire sur souris, peut maintenant être assurée *in vitro* ou à partir de cellules de l'espèce cible

(bovins, porcs, etc.). Le coût de ces produits reste, toutefois, un facteur limitant leur usage courant.

Parmi les autres productions d'avenir, on doit signaler celles des immunostimulants ou des immunomodulateurs, notamment les lymphokines (interférons, interleukines, etc.) qui peuvent être produits *in vitro* par des cellules. Ces molécules et certaines autres protéines de valeur thérapeutique pourraient même être secrétées directement dans le lait par des animaux transgéniques (*Transgenic farming*).

## Conclusion

L'ensemble des techniques issues de l'essor récent de la biotechnologie concourt à améliorer sans cesse les productions des animaux, directement ou en protégeant leur santé. Si certaines de ces techniques ouvrent des perspectives qui pourraient être inquiétantes quant à leur impact sur l'environnement, les équilibres démographiques ou la santé des consommateurs, la plupart apportent, au contraire, une amélioration incontestable par rapport à certaines techniques empiriques de la biologie. Mais un tri s'effectuera sans doute au cours du temps entre ces techniques, soit du fait du rejet spontané par le milieu naturel de certains organismes ou micro-organismes artificiellement manipulés par l'Homme, soit du fait de l'Homme lui-même, pour des raisons socio-économiques évidentes.

## **Bibliographie**

- 1. Office international des Epizooties (1990). Numéro spécial: "Biotechnologie et Science vétérinaire". Rev Sci Tech Off Int Epiz; 9(3): 615 915.
- 2. McCullough (1992). The application of biotechnology to the diagnosis and control animal diseases. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*; 12(1): 325 353.
- 3. Desmettre Ph. (1992). Biotechnologie et santé animale. Rev Sci Tech Off Int Epiz : 12(1) : 355 368.
- Animal Pharm (1991). Future prospects for veterinary biotehnology. PJ3/Publication, Richmond.

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales. Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 7-17.

2

# Apports de la biotechnologie au diagnostic des maladies animales

A. BENKIRANE, M.M. RWEYEMANU, K.J. WOJCIECHOWSKI, Y. CHENEAU

Service de la Santé Animale, Division de la Production et de la Santé Animales, FAO, Rome, Italie.

## Résumé

Depuis environ deux décennies, un certain nombre de techniques nouvelles ont vu le jour, contribuant à une amélioration sensible de la sensibilité et de la spécificité des tests de diagnostic des maladies humaines et animales. Ces techniques sont le résultat d'un certain nombre de progrès déterminants, parmi lesquels il convient de citer : la maîtrise des techniques de cultures cellulaires, l'avènement des tests immuno-enzymatiques, la technologie de production des anticorps monoclonaux et les différentes étapes d'exploration du code génétique.

Les outils de diagnostic dont on dispose aujourd'hui permettent de poser un diagnostic individuel plus précis, et surtout, de conduire des programmes rationnels de suivi et de surveillance de nombreuses maladies infectieuses et parasitaires. Sans vouloir renier les précieux services rendus à la médecine par les méthodes conventionnelles de diagnostic direct (isolement et identification de l'agent pathogène) et indirect (mise en évidence des témoins de l'infection à l'aide d'antigènes bruts et d'anticorps polyclonaux), tout porte à croire qu'elles seront progressivement supplantées par des manipulations issues de la biotechnologie, ces dernières promettant d'être plus précises, plus rapides et plus facile-

ment standardisables. En outre, elles présentent moins de risques pour le manipulateur et nécessitent un degré de technicité moindre, ainsi que du matériel et des installations moins coûteux.

L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, avec la collaboration des autres organisations internationales et le soutien actif de certains laboratoires, pôles d'excellence en biotechnologie, poursuit l'objectif d'opérer un transfert de ces technologies vers les pays en développement.

Au sens large, le terme biotechnologie s'applique à l'utilisation des systèmes biologiques ou de leurs constituants pour la production de biens ou de services. Au sens strict (biotechnologie nouvelle), ce terme est réservé à l'utilisation de l'ADN recombinant et des technologies associées.

Comme toute technologie, cette "technologie du vivant" est destinée à être exploitée, notamment à des fins commerciales; c'est ainsi qu'à titre d'exemple, pour le seul Japon, on estimait en 1992 le marché des produits issus de la biotechnologie (sens large) à 40 milliards d'ECU, tandis que les prévisions pour l'an 2000 du marché mondial de la nouvelle biotechnologie représenteraient un chiffre d'affaires de 80 milliards d'ECU.

En tant que moyen de production, la biotechnologie fait coopérer en harmonie de nombreuses disciplines scientifiques : de la chimie à la biologie moléculaire, de la génétique à la virologie et à l'immunologie, etc.

Les domaines d'application de la biotechnologie couvrent tous les secteurs de l'économie:

- a) Agriculture : productions animales et végétales brutes, produits alimentaires.
- b) Médecine (humaine et vétérinaire) : diagnostic et produits médicamenteux (hormones, produits thérapeutiques, vaccins).
- c) Industrie: produits chimiques et agro-industriels.
- d) Environnement : traitement des déchets résiduels et/ou toxiques. En santé animale, la biotechnologie trouve des applications dans :

- le diagnostic des maladies, la pathogénie, l'épidémiologie et le contrôle de qualité des vaccins:
- la mise au point des vaccins de type nouveau, d'utilisation plus commode;
- la thérapeutique et l'hormonologie;
- la résistance génétique aux maladies.

Avant d'aborder l'application de la biotechnologie au diagnostic, il convient de donner, en préambule, quelques rappels sur la notion de diagnostic en médecine vétérinaire :

## 1) Diagnostic vétérinaire (animaux de rente) et diagnostic en médecine humaine

Le premier est le plus souvent collectif, il vise à diagnostiquer une maladie pour prévenir de nouveaux cas; en revanche, le second est généralement individuel, visant à diagnostiquer une maladie en vue de la traiter. Cette distinction se reflète sur les qualités exigées d'un test de diagnostic.

## 2) Diagnostic, dépistage (screening), suivi (monitoring) et surveillance

- Diagnostic : le point de départ est un (ou des) individu(s) malade(s).

- Dépistage : le point de départ est constitué par des individus présumés sains, il est conduit dans les opérations de :
- suivi : il vise alors à s'assurer, selon les cas, que les individus sont toujours sains, ou qu'ils bénéficient toujours d'un état de grâce (exemple : protection contre une maladie infectieuse conférée par la vaccination);
- surveillance : cette méthode de screening consiste à instaurer une vigilance vis à vis d'infections menaçant une population, en s'assurant que les unités de cette population sont toujours à l'abri du risque (surveillance clinique et/ou microbiologique, sérologique, allergique...).

## 3) Qualité des test de diagnostic

Elle est est mesurée par leur sensibilité (capacité de détection des cas), leur spécificité (capacité de distinction entre les cas et les non-cas), ainsi que leurs valeurs prédictives positive et négative, celles-ci étant variables en fonction de la prévalence de la maladie dans une population. L'efficacité d'un test exprime la somme de ses performances globales et permet de le situer par rapport à l'"étalon or".

L'étalon or se définit comme un outil de contrôle de qualité qui fournit la base de détermination de la valeur d'un test de diagnostic. C'est le test de référence par rapport auquel la sensibilité et la spécificité des autres test sont évaluées.

Le Tableau I présente les paramètres permettant de juger la qualité d'un test de diagnostic et leurs méthodes de mesure.

Tableau I.	Méthodes d	l'évaluation	des tests o	de diagnostic.

Paramètre	Méthode de mesure	Expression
Valeur	table de contingence (2x2)	sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positive et négative, efficacité
Seuil optimum	courbe d'étalonnage	valeur optimale positive/négative
Comparaison des tests	courbe de Bayes	probabilité post./ probabilité ant.
Intérêt clinique	taux de vraie positivité/ taux de fausse positivité taux de fausse négativité/ taux de vraie négativité	ratio probable pour la positivité ou la négativité d'un test

Les tests hautement sensibles sont plus utiles quand leurs résultats sont négatifs; ils sont recommandés lorsqu'on atteint la phase d'éradication d'une maladie. Au contraire, les tests ayant une bonne spécificité sont souhaitables lorsque leurs résultats sont positifs; ils sont recommandés en phase de démarrage d'un programme de prophylaxie.

La distribution des fréquences des résultats d'un test dans des populations animales normales et malades oblige à faire un choix entre un test doué d'une très bonne sensibilité et un test doué d'une très bonne spécificité, car très peu de tests réunissent ces deux qualités. L'un des objectifs de la biotechnologie est de tendre vers cet idéal.

## 4) Niveaux de diagnostic

Il existe au moins cinq échelles de niveau de diagnostic d'une maladie animale :

- Centres de Référence Internationaux : leur rôle est dans l'innovation et la recherche d'approches fondamentales et/ou appliquées visant la conception de nouvelles technologies ou méthodes de diagnostic, ainsi que dans le diagnostic de référence officiel des épizooties majeures et l'épidémiologie moléculaire, pour la caractérisation et la classification des souches responsables des foyers d'épizooties.
- Laboratoire National Central : dans chaque pays, il devrait exister une structure pour l'adaptation des techniques nouvelles aux conditions du pays, leur expérimentation et éventuellement la confection de trousses de diagnostic (kits).
- Laboratoire Provincial/de District : sa mission est d'appliquer les techniques de laboratoire proposées et standardisées par le Laboratoire National Central.
- Vétérinaire praticien/technicien de terrain : il doit pouvoir disposer des trousses de diagnostic de terrain et les utiliser dans le respect de la législation en vigueur.
- Eleveur : l'utilisation par l'éleveur de certaines trousses ne doit être envisagée que si aucune formation n'est nécessaire (dip stick) et si le diagnostic de la maladie recherchée ne requiert pas la mise en place de mesures sanitaires légales.

## Considérations techniques

## Technologies de base

## Anticorps monoclonaux

Un lymphocyte B produit des molécules d'anticorps toutes douées d'une même spécificité antigénique (réactivité vis à vis d'un seul épitope). En faisant fusionner ce lymphocyte avec une cellule myélomateuse, à croissance rapide et indéfinie, on obtient une cellule de type hybride (hybridome) possédant les propriétés génétiques des deux cellules parentales : croissance rapide et production d'un seul clone de molécules d'anticorps. Les anticorps monoclonaux sont actuellement exploités dans le diagnostic et dans la caractérisation des antigènes; ils ont en outre des applications thérapeutiques potentielles.

Le Tableau II présente les principaux avantages et inconvénients de ces réactifs

Des performances notoires ont été accomplies grâce à ces molécules; il est actuellement possible de produire de très grandes quantités d'immunoglobulines avec une utilisation minimale des animaux de laboratoire, comme il est possible de fabriquer des anticorps monoclonaux à partir de lymphocytes provenant d'animaux autres que la souris. Cependant il paraît encore prématuré de se passer des anticorps polyclonaux. Les deux types d'anticorps sont comparés dans le Tableau III.

## Génie génétique ou technologie de l'ADN recombinant

Trois découvertes majeures ont rendu son avènement possible :

- possibilité d'introduction d'un brin d'ADN dans E. coli (transformation);
- purification de petits plasmides (10 kb; ex. Col E1) par centrifugation en gradient de

Tableau II. Anticorps monoclonaux dans le diagnostic.

#### Avantages

- 1. Molécules monospécifiques, chimiquement définies. Standardisation souhaitée.
- 2. 100% des lg produites possèdent la fonction anticorps active. Possibilité de marquage hautement spécifique (isotopes, enzymes, fluorescéine).
- 3. Facilement produits en culture cellulaire dès qu'ils sont identifiés. Chaque laboratoire peut obtenir le même réactif, en utilisant la même lignée cellulaire.
- 4. Manipulation aisée. On peut produire des cocktails ayant une réactivité définie, préparer des anticorps bispécifiques à partir de deux anticorps monoclonaux de spécificité différente, réaliser une focalisation en microscopie électronique, etc.
- 5. On peut définir les réactions antigéniques croisées.

#### Inconvénients

- 1. Trop spécifiques, d'où le risque de ne pas détecter des déterminants antigéniques très proches de l'épitope spécifique.
- 2. Les effets biologiques de la liaison Ag-Ac *in vitro* ne réflètent pas la situation chez l'animal. Aucune synergie possible entre Ac qui les ferait réagir avec différents sites.
- 3. Etant chimiquement identiques, tout trattement physique ou chimique qui affecterait une molécule affecterait toute la population d'anticorps monoclonaux.
- 4. Les Ac monoclonaux utilisables dans un test ne le sont pas forcément dans un autre

. Tableau III. Comparaison des anticorps monoclonaux et polyclonaux.

	Anticorps polyclonaux	Anticorps monoclonaux
Spécificité	multiple; population d'anticorps dirigés contre différents épitopes	unique; toutes les molécules d'anticorps sont dirigées contre le même épitope
Affinité	variable vis-à-vis des différents épitopes	homogène
avidité du sérum (= somme des affinités)	grande	faible

densité sur chlorure de césium ;

- découverte des endonucléases de restriction.

En outre, la découverte de la transcriptase reverse a rendu possible les manipulations génétiques de l'ARN.

## Définition

Production d'ADN hybride (recombinant) par insertion de gène(s) exogène(s) dans l'ADN d'un porteur ou vecteur (plasmides, bactériophages ou virus animaux à ADN tels que poxvirus, baculovirus...).

#### **Outils**

- enzymes de restriction (endonucléases) pour couper l'ADN à des endroits pré-définis, après la reconnaissance d'une séquence spécifique de bases dans la double hélice. Près de 800 endonucléases sont actuellement disponibles;
- ligases pour recoller les fragments du gène transféré dans le matériel génétique du vecteur, produisant ainsi de l'ADN hybride;
- transcriptase reverse permettant de synthétiser les brins d'ADN compléméntaires (cDNA) à partir d'un ARN (ex. viral).

## Conséquences

L'élément fondamental est l'identification de gène(s) codant pour une fonction phénotypique ou un produit donné. Une fois cette étape franchie, les nucléotides peuvent être séquencés et les protéines qu'ils codent définies. Ainsi :

- les peptides peuvent être chimiquement synthétisés;
- les agents infectieux peuvent être identifiés grâce à leur séquence nucléotidique;
- à l'aide de la PCR, il devient possible d'amplifier quelques séquences d'ADN en de multiples copies et un processus d'hybridation permet alors d'identifier rapidement et spécifiquement la séquence cible qui peut être dérivée d'un chromosome ou d'un génome viral.

## **Techniques**

## Tests immunologiques: ELISA, RIA, peroxydase, immuno-empreinte...

Toutes ces techniques sont basées sur le même principe : détection de complexes Ag-Ac à l'aide d'un marqueur.

Dans le modèle ELISA, les puits des microplaques sont revêtus soit par l'antigène (ex. virus), soit par les anticorps, et l'addition de l'autre partenaire de la réaction entraîne la formation du complexe Ag-Ac. Ce complexe est détecté après réaction avec des anticorps anti-espèce, dirigés contre les premiers anticorps (ex. anticorps anti-virus). L'anticorps révélateur est généralement conjugué à une enzyme. Celle-ci, en présence de son substrat, fournira un changement de couleur.

Le principe des principales variantes de l'ELISA, ainsi que leurs qualités et limites sont présentés dans le Tableau IV.

## Techniques basées sur les acides nucléiques

Ces techniques recouvrent le séquençage des nucléotides et les méthodes de détection des acides nucléiques des agents infectieux, par hybridation et/ou amplification (PCR).

Tableau IV. Principales variantes de la technique ELISA.

	Principe	Qualités et limites
ELISA	Adsorption directe de	-influence la conformation de l'Ag
indirect	l'Ag à la surface des	- interférence avec protéines contaminante
	plaques	et blocage Ag
ELISA	1. Ac de capture (Pc en	Ac Mc = spécificité
sandwich	général)	Ac Pc = sensibilité
	2. Ag	(plus grande avidité)
	3. Ac de détection	
	(Mc ou Pc)	
ELISA en phase	1. Ag + Ac détection	conformation Ag conservée
liquide	(en solution)	(très grande spécificité)
	2. Complexe + Ac capture	
ELISA	1 Ag	-très sensible pour détection anticorps
compétitif	2. sérum à tester	- difficilement applicable à la détection
	3. Ac détection	Ag (sauf en phase liquide)

## Sondes (radio-actives, froides)

Les produits pathologiques, les cultures cellulaires infectées, et les sections d'organes peuvent être examinés à l'aide de sondes spécifiques de l'agent pathogène incriminé. L'échantillon est étalé sur des filtres de nitrocellulose ou incorporé dans des blocs de paraffine. Si l'acide nucléique de l'agent pathogène recherché est présent, il sera détecté par la sonde marquée qui se lie par hybridation, c'est à dire par appariement des bases. La sonde détecte le génome de l'agent pathogène ou son ARN messager transcrit à partir du génome, selon le type de sonde. Pour les sondes radio-actives, la détection des fragments hybridants se fait par les rayons X. Pour les sondes froides, on ajoute un couple enzyme-conjugué comme la peroxydase-streptavidine (pour un marqueur comme la biotine); ensuite, la réaction est révélée à l'aide d'un substrat approprié.

## Amplification en chaîne par polymérase (ACP = PCR)

La technique repose sur l'amplification de séquences nucléotidiques spécifiques portées par le génome de l'agent recherché et met en œuvre l'activité d'une enzyme, l'ADN polymérase, capable de synthétiser des brins complémentaires d'ADN compris entre deux oligonucléotides ou amorces, choisis pour leur spécificité et introduits dans le milieu réactionnel de telle sorte qu'ils puissent s'hybrider spécifiquement au génome de l'agent préalablement extrait. Les amorces sont synthétisées comme oligonucléotides monocaténaires d'une vingtaine de nucléotides. L'un a une séquence dirigée dans un sens et l'autre dans le sens contraire. Ils ne sont pas marqués. Une fois initiée, la réaction progresse cycliquement et génère des copies de la séquence choisie exponentiellement. Dans de

nombreux cas, la quantité de matériel généré est suffisante pour permettre une visualisation directe, après électrophorèse en gel et coloration au bromure d'éthidium. De même, ce matériel peut être détecté par hybridation avec une sonde marquée complémentaire à la partie de la séquence qui doit être spécifiquement amplifiée. Cela augmente la sensibilité et la spécificité de la technique.

D'une manière générale, la spécificité de la PCR dépend de la nature des amorces utilisées. Quant à la sensibilité, elle est parfois jugée excessive à cause de la possibilité de contamination par des éléments exogènes présents dans la réaction et pouvant recéler la même séquence de nucléotides. En quelques années, la technique PCR a été explorée, et souvent avec bonheur dans le diagnostic de nombreuses maladies infectieuses, comme le montre le Tableau V.

Tableau V. Applications de la PCR en pathologie infectieuse animale.

Maladies virales	Maladies bactériennes
Fièvre aphteuse	Brucellose bovine
Peste porcine classique	Mycoplasmoses
Peste porcine africaine	Colibacillose
Bluetongue	Leptospirose
Coronavirus bovın	Listériose
Leucose bovine	Tuberculose
Leucose aviaire	Paratuberculose
Rotavirus bovin	Salmonellose
BVD	
CAEV	
Artérite à virus	
Rhinopneumonie	Maladie à protozoaires
Anémie infectieuse	Toxoplasmose
Leucémie féline	
Laryngotrachéite aviaire	
Bronchite aviaire	
Influenza	
Maedı-Visna	
Coryza gangréneux	
Maladie d'Aujeszky	
Rage	

On peut combiner le pouvoir des techniques basées sur la détection des acides nucléiques à celui des techniques immunologiques, mettant en évidence la réaction Ag-Ac. En effet, la PCR peut s'avérer défaillante si les acides nucléiques sont dégradés; de même, les techniques immunologiques souffrent des problèmes de réactions croisées, d'où l'intérêt de les associer.

Un progrès décisif a été accompli par le développement de vaccins préparés à partir de micro-organismes à génome délété, c'est à dire n'exprimant pas certains des déterminants antigéniques normalement présents sur les souches pathogènes sauvages. L'utilisation de réactifs de diagnostic permettant de mettre en évidence l'absence de réponse immunitaire post-vaccinale vis-à-vis de ces antigènes permet de distinguer les animaux vaccinés des animaux infectés. Cette approche laisse envisager l'éradication des maladies sous couverture vaccinale, jusque-là impossible en raison de l'équivalence du marquage sérologique des animaux vaccinés et infectés.

## Applications dans les pays en développement

## Diagnostic et surveillance

Les techniques faisant appel à des réactifs issus de la biotechnologie trouvent un champ d'application fertile dans le diagnostic des maladies animales, qu'il s'agisse de diagnostic immédiat ou de diagnostic de référence.

L'ELISA est une technique qui n'utilise pas d'isotopes radio-actifs, ne requiert pas les conditions de stérilité et se prête à l'automatisation, permettant la manipulation rapide de plusieurs échantillons. C'est actuellement la technique la plus utilisée dans les programmes de séro-surveillance.

La Division de la Production et de la Santé Animale de la FAO, ainsi que la Division Mixte FAO/AIEA en ont assuré une large diffusion dans les pays en développement. On peut dire à juste titre que l'application de l'ELISA au suivi sérologique de la peste bovine en Afrique constitue aujourd'hui le plus grand réseau d'utilisation d'un kit standardisé dans le monde. La FAO a adopté cette technique pour la standardisation du suivi sérologique et de la surveillance dans toutes les campagnes régionales dans le cadre du programme global d'éradication de la peste bovine (GREP). A l'heure actuelle, les organisations internationales œuvrent à promouvoir l'utilisation globale de cette technique dans les programmes régionaux de contrôle de la brucellose bovine, de la fièvre aphteuse, de la babésiose bovine et d'un certain nombre de maladies aviaires.

La PCR a révolutionné la recherche fondamentale et le diagnostic. L'attribution du dernier prix Nobel de chimie à K.B. Mullis, qui a été à l'origine du développement de cette technique, met en valeur les progrès qu'elle a permis de réaliser. On peut prédire que cette technique supplantera, dans un proche avenir, les méthodes conventionnelles de mise en évidence de l'antigène dans le diagnostic de la quasi-totalité des maladies infectieuses et parasitaires.

## Caractérisation moléculaire et épidémiologique

Toutes ces technologies ont rendu possible une discrimination beaucoup plus précise entre micro-organismes ou virus autrefois difficiles à distinguer entre eux par les moyens de la sérologie conventionnelle. Elles sont, en outre, appliquées à des fins taxonomiques, notamment en virologie. En effet, les séquences des gènes codant pour la polymérase étant parmi les mieux conservées, la comparaison des polymérases virales permet de ranger une souche virale dans un groupe connu ou, éventuellement, de créer une nouvelle subdivision dans la taxonomie virale. En outre, les données de séquençage des protéines

structurales permettent de différencier entre virus appartenant à un même sérotype. Les résultats obtenus avec le virus aphteux constituent l'exemple le plus probant de ces nouvelles applications. C'est ainsi qu'il a été possible d'apparenter la souche de type O responsable du récent foyer italien de fièvre aphteuse aux souches du Moyen-Orient (sud et ouest de l'Asie Mineure), tandis que la souche O bulgare semblait plus proche des souches du nord de l'Asie Mineure (Turquie, Iran...).

Déterminer la source d'un nouveau foyer de maladie, analyser la dynamique des épidémies/épizooties, établir le risque d'introduction d'une maladie sont devenus des outils de plus en plus précis de planification et de prise de décision dans les programmes de contrôle/éradication.

La FAO est en train de réexaminer le rôle de ses laboratoires de référence, avec l'optique de désigner comme centres de référence internationaux des instituts susceptibles de réceptionner des échantillons à partir de n'importe quelle région du monde et d'entreprendre une caractérisation à l'échelle moléculaire des souches d'agents pathogènes.

A côté de la biotechnologie, d'autres disciplines comme l'aérobiologie, l'imagerie par satellite, l'informatique et l'électronique concourent à la réalisation d'études épidémiologiques de mieux en mieux ciblées et permettent d'envisager des programmes de contrôle ou d'éradication rationnels. C'est le cas pour la lutte contre la peste bovine, la fièvre aphteuse et la rage, pour ne citer que ces trois maladies majeures. L'éradication de la lucilie bouchère de la Lybie constitue un bon exemple d'approche intégrée ayant rencontré du succès. La même approche ciblée et multi-disciplinaire est en train d'être appliquée au contrôle de la mouche tsé-tsé et de la trypanosomiase, ainsi qu'à l'épidémiologie de la theilériose.

## Formation, information, informatisation

La diffusion des techniques issues de la biotechnologie passe nécessairement par le recyclage des microbiologistes et leur initiation, voire leur perfectionnement en biotechnologie. La contribution de la FAO dans ce domaine a été d'organiser des ateliers de travail à l'échelle régionale, au profit des scientifiques impliqués ou désireux d'être impliqués dans l'application des techniques issues de la biotechnologie. Un autre point crucial est la sensibilisation des décideurs.

En outre, les laboratoires de diagnostic doivent avoir un accès facile et régulier aux très nombreuses publications consacrées à la biotechnologie (bulletins, revues, ouvrages). L'information relative à la tenue de réunions scientifiques doit pouvoir arriver aux intéressés.

Les laboratoires des pays en développement doivent également bénéficier d'un support logistique informatique par la mise à leur disposition de programmes informatiques pour l'analyse des séquences des acides nucléiques et des protéines, ainsi que de toutes les informations nouvelles dont ils ont besoin.

## Simplification des techniques

Dans les pays en développement, il y a généralement :

- peu de laboratoires bien équipés et disposant d'un personnel qualifié;
- de grandes distances à parcourir pour atteindre ces laboratoires, d'autant plus que les moyens de communication et de transport des prélèvements restent souvent insuffisants.

Par conséquent, tout en s'efforçant de mettre en place des structures adéquates, il serait fort utile de disposer de moyens de diagnostic simples et fiables. L'idéal serait de pouvoir utiliser des tests d'étable ou des trousses de terrain, nécessitant le minimum de technicité et échappant à des contraintes telles que la rupture de la chaîne du froid, ou encore les dates de péremption des réactifs. Un tel objectif est devenu envisageable grâce à l'apport des biotechnologies. Certaines réalisations ont déjà vu le jour, mais il deviendra possible de concevoir de telles applications à une plus grande échelle dès que certaines difficultés d'ordre technique auront été surmontées.

## Transfert de technologie

L'appui des laboratoires centres d'excellence internationaux aux laboratoires des pays démunis, en matière de biotechnologie, doit se traduire par l'adaptation des techniques mises au point dans les premiers aux conditions spécifiques des seconds. Certaines maladies animales ne sont rencontrées ou n'ont un intérêt économique évident que dans les pays en développement (peste bovine, fièvre de la vallée du Rift, dermatose nodulaire et autres poxviroses majeures, péripneumonie contagieuse bovine et pleuropneumonie contagieuse caprine, septicémie hémorragique, dermatophilose, trypanosomiases, theilérioses, etc.). Les recherches ayant trait à la mise au point de techniques de diagnostic ou de vaccins nouveaux pour ces maladies devraient être conduites dans ces pays, à chaque fois que les techniques sont applicables sur place.

## Conclusion

La biotechnologie fournit la base des réactifs de diagnostic immunologique conventionnel, apporte de nouvelles opportunités de développement de réactifs et de techniques de diagnostic direct ou indirect, parmi lesquelles il faut citer : la production d'antigènes par recombinaison génétique, l'obtention d'anticorps monoclonaux par fusion cellulaire et, dans un futur proche, par recombinaison génétique et enfin l'hybridation nucléique et l'amplification de gènes.

Ces réactifs et techniques concourent à la réalisation de diagnostics plus fiables, reposant sur des techniques plus spécifiques, plus sensibles et plus reproductibles.

La mission des Centres d'Excellence qui mettent au point de nouvelles techniques de diagnostic et améliorent leurs performances, est d'aider à opérer un transfert de technologie réel vers les pays en développement. Ceux-ci ont besoin d'utiliser les technologies disponibles pour résoudre, dans leur contexte, leurs problèmes spécifiques. Il est à espérer que cela contribuera à mettre un terme à la "fuite des cerveaux" des pays en développement vers les pays développés, pourvu que les conditions et l'ambiance de travail deviennent favorables.

De par ses activités, conduites soit à partir du Siège, soit de la Division mixte FAO/AIEA ou des Bureaux Régionaux, la FAO s'efforce d'aider à la réalisation de ces objectifs, avec les moyens limités dont elle dispose. Le renforcement de la collaboration avec toutes les organisations et institutions œuvrant dans le domaine, accélèrera le rythme de développement de la biotechnologie, et, partant, celui du développement économique et social.



3

# De nouveaux outils pour le diagnostic et l'épidémiologie de la trypanosome animale africaine

G. DUVALLET, Z. BENGALY, J.M. REIFENBERG, L. ARGIRO

CRTA/CIRDES, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso,

La trypanosome animale, transmise par les glossines, est un des obstacles majeurs au développement de l'élevage dans les zones subhumides d'Afrique de l'Ouest. Pourtant la demande en viande et en lait augmente rapidement, en raison d'un taux de croissance élevé de la population humaine et du changement, suite à l'urbanisation, des habitudes alimentaires [9,11].

La solution n'est pas dans l'augmentation numérique des animaux, en raison des risques de déforestation progressive et de dégradation de l'environnement, mais dans l'augmentation de la productivité du cheptel actuel. Pour cela, les effets de la trypanosome sur la santé animale et la productivité doivent être mieux compris pour être mieux combattus.

Les techniques de diagnostic sont à la base de toutes les recherches sur la trypanosome. Les techniques les plus sensibles de diagnostic parasitologique ne permettent pas de déceler des parasitémies inférieures à 100 parasites par ml [31,35]. L'identification des trypanosomes à l'état frais et/ou sur frottis de sang colorés aboutit au plus à la détermination du sous-genre. Chez la glossine, la morphologie du parasite n'est d'aucun secours; seule la localisation des parasites dans le vecteur apporte une indication grossière sur le sous-genre. Les études épidémiologiques, dans ce contexte, manquent de précision.

Les nouvelles biotechnologies introduites récemment pour les recherches sur la trypanosome, anticorps monoclonaux [29], sondes nucléiques [14, 17], amplification en chaine par polymérase [25], apportent à la fois une plus grande sensibilité et une spécificité inégalée.

Nous envisagerons ci-après ces techniques pour le diagnostic et les études épidémiologiques.

## Le diagnostic

En ce qui concerne le diagnostic clinique, il n'existe pas de signe pathognomonique qui permette un diagnostic de certitude. Le diagnostic de la trypanosomose requiert nécessairement des techniques de laboratoire.

On distingue les techniques parasitologiques qui, en révélant le parasite dans les liquides biologiques de l'hôte, apportent un diagnostic de certitude, et les techniques sérologiques qui mettent en évidence, soit des anticorps, soit des antigènes circulants; il s'agit dans ce cas d'un diagnostic de présomption, qui dépend de la sensibilité et de la spécificité des techniques utilisées.

Nous n'insisterons pas sur les techniques parasitologiques [6,10,34]. La majorité d'entre elles sont simples à mettre en œuvre, mais leur sensibilité est réduite [31]. La double micro-centrifugation [35] permet de déceler des parasitémies à 100 parasites par ml. La chromatographie sur colone de DEAE-cellulose [16] est plus sensible mais difficile à mettre en œuvre sur le terrain et réservée, jusqu'à présent, au dépistage de la maladie du sommeil chez l'homme [15]. L'inoculation à l'animal de laboratoire (souris, rat, *Mastomys sp.*) est parfois très sensible, notamment pour le sous-genre *Trypanozoon*, mais le diagnostic n'est pas immédiat. De plus, le coût d'entretien d'une animalerie est élevé et de nombreuses souches de trypanosomes ne poussent pas sur rongeurs.

Concernant le diagnostic sérologique, de nombreux tests ont été mis au point et testés, dans le passé, pour la détection des anticorps. Les deux tests les plus utilisés actuellement sont l'immunofluorescence indirecte (IFI) [37] et l'ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) [36]. Ces tests sont assez faciles à réaliser et de nombreux laboratoires nationaux en Afrique sont maintenant équipés, soit de microscope à fluorescence, soit de lecteur ELISA. Cependant l'utilisation dans ces tests d'un antigène mal défini (trypanosome entier pour l'IFI, lysat brut pour ELISA) rend difficile leur standardisation. D'autre part ces tests n'apportent qu'un diagnostic de présomption; ils ne différencient pas entre une infection passée et guérie et une infection présente. Les anticorps persistent en effet plusieurs mois après un traitement efficace ou une guérison spontanée [4]. Ces tests sont finalement plus utiles pour des études épidémiologiques (prévalence) que pour un diagnostic individuel [27].

Aussi dans ce contexte, l'introduction des tests permettant de détecter les antigènes circulants a été un progrès décisif pour le diagnostic [33]. La découverte dans l'organisme-d'antigènes circulants spécifiques est, en effet, synonyme d'infection présente. C'est le développement à l'*International Laboratory for Research on Animal Diseases* (ILRAD, Nairobi, Kenya) d'anticorps monoclonaux spécifiques d'espèces de trypanosomes [29], qui a donné à ces tests toute leur signification. Ainsi, le diagnostic sérologique devenait spécifique de l'espèce de parasite en cause. De plus, les mêmes réactifs sont utilisés quelle que que soit l'espèce animale étudiée. Les tests sont faciles à réaliser, de nombreux

sérums peuvent être analysés en même temps et un diagnostic individuel est possible en remplaçant les plaques à microtitration par des microtubes [27].

## Résultats obtenus au CRTA

La comparaison de la détection des parasites par centrifugation en tube capillaire [26], de la détection des antigènes circulants [28] et de la détection des anticorps IgC [3], sur 1633 bovins prélevés dans les zones infestées de glossines autour de Bobo-Dioulasso (Burkina Faso) a donné les résultats exprimés dans le Tableau I.

Tableau I. Résultats obtenus au CRTA.

Techniques	Nb de tests	Nb de tests	%	% Trypanosoma (c)		
utilisées	réalisés	positifs		brucei	congolense	vivax
Centrifugation en tubes capillaires	1633	144 (a)	9	1	51	96
Détection antigène circ. ELISA	1633	1075 (b)	66	645	786	533
Combinatson 2 techniques précédentes	1633	1090	67	645	798	597
Détection d'anticorps IgC ELISA	1633	1230	75	non	spécifique d'es	spèce

<sup>(</sup>a) dont 1 infection triple et 2 infections doubles

Ces résultats appellent les observations suivantes :

- 1) La sensibilité du test de détection des antigènes circulants est supérieure à la détection des parasites par centrifugation en tubes capillaires (66% contre 9% de cas positifs).
- 2) La combinaison des deux techniques n'a amélioré que très faiblement (15 cas positifs supplémentaires sur 1633 tests) le score du test de détection des antigènes circulants.
- 3) La détection des anticorps IgC par test ELISA indique un niveau élevé de prévalence : 75%. Ce chiffre reflète l'intensité du contact entre les animaux et les trypanosomes. Il ne permet pas de distinguer les infections dues aux différentes espèces de trypanosomes.
- 4) La technique parasitologique indique une prévalence plus forte des infections à *T. vivax* (67%) sur *T. congolense* (35%) et *T. brucei* (0,7%); les infections mixtes détectées représentent 2% des infections. La technique de détection des antigènes circulants montre une prévalence plus forte des infections à *T. congolense* (73%) devant *T. brucei* (60%) et *T. vivax* (50%), et 62% des infections sont des infections mixtes.

<sup>(</sup>b) dont 223 infections triples et 443 infections doubles

<sup>(</sup>c) nombres totaux observés par espèce, y compris les infections mixtes.

- 5) La divergence entre les deux techniques concernant les prévalences de *T. brucei* est compréhensible car *T. brucei* est très difficile à mettre en évidence par les techniques parasitologiques classiques. Concernant *T. vivax*, la divergence est plus difficile à expliquer. Elle pourrait provenir d'un manque de sensibilité pour cette espèce du test de détection des antigènes circulants [12].
- 6) Le test de détection des antigènes circulants montre l'importance, passée inaperçue jusqu'à présent, des infections mixtes dans la nature et de la forte prévalence de *T. brucei*. Ceci dénote l'importance du réservoir naturel de cette espèce dans laquelle sont regroupées les sous-espèces *gambiense* et *rhodesiense*, agents de la maladie du sommeil chez l'homme.

De ces résultats et d'autres (non publiés) obtenus au CRTA, les conclusions suivantes provisoires peuvent être tirées :

- Le test de détection des antigènes circulants sur ELISA représente une avancée spectaculaire dans le domaine du diagnostic des trypanosomes.
- La spécificité du test doit continuer à être étudiée. En particulier, de fortes prévalences à *T. brucei*, généralement observées, correspondent-elles bien à des infections chroniques? Dans l'attente de cette évaluation, il est recommandé d'utiliser un test parasitologique sensible en parallèle au test de détection des antigènes circulants.
- Ce test mérite d'être utilisé plus largement pour les études épidémiologiques, notamment les évaluations de prévalence, et l'étude de l'impact des mesures de lutte (lutte anti-vectorielle, usage de trypanocides) sur la transmission de la maladie.
- L'ensemble des laboratoires intéressés dépendent de l'ILRAD ou de l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (AIEA, Vienne, Autriche) pour la fourniture des réactifs (anticorps monoclonaux et conjugués correspondants). Il est prévisible que la demande va rapidement dépasser l'offre et nous recommandons fortement qu'une solution soit trouvée pour un approvisionnement régulier des laboratoires régionaux et nationaux.

## De l'épidémiologie des parasites à l'épidémiologie moléculaire

Les études épidémiologiques classiques ont utilisé les tests de diagnostic parasitologique et sérologique décrits ci-dessus. Leur sensibilité est limitée et l'identification des parasites assez grossière. L'introduction du test de détection des antigènes circulants a apporté une plus grande sensibilité et l'identification simultanée de l'espèce de trypanosome infectant. Ceci a permis de montrer, entre autre, l'importance des infections mixtes qui passent habituellement inaperçues. Ce test a permis aussi une évaluation plus précise de l'incidence de la maladie (nouvelles infections pendant une période donnée) et aussi de la trypanotolérance de certains taurins (antigènémie positive mais parasitémie non patente).

Parallèlement, des techniques issues de la biologie moléculaire ont été développées pour une identification plus précise des trypanosomes. Il s'agit des sondes nucléiques et de l'amplification en chaîne par polymérase (ACP = PCR en anglais). Ces outils ont été adaptés pour permettre aux parasitologistes de faire des distinctions très fines dans les populations de parasites. Ils permettent d'identifier les individus en analysant directement leur génome.

## Les sondes nucléiques

Une sonde nucléique est une molécule d'ADN (généralement), longue de 15 à plusieurs milliers de nucléotides, utilisée pour détecter sa séquence complémentaire dans un mélange d'acides nucléiques provenant d'une cellule. Pour les trypanosomes, les travaux de l'ILRAD et ceux de l'Université de Bristol (UK) principalement, ont permis de développer des sondes reconnaissant les différents espèces ou sous-espèces.

Les sondes disponibles sont énumérées dans le Tableau II.

Tableau II. Les sondes disponibles.

Sous genres	Espèces	Groupes taxonomiques	Sondes	Réf
Nannomonas	congolense	forme de savane	pgNRE-372	[14]
	sensu lato		369 bp	[8]
		forme Kilıfi	pgNIK-450	[14]
			400 bp	[8]
		forme de forêt	350 bp	[8]
	sımiae		pgNS-600	[13]
			200bp	[8]
Dunotella	vivax	forme Afrique de l'Ouest	IgDIL-10	[14]
			180 bp	[7]
		forme Afrique de l'Est	pkDIL-900	(*)
Trypanozoon	brucei		pgDR1 (ingi)	[14]
	sensu lato		177 bp	[8]

<sup>\*:</sup> ILRAD Actualités, janvier 1991

Un travail important a été réalisé au sein du sous-genre *Trypanozoon* pour séparer les sous-espèces *gambiense*, *rhodesiense*, *brucei* et *evansi* entre elles, en raison du rôle pathogène pour l'homme des deux premières. De nombreuses sondes ont été développées pour cela [2, 5, 20, 21, 22, 30, 32].

Pour les trypanosomes animales, c'est au sein du sous-genre *Nannomonas* que cet outil est le plus efficace pour le moment. En effet, parmi les trypanosomes indistinguables morphologiquement, les sondes nucléiques permettent de différencier au moins 5 groupes taxonomiques différents: *T. simiae*, *T. congolense* forme de savane, *T. congolense* forme Kilifi, *T. congolense* forme de forêt, et une nouvelle forme, découverte récemment en Gambie [24], non reconnue par les sondes précédentes.

Ces résultats ont une grande importance sur le plan épidémiologique. *T. simiae*, très pathogène pour les porcs, ne l'est pas pour les bovins; or, plus de 70% des infections à *Nannomonas* chez *Glossina morsitans submorsitans* en Gambie ont été rapportées à *T.* 

simiae [23]. Cela influe sur l'estimation du risque mesuré par le taux d'infection des glossines. D'autre part, les résultats obtenus en Gambie montrent aussi que *T. simiae* et *T. congolense* forme de savane n'ont été observés que chez *G. m. submorsitans* alors que *T. congolense* forme de forêt n'a été observé que chez *G. palpalis gambiensis* [24]. Ces spécificités parasites-vecteurs sont primordiales pour la compréhension des cycles épidémiologiques, et donc pour mieux cibler la lutte.

#### Résultats obtenus au CRTA

A l'occasion de séjours à l'ILRAD et à l'Université de Bordeaux-II (France) grâce à une convention Aupelf-Uref, les souches suivantes de *T. congolense* sensu lato, isolées dans la région de Bobo-Dioulasso ont pu être caractérisées (Tableau II).

<b>Tableau III.</b> Souches de <i>T. congolense</i> sensu lato isolées dans la	i region de Bobo-Dioulasso.
--	-----------------------------

Souches testées	Stabilats	Espèces hôtes	Sondes + (c)
Samandeni/82/CRTA/29	S2 (11.6.82)	zébu	pgNRE-372
Samndeni/82/CRTA/33	S4 (16 12.83)	zébu	pgNRE-372
Karankasso/83/CRTA/69	C1 (24.1.84)	zébu	pgNRE-372
Karankasso/83/CRTA/57	C1 (18.1.84)	zébu	pgNRE-372
Karankasso/83/CRTA/66	C3 (30.4.85)	zébu	pgNRE-372
Samorogouan/82/CRTA/53	ILRAD 2468 (a)	zébu	pgNRE-372
Banankélédaga/83/CRTA/67	ILRAD 2462 (a)	zébu	pgNRE-372
Samandeni/82/CRTA/31	C1 (26.12.83) = ILRAD 3875 (b)	zébu	pgNRE-372
Dinderesso/80/CRTA/3	C18 (28.8.84) = ILRAD 3874 (b)	chien	350bp

<sup>(</sup>a): résultats obtenus par l'ILRAD [18]

Ces résultats, obtenus à partir de souches isolées sur souris et conservées en azote liquide, ne reflètent pas la réalité épidémiologique de la circulation des différentes espèces de trypanosomes dans la nature. Ils montrent la présence des taxons *T. congolense* forme de savane et *T. congolense* forme de forêt autour de Bobo-Dioulasso. Les recherches doivent se poursuivre avec toute la batterie de sondes pour mieux caractériser les trypanosomes dans la nature au sein des cycles épidémiologiques.

Le problème principal rencontré pour le transfert de cette technologie est celui du marquage des sondes. Traditionnellement, il se fait à l'aide de produits radioactifs (<sup>32</sup>P). Les délais de livraison en Afrique, généralement non compatibles avec la durée de demi-vie de ces produits, la difficulté et les dangers de leur manipulation, l'absence de personnel entrainé à leur utilisation, l'impossibilité de conserver les sondes marquées, rendent leur emploi impossible en dehors de laboratoire comme l'ILRAD. Les recherches s'orientent

<sup>(</sup>b): résultats obtenus par l'ILRAD [R. Masake, comm pers, 1993]

<sup>(</sup>c): pgNRE-372 = T. congolense forme de savane; 350 bp = T. congolense forme de forêt

donc vers des marquages non radioactifs utilisant des réactions enzymatiques et/ou la chimiluminescence. Les kits proposés commercialement permettent de marquer les sondes et de les conserver ainsi pendant une année. Nous avons testé au CRTA le marquage chimiluminescent par kit ECL<sup>ND</sup> d'Amersham. Les résultats ont montré des réactions croisées entre les différentes sondes et un résultat positif a été obtenu avec du sang humain ou de souris non parasité. Des résultats similaires ont été obtenus par les chercheurs de l'IL-RAD, et, sur leurs conseils, nous allons tester le kit de chimiluminescence proposé par Boehringer-Mannheim (DIG DNA Labeling and Detection Kit Non Radioactive et Lumi-Phos 530) dont les résultats semblent prometteurs.

Si l'utilisation des sondes apporte une grande spécificité et permet de tester un grand nombre d'échantillons à la fois, une limitation semble être leur manque de sensibilité. En effet, en utilisant la technique "Dot-blot" de fixation des échantillons sur une membrane de nylon ou de nitrocellulose, la limite de détection semble être 100 trypanosomes par échantillon (soit environ 500 trypanosomes par ml). Cette technique reste cependant intéressante pour analyser et caractériser un grand nombre d'échantillons provenant de glossines capturées dans la nature.

## L'amplification en chaîne par polymerase

En décembre 1985, un groupe de chercheurs de la société Cetus Corp. a publié une technique permettant d'amplifier les séquences ADN double brin avec un facteur d'amplification égal à 2x10<sup>5</sup>. Cette technique est dénommée *Polymerase Chain Reaction* (PCR), ce qui a été traduit en français par Amplification en chaîne par polymérase (ACP).

Cette technique permet d'amplifier en quelques heures un fragment d'ADN: le recopier en plusieurs millions d'exemplaires. Elle présente une sensibilité extrême qui permet de détecter une molécule d'ADN aussi petite que 100 paires de nucléotides, présente à un seul exemplaire dans un prélèvement biologique.

La technique ACP est fondée sur le fonctionnement cyclique d'une ADN polymérase. Cette polymérase copie un brin d'ADN, utilisé comme matrice, en un brin complémentaire, par élongation, à partir de l'extrémité libre d'une amorce oligonucléotidique. La technique consiste donc à effectuer des cycles successifs d'amplification, au cours desquels deux amorces dirigent l'amplification de la séquence d'ADN double brin, préalablement dénaturé, qu'ils encadrent.

La seule limitation de la méthode concerne la longueur du segment amplifiable. Cette longueur est conditionnée par la distance séparant les deux amorces et est le plus souvent comprise entre 100 et 1000 nucléotides. Au-delà, il y a une baisse considérable du rendement.

Un cycle d'amplification comprend trois étapes successives :

- la dénaturation de l'ADN double brin en ADN simple brin, par chauffage à 94-95°C;
- l'hybridation des amorces oligonucléotidiques sur les brins d'ADN dénaturés, à une température d'environ  $55^{\circ}C$  ;
- l'extension des brins d'ADN par l'ADN polymérase à une température d'environ 72°C. Chaque amorce est allongée pour donner une séquence exactement complémentaire du brin recopié. Il en résulte un doublement de la séquence considérée.

Chaque étape dure environ 2 min. Pour éviter l'addition d'enzyme à chaque cycle, une ADN polymérase pouvant résister à 100°C a été isolée d'une archébactérie thermophile :

Thermus aquaticus, d'où son nom de Taq-polymérase. Comme cette enzyme résiste à la température requise pour la séparation des deux brins (90°C), il n'est pas nécessaire d'en rajouter à chaque cycle, ce qui diminue considérablement le prix de revient, et permet de faire toutes les opérations dans le même tube.

L'amplification en chaîne par polymérase est une révolution biologique qui fera date dans l'histoire de la biologie moléculaire. Son application la plus immédiate concerne le diagnostic, mais son intérêt en recherche fondamentale est également important pour le séquençage, le clonage, la mutagénèse dirigée et l'étude de l'expression des gènes.

Pour les trypanosomes, l'utilisation de l'ACP à des fins de diagnostic et/ou d'identification a déjà fait l'objet de plusieurs publications [20,25].

#### Résultats obtenus au CRTA

Après une mise au point des protocoles au CRTA en 1992, des amplifications ont été obtenus pour *T. congolense* forme de savane, *T. brucei*, et *T. vivax*. La polymérase utilisée est la Vent<sup>ND</sup> Polymerase de New England Biolabs. Les amorces énumérées dans le Tableau IV ont été fournies par l'ILRAD et le CIRAD-EMVT.

Amorces	Specificités	Taille fragments amplifiés
col 1 et 2	T. congolense forme de savane	320 bp
kol 1 et 2	T. congolense forme Kılıfı	non testé au CRTA
vol 1 et 2	T. vivax	170 bp
sol 1 et 2	T. simae	non testé au CRTA
bol 1 et 2	T. brucei	177 bp
bol 3 et 4	T. brucei	1520 bp

Tableau IV. Amorces fournies par l'ILRAD et le CIRAD-EMVT.

Les cycles adoptés sont : 90 secondes à 94°C, 60 secondes à 55°C et 90 secondes à 72°C, avec une répétition de 30 cycles. La révélation des produits de l'amplification se fait par électrophorèse en gel d'agarose avec incorporation de bromure d'éthidium et lecture sur table UV.

Dans ces conditions, les résultats préliminaires suivants ont été acquis :

- une bande d'amplification d'environ 320 bp a été obtenue avec les amorces col 1 et 2 pour les souches suivantes : CRTA/29, CRTA/31, CRTA/33, CRTA/69 et ILRAD/C49. Pour les 4 premières, ce résultat confirme celui obtenu avec les sondes nucléiques;
- une bande d'amplification d'environ 1520 bp a été obtenue avec les amorces bol 3 et 4 pour un clone de la souche Farakoba/80/CRTA/1, confirmant ainsi l'identification *T. brucei*;
- une bande d'amplification d'environ 170 bp a été obtenue avec les amorces vol 1 et 2 à partir d'un échantillon isolé sur bovin. Ce résultat est particulièrement intéressant car l'échantillon a été isolé sur le terrain dans une trousse KIVI (kit d'isolement *in vitro*, fourni par l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers). C'est le résultat de 3 semaines de cul-

ture après inoculation qui a été testé en ACP. Les trousses KIVI mises au point pour l'isolement de trypanosomes du sous-genre *Trypanozoon* [1] semblent donc permettre aussi l'identification de *T. vivax* dans un prélèvement.

Il est envisagé maintenant d'utiliser cette technique ACP plus largement pour déceler et identifier les trypanosomes chez les glossines.

## Conclusion

Les résultats récents de la recherche, notamment en immunochimie et en biologie moléculaire, ont apporté de nouveaux outils pour le diagnostic et l'épidémiologie des trypanosomes africaines.

Les anticorps monoclonaux spécifiques des différents groupes de trypanosomes, créés à l'ILRAD, ont permis le développement d'un test de détection des antigènes circulants. Ce test sensible présente l'immense intérêt d'identifier les groupes de trypanosomes en cause, en même temps que la détection d'une infection active. Utile pour aider au diagnostic, ce test doit devenir un outil indispensable pour les enquêtes épidémiologiques (estimation des prévalences régionales) et pour l'évaluation de l'efficacité des campagnes de lutte.

La biologie moléculaire a apporté deux outils : les sondes nucléiques et l'amplification en chaine par polymérase. Depuis 1992, de nombreux essais ont été réalisés pour la mise au point des protocoles d'utilisation des sondes nucléiques et de la technique ACP au sein de l'Unité d'Epidémiologie et de Biotechnologie appliquée du CRTA. Ces techniques doivent permettre une identification spécifique et/ou subspécifique des trypanosomes au niveau de l'hôte et du vecteur, avec une grande sensibilité. Elles sont cependant chères et difficiles à mettre en œuvre dans un laboratoire non spécialisé : c'est pourquoi nous pensons qu'elles doivent être réservées pour le moment à une utilisation en recherche stratégique pour mieux comprendre l'épidémiologie des trypanosomes.

Enfin un effort important doit être fait pour aider à la formation des cadres nationaux dans les zones d'endémie et au transfert de ces biotechnologies.

## Remerciements

Nous adressons nos remerciements à l'AUPELF-UREF (convention X/10.8/90.3) et au CIRAD-EMVT (ATP n°70/92) pour leur aide financière au transfert de ces technologies au CRTA. Nous remercions nos collègues de l'ILRAD (P.A.O. Majiwa, R. Masake, V. Nantulya, M. Touré) pour la fourniture des réactifs et leurs conseils techniques. Nous remercions le Dr S.M. Touré, Directeur du CRTA, pour son soutien constant ainsi que nos techniciens L. Millogo, Y. Mémé, J. Simporé pour leur aide technique au laboratoire et sur le terrain.

## Références

- 1. Aerts D., Truc P., Penchenier L., Claes Y., Le Ray D. (1992). A kit for *in vitro* isolation of trypanosomes in the field: first trial with sleeping sickness patients in the Congo Republic. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 86: 394-395.
- 2. Barnes D.A., Mottram J., Selkirk M., Agabian N. (1989).Two variant surface glycoprotein genes distinguich between different substrains of *Tripanosoma brucei gambiense*. *Molec Biochem Parasit*; 34:135-146.
- 3. Bocquentin R., Duvallet G. (1990). Amélioration de la reproductibilité du test ELISA adapté à la détection d'anticorps anti-trypanosoma congolense chez les bovins. Rev Elev Méd Vét Pays Trop; 43(2): 179-186.
- 4. Bocquentin R., Very P., Duvallet G. (1990). Cinétique des anticorps après traitement trypnocide chez les bovins infectés expérimentalement ou naturellement. Intérêt épidémiologique. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop*; 43(4): 479-483.
- 5. Borst P., Fase-Fowler F., Gibson W.C. (1987). Kinetoplast DNA of *Trypanosoma evansi*. *Molec Biochem Parasit*; 23: 31-38.
- Boyt W.P. (1986). Guide pratique pour le diagnostic, le traitement et la prévention de la trypanosomiase animale africaine. FAO, Rome, Italie.
- 7. Dickin S.K., Gibson W.C. (1989). Hybridisation with a repetitive DNA probe reveals the presence of small chromosomes in *Trypanosoma vivax*. *Molec Biochem parasit*; 33: 135-142.
- 8. Gibson W.C., Dukes P., Gashumba J.K. (1988). Species specific DNA probes for the identification of African trypanosomes in tsetse filies. *Parasitology*: 97: 63-73.
- Hoste C. (1987). Elevage et trypanosomiase animale africaine. Thèse de doctorat d'Etat, Université Paris VI, 30 septembre 1987.
- IEMVT-CIRAD (1991). Diagnostic et traitement des trypanosomes animales en Afrique. I. Le diagnostic. Fiche technique d'élevage tropical, fiche n°3, juin 1991, Ministère de la coopération/IEMVT-CIRAD, Paris, France.
- Jahnke H.E., Tacher G., Keil P., Rojat D. (1988). Livestock production in tropical Africa, with special reference to the tsetse affected zone. In: Livestock Production in tsetse affected areas of Africa, Proceeding of a Meeeting held 23-27 November 1987, Nairobi, Kenya, ILCA/ILRAD Publ.
- 12. Kanwe A.B., Bengaly Z., Saulnier D., Duvallet G. (1992). Evaluation du test de détection des antigènes circulants de trypanosomes à l'aide d'anticorps monoclonaux. Infections expérimentales et naturelles. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop*; 45(3) sous presse.
- 13. Knowles G., Betschart B., Kukla B.A., Scott J.R., Majixa P.A.O. (1988) Genetically discrete populations of *Trypanosoma congolense* from livestock on the Kenyan coast. *Parasitology*; 96: 461-474.
- 14. Kukla B.A., Majiwa P.A.O., Young J.R., Moloo S.K., Ole-Moiyoi O. (1987). Use of species specific DNA probes for the detection and identification of trypanosome infection in tsetse flies. *Parasitology*; 97: 1-16.
- 15. Lumsden W.H.R., Kimber C.D., Dukes P., Haller L., Stanghellini A., Duvallet G. (1981). Field diagnosis of sleeping sickness in the Ivory Coast. I. Comparison of the miniature anion-exchange/centrifugation technique with other protozoological methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*; 75(2): 242-250.
- 16. Lumsden W.H.R., Kimber C.D., Evans D.A., Doig S.J. (1979). *Trypanosoma brucei*: miniature anion-exchange/centrifugation technique for detection of low parasitaemias: adaptation for fiels use. *Tans R Soc Trop Med Hyg*; 73: 312-317.
- 17. Majiwa P.A.O., Otieno L.H. (1990). Recombinant DNA probes reveal simultaneous infection of tsetse flies with different trypanosome species. *Molec Biochem Parasit*; 40: 245-254.
- 18. Majiwa P.A.O., Webster P.A. (1987). A repetitive deoxyribonucleic acid sequence distinguishes *Trypanosoma simiae* from *T congolense*. *Parasitology*; 95: 543-598.

- 19. Masiga D.K., Gibson W.C. (1990). Specific probes for *Trypanosoma (trypanozoon) evansi* based on kinetoplast DNA minicircles. *Molec Biochem Parasit*; 40: 279-284.
- Masiga D.K., Smyth A.J., Hayes P., Bromidge T.J., Gibson W.C. (1992). Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *Intern J Parasit*.
- 21. Massamba N.N., Williams R.O. (1984). Distinction of African trypanosome species using nucleic acid hybridisation. *Parasitology*; 88: 55-65.
- 22. Mathieu-Daude F. (1991). Mode de reproduction de *Trypanosoma brucei* dans ses populations naturelles: implications taxonomiques et épidémiologiques. Thèse de doctorat de spécialité, Parasitologie, Université de Montpellier II, France.
- 23. McNamara J., Dukes P., Snow W.F., Gibson W.C. (1989). Use of DNA probes to identify *Try-panosoma congolense* and *T. simiae* in tsetse flies from Gambia. *Acta Trop*; 46: 55-61.
- 24. McNamara J., Snow W.F. (1991). Improved identification of *Nannomonas* infections in tsetse flies from the Gambia. *Acta Trop*.; 48: 127-136.
- 25. Moser D.R., Cook G.A., Ochs D.E., Bailey C.P., McKane M.R., Donelson J.E. (1989). Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Parasitology*; 99: 57-66;
- 26. Murray M., Murray P.K., McIntyre W.I.M. (1977). An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 71: 325-326.
- 27. Nantulya V.M. (1991). Molecular diagnosis of parasites. Experientia; 47: 142-145.
- Nantulya V.M., Lindqvist K.J. (1989). Antigen-detection enzyme immunoassays for the diagnosis of *Trypanosoma vivax*. *T. congolense* and *T. brucei* infections in cattle. *Trop Med Parasit*.: 40: 267-272.
- 29. Nantulya V.M., Musoke A.J., Rurangirwa F.R., Saigar N., Muiya S.H. (1987). Monoclonal antibodies that distinguish *Trypanosoma congolense*, *T. vivax*, and *T. brucei. Parasite immun*; 9: 421-431.
- 30. Paindavione P., Pays E., Laurent M., Geltmeyer Y., Le Ray D., Mehlitz D., Steinert M. (1986). The use of DNA hybridisation and numerical taxonomy in determining relationships between *Trypanosoma brucei* stocks and subspecies. *Parasitology*; 92: 31-50.
- 31. Paris I., Murray M., McOdimba F. (1982). A comparative evaluation of the parasitological techniques currently available for the diagnosis of African trypanosomiasis in cattle. *Acta Tropica*; 39: 307-316.
- 32. Pays E., Dekerke P., Van Assel S., Eldiridi A.B., Le Ray D., Van Meirvenne N., Steinert M. (1983). Comparative analysis of *Trypanosoma brucei gambiense* antigen gene family and its potential use in epidemiology of sleeping sickness. *Molec Biochem Parasit*; 7: 63-74.
- 33. Rae R., Luckins A.G. (1984). Detection of circulating trypanosomal antigens by enzyme immunoassay. *Ann Trop Med Parasit*; 78: 587-596.
- 34. Troncy P.M., Itard J., Morel P.C. (1981). Précis de parasitologie vétérinaire tropicale. Ministère de la Coopération/IEMVT, Paris, France, 717 p.
- 35. Very P., Bocquentin R., Duvallet G. (1990). Sensibilité de la double microcentrifugation pour la recherche des trypanosomes. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop* ;43(3): 325-329.
- 36. Voller A., Bidwell D.E., Bartlett A. (1970). A serological study on human *Trypanosoma rhodesiense* infections using a microscale enzyme-linked immunosorbent assay *Trop Med Parasit*; 26: 247-2
- 37. Williams J.S., Duxbury R.E., Anderson R.I., Sadun E.H. (1963). Fluorescent antibody reactions in *Trypanosoma rhodesiense* and *T. gambiense* in experimental animal. *J Parasitol*; 49(3): 380-384.

4

# Caractérisation et typage de souches de *Clostridium perfringens* par la méthode ELISA

A. GINTER\*, K. RENIER, A. COLLARD\*, B. LIMBOURG\*\*, G. DAUBE\*\*\*, P. SIMON\*\*\*, C. MANTECA\*\*\*, P. COPPE\*

- \* Division Immunologie animale, Centre d'économie rurale, Marloie, Belgique.
- \*\* Centre de dépistage des maladies animales, Erpent, Belgique.
- \*\*\* Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Service de bactériologie et des maladies bactériennes, Liège, Belgique.

Clostridium perfringens est divisé en 5 toxinotypes (A, B, C, D et E) sur base de sa capacité à produire les toxines létales majeures  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  et  $\iota$ . Le test le plus communément utilisé pour détecter les toxines létales majeures est le test de toxinotypie sur souris. Ce test est fastidieux à mettre en oeuvre, il est éthiquement discutable et comme tout test biologique, il est sujet à de multiples variations. Au cours de ce travail, nous avons développé une méthode de typage et de caractérisation de souches de Clostridium perfringens basée sur le principe d'un test ELISA. Ce test permet de détecter la production des toxines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\epsilon$  par des souches isolées à partir d'échantillons prélevés sur des cadavres. Il permet également la détection directe des toxines dans des organes ou dans des liquides biologiques du cadavre (liquides péricardiques, péritonéaux, contenu intestinal)

## Matériel et méthode

## Production des toxines

## Toxine alpha

## Toxine commerciale

La phospholipase C ou phosphatidylcholine de *Clostridium perfringens* a été achetée auprés de la firme Sigma (P4039 125 U). Cette toxine a été purifiée par le fabricant par une méthode chromatographique.

## Production en flacon

La souche ATCC 13124 de type A de *Clostridium perfringens* a été multipliée en flacon de 2 litres dans du milieu TGY (Trypticase, Glucose, Yeast extract) à 37°C durant 4 à 5 heures.

## Production en fermenteur

Une préculture de la souche ATCC 13124 de *Clostridium perfringens* a été réalisée en milieu TGY durnt 4 heure à 37°C. La préculture (200 ml) a servi à l'inoculation de 2 litres de milieu TGY dns un fermenteur New Brunswick BioFlo III. Le pH a été maintenu durant la fermentation à 7 à l'aide d'une solution de NaOH 10 N. La culture a été réalisée en atmosphère d'azote à 37°C. L'agitation du milieu de culture a été maintenue à 100 RPM durant tout le temps de la fermentation. Une solution de glucose à 50% a été injectée en continu dans le liquide de fermentation à l'aide d'une pompe d'alimentation à raison de 830 µl/min.

## Toxine bêta

## Production en flacon

La souche ATCC 3626 de type B a été multipliée dans 2 litres de milieu TGY à 37°C durant 8 à 10 heures.

## Production en fermenteur

Une préculture de la souche ATCC 3626 de *Clostridium perfringens* type B a été réalisée en milieu TGY durant 6 heures à 37°C. La préculture (200 ml) a servi à l'inoculation de 2 litres de milieu TGY dans un fermenteur New Brunswick BioFlo III. La culture en fermenteur a été réalisée de la même manière que pour la production de la toxine  $\alpha$  (durée de la fermentation : 24 heures).

## Toxine epsilon

## Production en fermenteur

La souche NCTC 2062 du type D a été multipliée durant 20 heures à 37°C dans un fermenteur New Brunswick. Le milieu retenu pour cette fermentation était celui décrit par K.J. Beh et S.H. Buttery [1]. L'ajustement du pH a été réalisé manuellement durant les 10 premières heures de fermentation à l'aide d'une solution de NaOH 3N. La culture n'a pas été réalisée en atmosphère d'azote.

#### **Purification des toxines**

## Toxine alpha

Filtration et chromatographie sur gel échangeur d'ions et sur gel de type tamis moléculaire

Le surnageant de culture de *Clostrdium perfringens* type A souche ATCC 13124 a été filtré sur une membrane de 0,22 μ puis sur une membrane avec un seuil de coupure de 100 KD (appareil de filtration tangentielle Minitan de la firme Millipore). Le filtrat a été concentré sur une membrane avec un seuil de coupure de 30 KD [2, 7]. Le rétentat de cette étape de filtration a été équilibré en tampon phosphate 20 mM pH 6,8 1 mM EDTA, 1 mM PMSF (Phenylmethan-sulfonylfluorid, Merck, 7349) par passage sur un gel sephadex G25 (Pharmacia G25 Sephadex Medium, 100 g, 17-0033-01). L'échantillon a ensuite été appliqué sur un gel échangeur anionique (sepharose Q fast flow de la firme Pharmacia 17-0510-01) en utilisant le même tampon. La séparation des divers composants de l'échantillon a été réalisée en appliquant un gradient linéaire de NaCl (0 à 500 mM NaCl) dans le tampon phosphate de base. Les fractions présentant une activité lécithinasique en gel d'agarose ont été concentrées par filtration tangentielle sur une membrane avec un seuil de coupure de 10 KD. Le rétentat de cette étape de filtration a été appliqué sur un gel superdex 75 (Pharmacia Hiload 26/60 superdex 75 prepgrade 17-1070-01) dans un tampon phosphate 50 mM NaCl 100 mM pH 7,4.

## Immunoaffinité

Nous avons fixé sur un gel de sepharose 4B activité au CnBr (Pharmacia 52-1153-00-AI) l'anticorps monoclonal DY2F5 spécifique de la toxine  $\alpha$  (voir ci-aprés les conditions d'obtention de cet anticorps). Cet anticorps a été purifié à partir de liquide d'ascite par passage sur un gel de protéine G sepharose fast flow (Pharmacia 17-0618-01). Dix millilitres de milieu de culture produits sur fermenteur ont été appliqués sur le gel d'immunoaffinité à raison de 2 ml par passage. Aprés équilibration du gel dans un tampon phosphate 20 mM pH 7,2 le tampon d'élution (glycine 100 mM ph 2,8) a été appliqué sur le gel. L'éluat a été immédiatement neutralisé par l'addition d'une solution de Tris 1 M pH 8.

#### Toxine bêta

Précipitation et chromatographie sur gel échangeur d'ions

Le surnageant de culture de la souche ATCC 3626 de *Clostridium perfringens* type B a été précipité à l'aide d'une solution de sulfate d'ammonium (313 gr/L poids/volume [9]). Le culot a été remis en solution dans un tampon Tris 10 mM pH 7,2. Le sulfate d'ammonium a été éliminé par passage de l'échantillon sur un gel de type sephadex G25 équilibré en tampon Tris 10 mM pH 7,2. Les fractions positives au test de létalité sur souris ont été regroupées avant d'être appliquées sur un gel d'immunoaffinité spécifique de la toxine  $\alpha$ . Ce dernier a été préparé par couplage sur un gel de sepharose 4B activité au CnBr (Pharmacia 17-0430-01) d'une solution d'immunoglobulines purifiées à partir d'un sérum polyclonal de lapin (Col 25) immunisé avec une préparation commerciale de toxine  $\alpha$  (Sigma). Le premier pic issu de ce gel d'immunoaffinité (échantillon débarassé de la toxine  $\alpha$ ) a été appliqué sur une colonne de type DEAE (LKB TSK DEAE 5PV 2133-110

HPLC) préalablement équilibrée en tampon Tris 10 mM pH 7,2. Les divers composants de l'échantillon ont été élués à l'aide d'un gradient de NaCl (0 à 500 mM NaCl en Tris 10 mM pH 7,2). Les fractions positives au test de létalité sur souris ont été regroupées et concentrées par lyophilisation.

## Précipitation et immunoaffinité

Le surnageant de culture de la souche ATCC 3626 de *Clostridium perfringens* type B a été précipité à l'aide d'une solution de sulfate d'ammonium (313 gr/L poids/volume). Le culot a été remis en solution dans un tampon PBS puis dialysé contre le même tampon de manière à éliminer le sulfate d'ammonium. L'échantillon a ensuite été appliqué sur un gel d'immunoaffinité spécifique de la toxine  $\alpha$  (Col 25). Le premier pic issu de ce gel d'immunoaffinité (échantillon débarassé de la toxine  $\alpha$ ) a été appliqué sur un gel d'immunoaffinité spécifique de la toxine  $\beta$ . Ce gel a été préparé par couplage sur un gel de sepharose 4B activé au CnBr d'une solution d'immunoglobulines purifiées à partir d'un sérum polyclonal de lapin (Col 35) immunisé avec de la toxine  $\beta$  préparée selon la méthode décrite au chapitre précédent.

## Toxine epsilon

## Précipitation et chromatographie sur gel échangeur d'ions

Le surnageant de culture de la souche NCTC 2062 de *Clostridium perfringens* type D a été précipité à l'aide d'une solution de sulfate d'ammonium (350 g/L poids/volume [10]). Le culot a été remis en solution dans un tampon Tris 10 mM pH 7,2. Le sulfate d'ammonium a été éliminé par passage de l'échantillon sur un gel de type sephadex G25 équilibré en tampon Tris 10 mM pH 7,2. Les fractions positives au test de létalité sur souris ont été regroupées avant d'être appliquées sur un gel échangeur anionique (sepharose Q fast flow de la firme Pharmacia) en utilisant le même tampon. La fraction non fixée sur le gel a été équilibrée en tampon Tris 50 mM pH 9,4 puis elle a été à nouveau appliquée sur le gel sepharose Q fast flow. La séparation des divers composants de l'échantillon a été réalisée en appliquant un gradient linéaire de NaCl (0 à 500 mM NaCl) dans le tampon de base (Tris 50 mM pH 9,4). Les différentes fractions obtenues ont été analysées en SDS PAGE (Phast system Pharmacia, phast gel gradient 10-15 % 17-0540-01).

## Immunoaffinité

Le surnageant de culture de la souche NCTC 2062 de *Clostridium perfringens* type D a été précipité à l'aide d'une solution de sulfate d'ammonium (313 gr/L poids/volume). Le culot a été remis en solution dans un tampon PBS puis dialysé contre le même tampon de manière à éliminer le sulfate d'ammonium. L'échantillon a ensuite été appliqué sur un gel d'immunoaffinité spécifique de la toxine  $\epsilon$  (anticorps monoclonal CK6G4). L'élution de la toxine  $\epsilon$  a été réalisée en suivant le même protocole que celui décrit pour la toxine  $\alpha$ .

## Immunisation des animaux

## Toxine alpha

Un lapin néo-zélandais a reçu 100 μg de toxine α commerciale (sigma) par voie intradermique en présence d'adjuvant complet puis incomplet de Freund. Il a été rappelé à intervalle de 1 mois. Le réactif obtenu a été appelé Col 25.

Un cobaye a été immunisé de la même manière avec une dose de  $10 \,\mu g$  de toxine  $\alpha$ . Le réactif obtenu a été appelé Cob 13.

Pour l'immunisation des souris Balb/C, la toxine (10 μg) a été formolée (solution à 0,5%) à 37°C durant 3 jours puis elle a été dialysée contre du PBS. La toxine a été injectée par voie intrapéritonéale en présence d'adjuvant complet ou incomplet de Freund (J0, J30, J45). La fusion cellulaire a été réalisée au 48ème jour.

## Toxine bêta

Un lapin néo-zélandais a reçu 10 à 20 µg de toxine  $\beta$  purifiée par précipitation et chromatographie sur échangeur d'ions, par voie intradermique en présence d'ajuvant complet puis incomplet de Freund. Il a été rappelé à intervalle de 1 mois. Le réactif obtenu a été appelé Col 35.

Un cobaye a été immunisé de la même manière avec une dose de 2 à 5  $\mu$ g de toxine  $\beta$ . Le réactif obtenu a été appelé Cob 16.

Les rappels du lapin et du cobaye ont ensuite été effectués en utilisant la toxine purifiée par immunoaffinité.

Pour l'immunisation des souris Balb/C, la toxine (8 µg) a été formolée (solution à 0,5%) à 37°C durant 3 jours puis elle a été dialysée contre du PBS. La toxine a été injectée par voie intrapéritonéale en présence d'adjuvant complet ou incomplet de Freund (J0, J15, J65, J72). La fusion cellulaire a été réalisée au 76ème jour.

## Toxine epsilon

Un lapin néo-zélandais a reçu 100 μg de toxine ε purifiée par immunoaffinité à l'aide de l'anticorps mooclonal CK6G4 par voie intradermique en présence d'adjuvant complet puis incomplet de Freund. Il a été rapelé à intervalle de 1 mois. Le réactif obtenu a été appelé Col 26.

Pour l'immunisation des souris Balb/C, la toxine (10 µg) a été formolée (solution à 0,5%) à 37°C durant 7 jours. Cette toxine avait été purifiée par précipitation et chromatographie sur gel échangeur d'ions. La toxine a été injectée par voie intrapéritonéale en présence d'adjuvant complet ou incomplet de Freund (J0, J30, J60). La fusion cellulaire a été réalisée au 63ème jour.

## Production des anticorps monoclonaux

Les fusions cellulaires ont été réalisées selon la procédure classique à l'aide de myélome SP2/OAG14 [5].

## Purification des sérums polyclonaux et des liquides d'ascite

Les liquide d'ascite et les sérums sanguins de lapin et de cobaye ont été purifiés sur gel de protéine G (Pharmacia) selon la procédure préconisée par le fabricant.

## Couplage des anticorps à la péroxydase

Le couplage des anticorps à la péroxydase (VI 25.000 U Sigma P8375) a été effectué en suivant la procédure décrite par Boehringer (Biochemistry 1989 Boehringer Mannheim), elle-même dérivée de la méthode de P.K. Nakane et A. Kawaoi [6].

## **Test ELISA**

#### ELISA indirect

Pour le criblage des fusions et l'évaluation du titre des sérums polyclonaux, les toxines α, β et ε ont été fixées directement sur les microplaques (Nunc maxisorp F16 4/67466) à raison de 10 μg par ml en PBS (une nuit à 4°C). Les microplaques ont ensuite été saturées par une solution d'hydrolysat de caséine (Merk 2242 caséine selon Hammersten) préparée selon la procédure préconisée par la firme Nunc (Caséine Nunc Bulletin 7.12.89). Les plaques ont ensuite été séchées par lyophilisation et stockées sous vide dans un emballage de plastic. Les échantillons à analyser (sérums sanguins, liquides d'ascite, solutions d'anticorps purifiés et surnageants de culture) ont été appliqués à une dilution adéquate en hydrolysat de caséine dans les micropuits. La fixation des anticorps a été mise en évidence par des antisérums spécifiques couplés à la péroxydase (chèvre anti immunoglobulines de souris, mouton anti immunoglobulines de cobaye et mouton anti immunoglobulines de lapin). La fixation des conjugués a été révélée par une solution de TMB (Tétra Méthyl Benzidine) et d'eau oxygénée (KPL TMB Microwell Peroxidase Substrate System 50-76-00).

## ELISA sandwich

## Toxine alpha

Les colonnes impaires des microplaques ont été sensibilisées avec l'anticorps polyclonal de cobaye Cob 13 et les colonnes paires avec un anticorps polyclonal provenant d'un cobaye non immunisé (anticorps témoin négatif). En parallèle, des microplaques ont été également sensibilisées avec l'anticorps monoclonal DY2F5 (colonnes impaires) et avec un anticorps monoclonal témoin (AK13A2) spécifique du BRSV (Bovine Respiratory Syncitial Virus). Après saturation des microplaques à l'aide d'une solution d'hydrolysat de caséine, elles ont été séchées par lyophilisation puis stockées sous vide en emballage de plastic. Les surnageants de culture de Clostridium perfringens ont été distribués tels quels sur les microplaques. Les échantillons provenant de contenu intestinal de veaux morts d'entérotoxémie ont été dilués au 1/2 en hydrolisat de caséine, puis centrifugés avant d'être distribués sur les microplaques. Les liquides biologiques (liquides péritonéaux et liquides péricardiques) ont également été dilués au 1/2 en hydrolisat de caséine. Aprés une heure d'incubation à température ambiante, les microplaques ont été rinçées par immersion dans une solution de PBS tween 20 0,1%. Le conjugué utilisé pour révéler la fixation de la toxine α sur la plaque était préparé par couplage à la peroxydase, d'une solution d'immunoglobulines purifiées à partir du sérum polyclonal du lapin Col 25. L'activité enzymatique a été révélée par une solution de TMB et d'eau oxygénée.

# Toxine bêta

Le test ELISA a été réalisé comme décrit au chapitre précédent, l'anticorps de capture fixé sur la microplaque étant le sérum de lapin Col 35 et le conjugué étant préparé à partir du sérum polyclonal de cobaye Cob 16.

# Toxine epsilon

Pour ce test, l'anticorps monoclonal CK6G4 a été utilisé comme anticorps de capture et le sérum polyclonal de lapin Col 26 comme conjugué.

# Détermination de l'activité lécithinasique de la toxine alpha en gel d'agarose

Cinq millilitres d'une solution de lécithine d'œuf (Lécithine Merk Art. 5331 25g) (500 mgr/ 5 ml d'isobutanol) sont mélangés à 50°C avec 100 ml d'une solution de Tris maléate 50 mM pH 7 + CaCl<sub>2</sub> 10 mM +1,4 gr d'agar noble. La préparation est coulée en boîte de pétri. Après perforation des puits dans la gélose, les échantillons sont déposés à raison de 15 µl par puits (Calmels).

# Test de toxinotypie sur souris

La technique utilisée est celle de la neutralisation de l'effet létal sur souris par des antisérums commerciaux (Wellcome RP04, RP05, RP06, RP08) produits contre les souches bactériennes complètes (corps bactériens + toxines). Les antisérums disponibles sont spécifiques de *Clostridium perfringens* type A, B, C, D et E. Les prélèvements à tester sont initialement étalés sur une gélose au sang pour anaérobies (anerobic blood agar base 152/00205M Gibco). Après une nuit à 37°C en anaérobiose (jarre Merck), les colonies isolées sont transférées dans un bouillon TGY. Après 4 à 5 heures de culture à 37°, les bouillons sont centrifugés à 6.500g durant 20 minutes. La moitié du surnageant récolté est trypsiné (Life technologies : trypsine 1 : 250 VSP grade 066-07072E; 2U = 25g) à 1 pour 1000 (V : V) durant 1 heure à 37°C. A 500 μl de surnageant trypsiné ou non sont ajoutés les antisérums spécifiques selon le protocole décrit dans le Tableau I. Le volume d'antisérum ajouté à 500 μl de surnageant de culture est de 50 μl. La neutralisation est réalisée à température ambiante durant 30 minutes.

Tableau I.

	Surnageant non trypsiné	Surnageant trypsiné
	-	-
	+A	+A
Antisérums	+A +C	+A +C
	+A +D	+A +D
	+A +C +D	+A +C +D
	+A +E	+A +E

Le mélange surnageant + antisérum est injecté par voie intrapéritonéale à des souris de 20 à 30 grammes. Les souris sont observées durant 3 jours et le taux de mortalité est enregistré.

# Résultats

# Production des toxines (Tableau II)

# Tableau II.

Alpha commerciale Alpha en flacon Alpha en fermenteur	7 LD50/ unité "Sigma" non réalisé 600 LD50/ ml
Bêta en flacon Bêta en fermenteur	3 - 10 MLD/ml 600 LD50/ ml
Epsilon en fermenteur	45 - 1250 MLD/ ml

La dose létale 50 (LD50) est la dose la plus faible qui tue au moins la moitié d'un lot de souris.

La MLD (minimum lethal dosis) est la dose la plus faible qui tue 100% d'un lot de souris.

# Immunisation des animaux

Lors de tests ELISA de type indirect (fixation des toxines purifiées sur les microplaques), la monospécificité des divers sérums polyclonaux (Col 25 et Cob 13 pour la toxine  $\alpha$ , Col 35 et Cob 16 pour la toxine  $\beta$ , Col 26 pour la toxine  $\varepsilon$ ) a pu être confirmée. Le pouvoir de neutralisation de l'effet létal des toxines correspondantes a également été confirmé pour ces 5 sérums polyclonaux.

# Production des anticorps monoclonaux (Tableau III)

#### **Tests ELISA**

# Toxinotypie des souches de Clostridium perfringens (comparaisons entre le test ELISA et les sondes génétiques).

171 souches de *Clostridium perfringens* ont été isolées en milieu TGY à partir de divers échantillons (108 contenus intestinaux, 32 matières fécales, 9 colons, 4 foies, 7 reins, 2 liquides péritonéaux, 1 bile, 1 rate et 7 échantillons d'origine inconnue) provenant de diverses espèces animales (21 moutons, 11 chèvres, 45 porcs, 45 bovins, 15 chats, 26 chiens, 3 cerfs et 5 échantillons d'origine inconnue). Les surnageants de ces 171 souches

ont été testés en ELISA de type sandwich pour la présence des toxines  $\alpha$  (avec le polyclonal col 25 ou le monoclonal DY2F5),  $\beta$  et  $\epsilon$ . Ces échantillons ont également été testés avec l'anticorps monoclonal CN2E12, un anticorps spécifique d'un déterminant antigénique de stucture de *Clostridium perfringens*. Cet anticorps permet de déceler un niveau anormalement élevé de *Clostridium perfringens* dans un échantillon biologique.

Les résultats obtenus avec ces divers tests ELISA ont été comparés à ceux obtenus à l'aide de sondes génétiques (sonde alpha et epsilon [4] ) (Tableaux IV, V VI).

Tableau III.

Antigène	Nb fusions	Total clones	Clones positifs	Clone	Isotype
				DY2F5	IgG1, K
Alpha	6	57	4	DY5H5	IgG2a, K
				DY8C7	IgG1, K
				DY8H2	IgG1, K
				EI2D7	IgM, K
Bêta	2	27	3	EI8H9	IgM, K
				EI8E4	IgM, K
<del></del> -				BQ5D6	IgG1, ?
				BQ11A9	IgG1,?
				CK6G4	IgG1, K
Epsilon	2	30	7	CK4D11	IgG1, K
				CK1B2	IgG1, K
				CK4H8	IgG1, K
				CK1A4	IgG1, K

**Tableau IV.** Comparaison ELISA CN2E12 versus alpha toxine et sonde alpha.

	Sonde α+	ELISA		
CN2E12		+	+/-	-
+	170	157	8	5
+/-	0	0	0	0
-	1	0	1	0
Total	171	157	9	5

Tableau V. Comparaison ELISA DY2F5 versus sonde α, ELISA CN2E12 et alphá toxine.

	Sonde α	ELIS	A CN2E	E12 ELI	SA alpha		
DY2F5	+	+	+/-	-	+	+/-	-
+	17	17	0	0	17	0	0
+/-	4	4	0	0	3	0	0
-	126	126	0	0	116	7	3
Total	147	147	0	0	136	7	4

Sur les 171 échantillons, 147 seulement ont été testés à l'aide du monoclonal DY2F5.

**Tableau VI.** Comparaison ELISA epsilon toxine *versus* sonde epsilon, ELISA alpha et ELISA CN2E12.

•	Sond	eε ELIS	A alpha	ELIS	A CN2E12			
ELISA ε	+	-	+	+/-	<u>-</u>	+	+/-	-
+	31	0	26	3	2	30	0	1
+/-	0	1	1	0	0	1	0	0
-	0	139	130	6	3	139	0	0
Total	31	140	157	9	5	170	0	1

L'absence de sonde spécifique de la toxine  $\beta$  a empêché l'établissement de toute comparaison avec les résultats obtenus en ELISA. Sur les 171 échantillons, 10 ont été positifs en ELISA.

Toxinotypie de souches de Clostridium perfringens (comparaisons entre le test de létalité sur souris, le test ELISA et les sondes génétiques)

24 souches isolées en culture ont été caractérisées par le test ELISA pour la production de toxines  $\alpha$  et  $\epsilon$ , et les résultats obtenus ont été comparés avec ceux fournis par les sondes génétiques et par le test de létalité sur souris. Le Tableau VII présente les résultats obtenus.

Tableau VII.

	Toxinotypie sur souris					
		A	В	D	NL	
ELISA alpha	+	18	1	1	4	
Sonde alpha	+	18	1	1	4	
ELISA epsilon	+	0	1	1	0	
Sonde epsilon	-	0	1	1	0	

NL: souche non létale

# Tests réalisés à partir d'échantillons prélevés sur un veau avec des anses intestinales ligaturées

Les échantillons prélevés au niveau de la lumière intestinale d'un veau avec des anses ligaturées ont été analysés en ELISA. Le Tableau VIII reprend la liste des souches inoculées au sein des 13 anses isolées. Les résultats obtenus en ELISA à partir du contenu intestinal figurent également sur ce tableau. Les prélèvements ont été effectués 12 heures après l'inoculation expérimentale.

Tableau VIII.

		Alpha	Bêta	Epsilon	CN2E12	DY2F5
0	milieu culture	-	-	-	+	-
1	C. sordelli isolé du terram	-	-	-	-	-
2	C. bifermentans	-	-	-	-	-
3	C. sordellı toxinogène	-	-	-	+	-
4	C. perfringens 45017C6	+	-	-	+	-
5	C. perfringens 45017MF3	+	-	-	+	+
6	C. perfringens 45017CO2	-	-	-	+	-
7	C. perfringens 45017CO4	+	-	-	+	-
8	C. perf. 45017 C6 + MF3 + CO2 + CO4	+	-	-	+	+
9	C. sord. isolé du terrain + C. perf. 45017C6	+	-	-	+	-
10	C. sord. isolé du terrain + C. perf. 45017MF3	3 +	_	-	+	-
11	C. sord. toxinogène + C. perf. 45017C6	+	-	-	+	-
12	milieu de culture	-	-	-	+	_

# Tests réalisés sur des échantillons biologiques

Des échantillons tels que du contenu intestinal, du liquide péricardique ou péritonéal, du foie ont été prélevés sur des cadavres d'animaux morts dans des conditions qui laissaient suspecter une participation de *Clostridium perfringens*. Ces échantillons ont été testés en ELISA pour la présence des toxines  $\alpha$  et  $\epsilon$  ainsi qu'avec le test ELISA de détection de *Clostridium perfringens* (CN2E12). Les échantillons ont été mis en culture et quelques colonies ont été testées par hybridation avec les sondes  $\alpha$  et  $\epsilon$ . Seuls les échantillons donnant une réaction positive avec la sonde  $\alpha$  ont été retenus pour la comparaison avec les résultats des tests ELISA (Tableau IX).

Tableau IX.

<u> </u>	ELISA alplha			ELI	SA CN2	E12
	+	+/-	-	+	+/-	-
sonde α+	6	4	12	17	_ 1	4

Les souches de *Clostridium perfringens* isolées de 22 échantillons retenus pour cette étude ont été testées par hybridation avec la sonde ε. Aucune de ces souches n'a donné de signal positif avec cette sonde (Tableau X), alors que l'ELISA a donné un signal positif avec un échantillon et un signal douteux avec deux autres échantillons.

Tableau X.

	ELISA epsilon				
	+	+/-	-		
sonde ε-	1	2	19		

# Discussion

# Production de toxines`

La production des toxines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\epsilon$  s'étant révélée particulièrement médiocre en flacon, les cultures ont été réalisées en fermenteur. Dans ces conditions, la production des 3 toxines était très bonne comme indiqué dans le Tableau II. La toxine  $\alpha$  d'origine commerciale a été utilisée à plusieurs reprises au cours de ce travail.

# Purification des toxines

# Toxine alpla

# Toxine commerciale

L'analyse en SDS PAGE avec coloration à l'argent de la préparation commerciale (100 µg/ml de protéines) a montré la présence d'une bande majoritaire d'un poids moléculaire d'environ 43 KD. D'autres bandes d'un poids moléculaire supérieur ou inférieur étaient également visibles. La préparation commerciale n'est donc pas d'une pureté suffisante.

# Filtration et chromatographie

L'analyse en SDS PAGE avec coloration au bleu de coomasie d'une préparation de toxine  $\alpha$  purifiée par filtration tangentielle et chromatographie échangeuse d'ions a montré que la bande majoritaire est dédoublée (40 KD et 41.5 KD). Ici aussi, d'autres bandes d'un poids moléculaire supérieur ou inférieur à celui de la toxine  $\alpha$  étaient également visibles, ce qui indique bien que cette méthode de purification de la toxine n'est pas adéquate.

# Immunoaffinité

L'analyse en SDS PAGE avec coloration à l'argent a montré la présence d'une seule bande d'un poids moléculaire à 42 KD. L'anticorps monoclonal DY2F5 est donc un réactif adéquat pour purifier de façon aisée la toxine  $\alpha$  à partir de surnageant de culture de *Clostridium perfringens* type A.

# Toxine bêta

# Précipitation et chromatographie

Une analyse en SDS PAGE avec coloration à l'argent de la préparation de toxine  $\beta$  purifiée par précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie échangeuse d'ions a montré que la toxine  $\beta$  était présente (poids mmoléculaire 35 KD) mais qu'elle était contaminée par de nombreuses autres protéines. Cette méthode est donc inadéquate pour purifier de façon valable la toxine  $\beta$ .

# Précipitation et immunoaffinité

La préparation précédente a été adsorbée par un sérum polyclonal spécifique de la souche A, ce qui a eu pour effet de la débarasser d'un grand nombre de contaminants. L'analyse en SDS PAGE a montré que la toxine  $\beta$  était beaucoup plus pure que dans la préparation précédente si l'on excepte la présence d'un contaminant important d'un poids moléculaire d'approximativement 65 KD. Dans l'attente de la disponibilité d'un anticorps monoclonal, cette technique est donc retenue pour assurer la purification de la toxine  $\beta$ 

# Toxine epsilon

# Précipitation et chromatographie

Les résultats obtenus en SDS PAGE avec coloration à l'argent de la préparation de toxine ε purifiée par précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie échangeuse d'ions ont montré que d'emblée la pureté de la toxine était très bonne. La bande majoritaire correspondant à la protoxine ε avait un poids moléculaire de 33 KD. Malgré les bons résultats enregistrés avec cette méthode, une procédure de purification de la toxine par

immunoaffinité a été développée dans le but de disposer d'une méthode plus rapide et plus facile à mettre en œuvre.

# Immunoaffinité

La toxine ε a été purifiée par immunoaffinité sur l'anticorps monoclonal CK6G4. L'analyse de la préparation en SDS PAGE avec coloration à l'argent a démontré que la toxine était parfaitement purifiée.

# Production des anticorps monoclonaux

# Toxine alpha

L'anticorps DY2F5 neutralise l'effet létal de la toxine  $\alpha$  sur souris. Cet anticorps reconnaît également la toxine  $\alpha$  en western blotting et il neutralise son effet lécithinasique *in vitro*. DY2F5 est le seul anticorps spécifique de la toxine  $\alpha$  qui soit capable d'assurer son immunocapture sur microplaque. Les 3 autres reconnaissent bien la toxine lorsque cette dernière est directement fixée sur la microplaque (ELISA indirect), mais ils sont incapables de la capturer lorsqu'ils sont eux-mêmes fixés sur la microplaque (ELISA sandwich). Assez curieusement, l'anticorps DY2F5 ne reconnait pas toutes les souches productrices de la toxine  $\alpha$ .

#### Toxine bêta

Les signaux obtenus avec 3 anticorps monoclonaux spécifiques de la toxine  $\beta$  sont très faibles, ce qui peut sans doute être mis en relation avec la classe de ces anticorps (3 IgM). Ils n'ont pas été testés en neutralisation de l'effet létal, ni en western blotting.

# Toxine epsilon

L'anticorps monoclonal CK6G4 fonctionne en immunocapture (ELISA sandwich), et en ELISA de type indirect (fixation de la toxine sur la microplaque). Cet anticorps ne reconnait pas la toxine en western blotting, et il ne neutralise pas son effet létal sur souris. Cet anticorps est utilisé pour purifier la toxine  $\varepsilon$  par immunoaffinité.

# **Tests ELISA**

# Toxinotypie de souches de Clostridium perfringens (comparaisons entre le test ELISA et les sondes génétiques)

Les résultats obtenus en ELISA en matière de détection des toxines  $\alpha$  et  $\epsilon$  dans des surnageants de culture de 171 souches de *Clostridium perfringens* isolées d'échantillons biologiques ont été comparés à ceux obtenus par typage moléculaire de ces mêmes souches à l'aide de 2 sondes génétiques spécifiques des gènes des toxines  $\alpha$  et  $\epsilon$ .

En comparaison des résultats obtenus avec la sonde  $\alpha$ , la sensibilité du test ELISA spécifique de la toxine  $\alpha$  est de 91,8% si on considère les douteux comme négatifs, et de 97,1% si on les considère comme positifs. Il n'est pas possible de calculer la spécificité du test, puisque dans cet essai, seuls des échantillons positifs pour la sonde ont été retenus. Les 5

échantillons négatifs pour la toxine  $\alpha$  sont bien des faux négatifs, puisque dans les mêmes conditions de culture, l'anticorps CN2E12 parvient bien à détecter la présence de la bactérie (Tableau IV). Pour une raison inconnue, il semble que ces 5 souches n'ont pas produit de toxine en culture ou qu'elles en ont produit à un niveau trop faible pour que la toxine soit détectable par le test ELISA. Il est à remarquer que parmi ces 5 souches, 2 sont du type D (Tableau VI), un type qui est connu pour être un faible producteur de toxine  $\alpha$ .

Sur les 9 souches qui ont donné un résultat douteux en ELISA de détection de la toxine  $\alpha$ , 8 ont produit un résultat positif avec l'anticorps CN2E12 et 1 un résultat négatif (Tableau IV). En aucun cas, une souche positive pour la toxine  $\alpha$  n'a donné de résultat négatif avec l'anticorps CN2E12. Sur les 9 souches douteuses au test ELISA  $\alpha$ , 3 étaient de type D (Tableau VI).

Si on compare les résultats fournis par l'anticorps CN2E12 avec ceux obtenus avec la sonde α, (Tableau IV), on obtient une sensibilité du test de 99,4%. Seul un échantillon a donné un résultat faussement négatif. Il s'est révélé, par après, que cet échantillon n'était pas pur (contamination par d'autres micro-organismes).

Le Tableau V démontre clairement que l'anticorps monoclonal DY2F5 ne reconnait qu'un nombre limité de souches bactériennes (17 sur les 136 souches trouvées positives avec le test ELISA de détection de la toxine α). Le séquençage des gènes provenant de souches DY2F5 positives et négatives est actuellement en cours de manière à déterminer à quel niveau de la toxine se situe d'épitope reconnu par le monoclonal. Il semble bien qu'au sein des souches DY2F5 négatives, une proline remplace la sérine en position 363 [8]).

En l'absence de sondes spécifiques du gène de la toxine  $\beta$ , il n'est pas possible de valider le test ELISA de détection de cette toxine. Les sérums polyclonaux utilisés pour produire ce test semblent toutefois manquer actuellement d'affinité et les signaux enregistrés restent faibles même lorsque des souches de référence sont utilisées. Le fait de disposer depuis peu de quantités importantes de toxine  $\beta$  pure devrait permettre de remédier à cette situation et d'améliorer la qualité générale du test.

Pour la toxine  $\varepsilon$  (Tableau VI), la sensibilité du test ELISA est de 100% et la spécificité de 99,3% si on classe l'échantillon douteux dans les positifs (sensibilité = 100%, spécificité = 100% si on classe l'échantillon douteux dans les négatifs).

# Toxinotypie de souches de Clostridium perfringens (comparaisons entre le test de létalité sur souris, le test ELISA et les sondes génétiques)

Sur les 24 souches testées (Tableau VII), les résultats obtenus avec les tests ELISA se sont révélés être parfaitement identiques à ceux obtenus avec les sondes génétiques. Quatre échantillons n'ont pas pu être typés sur souris (souches non létales). Ces 4 souches étaient du type A tel que confirmé par ELISA et par les sondes génétiques.

# Tests réalisés à partir d'échantillons prélevés sur un veau avec des anses intestinales ligaturées

On constate en analysant le Tableau VIII, que l'anticorps CN2E12 donne un signal positif avec le contenu des anses intestinales inoculées avec *Clostridium perfringens*. Les anses 0 et 12 sont également positives, ce qui indique que la simple inoculation de milieu de culture a suffi à favoriser le développement des souches de *Clostridium perfringens* 

présentes dans l'intestin du veau. Ce fait a pu être confirmé par culture. Assez curieusement, le contenu de l'anse numéro 3 a également donné un résultat positif avec l'anticorps CN2E12, alors que seul du *Clostridium bifermentans* y avait été inoculé. Par culture, il a été possible de démontrer que dans cette anse également une souche endogène de *Clostridium perfringens* avait eu l'occasion de se multiplier.

Le test ELISA de détection de la toxine a pu identifier la présence de la toxine dans toutes les anses où on pouvait s'attendre à l'y trouver, à l'exception des anses 0 et 12 (milieu de culture) et de l'anse 6 (souche 45017CO2 de *Clostridium perfringens*) Cette dernière souche était très faiblement hémolytique *in vitro* ce qui peut expliquer que le test ELISA ne l'ait pas détectée.

Les ELISA  $\alpha$  et  $\epsilon$  sont restés négatifs, ce qui correspond bien à ce que l'on pouvait attendre.

L'anticorps DY2F5 n'a détecté la toxine  $\alpha$  que dans deux anses. Il confirme ici ce que l'on sait de lui, c'est à dire qu'il ne reconnaît qu'un nombre limité de souches productrices de la toxine  $\alpha$ .

En résumé, on peut dire que cet essai a parfaitement démontré l'efficacité des tests ELISA à détecter les toxines létales majeures et un taux élevé de *Clostridium perfringens* au niveau du contenu de l'intestin.

# Tests réalisés sur des échantillons biologiques

Le Tableau IX montre clairement que la toxine α est très difficile à déceler dans des échantillons biologiques (10 échantillons positifs sur 22 en prenant en considération les douteux). La toxine α est en effet très sensible à l'action des enzymes protéolytiques, et elle est très vite dégradée dans les échantillons biologiques. Le monoclonal CN2E12 reconnaît pour sa part un antigène beaucoup plus résistant et les résultats présentés dans le Tableau IX montrent que ce test ELISA est beaucoup plus fiable pour détecter la présence de Clostridium perfringens dans les échantillons biologiques (18 positifs au test ELISA sur 22 échantillons positifs avec la sonde α). Les 4 échantillons négatifs ont tous donné un comptage inférieur à 3 millions de bactéries par millilitre, ce qui peut expliquer qu'ils n'aient pu être détectés par le test ELISA CN2E12. Pour le test ELISA de détection de la toxine ε, 19 échantillons sur 22 donnent des résultats concordants, 1 échantillon est positif au test ELISA et négatif au test d'hybridation avec la sonde, et deux autres échantillons donnent des résultats douteux en ELISA. Il se pourrait que les souches typées par hybridation avec la sonde ne soient pas représentatives de la population générale des clostridies de l'échantillon biologique. L'hybridation n'a en effet été réalisée que sur un nombre très restreint de souches.

# Conclusion

Les outils développés dans le cadre de ce travail permettent d'aborder de façon plus aisée et plus efficace que par le passé l'étude des pathologies dues à *Clostridium perfringens*. Ils permettront à l'avenir de ne plus devoir passer par le test de toxinotypie sur souris toujours très laborieux à effectuer et éthiquement condamnable. Le problème de la détection des toxines létales majeures directement au sein d'échantillons pathologiques semble devoir être abordé avec prudence. La toxine  $\alpha$  est en effet très rapidement dégradée et sa

détection directe sur le cadavre semble devoir passer par un test ELISA décentralisable à réaliser immédiatement au moment de l'autopsie.

L'ELISA faisant appel à l'anticorps monoclonal CN2E12 donne des résultats plus fiables en ce qui concerne la détection de *Clostridium perfringens* dans des échantillons biologiques. En ce qui concerne la toxine  $\beta$ , l'absence de sondes génétiques nous empêche provisoirement de tirer des conclusions quant à la validité de notre test. Quoi qu'il en soit, nous pensons que ce test devra encore évoluer. Les tests que nous avons développés pour la détection de la toxine  $\epsilon$  et pour la mise en évidence d'un niveau anormalement élevé de *Clostridium perfringens* sont au point et peuvent être utilisés en routine.

# Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier le Dr Marchal et son équipe de l'Institut Pasteur du Brabant pour l'aide apportée à la réalisation de ce travail.

Ce travail a été réalisé grâce au support financier de l'I.R.S.I.A. (Institut pour l'encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture).

# Références

- 1. Beh K.J., Buttery S.H. (1978). Reverse phase passive haemagglutination and single radial immunodiffusion to detect epsilon antigen of *Clostridium perfringens* type D. *Aus Vet J*; 54: 541-544.
- Bruce A. (1970). Diner purification and properties of Clostridium welchii phospholipase C. Bioch Bioph Acta; 198: 514-522.
- 3. Calmels D. Mise en évidence et titrage de la toxine alpha de *Clostidium perfringens* par diffusion radiale. Iffa Mérieux, Lyon, France.
- 4. Daube G. (1993). Typage moléculaire de *Clostridium perfringens*. Application à l'étude de l'entéroxémie bovine. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Vétérinaires, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Belgique.
- Kohler G., Milstein C. (1975). Continuous culture of fused cells secreting antibody of predifined specificity. *Nature London*; 256: 495-497.
- Nakane P.K., Kawaoi A. (1974). Peroxidase-labeled antibody, a new method of conjugation. J Hist Cyt: 22 (12): 1084-1091.
- 7. Odendaal M.W. (1987). Purification of the alpha toxin of *Clostridium perfringens* type A by ultrafiltration and gel chromatography. *Ond J Vet Res*; 54: 39-43.
- 8. Saint-Joanis B., Garnier T., Cole St.T. (1989). Gene cloning shows the alpha-toxin of *Clostridium perfringens* to contain both sphingomyelinase and lecithinase activities. *Mol Gen Genet*; 219: 453-460.
- 9. Sakurai J., Fujii Y. (1987). Purification and characterization of *Clostridium perfringens* beta toxin *Toxicon*; 25 (12): 1301-1310.
- 10. Worthington R.W., Mülders M.S.G., Van Rensburg J.J. (1973). *Clostridium perfringens* type D epsilon protoxin. Some chemical, immunological and biological properties of a highly purified protoxin. *Ond J Vet Res*; 40(4).

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales. Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 49-55.

5

# Le ribotypage est-il intéressant pour la recherche d'un marqueur épidémiologique dans les souches de *Bordetella bronchiseptica* ?

S. VANDEVENNE, J. MAINIL, A. KAECKENBEECK

Faculté de Médecine Vétérinaire, Bactériologie, Liège, Belgique.

Les bactéries du genre *Bordetella* sont responsables de pathologies respiratoires en médecine vétérinaire et en médecine humaine. Ce genre comprend deux espèces dont le pouvoir pathogène est limité à l'espèce humaine (*B. pertussis* et *B. parapertussis*) [6], une dont le pouvoir pathogène est limité au dindon (*B. avium*) et une dont le pouvoir pathogène s'étend à diverses espèces animales (*B. bronchiseptica*) [1]. Cette dernière espèce est un pathogène respiratoire du porc (en synergie avec *Pasteurella multocida* type D dans la rhinite atrophique) et du chien (associée à d'autres agents, dans la toux des chenils). Elle est aussi responsable de troubles respiratoires et septicémiques dans diverses autres espèces animmales (lapin, cobaye...). *B. bronchiseptica* est également connue depuis très longtemps comme pathogène respiratoire chez l'homme, mais son rôle était considéré comme très mineur jusqu'à récemment. En effet, depuis quelques années, la fréquence d'isolement de *B. bronchiseptica* à partir d'êtres humains dont l'état général est médiocre est en hausse, ainsi qu'à partir d'enfants [4].

Au vu des nombreuses espèces animales infectées par *Bordetella bronchiseptica*, il était intéresssant de comparer génotypiquement diverses souches isolées d'espèces animales différentes, afin de rechercher un marqueur épidémiologique permettant de suivre les souches en fonction de l'espèce animale d'origine et peut-être aussi des individus.

La première approche est le ribotypage [3] ou hybridation ADN-ADN avec des sondes radioactives dérivant des gènes codant pour l'ARNr 23S.

La seconde approche est une comparaison des patterns de restriction du produit d'amplification du gène de l'ARNr 16S.

# Matériel et méthodes

#### Souches

17 souches de *Bordetella bronchiseptica* ont été étudiées : 9 souches humaines (isolées de 3 sujets à des moments différents) : R1, R2, R3, R4, B1, B2, B3, M1, M2; 3 souches de lapins (isolées de 3 sujets différents) : LR1, LR2, 52125; 2 souches canines (isolées de 2 sujets différents) : 45075, 55110; 2 souches équines (isolées de 2 sujets différents) : CV1, CV2 et 1 souche porcine : B6L. Deux souches du genre *Alcaligenes*, un genre proche de *Bordetella* ont aussi été étudiées pour comparaison : 6080T (*Alcaligenes faecalis*) et 6075T (*Alcaligenes piechaudii*).

# Le ribotypage

#### Extraction de l'ADN total

La technique d'extraction de l'ADN total est inspirée de la méthode de Popoff [7], qui repose sur une extraction par le lysosyme, le Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), et la pronase

# Electrophorèse

L'ADN est restreint par un des enzymes de restriction suivant : *Bam* HI, *Bgl* II, *Eco* RI, *Hind* III, *Pst* I ou *Xho* I et est ensuite soumis à une électrophorèse d'une nuit à 1,3 Volts/cm dans un gel d'agarose 0,6%. Les bandes sont ensuite révélées par transillumination aux ultra-violets (365 nm) après coloration au bromure d'éthidium.

# Transfert de l'ADN

Après dénaturation à l'HC1 0,2M et au NaOH 0,5M, l'ADN est transféré sur une membrane de nylon (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham) selon la technique du "Vacuum Blot" (Bio-Rad). Les membranes sont ensuite imprégnées de NaOH 0,4M afin de fixer les fragments d'ADN.

# Hybridation ADN-ADN

#### Sonde

La sonde 23S (1768pb), correspondant au gène codant pour l'ARNr 23S et une partie de l'ARNr 5S, est extraite du plasmide vecteur à l'aide des enzymes adéquats : *Kpn* I et *Sma* I. L'ADN est ensuite récupéré selon la technique "Gene-Clean" (BIO 101). Le marquage est effectué par la technique du random-priming [2].

# Hybridations et lavages

Les membranes sont préhybridées pendant 1 heure à 65°C dans une solution 3XSSC, 10X Denhardts, 0,1% SDS et 1% d'ADN de sperme de hareng, sous agitation modérée. Ensuite, la sonde dénaturée est ajoutée au milieu de préhybridation pour atteindre une activité de 2 X 10<sup>6</sup> cpm. L'hybridation se déroule une nuit à 65°C sous agitation modérée. Après hybridation, les membranes subissent deux lavages de 20 minutes à 65°C dans une solution de 3XSSC, 0,1% SDS [8].

# Autoradiographie

Les filtres lavés sont emballés dans un sachet plastique scellé hermétiquement et l'autoradiographie se déroule en cassette avec écrans renforçateurs à -80°C pendant 3 à 7 jours en fonction du signal.

# Pattern de restriction du produit d'amplification

# Amplification en chaîne par polymérase

Les primers ont été synthétisés selon la séquence publiée par Gurther *et al.* [5]. Aux tubes contenant 50µl d'ADN sont ajoutés 50 µl d'un mélange concentré deux fois, de telle sorte que la réaction d'amplification se déroule en solution 10mM Tris HC1 ph 8,5, 50mM KC1, 1,5mM MgC1<sub>2</sub>, 0,01% gélatine, 0,2mM d'NTP (Pharmacia), 0,2µM de chaque primer spécifique, 20 U/ml Amplitaq DNA Polymerase. La réaction se déroule sur un DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus). Les cycles sont les suivants : prédénaturation pendant 5 minutes à 95°C, suivie de 30 cycles comprenat 1 minute à 95°C, 1 minute à 50°C et 2,5 minutes à 70°C.

# Analyse du produit d'amplification

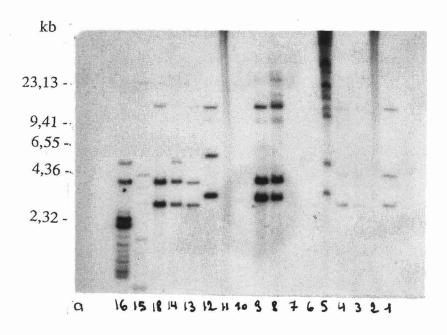
Après digestion par un des enzymes de restriction suivants, *Eco* RI, *Hinf* I, *Taq* I, *Xho* I, *Hind* I ou *Hpa* II, les échantillons sont chargés sur gel d'agarose 3% et soumis à une électrophorèse en 40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, sous un voltage constant de 3 Volts/cm durant 1 h 30. Après coloration au bromure d'éthidium, le produt d'amplification est visualisé par transillumination aux ultra-violets (365 nm).

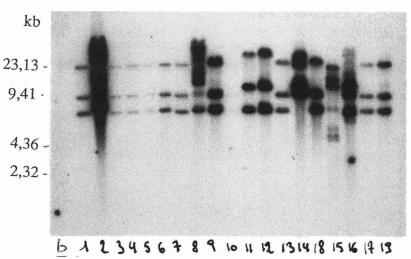
# Résultats et discussion

# Le rybotipage (Figures 1 et 2)

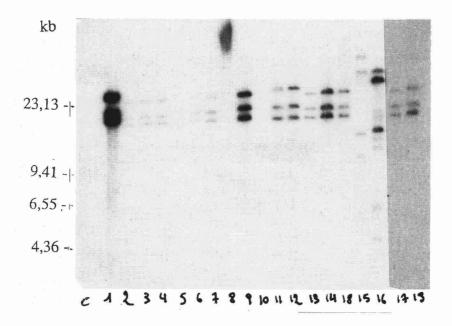
Des profils d'hybridation totalement différents ont été observés entre les souches de *Bordetella bronchiseptica* et d'*Alcaligenes*. Pour chaque enzyme de restriction utilisé, au moins une bande de même mobilité a été observée chaque fois pour toutes les souches de *B. bronchiseptica* étudiées, et nous permet ainsi de faire un diagnostic du genre et même d'espèce bactériens en comparaison avec les caractères phénotypiques.

L'hybridation après digestion par *Eco* RI montre un polymorphisme inter et intra espèce animale. Sur la Figure 1a, on remarque deux bandes communes entre les souches humaines B et M et une bande commune entre la souche humaine B et les deux souches





Figures 1 a, b et c: Ribotypes après digestion par Eco RI (a), Bgl II (b) et Bam HI (c).

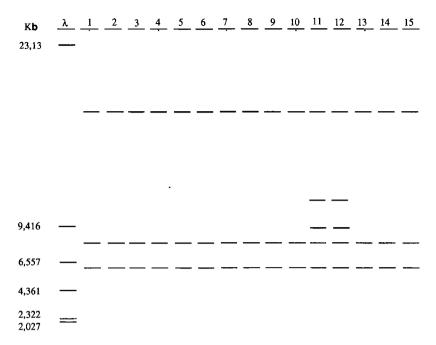


canines. Les deux souches canines ont un profil d'hybridation différent. Les profils de restriction après digestion par *Xho* I permettent également de différencier certaines souches d'une même espèce animale d'origine (Figure. 2). Après digestion par *Bam* HI (Figure 1c), les profils de restriction des souches humaines M sont différents de ceux des soouches humaines B et R et des profils des souches canines, lapines, équines et porcines. Les résultats obtenus après digestion par *Bgl* II mmontrent également un polymorphisme inter et intra espèce animales (Figure 1b).

Par contre, les profils de restriction sont identiques pour des souches isolées du même sujet à des moments différents.

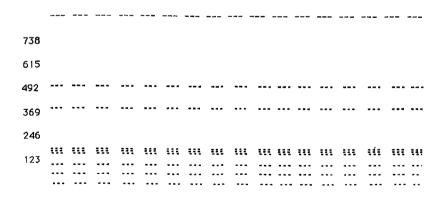
Les résultats obtenus après restriction avec *Pst* I n'ont pu être interprétés suite à une restriction partielle (activité enzymatique réduite ?)

Les profils de restriction après digestion par *Hind* III étaient tous identiques, une seule bande a été révélée. Les fragments d'ADN restreints sont vraisemblablement de poids moléculaire trop élevés et devraient être séparés par une électrophorèse en champ pulsé.



**Figure 2.** Ribotype après digestion par *Xho* I. Souches: *Bordetella bronchiseptica* humaines R1(1), R2(2), R3(3), R4(4), B1(8), B2(9), B3(10), M1(11), M2(12); lapines LR1(5), LR2(6), 52125(7); canines 45075(13), 55110(14), porcines B6L(18).

# Hpa II



**Figure 3.** Résolution sur gel d'agarose 2% du produit d'amplification du gène 16S après digestion par *Hpa* II. On obtient 8 fragments de 498 pb, 159 pb, 130 pb, 118 pb, 81 ;b, et 11 pb. Les souches testées sont de gauche à droite : R1 à 4 (humain), 3 souches de lapins, B1 à 3 (humain), M1 et 2 (humain), 2 souches canines et 2 souches équines.

# Pattern de restriction du produit d'amplification (Figure 3)

Aucun polymorphisme n'a été observé avec les différents enzymes utilisés. Par exemple, lors de la digestion par *Hpa* II, on retrouve les 8 fragments attendus (en fonction de la carte de restriction du gène), mais il n'y a aucun polymorphisme entre des souches de même espèce, ou entre des souches d'espèces animales différentes.

En fonction de ces résultats sur quelques souches de *Bordetella bronchiseptica*, nous pouvons donc conclure à un polymorphisme non seulement entre souches d'espèces animales différentes, mais aussi entre différentes souches d'une même espèce animale. Bien sûr, un plus grand nombre de souches devrait être étudié avant de pouvoir envisager des applications épidémiologiques. Il serait alors possible d'utiliser le ribotypage pour rechercher une source d'infection humaine ou pour tracer les souches dans une épidémie, dans et entre des exploitations porcines ou des chenils par exemple.

Par contre, les patterns de restriction du gène 16S, après amplification en chaîne par polymérase et digestion par différentes enzymes de restriction, n'apportent pas pour le moment d'information supplémentaire.

# Références

- 1. Bisping W., Amstberg. (1988). Farbatlas zur diagnose bakterieller infektionserreger der Tiere, Hambourg, Germany, Ed. Parey: 153-156.
- 2. Feinberg A.P., Vogelstein B. (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to specific activity. *Anal Biochem*; 132:6-13.
- 3. Grimont F., Grimont P.A.D. (1986). Ribosomial ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonotools. *Ann Inst Pasteur/Microbio*; 137B: 165-175.
- 4. Guiso N. (1992). Comm. Personn.
- Gurtler V., Vicki A., Mayoll W., Mayoll B. (1991). Classification of medically important clostridia using restriction endonuclease site differences of P.C.R. amplified 16S rDNA. J Gen Microbiol; 137: 2673-26.
- 6. Pitman M. (1984). In: Krieg N.R. et al. eds Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.. Williams and Wilkins, Baltimore, London; 1: 388-393.
- 7. Popoff M. (1991). Cours de Bactériologie, Taxonomie et Epidémiologie moléculaire. Institut Pasteur, Paris, France.
- 8. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spr ing Harbor Laboratory Press, New-York, USA.

Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales. Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris © 1994, pp. 57-71.

6

# Utilisation de la méthode d'amplification génétique (PCR) pour la détermination des types toxiques de *Clostridium perfringens* et la recherche de son entérotoxine

B. KADRA\*, J.P. GUILLOU\*\*, A. CHIKHI\*\*\*

- \* Service Vaccins Bactériens, Institut Pasteur d'Algérie, Alger, Algérie.
- \*\* Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires, Maisons Alfort, France.
- \*\*\* Institut de Biologie, USTHB, Bab Ezzouar, Alger, Algérie.

# Résumé

Soixante et une souches de Clostridium perfringens ont été identifiées par les techniques bactériologiques classiques, leur type toxinique a été déterminé par le test de toxinotypie sur souris. La production de l'entérotoxine par certaines souches a été mise en évidence par le test d'agglutination au latex et par le test de cytotoxicité sur cultures cellulaires VERO.

Toutes ces souches ont été étudiées par la technique PCR (Polymerase Chain Reaction) en utilisant les cibles nucléigues suivantes :

- gène de la toxine alpha de C. perfringens,
- gène de toxine epsilon de C. perfringens,
- gène de l'entérotoxine de C. perfringens.

Nous avons procédé à des amplifications simples (amplifiant un seul gène), duplex ou tri-

plex (amplifiant plusieurs gènes dans le même tube), suivant que les bactéries exprimaient 1, 2 ou les 3 toxines.

Les produits sont révélés au terme de l'amplification par électrophorèse en gel d'agarose, par restriction enzymatique ou à l'aide de sondes oligonucléotidiques spécifiques marquées à la DIGOXYGENINE.

La technique P.C.R. s'est montrée beaucoup plus performante que les techniques d'identification et de typage utilisées habituellement (toxinotypie sur animal, tests immunologiques et de cytotoxicité sur cultures cellulaires).

Dès que le gène de la toxine bêta sera séquencé, nous pourrons envisager la mise au point d'un kit diagnostique utilisable aussi bien en santé animale qu'en hygiène alimentaire; il permettra l'identification simultanée de Clostridium perfringens types A, B, C et D, et la recherche de l'entérotoxine.

En Algérie, les entérotoxémies peuvent affecter et engendrer de lourdes pertes si des mesures de prévention et de prophylaxie ne sont pas appliquées de manière rigoureuse [6]. En effet, il s'agit là de toxi-infections à point de départ digestif, d'allure enzootique, communes à de nombreuses espèces animales, atteignant plus particulièrement les ovins [7,10].

Les germes responsables sont des anaérobies sporulés appartenant au genre *Clostri dium*, particulièrement *C. perfringens*, et à un degré moindre *C. sordelli* [1,2]. La détermination de la bactérie et la connaissance du type toxinique impliqué dans une entérotoxémie sont essentielles pour la mise en place d'une prophylaxie efficace.

L'identification de la toxine est effectuée par séroneutralisation sur animaux de laboratoire (souris ou cobayes) à l'aide d'antisérums spécifiques. Cette toxinotypie nécessite un approvisionnement permanent en animaux de laboratoire et l'utilisation de sérums diagnostiques monovalents de plus en plus difficiles à trouver et extrêmement coûteux.

Des techniques de substitution comme l'hémagglutination passive ou la technique ELISA ont été proposées. Elles nécessitent, là encore, des sérums diagnostiques quasiment introuvables, ce qui peut constituer un handicap pour leur développement. Il convient donc de trouver une méthode de remplacement pour la mise en évidence et le typage de *C. perfringens*.

Dans cette optique, il est intéressant d'évaluer les possibilités de la technique d'amplification génétique par P.C.R. comme outil de diagnostic.

En collaboration avec le LCRV (Laboratoire Central de Recherche Vétérinaire de Maisons-Alfort, Paris, France) et l'IPP (Institut Pasteur de Paris, France), une trousse de diagnostic pour le typage de *C. perfringens* est en cours de réalisation.

Les séquences codant pour les gènes des toxines alpha [9,12,13], epsilon [5] et entérotoxine [14] ont été publiées et nous ont permis de choisir des amorces spécifiques.

#### Intérêt et but du travail

Le but de ce travail est l'évaluation de la technique P.C.R. pour mettre en évidence et typer *C. perfringens* à l'aide de séquences de gènes de toxines déjà connues.

En parallèle, nous effectuerons les tests classiques d'identification et de toxinotypie. Pour les souches produisant de l'entérotoxine, nous effectuerons le test au latex et le test de cytotoxicité sur cultures cellulaires.

# Matériel et méthode

#### Identification des souches

Pour l'identification de *C. perfringens*, nous avons utilisé les galeries classiques comme décrit par Sebald [11], ainsi que la galerie Api anaérobie.

# **Toxinotypie**

C'est une méthode immunologique d'identification permettant la détermination du type toxinique *C. perfringens*.

Elle consiste en la neutralisation des toxines produites par des antisérums correspondants. Ce test se fait sur souris (Tableau I).

**Tableau I.** Principales toxines de *C. perfringens* et toxinotypie

Types	Principales toxines				Neutralisation par sérum anti-					
	α	β	ε	ι		A	В	C	D	E
A	+				-	+	+	+	+	+
В	+	+	+			-	+	-	-	-
C	+	+				-	+	+	-	-
D	+		+			-	+	-	+	-
E	+			+		-	-	-	-	+

<sup>(+)</sup> souris vivante

Remarque . il est bon de signaler qu'il existe également un autre schéma de toxinotypie effectué sur cobayes et impliquant des réactions de dermonécrose [12].

# Recherche de l'entérotoxine de C. perfringens

Certaines souches de *C. perfringens* impliquées dans les intoxications alimentaires produisent de l'entérotoxine. Les deux tests les plus utilisés actuellement pour la mise en évidence de cette entérotoxine sont le test au latex [3] et le test de cytotoxicité sur cultures cellulaires [8].

# Souches bactériennes

Les souches proviennent de l'IPA (Institut Pasteur, Alger, Algérie) : 36 souches, l'IPP : 17 souches et du LCRV : 8 souches.

<sup>(-)</sup> souris morte

# Amorces nucléotidiques

Les amorces utilisées dans la réaction P.C.R. ont été sélectionnés sur les gènes codant pour la toxine alpha (Figure 1), epsilon (Figure 2) et entérotoxine (Figure 3). Ces amorces synthétiques sont constituées en général de 18 à 30 nucléotides et ont une composition en base guanine et cytosine variant de 45% à 55% afin d'optimiser au maximum l'hybridation sur la séquence d'ADN cible. Les choix des amorces sont effectués à l'aide des logiciels "PC gène" et "OLIGO".

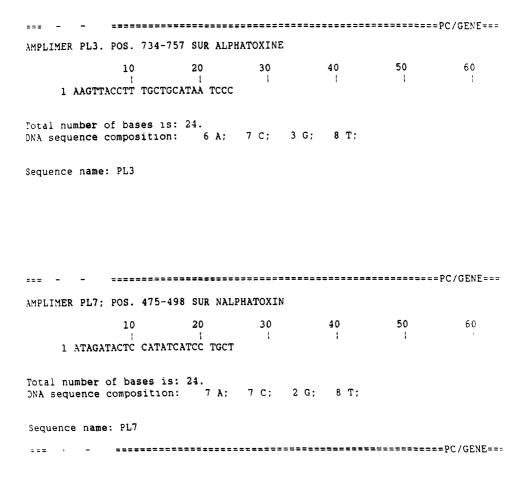


Figure 1 / Amorces PL<sub>3</sub> / PL<sub>7</sub> du gène codant pour l'alpha-toxine.

```
50
                                              60
          10
                 20
                         30
                                40
                  - 1
    1 CTACTACTCA TACTGTGGGA ACTTCG
Total number of bases is: 26.
DNA sequence composition: 6 A; 7 C; 5 G; 8 T; 0 OTHER;
Sequence name: EPSILON443
         10
                 20
                        30
                               40
                                       50
                                               60
                  1
                         1
                                       - 1
                                               - (
    1 GGAGTCTTTC TATTAAGGCA CCAGGA
Total number of bases is: 26.
DNA sequence composition: 7 A; 5 C; 7 G; 7 T; 0 OTHER;
Sequence name: EPSILON953
         SONDE INTERNE GENE EPSILON DE C. PERFRINGENS POS.: 677
          10
                 20
                        30
                                       50
                                              60
                                - 1
    1 TAGTAGGACA AGTAAGTGGA AGTG
Total number of bases is: 24.
DNA sequence composition: 9 A; 1 C; 9 G; 5 T; 0 OTHER;
Sequence name: EPSILON677
```

Figure 2. Amorces et sonde du gène codant pour l'epsilon-toxine.

```
AMPLIMER SENS DE L'ENTEROTOXINE DE C. PERFRINGENS POS.418 26-BP
             10
                      20
                                30
                                         40
                                                  50
                                                           60
                                - 1
     1 CAAGCATCTG TAGAATATGG ATTTGG
Total number of bases is: 26.
DNA sequence composition: 8 A;
                              3 C: 7 G:
                                          8 T: 0 OTHER:
Sequence name: ENTERO418
           AMPLIMER ANTISENS DE L'ENTEROTOXINE DE C. PERFRINGENS POS. 808 24-BP
                                                           60
                                30
                                         40
             10
                      20
    1 GTCCAAGGGT ATGAGTTAGA AGAACG
Total number of bases is: 26.
                              3 C; 9 G; 5 T; 0 OTHER;
DNA sequence composition: 9 A;
Sequence name: ENTERO808
AMPLIMER SENS DE L'ENTEROTOXINE C. PERFRINGENS POS.607 26-BP
             10
                      20
                                30
                                                  50
                                                           60
                                         1
                                                   - [
     1 GGAATATGGC TTAGTAAAAC ATCTGC
Total number of bases is: 26.
DNA sequence composition: 9 A;
                              4 C; 6 G; 7 T; 0 OTHER;
Sequence name: ENTERO607
```

Figure 3 : Amorces et sonde du gène codant pour l'entérotoxine.

# Conditions de la réaction d'amplification

# Simple amplification (gène alpha)

Nous avons dans un premier temps amplifié un fragment de 283 bp, correspondant au gène de l'alphatoxine qui est un marqueur d'espèce. Les réactions d'amplification ont été effectuées à l'aide du bain sec programmable : PCT-100 (M.J. Research Inc.). Dans chaque tube, on prépare la solution d'hybridation à laquelle on ajoute 5µl de la dilution Taq Polymérase (2U) (Tableau II).

Tableau II. Solution d'hybridation

Nombre de réactions	1	2	3	N=	C.T.	Q
H <sub>2</sub> O bidist. stérıle μl	14	28	42	14N=		
Tampon x 10	10	20	30	10N=		
DNTP dilués 1,25mM de chaque (II.2)	16	32	48	16N=	200μΜ	20 nmoles
Amplimer n° 1 (20μM)	5	10	15	5N=	1μΜ	100 pmoles
Amplimer n° 2 (20μM)	5	10	15	5N=	$1 \mu M$	100 pmoles

# Amplification Duplex et Triplex

Nous avons procédé à l'amplification simultanée de 2 gènes (alphatoxine et entérotoxine) et de 3 gènes (alphatoxine, entérotoxine et epsilon toxine). Les conditions des réactions sont similaires à la simple amplification. La seule variable est la quantité d'amorces à ajouter. Elle est de 3 µl de chaque amorce pour la duplex, et de 2 µl pour la triplex. Trente cycles thermiques (fixation des amorces à 50°C/1mn - extension à 72°C/1mn - dénaturation à 95°C/1mn) ont été effectués avant une extension terminale à 72°C/10mn.

# Détection des produits d'amplification

Les produits sont révélés, au terme de l'amplification, par électrophorèse en gel d'agarose et à l'aide de sondes oligonucléotidiques spécifiques marquées à la digoxygénine.

# Résultats

# Identification

Nous avons constaté que les deux types de galeries (classique et Api anaérobie) permettent une identification précise de l'espèce *C. perfringens*.

# **Toxinotypie**

La toxinotypie des souches testées de *C. perfringens* nous a donné les résultats exprimés dans le Tableau III.

# Recherche sur l'entérotoxine de C. perfringens

Après avoir préalablement cultivé les souches de *C. perfringens* sur milieu de sporulation, nous avons procédé au test au latex et au test de cytotoxicité sur culture cellulaire. Quatre souches ont agglutiné les particules de latex, ce qui implique qu'elles sont productrices d'entérotoxine. Ces mêmes souches se sont révélées cytotoxiques sur culture cellulaire (Tableau IV).

Tableau IV.

Identification de la souche	Origine	Entérotoxine				
de la souche		Test au latex	Test de cytotoxicité sur culture cellulaire			
CPNCIBE	IPP	+	+			
R3	IPP	+	+			
CP76	IPP	+	+			
64	LCRV	+	+			

# Amplification génétique par P.C.R.

# Simple amplification

Nous avons procédé dans un premier temps à des amplifications simples (amplifiant un seul gène) avec les couples d'amorces PL<sub>3</sub>/PL<sub>7</sub> (alpha-toxine), P443/P953 (epsilon-toxine) et P418/P808 (entérotoxine). Ces couples d'amorces amplifient respectivement des régions de 283, 510 et 426 paires de bases, conformément aux prévisions de l'analyse informatique.

# Amplification Duplex et Triplex

Selon que les bactéries exprimaient une, deux, ou trois toxines, nous avons effectué des amplifications duplex et triplex, c'est-à-dire que dans une même réaction, nous avons amplifié deux ou trois gènes dans le même tube.

Pour les souches R3 et 64, nous avons amplifié les gènes de l'alpha-toxine et de l'entérotoxine (Figure 4).

Une amplification triplex a été réalisée avec la souche CP76, où nous avons amplifié les gènes le d'alpha-toxine, de l'entérotoxine et de l'epsilon-toxine (Figure 5).

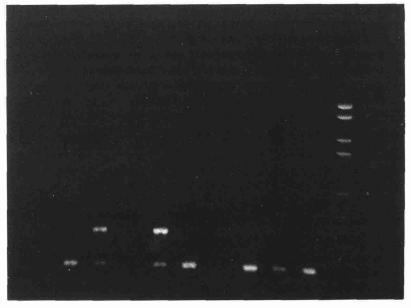
# Spécificité des produits amplifiés

Bien que les bandes obtenues soient de poids moléculaire attendu, la spécificité de la réaction d'amplification a été confirmée par hybridation moléculaire à l'aide d'une sonde interne marquée à la digoxygénine.

Tableau III

	IPA/IPP/LCVR		Α	В	C	D	I
la souche	- II AVII I I LC V K		_ ^_				
4311	IPA		+				
431R	IPA		+				
CPDE	IPA					+	
CPDA	IPA					+	
442	IPA		+				
CWC	IPA				+		
CP3	IPA		+				
CWD	IPA		•			+	
CP68/83	IPA		+				
CP33/53	IPA		+				
CP64/67	IPA					+	
CP35/53	IPA					+	
CP58/65	IPA					т	
			+	m.t	n.t		
380	IPA		nt	nt	nt	nt	1
D137	IPA		+				
4461	IPA		+				
4891	IPA		nt	nt	nt	nt	I
434	lPA		nt	nt	nt	nt	1
439	IPA		nt	nt	nt	nt	1
470	IPA		+				
8	IPA		+				
11 <b>F</b>	IPA		+				
D286	IPA		+				
5	IPA				+		
61	IPA					+	
CPC91	IPA				+		
CP39/91	IPA					+	
CP12	IPA		+				
CP27	IPA					+	
CP45/90	IPA		+				
CWA35	IPA		+				
36/91	IPA		+				
	IPA IPA						
CP198			+				
249 CD40	IPA						-
CP49	IPA						-
CP2	IPA		+				
9	LCVR		+				
10	LCVR		+				
10F	LCVR		+				
11	LCVR		+				
12	LCVR					+	
16	LCVR		+				
19	LCVR		+				
64	LCVR		+				
128	IPP		+				
CP42	IPP		+				
CP45	IPP		+				
CP41	IPP		+				
CP40	IPP		+				
CP46	IPP		+				
CPNCIBE	IPP		,				-
R3	IPP		nt	nt	nt	nt	1
CAPTCC13124	IPP		л Т	111	111	iit.	,
CP3922	IPP		٠				
			+				
CPG23	IPP		+				
CPD250	IPP					+	
CPD75	IPP					+	
CPD76	IPP					+	
CP33 89	IPP		+				
CP34.89	IPP		+				
CP35.89	IPP		+				
	Total						
Types toxiques Nombre		A 38	B 0	C 3	D 14	E 1	1

# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



**Figure 4.** Amplification duplex avec les amorces PL<sub>3</sub>/PL<sub>7</sub> (alpha-toxine) et P418/P808 (entérotoxine).

Souches de C. perfringens testées : 1 : Cp249; 2 :  $R_3$ ; 4 : Cp64; 5 : Cp39/91; 7 : Cp5; 8 : Cp431; 9 : Cp6

Souches de C. sordelli testées: 3: Cs27; 6: Cs26

10 : Marqueur de taille moléculaire (ADN de phage lambda)

# Southern Blot

L'hybridation moléculaire à l'aide de sondes internes permet d'identifier formellement le produit amplifié. Les résultats obtenus avec les oligonucléotides alpha, EP677, entéro 607, sondes internes de l'alpha-toxine, de l'epsilon-toxine, et de l'entérotoxine sont donnés par les Figures 6 et 7.

Les bandes observées sur le gel (Figure 6A) correspondant au fragment amplifié des gènes de l'alpha-toxine (283 bp) hybrident spécifiquement avec la sonde alpha (Figure 6B).

Sur la Figure 7, les fragments amplifiés des gènes de l'epsilon-toxine et de l'entérotoxine hybrident spécifiquement avec leur sonde respective.

# Dot Blot

L'identification des produits d'amplification Dot Blot est réalisée à l'aide de souches froides marquées à la digoxygénine. L'hybridation réalisée avec les sondes EP677 et entéro 607 montre la spécificité de la réaction d'amplification (Figure 8).



**Figure 5.** Amplification triplex avec les amorces PL<sub>3</sub>/PL<sub>7</sub> (alpha-toxine), P418/P808 (entérotoxine) et P443/P953 (epsilon-toxine)

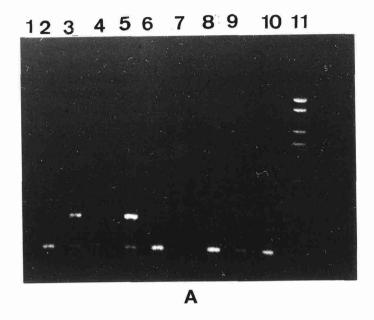
Souches de *C. perfringens* testées : A : R<sub>3</sub> .; 2 : Cp76; 3 : Cp75; 4 : G23; 5 : Cp264; 6 : Cp4; 7 : Marqueur de taille moléculaire (ADN de phage lambda).

# Conclusions et perspectives

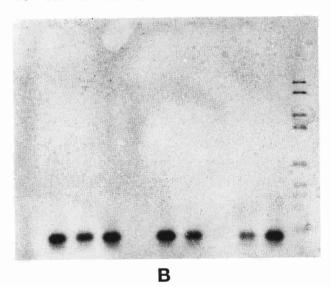
Ce travail nous a permis d'évaluer les possibilités de la technique d'amplification génique par P.C.R. pour le typage de *C. perfringens*. Nous avons procédé à des amplifications simples (amplifiant un seul gène), duplex ou triplex (amplifiant plusieurs gènes dans le même tube), suivant que les bactéries exprimaient une, deux ou trois toxines.

La spécificité des produits d'amplification est démontrée par hybridation moléculaire à l'aide de sondes internes aux fragments amplifiés, ainsi que par l'analyse des produits de restriction enzymatique.

La comparaison entre les séquences nucléotidiques des différentes espèces productrices d'une phospholipase C (C. bifermentants, B. cereus...) a permis le choix d'amorces spécifiques à C. perfringens. Des tests de P.C.R. duplex amplifiant le gène gène de

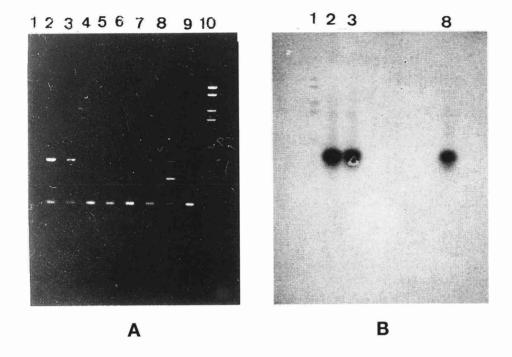


# 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1



**Figure 6** (A,B). Hybridation moléculaire par Southern-blot à l'aide de la sonde alpha-toxine. A: 1: marqueur VI marqué à la digoxygénine; 2: Cp249; 3: R<sub>3</sub>; 4: Cs27; 6: Cp39/91; 7: Cs26; 8: Cp5; 9: Cp431; 10: Cp6; 11: marqueur VI

B: hybridation avec la sonde alpha



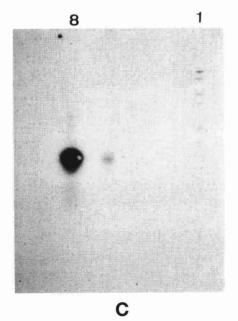


Figure 7 (A,B,C).

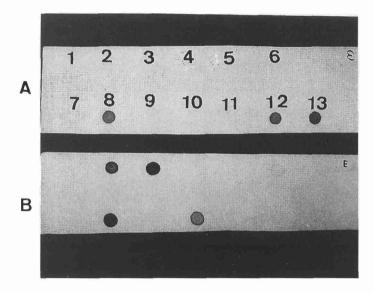
Hybridation moléculaire par Southern-blot à l'aide des sondes epsilon-toxine (EP677) et entérotoxine (607).

A: 1: marqueur VI marqué à la digoxygé nine; 2: Cp75; 3: Cp250; 4: G23; 5: 33/89; 6: Cp27; 7: Cp34/89;

33/89; 6 : Cp27; 7 : Cp34/89; 8 : Cp76; 9 : Cp35/89; 10 : marqueur VI B : hybridation avec la sonde epsilon-

toxine (EP677)
C: hybridation avec la sonde entérotoxine

(607)



**Figure 8**. Hybridation moléculaire par Dot-blot. ADN amplifié de souches de *C. perfringens* par les amorces des gènes epsilon-toxine et de l'entérotoxine.

Spots: 1: Cp249; 2: R<sub>3</sub>; 3: Cp64; 4: Cp28/91; 5: Cp27; 6: Cp431; 7: Cp35/89; 8: Cp76;

9: Cp34/89; 10: NCIBE; 11: Cp33/89; 12: Cp75; 13: Cp250.

A: hybridation avec la sonde epsilon Ep677

B: hybridation avec la sonde entérotoxine 607.

l'alpha-toxine et de l'entérotoxine ont été réalisés et ont été comparés avec les tests de séroneutralisation sur souris, de cytotoxicité sur culture cellulaire, et avec le test au latex.

Les amplifications du gène de la toxine epsilon effectuées sur des souches de *C. per-fringens* se sont avérées spécifiques. Il nous faudra tester l'amplification génique de cette toxine avec des souches de type B.

Havard, Hunter et Titball [4] ont récemment testé plusieurs souches de *C. perfringens* B et D en amplifiant les gènes de l'epsilon-toxine avec des amorces choisies sur la séquence codante de ce gène.

Leurs résultats étaient concluants. Ils ont obtenu des amplifications spécifiques avec les souches de *C. perfringens* B et D, et négatives avec d'autres types de *C. perfringens* (A,C et E) de *Bacillus subtilis* et *B. anthracis*.

Nous avons, par ailleurs, pu amplifier spécifiquement trois gènes de souches produisant l'alpha, l'epsilon et l'entérotoxine dans une réaction triplex.

La technique P.C.R. s'est montrée beaucoup plus performante que les techniques d'identification et de typage utilisées habituellement (toxinotypie sur animal, tests immunologiques et de cytotoxicité sur cultures cellulaires).

Dès que le gène de la toxine bêta sera séquencé, nous pourrons envisager la mise au point d'une trousse diagnostique utilisable aussi bien en santé animale qu'en hygiène alimentaire; il permettra l'identification simultanée de *Clostridium perfringens* types A, B, C et D, et la recherche de l'entérotoxine.

# Références

- Al-Mashat R.R., Taylor D.J. (1983). Clostridium sordellii in enteritis in an adult sheep. Vet Rec; 112: 1-19.
- El Idrissi A.H., Gssair L., Benkirane A. (1991). Clostridium sordellii: causes possibles des entérotoxémies au Maroc. Maghreb Vétérinaire; Vol 5: N° 25: 21-23.
- 3. Harmon S.M., Kautter D.A. (1986). Evaluation of a reversed passive latex agglutination test kit for *Clostridium perfringens* enterotoxine. *J Food Prot*; 49: 523-525.
- Havard H.L., Hunter S.E.C., Titball R.W. (1992). Comparison of the nucleotide sequence and development of a PCR test for the epsilon-toxine gene of *Clostridium perfringens* type B and D Fems Microbiol Lett; 97: 77-81.
- Hunter S.E., Clarke I.N., Kelly D.C., Titball R.W. (1992). Cloning and nucleotide sequencing
  of the Clostridium perfringens epsilon-toxine gene and its expression in Escheria coli. Am Soc
  Microbiol; 60: 102-110.
- 6. Kadra B. (1985). Isolement et typage de souches de *Clostridium perfringens* en Algérie. *Maghreg Vetérinaire*: Vol 2: N°8: 27-29.
- Katitch R.V. (1963). Les toxi-infections causées par les microbes anaérobies et l'importance de leur étude. Bul Off Int Epiz; 59: 1351-1359.
- 8. Mahony D.E., Gilliatt E., Dawson S., Stockdale E., Lee S.H.S. ( ). Vero cell assay for rapid detection of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Am Soc Microbiol*; 55: 2141-2143.
- 9. Okabe A., Shimizu T., Hayashi H. (1989). Cloning and sequencing of phospholipase C gene of *Clostridium perfringens. Biochem Biophys Res Comm*; 150: 33-39.
- Popoff M. (1979). Entérotoxémie à Clostridium perfringens chez les ovins et glucosurie. Bul Soc Vét Prat de France; 63: 431-448.
- Sebald M. (1990). Diagnostic bactériologique d'une infection à Clostridium perfringens. Rev Prat ; N°7 : mars.
- 12. Sterne M., Batty I. (1975). Criteria for diagnosing clostridial infections in pathogenic clostridia. Butterworth and Company; London: 79-84.
- Titball R.W., Hunter S.E.S., Martin K.L., Morris B., Shuttleworth A.D., Rubidge T., Anderson D.W., Kelly D.C. (1989). Molecular cloning and nucleotide sequence of alpha-toxin (phospholipase C) of *Clostridium perfringens*. *Infect Immun*; 57: 367-376.
- 14. Tso J.Y., Seibel C. (1989). Cloning and expression of the phospholipase C gene from *Clostridium perfringens* and *Clostridium bifermentans*. *Infect Immun*: 57: 468-476.
- Vandamme-Jongsten M., Wernars K., Notermans S. (1989). Cloning and sequencing of the Clostridium perfringens enterotoxin gene. Antonie van Leeuweuhoek; 48: 411-413.