



ANNEE 2001

N° 57

**« ISOLEMENT ET IDENTIFICATION D'UN
ANTIGENE IMMUNOGENE DE *CLOSTRIDIUM
CHAUVOEI*, CANDIDAT A LA CONSTRUCTION
D'UNE SOUCHE VACCINALE RECOMBINANTE
BIVALENTE CONTRE LES DEUX MALADIES
CHARBONNEUSES BOVINES »**

THESE

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE 3^e CYCLE EN
BIOLOGIE ANIMALE

PRESENTEE ET SOUTENUE
LE 06 JUILLET 2001

PAR

Mbaye MBENGUE



ST. 6778

JURY

PRESIDENT :	M. Bhen Sikina	TOGUEBAYE	Professeur
MEMBRES :	M. Mamady	KONTE	Chercheur
	Mme Corinne ROULAND	LEFEVRE	Professeur
	Mme Awa KANE	AÏDARA	Chercheur
	M. Alioune	DIEYE	Professeur
	M. Cheikh Tidiane	BA	Professeur
	M. Amadou	SALL	Chercheur
DIRECTEUR DE THESE :	Dr. Mamady	KONTE	

AU NOM D'ALLAH
LE TOUT PUISSANT

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué à l'élaboration de ce travail.

Je dédie ce travail à,

- **Mes parents :**

Que ce modeste travail soit pour vous un modeste témoignage de mon attachement sincère, de ma profonde gratitude. Vos prières ne m'ont jamais fait défaut.

Que DIEU vous garde longtemps encore parmi nous, afin que vous puissiez continuer nous guider vers le droit chemin de l'Islam.

- **Mon épouse :**

Ton amour, ta patience, ton soutien à tous les niveaux m'ont donné la force et la persévérance nécessaire pour mener à bien mes recherches.

Tu as su m'assurer une bonne formation, pour ton affection et ton soutien moral. Qu'ALLAH, le tout puissant te garde toujours à mes côtés.

Trouve dans ce travail, l'expression de ma vive reconnaissance et de ma profonde affection.

- **Mes enfants :**

Pour vous encourager dans vos études, et vous inciter à mieux faire.
Profonde affection .

- **Mes Frères et sœurs :**

Ce travail est le vôtre, veuillez y trouver l'expression de ma profonde gratitude.

Mes beaux parents :

Ce travail est le vôtre, veuillez recevoir l'expression de ma profonde reconnaissance.

Mes suivants remerciements à :

- **Monsieur le Directeur Général de l'ISRA**

Pour m'avoir autorisé à préparer cette thèse de 3^{ème} cycle de biologie animale à l'UCAD .
Toute ma reconnaissance et mon respect.

- **Monsieur Mamady KONTE**

Directeur du LNERV/ISRA et Directeur de Thèse

Avec vous, j'ai été à l'école de la rigueur scientifique, du goût du travail bienfait. vous nous avez prodigué un encadrement de haute qualité, malgré vos multiples charges à la Direction du LNERV.

Je ne saurais suffisamment vous remercier de m' avoir fait confiance en acceptant de diriger cette thèse.

Vous avez été et demeurez pour moi au delà de l'encadreur, un ami, un frère, un confident incontesté.

Vous avez su m'accueillir et m'intégrer dans la belle équipe que vous formez avec vos collaborateurs.

Ces moments passés ensemble seront inoubliables et resteront à jamais gravés dans ma mémoire.

Je vous prie, cher Mamady KONTE, d'accepter mes sincères remerciements et ma profonde gratitude.

- **Monsieur le Professeur Bhen Sikina TOGUEBAYE**

Chef du Département de Biologie Animale de la Faculté des Sciences et Techniques de l'UCAD.

Nous sommes très honorés que vous ayez accepté de présider ce jury de thèse, malgré vos lourdes tâches.

Nous avons toujours été sensibles à vos sages conseils et orientations, surtout dans les moments les plus critiques.

Nous vous prions de recevoir l'expression de notre profonde gratitude.

- **Monsieur Seydil Moukhtar Kounta TOURE**

Ancien Chef de service de Parasitologie du LNERV/ISRA

Ancien Directeur du Département de recherches zootechniques et vétérinaires de l'ISRA

Ancien Directeur Général du CIRDES (ex CIRTA) de Bobo Dioulasso - Burkina Faso

Dès nos débuts à l'ISRA, vous n'avez jamais cessé de m'apporter l'appui nécessaire à une bonne formation universitaire. Vous m'avez accordé un stage bénéfique en biotechnologie au CIRDES de Bobodioulasso, ce qui m'a permis de me familiariser d'avantage avec l'outil moléculaire.

Nous vous témoignons notre reconnaissance sincère et respectueuse.

Je ne saurais oublier votre épouse, Mme Bineta TOURE, si parfaite.

Conseillère affectueuse de tous les temps ; qu'elle trouve ici, l'expression de mon respect et de ma profonde gratitude.

- **Dr Alain BRAUMAN**

Chargé de recherches au laboratoire de Microbiologie de l'IRD de bel air

Pour l'aide précieuse apportée à la réalisation de ce travail.

Nous vous prions de recevoir l'expression de notre vive reconnaissance et merci pour tout.

- **Professeur Corinne ROULAND - LEFEVRE**

Chargé de recherches en mission à l'IRD et Professeur à l'Université de Paris XII Créteil

Après m'avoir guidé dans une partie de mes travaux de recherches et avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse, veuillez recevoir ici l'expression de notre profonde reconnaissance et de notre respect.

- **Dr Mamadou GUEYE**

Chargé de recherches au MIRCEN de Bel air

Vous m'avez introduit à l'IRD de Bel Air par votre ouverture et votre grande disponibilité, je vous prie de recevoir l'expression de ma gratitude.

- **A tout le personnel de l'IRD de bel air**

Ma profonde reconnaissance.

- **Professeur Alioune DIEYE**

Chargé de recherches à l'IPD et Professeur à la faculté de Médecine et de Pharmacie de l'UCAD.

Vous avez suscité en moi une grande admiration et un sentiment de respect.
Nous vous remercions de vos remarques et suggestions qui m'ont été d'un grand apport scientifique.

Nous sommes aujourd'hui honorés de vous compter dans notre jury de thèse.
Sincères remerciements et profond respect.

- **Dr Awa KANE AÏDARA**

Chargé de recherches à l'IPD

Nous vous adressons nos vifs remerciements, pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse, malgré vos tâches nombreuses.

Merci de l'accueil combien chaleureux réservé à mon arrivé dans votre laboratoire et de l'aide inestimable apportée à la réalisation de ce travail .

Recevez l'expression de notre gratitude et de notre profond respect

- **Dr Amadou SALL**

Chargé de recherches à l'IPD

Nous vous remercions par vos remarques et suggestions et d'avoir bien voulu accepté de faire partie de ce jury de Thèse.

Veillez trouver ici l'expression de notre reconnaissance

- **Dr Mbayame NDIAYE**

Chargé de recherches à l'IPD

Pur votre grande disponibilité, nous vous disons merci .

- **A tout le personnel de l'Institut Pasteur de Dakar**

Toute ma reconnaissance.

- **A tout le personnel du laboratoire de Biochimie de la Faculté de médecine et de Pharmacie de l'UCAD**

Veillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude et toute ma reconnaissance pour les services rendus.

- **Dr Michèle MOCK et Dr Fabien BROSSIER**

Chargés de recherches à l'unité des toxines et pathogénies bactériennes de l'Institut Pasteur de Paris

Pour l'aide précieuse apportée à la réalisation de l'étude moléculaire.

Nous vous remercions de cette exemplaire collaboration scientifique et souhaite qu'elle se renforce dans le temps. Nous vous prions de recevoir l'expression de notre gratitude et de notre aimable considération.

- **Drs Geneviève LIBEAU et Monique ROYER** du CIRAD de Montpellier

Pour votre contribution scientifique

- **A tout le personnel du centre collaborateur ONUSIDA**

Pour votre collaboration.

- **Au Dr Seydou TRAORE**

Maître Assistant au département de Biologie végétale

Pour votre grande disponibilité.

- **A tout le personnel du Laboratoire national de l'élevage et de recherches vétérinaires de HANN**

Toute notre reconnaissance.

- **A tout le personnel de la Direction Générale de l'ISRA**

Pour votre disponibilité

Avant Propos

L'antigène immunogène et le gène dont il est le produit est connu et disponible en ce qui concerne la valence charbon bactérien à *B anthracis*.

L'identification et la caractérisation moléculaire de l'antigène immunogène de *Cl chauvoei* constitue l'objet de cette Thèse ; c'est la première étape d'un processus d'identification et d'isolement du gène de *Cl chauvoei*.

Les recherches pour la plupart ont été menées dans différents laboratoires grâce à la collaboration de certains instituts de recherches au Sénégal et à l'étranger.

Ainsi les travaux de biochimie ont été effectués à l'Institut de recherche pour le développement (IRD, anciennement ORSTOM) de bel air et aussi à l'Institut Pasteur de Dakar (IPD).

Les études bactériologiques et immunologiques ont été menées au laboratoire de microbiologie du LNERV/ISRA de Dakar et au laboratoire de biochimie immunologie de la faculté de médecine de l'UCAD.

Les expériences de biologie moléculaire de microséquençage des protéines (identification de la structure et de la composition en acides aminés), ont été réalisées dans le cadre de la collaboration avec le laboratoire de l'unité des toxines et pathogénies bactériennes de l'Institut Pasteur de Paris (IPP).

SOMMAIRE

Remerciements -----	3
Avant – Propos-----	7
Liste des sigles et abréviations-----	13
Liste des figures -----	15
Liste des tableaux-----	17
Résumé-----	19
Summary-----	20
Introduction -----	21
<u>Première Partie :</u>	
Données bibliographiques -----	24
I. - <u>Généralités sur les maladies charbonneuses</u> -----	25
I.1. - <u>Le charbon bactérien</u> -----	25
I.1.1. Définition-----	25
I.1.2. Epidémiologie-----	25
I.1.3. Mode de transmission-----	25
I.1.4. Pouvoir pathogène, antigénique et immunisant de <i>Bacillus anthracis</i> -----	26
I.1.5. Diagnostic-----	26
I.1.6. Traitement-----	26
I.2. <u>Le charbon symptomatique</u>-----	26
I.2.1. Définition-----	26
I.2.2. Epidémiologie-----	27
I.2.3. Mode de transmission-----	27
I.2.4. Pouvoir pathogène-----	27
I.2.5. Diagnostic-----	27
I.2.6. Plan de prophylaxie-----	27
I.3. <u>Bases moléculaires de la prévention des maladies charbonneuses bovines</u>-----	28
I.3.1. Prévention du charbon bactérien à <i>Bacillus anthracis</i> -----	27
I.3.1.1. Principe de la prévention -----	28
I.3.1.2. Structure des antigènes immunogènes-----	28
I.3.1.3. Vaccins et vaccinations contre le charbon bactérien-----	29
I.3.2. Prévention du charbon symptomatique à <i>Clostridium chauvoei</i> -----	29
I.3.2.1. Principe de la prévention-----	29
I.3.2.2 Structure des antigènes immunogènes-----	29
I.3.2.3. Vaccins et vaccinations contre le charbon symptomatique-----	30
II. <u>Généralités sur les vaccins recombinants</u>-----	30
II.1. <u>Principe de fabrication des vaccins recombinants</u>-----	30
II.1.1. Identification de l'antigène immunisant et isolement du gène correspondant-----	30

II 1.2. Choix des vecteurs (transfert et/ou d'expression)-----	31
II.1.3. Clonage de l'ADN recombiné-----	31
II.1.4. Identification du clone recombinant -----	31
II.2. Exemples de vaccins recombinants -----	31
II.2.1. Vaccins recombinants subunitaires-----	31
II.2.2. Vaccins recombinants vivants -----	31
II.2.3. Exemples de vaccins recombinants en santé animale-----	32
II.2.3. 1. Vaccins recombinants réalisés dans le monde-----	32
II.2.3.2. Projet de fabrication de vaccins recombinants au Sénégal-----	32
Conclusion partielle -----	32

Deuxième Partie : Travaux personnels ----- 33

Recherche de l'antigène immunogène de *Clostridium chauvoei*, candidat à la construction d'une souche vaccinale, recombinante, bivalente contre les deux maladies charbonneuses du bovin.

I. Matériels et Méthodes -----	34
I.1. Matériels -----	34
I.1.1. Matériel biologique-----	34
I.1.1.1 Souche de <i>Cl. Chauvoei</i> -----	34
I.1.1.2. Animaux de laboratoire -----	34
I.1.2. Sites expérimentaux et équipements de laboratoire (Equipements – Petit matériel de laboratoire – Produits et réactifs chimiques)-----	34
I.2. Méthodes -----	34
I.2.1. – Etudes bactériologiques -----	34
I.2.1.1. Préparation des milieux de culture-----	34
I.2.1.2. Isolement et Identification de <i>CL. Chauvoei</i> -----	35
I.2.2. – Etudes biochimiques -----	35
I.2.1.1. Extraction des protéines solubles et précipitation et dialyse -----	36
I.2.1.2. Séparation des fractions protéiques -----	37
I.2.1.3. Dissociation des glycoprotéines du corps bactérien -----	38
I.2.1.4. Dosage des fractions protéiques -----	39
- Dosage des protéines totales intra, extracellulaires et du corps bactérien -----	39
- Dosage des fractions protéiques après purification par électrophorèse -----	42
I.2.3. – Etudes immunologiques -----	42
I.2.3.1. Activités biologiques des fractions protéiques sur souris blanches et sur cobayes---	42
I.2.3.2. Etude du pouvoir immunogène des fractions protéiques sur cobaye -----	42
I.2.3.3 Suivi de la cinétique des anticorps et dosage de Ig -----	43
I.2.3.4 Test de WESTERNBLOT sur sérums de cobayes vaccinés contre les fractions 19 exocellulaire et 3ad du corps bactérien (sérums récoltés 14 jours après inoculation). -----	51

I.2.3.5. Séparatio des anticorps correspodant aux antigènes les plus immunogènes -----	55
I.2.4. – Choix et analyse moléculaire de l'antigène immunogène candidat -----	57
I.2.4.1. Choix de l'antigène la plus immunogène -----	57
I.2.4.2. Structure et composition en acides aminés (microséquençage) -----	57
II. Résultats et Discussions -----	58
II.1. Etudes bactériologiques générales -----	58
- Caractères culturaux -----	58
- Caractères biochimiques -----	58
II.2. Etudes des protéines bactériennes -----	59
- Séparation/ identification des fractions protéiques bactériennes par chromatographie en phase liquide (CPL) -----	59
- Protéines extracellulaires -----	59
- Protéines intracellulaires -----	60
- Protéines liées au corps bactérien -----	63
- Purification des fractions protéiques (exo et endocellulaires) par électrophorèse sur gel PAGE -----	65
- Extraction et purification des fractions protéiques liées au corps bactérien -----	67
- Dosage des protéines totales -----	67
- Dosage des fractions protéiques -----	68
II.3 Etude de l'activité biologique des fractions protéiques sur animaux de laboratoire 70	
II.4. – Etude immunologique des fractions protéiques -----	73
- Immunisation des cobayes -----	73
. Protocole de l'immunisation -----	73
. Immunisation à l'aide de fractions protéiques exocellulaires -----	74
. Immunisation à l'aide de fractions protéiques endocellulaires -----	76
. Immunisation à l'aide de fractions protéiques du corps bactérien -----	77
. Etude de la cinétique des anticorps (Ac) par l'ELISA/ et par le dosage des Ig par la méthode immunoturbidimétrique -----	77
. Immunogénicité des protéines exocellulaires -----	78
. Immunogénicité des protéines endocellulaires -----	80
. Immunogénicité des protéines du corps bactérien -----	82
- Séparation des anticorps correspondant aux antigènes les plus immunogènes par électrophorèse -----	92
II.5. – Analyses moléculaires des fractions protéiques -----	95
. Digestion enzymatique et séparation des peptides par HPLC -----	95
. Microséquençage peptidique -----	115
II.6. – Sondes nucléiques dérivées de la région peptidique d'intérêt -----	115
Conclusion générales -----	118
Perspective de Recherches -----	119
Références bibliographiques -----	120

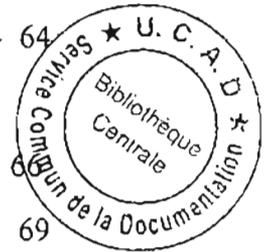
Liste des sigles et abréviations

A	: Adénosine
ADN	: Acide désoxyribonucléique
AFLP	: Amplified fragment length polymorphism
Ag	: Antigène
ARN	: Acide ribonucléique
Ac	: Anticorps
ARN	: Acide ribonucléique messenger
BBC	: Bleu brillant de coomassie
CPL	: Chromatographie en phase liquide
DAB	Diaminobenzidine
DEAE	: Diethylaminoethyl
D O	: Densité optique
ELISA	: Enzym linked immnosorbent assay
FM	: Faculté de médecine
G	: Glycine
GUA	: Guanosine
V	: Valine
H	: Histidine
HPLC	: High pressure liquid chromatography
I	: Isoleucine
IgG	: Immunoglobuline G
IgM	: Immunoglobuline M
IPD	: Institut Pasteur de Dakar
IPP	: Institut Pasteur à Paris
IRD	: Institut de Recherche pour le développement
ISRA	: Institut sénégalais de recherches agricoles
K	: Lysine
kDa	: kilodaltons

L	: Lysine
LNERV	: Laboratoire national d'élevage et de recherches vétérinaires
MAF	: Milieu anaérobie foie
PAGE	: Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PEG	: Polyéthylène glycol
Q	: Glutamine
RM	: Rapport de migration
S	: Serine
SAB	: Sérum albumine bovine
T	: Thréonine
TCA	: Acide trichloracétique
TFA	: Tetrafluoroacetic acid (Acide tétrafluoroacétique)
TMB	: Tétraméthyl benzidine
TR	: Temps de rétention
UCAD	: Université Cheikh Anta Diop
U	: Uracyle
V	: Valine
VGF	: Viande foie glucose

Liste des figures

<u>N°s</u>	<u>Titres</u>	<u>Pages</u>
1 :	Chromatographie (CPL) sur colonne de sépharose A Cl 6B des protéines du milieu extracellulaire -----	60
2 :	Chromatographie (CPL) sur colonne de sépharose A Cl 6B des protéines du milieu intracellulaire -----	62
3 :	Chromatographie (CPL) sur colonne de sépharose A Cl 6B des protéines du corps bactérien -----	64
4 :	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide à 7,5% des extraits protéiques bruts et des fractions protéiques purifiées sur colonne anionique de sépharose A Cl 6B des trois compartiments de <i>Cl. Chauvoei</i> -----	66
5 :	Courbe étalon d'albumine -----	69
6 :	ELISA/ anti <i>Cl. Chauvoei</i> du milieu extracellulaire -----	79
7 :	ELISA/ anti <i>Cl. Chauvoei</i> du milieu intracellulaire -----	81
8 :	ELISA/ anti <i>Cl. Chauvoei</i> du corps bactérien -----	83
9 :	Cinétique des IgG et des IgM anti <i>Cl. Chauvoei</i> du milieu extracellulaire -----	85
10 :	Cinétique des IgG et des IgM anti <i>Cl. Chauvoei</i> du milieu intracellulaire -----	87
11 :	Cinétique des IgG et des IgM anti <i>Cl. Chauvoei</i> du corps bactérien -----	89
12 :	Test de WESTERNBLOT sur sérums de cobayes vaccinés contre les fractions 19 exocellulaire et 3ad du corps bactérien -----	91
13 :	Electrophorèse sur acétate de cellulose des immunoglobulines sériques de cobayes vaccinés contre les fractions 3 -7 - 19 et 21 du milieu extracellulaire de <i>Cl. Chauvoei</i> -93	
14 :	Electrophorèse sur acétate de cellulose des immunoglobulines sériques de cobayes vaccinés contre les fractions 2a - 2b du milieu intracellulaire et les fractions 3a - 3ad et 3b du corps bactérien de <i>Cl. Chauvoei</i> -----	95
15 :	Chromatogramme HPLC sur la protéine F 19 exocellulaire -----	97
16 :	Chromatogramme HPLC sur la protéine standard -----	100
17 :	Chromatogramme HPLC résidu acide aminé n°1 du fragment 14 de la protéine 19 extracellulaire de <i>Cl. chauvoei</i> -----	102
18 :	Chromatogramme du résidu acide aminé n° 2 du fragment 14 de la protéine 19 du milieu extracellulaire de <i>Cl. chauvoei</i> -----	103
19 :	Chromatogramme du résidu acide aminé n° 3 du fragment 14 de la protéine 19 du milieu extracellulaire de <i>Cl. chauvoei</i> -----	104
20 :	Chromatogramme du résidu acide aminé n° 4 du fragment 14 de la protéine 19 du milieu	



extracellulaire de <i>Cl.chauvoei</i> -----	105
21: Chromatogramme du résidu acide aminé numéro 5 du fragment 14 de la protéine 19 du milieu extracellulaire de <i>Cl.chauvoei</i> -----	106
22: Chromatogramme du résidu acide aminé numéro 6 du fragment 14 de la protéine 19 du milieu extracellulaire de <i>Cl.chauvoei</i> -----	107
23 : Chromatogramme du résidu acide aminé numéro 7 du fragment 14 de la protéine 19 du milieu extracellulaire de <i>Cl.chauvoei</i> -----	108
24 : Chromatogramme du résidu acide aminé numéro 8 du fragment 14 de la protéine 19 du milieu extracellulaire de <i>Cl.chauvoei</i> -----	109
25 : Chromatogramme du résidu acide aminé numéro 9 du fragment 14 de la protéine 19 du milieu extracellulaire de <i>Cl.chauvoei</i> -----	110
26 : Chromatogramme du résidu acide aminé numéro 10 du fragment 14 de la protéine 19 du milieu extracellulaire de <i>Cl.chauvoei</i> -----	111
27 : Chromatogramme du résidu acide aminé numéro 11 du fragment 14 de la protéine 19 du milieu extracellulaire de <i>Cl.chauvoei</i> -----	112
28 : Chromatogramme du résidu acide aminé numéro 12 du fragment 14 de la protéine 19 du milieu extracellulaire de <i>Cl.chauvoei</i> -----	113
29 : Chromatogramme du résidu acide aminé numéro 13 du fragment 14 de la protéine 19 du milieu extracellulaire de <i>Cl.chauvoei</i> -----	114

Liste des tableaux

<u>N°s</u>	<u>Titres</u>	<u>Pages</u>
I:	Chromatographie (CPL) sur colonne de sépharose A Cl.6B des protéines du milieu extracellulaire de <i>Cl. Chauvoei</i> -----	59
II :	Chromatographie (CPL) sur colonne de sépharose A Cl.6B des protéines du milieu intracellulaire de <i>Cl. Chauvoei</i> -----	61
III :	Chromatographie (CPL) sur colonne de sépharose A Cl.6B des protéines du corps bactérien de <i>Cl. Chauvoei</i> -----	63
IV :	Electrophorèse sur gel PAGE des extraits protéiques bruts et des fractions protéiques purifiées sur colonne de sépharose A Cl 6B -----	65
V :	Dosage des protéines totales -----	67
VI :	Courbe étalon d'albumine -----	68
VII:	Dosage des protéines fractionnées -----	70
VIII :	Activité biologique des protéines totales sur souris blanches -----	71
IX :	Activité biologique des protéines fractionnées sur cobayes -----	72
X :	Immunsation des cobayes contre les fractions protéiques non détoxifiées du milieu extracellulaire. -----	74
XI :	Immunsation des cobayes contre les fractions protéiques détoxifiées du milieu extracellulaire. -----	75
XII :	Immunsation des cobayes contre les fractions protéiques non détoxifiées du milieu intracellulaire -----	76
XIII :	Immunsation des cobayes contre les fractions protéiques détoxifiées du milieu intracellulaire -----	76
XIV :	Immunsation des cobayes contre les fractions protéiques du corps bactérien -	77
XV :	Titre (DO) de sérums de cobayes vaccinés contre les fractions protéiques exocellulaires -----	78
XVI :	Titre (DO) de sérums de cobayes vaccinés contre les fractions protéiques endocellulaires -----	80
XVII :	Titre (DO) de sérums de cobayes vaccinés contre les fractions protéiques du corps bactérien-----	82
XVIII :	Teneurs en g/l des classes d'immunoglobulines de cobayes du milieu extracellulaire -----	84
XIX :	Teneurs en g/l des classes d'immunoglobulines de cobayes du milieu intracellulaire -----	86

XX : Teneurs en g/l des classes d'immunoglobulines de cobayes du corps bactérien -----	88
XXI : Teneurs en g/l des immunoglobulines sériques de cobayes vaccinés contre Les fractions 3 – 7 – 19 – 21 du milieu extracellulaire obtenues en électrophorèse sur acétate de cellulose sérums récoltés 14 jours après inoculation)-----	92
XXII : Teneurs en g/l des immunoglobulines sériques de cobayes vaccinés contre les frac- tions 2a - 2b du milieu intracellulaire et 3a – 3ad et 3b du corps bactérien obtenues en électrophorèse sur acétate de cellulose (sérums récoltés 14 jours après inocu- lation) -----	94
XXIII HPLC sur la protéine 19 -----	99
XXIV : Chromatographie HPLC sur les 19 acides aminés essentiels : les DO en fonction du temps de rétention -----	101
XXV Comparaison des résidus du standard et de ceux du fragment 14 de la protéine 19 --	114
XXVI : Codon universel du gène <i>Clostridium</i> -----	116

RESUME :

Des études bactériologiques, biochimiques, immunologiques et moléculaires ont permis d'identifier, d'isoler et de caractériser l'antigène soluble la plus immunogène de *Cl chauvoei*. Il s'agit d'une fraction protéique, la fraction 19, excrétée par la bactérie dans un milieu de culture approprié.

Cette fraction 19 du milieu extracellulaire donne lieu à la production d'anticorps chez le cobaye, révélée par le test ELISA anticorps, confirmée par la technique du Westernblot. Ces titres obtenus sont élevés pour les IgG, plus faibles pour les IgM.

Ces anticorps ont été dosés par le test immunoturbidimétrique.

La séquence de la fraction F14 de la protéine 19 a été établie après digestion enzymatique et séparation par la HPLC.

La structure d'une sonde dégénérée a été établie à l'aide d'un logiciel DNAsis ; cette sonde permettra l'identification du génôme de *Cl chauvoei* codant pour la fraction 19, candidat pour un vaccin recombinant, bivalent contre le charbon bactérien et le charbon symptomatique du bovin.

MOTS CLES :

Antigène – Anticorps – *Bacillus anthracis* – Charbon - *Clostridium chauvoei* – DNA - ELISA – Gène - Immunogène – Immunoglobulines – Protéine – Recombinant – Séquence – Vaccin – Westernblot..

SUMMARY :

Molecular, immunological, biochemical and bacteriological studies has allowed the isolation and characterization of the most immunogenic soluble antigen from *Cl chauvoei*.

It's the 19 proteic fragment secreted by bacteria in an appropriated culture medium. This 19 extracellular fragment gives antibodies on animals sera which can be revealed by ELISA and confirmed by Westernblotting. These titers are highers for IgG and lower for IgM. These antibodies has been tested by immunoturbidimetry.

The F14 fragment sequence has been established after enzymatic attack and separation by HPLC .

The structure of degenerated sonde can allow an identification of *Cl chauvoei* genome which can code for a recombinant vaccine which can protect against anthrax and blackleg.

KEYS WORDS

- Antigen - Antibodies - Anthrax - *Bacillus anthracis* - Blackleg - *Clostridium chauvoei* - ELISA - Gene - Immunogen - Immunoglobulins - Protein - Recombinant - Sequence - Vaccine - Westernblot.

Introduction :

Le charbon symptomatique, et le charbon bactérien sont des maladies telluriques, se maintenant pérennes dans le sol par des spores. La première est causée par une bactérie anaérobie (*Cl. Chauvoei*) et est toujours mortelle, tandis que la seconde due à une bactérie aérobie (*B.anthraxis*) est le plus souvent mortelle.

Ces deux maladies sont souvent retrouvées sur les mêmes sites éco-géographiques. La protection du bétail contre ces deux maladies repose depuis très longtemps sur la vaccination.

La vaccination simultanée par deux vaccins monovalents a été réalisée par divers auteurs (SIMPSON,1964 ; STARTEW, 1939 ; BLANCOU et al 1974) et s'est avérée efficace, comparée à deux vaccinations différées dans le temps.

La vaccination par injection unique, avec un vaccin bivalent constitué par le mélange d'une souche vaccinale vivante de *Bacillus anthracis* et une souche de *Cl. chauvoei* soit vivante et atténuée, soit virulente ou inactivée par le formol, lui - même neutralisé par le sulfate de sodium (BURDOV, 1962) est moins appliquée.

Cette forme de vaccination a été utilisée dans différents pays : URSS (BURDOV, 1962). Iran (DELPY,1952). France (I.S.T,1969). Canada (CHO,1971). Madagascar (BLANCOU, 1974). Cameroun (LANAVET Garoua/Biopharma).

Dans la conception de ce vaccin unique, il apparaît que seule la composante clostridienne semble avoir préoccupée les chercheurs, afin d'obtenir une souche vivante suffisamment atténuée pour être exempte de tout pouvoir pathogène résiduel, la seconde valence étant supposée acquise avec la disponibilité des spores de vaccination apathogène.

Le choix entre un vaccin vivant et un vaccin tué repose sur les caractères antigéniques et les propriétés immunologiques.

Cependant, il faut noter que *Cl. chauvoei* n'a fait l'objet que de très peu d'études concernant son pouvoir immunogène (STEFANINI DE GUZMAN, 1999) ; (MATTAR, et al 1998) ; (STEFANINI DE GUZMAN et al,1998, Argentina).

Une bonne vaccination à effet durable nécessite la sélection de souches vaccinales adaptées, la mise au point de vaccins efficaces et leur amélioration constante.

La technologie de fabrication des vaccins bactériens dits classiques utilise encore l'agent infectieux total, soit vivant et atténué dans son pouvoir pathogène (vaccins vivants, lyophilisés) soit inactivé (vaccins tués, adjuvés), ou son produit d'excrétion traité à la chaleur et au formol (anatoxines).

Les vaccins classiques pèchent souvent par leur manque de spécificité et les interférences antigéniques entre certaines souches vaccinales de plus, étant d'efficacité incomplète et irrégulière et, les vaccins vivants peuvent conserver une pathogénicité résiduelle.

A ces insuffisances intrinsèques liées au vaccin lui-même, s'ajoutent des difficultés de conservation et de respect de la chaîne de froid en milieu tropical, des difficultés de reconstitution (s'il y'a lieu) et d'administration du vaccin à l'animal au niveau des troupeaux.

Ces défauts sont évités, pour les plus importants, avec l'avènement des vaccins dits recombinants. Ces vaccins ne font plus appel à l'agent infectieux dans son intégralité mais uniquement à son ADN et un fragment précis de l'ADN, codant pour l'épitope spécifique qui donne lieu à la production de l'anticorps protecteur et seulement celui - là. Ainsi sont écartés toute pathogénicité résiduelle, toute interférence antigénique et le manque de spécificité. De plus, n'étant plus question de germe à pathogénie spécifique, toute thermosensibilité peut être exclue pour certains types de vaccins recombinants. La mise au point de vaccins polyvalents devient aisée.

La technologie générale de mise au point des vaccins recombinants repose sur la disponibilité de différents éléments : la source de l'ADN codant pour un antigène ou un épitope d'intérêt ; un véhicule pour transporter le fragment d'ADN, ou vecteur, pouvant servir seulement au transfert de gène ou aussi, pour certains, assurer l'expression de ce gène dans un hôte adéquat ; le dernier élément est une cellule hôte soit procaryote soit eucaryote, dont la multiplication permettra d'identifier le clone recombinant recherché grâce à des marqueurs spécifiques.

Le présent travail s'inscrit dans la dynamique de mise au point d'un vaccin recombinant bivalent contre le charbon bactérien et le charbon symptomatique. La construction de la souche vaccinale recombinante exprimant les deux antigènes immunogènes d'intérêt repose sur l'utilisation de la bactérie *Bacillus anthracis* comme vecteur exprimant à la fois son propre gène codant pour son antigène immunogène et celui de *Clostridium chauvoei* exprimant l'antigène immunogène de celui-ci.

L'utilisation de *B. anthracis* comme vecteur repose sur deux propriétés intéressantes : il est apathogène, parce que débarrassé du gène codant pour le facteur létal tout en conservant la faculté d'expression de l'antigène immunogène qui lui est spécifique.

L'identification du gène codant pour la protéine immunogène de *Cl. Chauvoei*, la seconde valence du vaccin, constitue l'objet de la présente thèse qui comporte deux parties :

- La première partie concerne les données bibliographiques faisant le point sur les connaissances en matière de pathologie charbonneuse des bovins, de vaccins et de la vaccination contre ces deux maladies, de l'étude moléculaire de déterminants antigéniques, de notions de recombinaisons génétiques applicables dans ce domaine

- La deuxième partie consacre les travaux personnels effectués qui sont présentés en plusieurs chapitres :
 - Matériel et méthodes
 - Résultats et discussions
 - Conclusions
 - Perspectives de recherches

PREMIERE PARTIE :
Données bibliographiques

I. Généralités sur les maladies charbonneuses

I.1 le charbon bactérien

I.1.1 Définition :

La fièvre charbonneuse ou charbon bactérien, est une maladie infectieuse, virulente, inoculable, commune aux animaux domestiques et sauvages et à l'homme, due à la multiplication dans l'organisme d'un germe spécifique, la bactérie charbonneuse, caractérisée par une évolution rapide, le plus souvent mortelle, avec des symptômes septicémiques d'allure asphyxique et hémorragique et un ramollissement hypertrophique de la rate.

I.1.2. Epidémiologie :

La maladie animale est cosmopolite avec une fréquence plus ou moins grande selon les pays. Dans les pays où sévit la maladie, la bactérie est collée au sol d'où le nom de maladie tellurique. Dans les pays indemnes, la maladie apparaît à la faveur de l'importation de fourrage, de sang, de poudre d'os, provenant des pays à charbon où elle sévit sous forme enzootique dans les troupeaux. Elle présente des caractères épidémiologiques variables en fonction des années (soit durant les années à charbon, caractérisées soit par des pluviométries, soit par de très grandes sécheresses, occasionnant la dissémination des spores) et des saisons (saison à charbon : printemps et été en Europe, durant et juste après la saison des pluies en Afrique).

Chez l'homme, la maladie revêt un caractère professionnel ou accidentel avec une forme interne mortelle, ou externe sous forme de pustule maligne qui, non traitée peut entraîner une septicémie mortelle.

L'agent infectieux en cause est nommé *Bacillus anthracis*. C'est un bacille volumineux, rectiligne, à bouts carrés et mesurant 6 à 8 µm de long sur 1 à 2 µm de diamètre, immobile, prenant la coloration de Gram, en chaînettes. Dans les produits pathologiques, il se présente sous forme de bâtonnets isolés ou en courtes chaînettes de 2 à 3 articles ; il possède aussi une capsule. En culture, il se présente sous forme de chaînes longues, sans capsule.

La bactérie se multiplie par scissiparité en milieu favorable ou eugénésique, et sporule en milieu défavorable ou dysgénésique (température de sporulation 18 à 42°C, nécessitant de l'humidité et de l'oxygène, toutes conditions non réunies sur l'animal vivant mais réunies dans un milieu en putréfaction même si le cadavre est enfoui sous terre.).

I.1.3 Mode de transmission :

Chez les animaux, l'infection se fait essentiellement par voie digestive (fourrages pollués,...).

Chez l'homme, l'infection se réalise le plus souvent par voie cutanée (maladie professionnelle). Une contamination accidentelle peut se produire par consommation de viande provenant d'animaux abattus pendant l'incubation ou l'évolution du charbon.

I.1.4. Pouvoir pathogène, antigénique et immunisant de *B. anthracis* :

Le pouvoir pathogène du bacille charbonneux repose sur sa virulence et sur sa toxicité. La virulence ou la capacité à proliférer dans l'organisme, repose sur l'existence d'une capsule de nature polypeptidique. La capsule est antigénique, provoquant l'apparition d'anticorps ne protégeant pas les bovins.

La toxicité est conférée par une toxine qui entraîne la formation d'anticorps neutralisants jouant un rôle important dans l'immunité anticharbonneuse. Cette toxine est de nature protéinique et composée de trois facteurs I, II et III, qui pris séparément sont atoxiques. Le facteur I est encore appelé le facteur oedématogène, car mélangé au facteur III, il produit des oedèmes chez le lapin. Le facteur II est le facteur immunogène. Le facteur III ou facteur létal, injecté avec le facteur II à la souris, entraîne la mort de cette dernière ((STANLEY et SCHMIT, 1961 ; STANLEY et SCHMIT, 1963).

Le pouvoir toxique de *Bacillus anthracis* la fait utiliser comme arme biologique à des fins militaires depuis la seconde guerre mondiale (un gramme de spore de *B. anthracis* peut tuer 10 millions de personnes correspondant à une dose létale cinquante (DL 50) d'environ 8000 spores par voie buccale) (IVINS et al, 1986 ; 1990 ; 1992).

Les différents antigènes de *Bacillus anthracis* donnent lieu à la présence dans l'organisme infecté d'anticorps de signification biologique différente mises en évidence par diverses réactions sérologiques après l'infection.

I.1.5. Diagnostic :

Le diagnostic du charbon bactérien, est à la fois :

- clinique, (troubles digestifs, entérite hémorragique)
- nécropsique, (septicémie hémorragique) avec du sang noir, épais , incoagulable, une rate hypertrophiée de couleur foncée et expérimental, directement (par isolement et identification du germe à partir de prélèvement de sang ou d'organes contaminés) ou indirectement (par examen microscopique).

I.1.6. Traitement :

Le charbon bactérien peut être efficacement traité s'il est institué rapidement par antibiothérapie ou par usage de la sérothérapie à l'aide de sérums hyper immuns (LUCCHESI, 1941).

L'activité de la toxine létale peut être neutralisée aussi bien *in vitro* qu' *in vivo* à l'aide d'anticorps monoclonaux, dirigés contre les épitopes de l'antigène protecteur (LITTLE, 1996).

I.2. Le Charbon symptomatique

I.2.1. Définition :

C'est une maladie bactérienne, toxi infectieuse, inoculable, frappant les bovins, les ovins, caractérisée par des troubles très graves et par l'apparition de foyers hémorragiques emphysémateuses. L'évolution est toujours mortelle.

I.2.2. Epidémiologie :

Cette maladie est connue depuis très longtemps décrite par CAHBERT en 1782, ensuite par ARLOIN, CANEVIN et THOMAS en 1887 (ARLOIN et al, 1887).

Le charbon symptomatique est cosmopolite ; dans les pays infectés, on peut distinguer des régions à charbon (maladies telluriques rattachées au sol de certaines régions).

La maladie sévit sous forme sporadique ou enzootique, mais pas épizootique.

I.2.3. Mode de Transmission :

La transmission du charbon symptomatique peut se faire soit sur le mode externe (d'origine traumatique par la plaie, lors des cas de morsures) soit par le mode interne (par ingestion des aliments ou de l'eau de boisson souillée, fréquente chez les bovins).

I.2.4 Pouvoir pathogène :

Cl. chauvoei, l'agent responsable du charbon symptomatique est un bacille à Gram positif produisant une spore déformante, centrale ou subterminale, anaérobie stricte.

Le pouvoir pathogène de *Cl. chauvoei* est due essentiellement à la toxine et non à la virulence du germe. La toxine est une endotoxine thermostable.

Parmi les hôtes naturels, les bovins sont souvent atteints et les ovins à la suite de complications traumatologiques. Le mouton est moins sensible que la souris qui est atteinte exceptionnellement. Le cheval et le porc sont résistants. La maladie a été observée chez le buffle, le chameau et le dromadaire. Pour l'expérimentation, le cobaye et le hamster sont utilisés.

I.2.5. Diagnostic :

Le charbon symptomatique peut être suspecté au plan clinique durant la présence d'une tuméfaction chaude d'abord, devenant froide et indolore ensuite.

Le diagnostic expérimental consiste à mettre en évidence le gène à partir de matériels prélevés au niveau des lésions.

Le diagnostic indirecte peut être réalisé en sérologie par l'utilisation de la séroneutralisation et de l'Elisa/Ac.

I.2.6. Plan de prophylaxie

Le plan de prophylaxie recommandé est le suivant :

- En milieu indemne, pratiquer la vaccination sur animaux de tous âges (les veaux).
Renouveler la vaccination 6 à 12 mois plus tard.
- En milieu infecté, faire une sérovaccination car les animaux peuvent être en infection latente. A défaut, on peut faire une vaccination simple.

I.3. Bases moléculaires de la prévention des maladies charbonneuses bovines

I.3.1 Prévention du charbon bactérien à *Bacillus anthracis* :

I.3.1.1. Principe de la prévention

La prévention contre le charbon bactérien repose sur la vaccination par l'utilisation de vaccins inactivés adjuvés à l'aide de l'hydroxide d'alumine.

Deux types de protection par l'immunisation active ou par la forme passive, sont utilisés.

Chez l'animal : la prévention du charbon repose essentiellement sur la prophylaxie médicale par injection annuelle d'un vaccin constitué de suspension de spores d'une souche atténuée de *B. anthracis*. L'immunité conférée par ce vaccin est excellente.

L'arrêt de la vaccination en région infectée, risque d'être suivie d'une réapparition importante de cas de charbon animal (POMERANTSU, 1995 ; POMERANTSU et al, 1997).

Le succès de la lutte contre le charbon animal repose donc sur une vaccination régulière appliquée aux espèces sensibles en zone polluée, associée à des mesures sanitaires de destruction des cadavres en cas d'apparition de la maladie (LEON LE MINOR et al, 1990).

I.3.2 Structure des antigènes immunogènes :

- L'antigène capsulaire :

La capsule bactérienne est faite d'une sorte d'exsudat qui reste fixée à la bactérie de manière plus ou moins forte (" Slime layer " = couche de limon, des anglo - saxons). L'antigène capsulaire de *B. anthracis* est composé d'un polypeptide qui intervient dans la virulence de la bactérie en empêchant la phagocytose par les macrophages. Il neutralise aussi le pouvoir bactéricide du sérum et rend le sang incoagulable. Il provoque l'élaboration d'anticorps anti capsulaires qui n'ont pas de pouvoir protecteur chez la souris (HANDBY et al, 1946 ; LEON LEMINOR, 1990).

La capsule est codée par le plasmide PXO2 de *B. anthracis* :

- Les antigènes somatiques :

Il sont constitués par des polysaccharides, mis en évidence par des réactions de précipitation, notamment la réaction d'Ascoli.

- La toxine :

Elle entraîne la formation d'anticorps neutralisants, jouant le rôle principal dans l'immunité anticharbonneuse. L'existence d'une toxine charbonneuse était soupçonnée depuis très longtemps ; différentes recherches ont permis au cours de ces dernières années d'en préciser la nature et les propriétés (FISH, D ; MAILLANDI, B, G ; DOBBS, JP ; LINCOLN, R, E, 1968). Des communautés antigéniques entre *B. anthracis* et d'autres espèces du genre *Bacillus* ont été constatées (POULET, P, 1972). Ainsi par immuno - diffusion en gélose, MICHEL et al 1973, ont montré l'existence de communautés antigéniques avec *B. cereus*, *B. subtilis* et *B. megaterium* par épuisement de sérums anti *B. anthracis* à l'aide de suspensions de ces trois bactéries, il est possible d'obtenir un réactif qui ne reconnaît plus que *B. anthracis* (MICHEL et al, 1973).

De même en immunofluorescence, des communautés antigéniques avec ces mêmes bactéries ont été enregistrées (BROOMS, S and GILBERT, 1978). L'épuisement de sérums anticharbonneux les rend spécifiques de *B. anthracis* sous forme bacillaire, mais non sous forme sporulée.

La toxine de nature protéique sécrétée par *B. anthracis* se compose de trois facteurs qui pris séparément sont atoxiques :

- L'antigène protecteur (PA) ou facteur II ou facteur immunogène, d'un poids moléculaire égal à 83 kilodaltons ,
- le facteur létal (LF) ou facteur III, d'un poids moléculaire de 85 kilodaltons,
- le facteur oedématogène (EF) ou facteur I d'un poids moléculaire de 89 kilodaltons.

Ces trois protéines sont codées respectivement par les gènes (*pag*, *lef* et *cya*) (Leppla, S, H, 1988 ; 1995 ; 1982), tous trois portés par le plasmide de virulence PXO1 de 185 kbp (FABIEN, BROSSIER et al, 2000).

Ces toxines sont responsables des effets physio - pathologiques observés au cours de l'infection (PEZARD, C et al, 1995 ; 1991).

L'action toxique de diverses souches peut varier suivant la production respective de ces trois facteurs.

I.3.1.3. Vaccins et vaccinations contre le charbon bactérien :

Les premiers travaux sur les vaccins, reviennent à Pasteur qui avait découvert en 1881 un processus d'atténuation de la virulence de *B. anthracis in vitro* à 42°C, puis fixation de l'atténuation par sporulation à 37°C.

Pasteur obtint ainsi deux types de vaccins :

Le vaccin de type Pasteur n°1 (le plus atténué) et le n°2 (le moins atténué). Cependant les vaccins ont un pouvoir pathogène résiduel (apparition parfois de charbon vaccinal) et une atténuation plus poussée de ces vaccins Pasteur, s'avérait néanmoins nécessaire, entrepris par divers auteurs (BESREDA, 1925 ; MAZUDE et HUSKA 1930 ; RAMON - STAND ; DELPY, 1931).

La souche vaccinale de DELPY est capsulée, mais non productrice de toxine, donc dépourvue de plasmide PXO1 (DELPY, 1931).

Les vaccins de type moderne ont suivi, notamment le vaccin Sterne dont la souche vaccinale est dépourvue du plasmide PXO2 et les vaccins chimiques (vaccins non microbiens, ne contenant que le facteur II, le facteur vaccinant).

Ce dernier type de vaccin relève désormais des techniques de fabrication des « vaccins recombinants ».

I.3.2. Prévention du charbon symptomatique à *Cl. Chauvoei* :

I.3.2.1 Principe de la prévention : (voir page précédente)

I.3.2.2 Structure des antigènes immunogènes :

Cl. chauvoei, produit une exotoxine létale et antigénique pouvant posséder un pouvoir immunogène.

La toxine produite par *Cl. Chauvoei*, entraîne la formation d'anticorps neutralisants jouant un rôle dans l'immunité anticharbonneuse.

Cl. chauvoei, produit une exotoxine létale et antigénique, des enzymes pouvant participer au pouvoir pathogène et des antigènes liés au corps bactérien ayant un pouvoir vaccinant.

Ainsi, *Cl. Chauvoei* possède des antigènes somatiques O (AgO), thermostables, communs à toutes les souches (vaccin univalent) et des antigènes flagellaires H (AgH).

1.3.1.2. Vaccins et vaccination contre le charbon symptomatique :

Un vaccin efficace contre le charbon symptomatique est une anaculture obtenue par formolage à 4 p1000 et une atténuation à 37°C pendant 8 jours d'une culture totale, adjuvée, à l'hydroxide d'allumine.

La méthode de protection immunitaire, n'a fait l'objet que de très peu de recherches : Des études ont été menées par STEFANINI DE GUZMAN sur le pouvoir immunogène des AgO et des AgH de *Cl. chauvoei* à partir de certaines souches à San Luis (Argentina) : ces études se sont basées sur des antigènes intra - extra cellulaire et sur le corps bactérien (paroi et flagelles) et sur les toxines produites.

Les expériences menées sur le pouvoir immunogène de *Cl. chauvoei* à San Luis ont donné un taux de protection de 90% pour les protéines flagellaires et de 100% pour les protéines du corps bactérien (Stefanini de GUZMAN, A, M 1999, Argentina) : Ces résultats montrent que le corps bactérien est le support de l'immunité contre le charbon symptomatique et que les antigènes flagellaires le sont moins à un degré légèrement significatif.

La protection des animaux par l'usage de protéines solubles (antigènes solubles) devient important dans le domaine vétérinaire.

II. Généralités sur les vaccins recombinants :

II.1. Principe de la fabrication des vaccins recombinants :

Ce sont des vaccins dont la souche vaccinale est construite par génie génétique ; reposant sur l'expression dans l'organisme à vacciner d'un gène étranger codant pour un antigène immunogène spécifique. Ce processus comprend plusieurs étapes :

II.1.1. Identification de l'antigène immunisant et isolement du gène correspondant :

Les meilleurs antigènes sont de nature protéinique ; toute protéine est codée par un gène spécifique et un seul.

La première étape consiste à identifier et à isoler le fragment de génôme codant pour la protéine d'intérêt, si la séquence est connue au préalable. Si la séquence d'un épitope est déterminée à partir de la séquence des acides aminés de la protéine purifiée, la synthétiser par voie chimique à partir de l'ARN messager (ARNm).

Le pouvoir antigénique du vaccin est fondamental, c'est lui qui suscite la synthèse d'anticorps protecteurs. Les meilleurs antigènes sont de nature protéinique. Toute protéine est codée par un gène spécifique et un seul.

La première étape consiste à identifier (par clonage / séquençage) et à isoler ce fragment de génôme, si la séquence est connue au préalable, sinon la synthétiser par voie chimique ou à partir de l'ARNm.

Exemple : la toxine botulinique induit la production d'antitoxines assurant une protection hautement spécifique de l'animal producteur. Le gène codant pour la toxine sera identifié (par voie descendante ou ascendante) et isolé grâce à des enzymes de restriction.

II.1.2. Choix des vecteurs (de transfert et/ ou d'expression) :

L'ADN synthétisé ou le fragment d'ADN génomique isolé doit être porté par un vecteur (plasmide, bactériophage, cosmide) capable de se répliquer et d'être transféré dans une cellule (l'hôte adéquat). Cette recombinaison *in vitro* nécessite des enzymes (enzymes de restriction) pour couper et d'autres pour lier (ADN ligases) insertion et vecteur.

II.1.3. Clonage de l'ADN recombiné :

Le mélange d'ADN d'hybrides recombinés et d'ADN non recombinés (ADN vecteur et fragments d'ADN à insérer) peut être introduit dans une bactérie par transfert (plasmide) ou infection (bactériophage) ou dans une cellule eucaryote en culture par transfection (ADN nu) ou par infection avec un virus à ADN.

Le plasmide recombinant transféré dans une bactérie va s'autorépliquer sans affecter la croissance de la cellule bactérienne. En étalant ces bactéries diluées sur de la gélose stérile, il sera possible d'isoler des colonies bactériennes correspondant chacune à une bactérie contenant un plasmide recombiné (clone bactérien). A l'inverse, le bactériophage recombinant va se reproduire en provoquant, lors d'un cycle lytique, la lyse des bactéries. Dans ces conditions l'on isolera des plages de lyse sur un tapis de bactéries correspondant à l'infection par un bactériophage recombinant.

II.1.4. Identification du clone recombinant :

Il s'agit d'identifier, d'aller "pêcher" le clone bactérien ou cellulaire, la plage de lyse, contenant l'ADN recombinant recherché.

A cet effet, il est utilisé des marqueurs de sélection, associés au vecteur ou au fragment d'ADN à détecter (gènes de résistance aux antibiotiques des plasmides, gène normal pour un hôte muté pour ce marqueur). Des sondes moléculaires peuvent aussi être utilisées pour rechercher le bon clone dans une population hétérogène par hybridation *in situ*.

II.2. Exemples de vaccins recombinants

II.2.1 Vaccins recombinants subunitaires :

Une partie isolée ou synthétisée de la protéine d'enveloppe d'un virus ou d'une protéine de surface d'une bactérie d'intérêts peuvent être utilisées comme une voie alternative à la place de ces microorganismes. Les clones recombinants de bactéries (ou de levures) produisent ces protéines en grandes cultures qui sont ensuite purifiées et utilisées comme vaccin.

II.2.2. Les vaccins recombinants vivants :

Il s'agit de vaccins constitués d'un vecteur vivant, viral ou bactérien, dépourvu de virulence pour l'espèce à vacciner, que l'on a rendu capable, par génie génétique, d'exprimer un ou plusieurs antigènes hétérologues susceptibles d'induire une immunité protectrice contre le pathogène dont ils proviennent.

II.2.3. Exemples de vaccins recombinants en santé animale :

II.2.3.1 Vaccins recombinants réalisés dans le Monde :

- Le vaccin vivant recombinant à partir d'une souche recombinante de *B. anthracis* exprimant un épitope immunogène de *Cl. perfringens* (J, C, SIRARD et al 1997, AMS, 1997).

- Le vaccin vivant recombinant thermostable contre la peste bovine utilisant une souche recombinante du virus de la vaccine (cow pox) exprimant la protéine d'enveloppe immunogène du virus de la peste bovine (ILMB, UC Davis, CA, USA, 1997).

II.2.3.2 Projet de fabrication de vaccins recombinants au Sénégal

- Vaccin vivant recombinant bivalent contre le charbon bactérien et le charbon symptomatique, utilisant une souche avirulente recombinante de *B. anthracis* (utilisé comme vecteur d'expression) exprimant l'épitope immunogène de *Cl. Chauvoei* (en cours de réalisation au Sénégal).
- Vaccin recombinant contre le botulisme des types C et D.

CONCLUSION PARTIELLE :

Le point sur l'état actuel des connaissances maintient que dans l'optique de la préparation d'une souche vaccinale recombinante, une recombinaison génétique concerne un génome vecteur et des gènes codant pour les antigènes immunogènes ciblés. A cet effet, des éléments sont connus et disponibles, d'autres sont inconnus et doivent être recherchés.

Les éléments connus et disponibles sont : l'antigène immunogène de *B. anthracis* et son gène correspondant. *B. anthracis* est lui même choisi comme vecteur à introduire, après recombinaison dans l'organisme dans la perspective de préparation d'un vaccin vivant recombinant.

Les éléments inconnus sont l'antigène immunogène de *Cl. Chauvoei* et le gène codant pour cet antigène.

L'objectif essentiel de ce travail de thèse est précisément l'identification de cet antigène et de son gène, un dispositif expérimental adéquat et aussi un plan permettant d'accéder à ces connaissances.

Deuxième Partie : Les travaux personnels :

Recherche de l'antigène immunogène de *Clostridium chauvoei*, candidat à la construction d'une souche vaccinale recombinante, bivalente contre les deux maladies charbonneuses du bovin.

I . Matériels et Méthodes :

I.1 Matériels :

I.1.1 Matériel biologique

I.1.1.1.Souche de *Cl. Chauvoei* :

La souche de *Cl. Chauvoei* utilisée pour la recherche de l'antigène immunogène est d'origine sénégalaise, isolée dans la région de Thiès à l'occasion d'un foyer de charbon symptomatique. Cette souche virulente, purifiée est rapidement conservée en milieu liquide anaérobie sous huile et sert de souche vaccinale pour la préparation d'un vaccin inactivé actuellement utilisé et conférant une immunoprotection chez les bovins (voir techniques vaccins).

I.1.1.2. Animaux de laboratoire :

L' animal de laboratoire répondant le mieux à *Cl. Chauvoei* (cobaye) est choisi, tant pour les tests d'activité biologique des fractions bactériennes que pour les études immunologiques. Quelques souris blanches sont aussi employées pour l'étude comparative des activités biologiques.

Au total, une centaine de cobayes fournis par l'IPD et élevés à la station expérimentale de Keur Massar située au village de Mbao (banlieue de Dakar), ont été nécessaires et une dizaine de souris.

Une fois inoculés, les animaux sont suivis régulièrement et le diagnostic est réalisé en cas de mortalité.

I.1.2. Sites expérimentaux et équipement de laboratoire :

Les travaux de biochimie se sont déroulés à l'IRD et à l'IPD. Les études bactériologiques et immunologiques ont eu lieu au LNERV/ISRA et à la FMPOS/UCAD.

Les études moléculaires ont été réalisées à l'IPP.

Le matériel utilisé au cours de ces études est très diversifié et comprend : Le matériel classique destiné aux prélèvements sanguins et le matériel de laboratoire comprenant l'équipement, le petit matériel classique et les produits et réactifs chimiques.

I.2. Méthodes

I.2.1. Etudes bactériologiques

I.2.1.1. Préparation du milieu de culture

Le milieu utilisé pour la culture de *Cl chauvoei* est constitué par une digestion papaïnique d'un mélange d'extrait de foie de bœuf glucosé à 10‰ et filtré sur filtre Seltz EKS.

La digestion papaïnique offre l'avantage appréciable d'être beaucoup plus rapide. Pour les besoins de la fabrication, ce milieu est conditionné de trois façons :

Le milieu contient :

De la viande de boeuf parée, hachée, du foie de boeuf paré, haché, de la papaine et de l'eau distillée. Le pH du milieu est ajusté à 7,6 - 7,8.

Technique de préparation du milieu viande foie :

- la viande de bovin est découpée et parée, le foie haché.
- La digestion papaïnique est réalisée dans un digesteur contenant de l'eau distillée à la température de 50°C, ensemble la viande et le foie. La papaine est alors introduite après homogénéisation, la température du mélange est portée à 70°C en une heure. Au bout de ce temps, la digestion est pratiquement terminée, la température est alors élevée à 85°C, pour détruire la papaine et arrêter son activité enzymatique. Le pH est vérifié qui doit être autour de 7,6 - 7,8. Le mélange est filtré sur papier filtre wattman 41 et du glucose est ajouté pour obtenir la concentration finale de 10‰ 1,5 à 2 litres de digestat glucosé ci-dessus sont filtrés dans deux erlenmeyers de 2 litres puis placés dans des flacons qui sont placés à l'étuve à 37°C avant d'êtreensemencés pour tester leur stérilité.

1.2.1.1. Isolement et caractérisation de *Cl. chauvoei*

Reviviscence de la souche :

0,5 ml du lot semence est repiqué sur le milieu bouillon viande foie glucosé à 10‰, sous huile en tube de 22 immédiatement après régénération de ce dernier. Au bout de 15 heures d'étuve à 37°C, la culture atteint une phase exponentielle : 3ml de cette primoculture sont réensemencés en bouillon viande foie glucosé (ou, en bouillon viande peptone) régénéré dans un erlenmeyer dans 1 litre après test de pureté bactériologique par coloration de Gram.

Passage sur bovin :

La souche bactérienne devra servir comme témoin de pathogénicité ; ce contrôle est effectué sur bovin. L'animal est non vacciné. L'inoculation par voie intramusculaire profonde de l'inoculum constitué à parties égales de 2,5 ml de la culture additionnée à 2,5ml de CaCl₂ à 5%, favorise le réveil des spores et la multiplication de *Clostridium*.

Récolte de sang à la phase septicémique :

15 à 20 heures après l'inoculation, l'animal est en phase préagonique : il est couché sur un côté et les quatre membres en extension, avec un oedème volumineux, localisé à la zone d'inoculation. La prise de la température rectale, révèle un début d'hypothermie et du sang est alors prélevé stérilement à la veine jugulaire dans un flacon de 500ml renfermant des billes de verre et du citrate de sodium à 5%. L'animal ayant succombé, il est procédé à l'autopsie après avoir ligaturé les vaisseaux sanguins afférents et du prélèvement du coeur. En lieu et place un os long, peut être prélevé. Ces prélèvements sont destinés à effectuer des hémocultures.

Ensemencement des bouillons VF glucosés sous huile, conditionnés en tube de 22

Aussitôt après la récolte, le sang estensemencé dans les bouillons VF glucosés sous huile en tube de 22, préalablement régénérés pendant 20 minutes. La dose d'inoculum de sang est d'environ 2 ml pour obtenir une bonne culture à démarrage rapide. L'incubation a lieu à 37°C à l'étuve, pendant 72 Heures, en présence de 10% de CO₂.

Identification de *Clostridium. chauvoei* :

A partir d'un tube de culture ayant présenté une croissance rapide accompagnée d'un trouble intense, sont réalisés un frottis et un état frais avec bactérioscopie avec ou sans coloration préalable. L'identification complète repose sur les caractères biochimiques.

I.2.2. Etudes biochimiques

La culture totale de *Cl. Chauvoei* a été séparée en trois parties :

Le milieu extracellulaire contenant les excréments de la bactérie et les éléments du milieu ;

Le milieu intracellulaire où l'on trouve les sécrétions de la bactérie qui peuvent se trouver hors de la cellule qu'après éclatement de la bactérie ;

Le corps bactérien c'est à dire la phase solide de la bactérie composée de la paroi, des substances diverses, la capsule éventuellement et les flagelles.

I.2.2.1. Extraction des protéines solubles et précipitation et dialyse :

Les trois parties sont séparées comme suit : __

Elle se fait à froid dans de la glace pour éviter la dénaturation des protéines.

La culture jeune de 24 à 48 heures de *Cl. chauvoei* sur milieu anaérobie foie glucosé à 10‰ est centrifugée dans des tubes corex en verre de 25 ml à une vitesse de 10000 tours /30mn (12000g) et le surnageant (milieu extracellulaire) est recueilli.

Le culot de centrifugation est repris avec du NaCl à 9‰, puis recentrifugé : le surnageant récolté rajouté au premier constitue le milieu extracellulaire.

Le culot de centrifugation est repris avec du tampon de lavage et est sonifié à une puissance de 100Hz pendant une minute et trois fois de suite.

Après la sonification, les extraits protéiques sont ensuite refroidis et centrifugés à 10000 tours pendant 30mn (12000g), et le surnageant récolté va constituer le milieu intracellulaire.

Le culot restant, est repris avec 1ml de tampon de lavage et recentrifugé à la même vitesse et le surnageant récolté (reste du milieu intracellulaire). Le culot renfermant les particules solides est repris avec 1 ml de tampon et constitue le corps bactérien qui est conservé à -20°C.

Précipitation des protéines solubles par le sulfate d'ammonium :

Les extraits des milieux intra et extracellulaires, sont soumis à une précipitation par une solution de sulfate d'ammonium à 80%.

Les solutions de volume égal à 1 litre reçoivent $550 \times 3 = 1650$ g de sulfate d'ammonium à 80%.

Un volume $v \approx 210$ ml de volume extracellulaire reçoit une quantité de sulfate d'ammonium de 120g suivant le tableau de correspondance. Le sulfate d'ammonium est versé au fur et à mesure jusqu'à sa dissolution complète dans le milieu extracellulaire à + 4°C . Une fois dissout, le mélange est laissé au repos à +4°C pendant un nuit afin de bien faire précipiter les protéines par le sulfate d'ammonium et on procède ensuite à la dialyse.

Dialyse du précipité des protéines totales :

Il est utilisé des membranes à dialyse traitées dans une opération qui se déroule comme suit : dans un becher de 1 litre contenant de l'eau distillée les morceaux de membrane découpés sont chauffés à 100°C pendant 20mn. Cette opération permet d'enlever le glycérol, une substance protectrice des membranes.

Ces dernières sont ensuite trempées dans un mélange à 50% d'eau distillée et d'ethanol, l'une des extrémités de la membrane est fermée et testée à l'aide d'eau distillée et son étanchéité est testée à l'aide de l'eau distillée versé à l'intérieur. Un second noeud est réalisé et la membrane est remplie de l'échantillon à dialyser et attachée.

La membrane est par la suite trempée dans un becher de 5 litres renfermant de l'eau distillée. La dialyse entamée est réalisée à + 4°C pendant une nuit.

Le lendemain, si une homogénéité du mélange est visible, la dialyse est arrêtée et la récolte du milieu extracellulaire effectuée.

Après, dialyse, les protéines totales peuvent être dosées par la technique CIVAS utilisant le réactif de Bradford.

1.2.2.2. Séparation des fractions protéiques par chromatographie :

C'est la méthode de chromatographie en phase liquide qui a été utilisée pour la séparation

Préparation des solutions tampons

- Tampons chlorure de sodium phosphate sont préparés à partir de la solution mère de tampon phosphate 10mM pH 7,7 mélangée à des solutions de NaCl de différentes concentrations (25 mM, 50 mM, 100 mM, 250 mM et 500mM).

- Le tampon phosphate 0,01M pH 7,7

Deux solutions stock de 1 litre sont souvent préparées:

Solution A : 0,2M KH_2PO_4 27,218g/litre d'eau distillée

Solution B : 0,2M Na_2HPO_4 , 12 H_2O 71,63g/litre d'eau distillée

La solution tampon phosphate 0,1M est obtenue en mélangeant 195 ml de la solution A à 305 ml de la solution B et en ajoutant 500 ml d'eau distillée. La solution est mélangée et diluée à 0,01M et le pH ajusté à 7,7.

Les solutions de tampon phosphate 2mM et 5mM sont préparées à partir de la solution mère préparée ci dessus.

Technique de fractionnement

Le fractionnement des protéines totales est obtenu à l'aide d'une colonne d'échangeur anionique de diethyl ethyl amino ethyl (DEAE) sépharose A CL 6B. La colonne utilisée a un diamètre de 2cm et une hauteur de 8cm. La colonne est préalablement équilibrée avec une solution de tampon phosphate 2 mM. Les échantillons protéiques sont déposés sur la colonne et élués par utilisation d'un gradient continu de force ionique croissante de solutions tampons de concentrations différentes. La séparation s'effectue à une vitesse d'écoulement qui est réglée à 2ml/min.

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec un tampon d'équilibration phosphate de potassium 20mM à pH = 8 et en appliquant un gradient linéaire et continu de chlorure de sodium.

Après la précipitation par le sulfate d'ammonium à 80% et la dialyse contre de l'eau distillée, le fractionnement des protéines solubles est réalisé à l'aide d'une colonne anionique de DEAE sépharose CL6B.

La colonne est lavée avec une solution tampon phosphate 2mM à pH 7,7.

Les protéines sont éluées à l'aide de solutions tampons suivantes de concentration différente :

Tampon phosphate 2mM - 5mM - 10mM.

Tampon NaCl 25mM additionné de tampon phosphate 10mM

Tampon NaCl 50mM additionné de tampon phosphate 10mM

Tampon NaCl 100mM additionné de tampon phosphate 10mM

Tampon NaCl 250mM additionné de tampon phosphate 10mM

Tampon NaCl 500mM additionné de tampon phosphate 10mM
trois essais /tampon éluant, le volume de l'éluat/échantillon est de 2ml/mn.
La colonne est coulée et l'extrait protéique élué.

I.2.2.3. Dissociation des glycoprotéines du corps bactérien :

Principe:

La dissociation des glycoprotéines dans lesquels le glycopolyoside est solidement lié à la protéine est difficilement réalisable, du fait que les différentes méthodes drastiques qui ont été proposées ne ménagent en aucun cas ni la protéine ni le glycopolyoside.

Actuellement, cette dissociation a pu être réalisée grâce à des méthodes d'hydrolyse chimique ou enzymatique.

Ces deux méthodes récentes offrent l'avantage de respecter l'intégrité de la molécule glucidique.

La glycoprotéine est ensuite déprotéinisée par des méthodes classiques.

Méthode chimique

- Hydrolyse

La dissociation des glycoprotéines est réalisée par des solutions salines concentrées (CaCl_2 à 10%), par des solutions d'urée à 50% (HIDLEMAN et al, 1949); Celle des glycoprotéines et des glycopolyosides par des solutions alcalines: soude ou potasse à des concentrations variant de 2 à 10% (MORNER, 1889; LINDBERG et al, 1953, 1956), baryte à 10% (FRANCKEL et JELLINCK, 1951; WERNER, 1952 ; RIMINGTON, 1931, 1929 ; COLLINS et al, 1953 ; SMITH et al, 1954 ; MORNER, 1955).

L'hydrolyse a lieu après avoir mélangé à parties égales la fraction protéique supposée renfermée des glycoprotéines et la solution de CaCl_2 à 10% pendant un demi - heure à l'issue de laquelle, une centrifugation à 5000 tours/mn pendant 30mn est réalisée.

- Précipitation des fractions protéiques

Les fragments protéiques sont ensuite éliminés par une précipitation tannique (MORNER, 1955 ; LINDBERG et al, 1953), phosphotungstique (FURTH et BRONO, 1937, 1962), mercurique (LEVENE et MORY, 1958), plombique (FRANCKEL et JELLINCK, 1951) par la formation d'un gel par agitation avec un mélange de chloroforme et d'alcool amylique (LEDBERGER et al, 1953).

La formation de sels avec les protéines peut être évitée au cours de la purification par l'addition de formol : Les protéines dénaturées précipitent (MASSAMINE et al, 1943 ; 1951 ; 1956).

Il est hors de doute qu'une hydrolyse prolongée en milieu très alcalin s'accompagne d'une altération de la glycoprotéine. On sait en particulier que l'action de la soude N/1 à 100°C pendant 16 heures, libère sous forme d'ammoniac 50% de l'azote du glycoprotéine et détruit une partie du mannose (NEUBERGER, 1928).

La précipitation a été effectuée avec l'acétate de plomb qui est mélangé à volume égal à l'hydrolysate et l'ensemble incubé à la température du laboratoire pendant 30 mn à l'issue desquelles, une centrifugation à froid à 5000 tours/mn pendant 30 mn est réalisée.

Après la centrifugation, on enlève le surnageant représentant les glycopolyosides (qui est dosé par la méthode de Fehling pour confirmer la présence des glucides), le culot représentant les protéines est purifié par une colonne HPLC et dosé par la méthode de BRADFORD

Après la purification, un test d'immunisation sur cobayes pendant une période de 14 jours est fait afin d'évaluer la cinétique des anticorps produits.

Méthode enzymatique

- Hydrolyse :

Les glycoprotéines sont hydrolysées par des enzymes protéolytiques (pepsine, trypsine cristallisée) qui sont sans action sur le glycopolyoside (RIMINGTON, 1931).

Précipitation des fractions protéiques:

Elle est réalisée avec l'acide acétique concentrée ou par de l'alcool. Les impuretés d'origine protéique sont éliminées par un passage sur de la terre à fouillon, par une extraction par le phénol ou par le réactif de Lilyod. La méthode de Neuberger (NEUBERGER, 1928), met à profit l'acétylation des acides alpha aminés en solutions neutres ou légèrement alcalines par les cétones ($\text{CH}_2 = \text{CO}$). Les N acetyl aminoacides, solubles dans les solvants organiques sont extraits par le chloroforme : le glycopolyoside est ensuite acétylé par l'anhydride acétique et la pyridine à 2°C pendant deux jours, séparé par des acides aminés demeurés intacts par une extraction chloroformique, désacétylé par la lithine à PH 9,0 précipité par l'éthanol.

Au cours de nos recherches, la dissociation des glycoprotéines de la fraction 3a du corps bactérien de *Cl. chauvoei* a été réalisée par la méthode chimique.

I.2.2.4. Dosage des fractions protéiques :

Principe :

Les protéines sont dosées selon la technique (CIVAS, 1984), utilisant le réactif de BRADFORD (BRADFORD,1976). Cette technique est basée sur la transformation de la forme leuco (brun orange) du bleu de coomassie G250 en une forme bleue due à la formation d'un complexe entre le colorant et les groupements NH_2 des protéines. Elle permet de doser des quantités de protéines inférieures à 2 μg .

Préparation du réactif de BRADFORD :

dans un bécher de 100ml, mettre :

- Bleu de coomassie G250	0,060g
- Acide perchlorique	3g
- Chlorure de sodium	2,92g
- Eau distillée qsp	100ml

Le bleu de coomassie est d'abord mélangé à l'acide perchlorique et le chlorure de sodium est rajouté à l'ensemble qui est filtré sur papier filtre Wattman n°1. La densité optique est déterminée à 465nm et est ensuite ramenée à 1,3 - 1,5 à l'aide d'une solution d'acide perchlorique (p/v) contenant du chlorure de sodium à 0,5 M.

Réalisation du dosage :

1,5 ml du réactif de BRADFORD est additionné à un volume égal de solution protéique de 2 à 25 μg de protéines. Après mélange, la lecture spectrophotométrique est effectuée à 595 nm contre un mélange v/v de réactif et d'eau distillée. La densité optique varie linéairement avec la quantité de protéines présente dans l'échantillon jusqu'à 10mg. Une gamme étalon d'albumine est réalisée pour la détermination des concentrations protéiques par la correspondance.

Une DO de 0,056 lue à 595nm correspond à 5 μg de protéines

Une DO de 0,150 lue à 595nm, correspond à 10 μg de protéines.

. Purification des fractions protéiques par électrophorèse :

Electrophorèse analytique sur gel de Polyacrylamide

Principe :

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide consiste à assurer une identification des fractions protéiques collectées après chromatographie en phase liquide, par suite d'une migration dans un champ électrique.

Préparation du gel de Polyacrylamide

L'électrophorèse est généralement réalisée dans des colonnes de verre (0,5 x 10) avec des gels à 7,5% (p/v) d'acrylamide selon la technique de Maizel (MAIZEL, 1964).

Technique de MAIZEL

Le gel de polyacrylamide est préparé par mélange à parties égales des quatre solutions suivantes:

- Solution n°1

Acrylamide	40g
NN - méthylène - bis - Acrylamide	1,06g
Eau distillée QSP	100ml

- Solution n°2

- diméthyl aminopropionitrile à 2% (v/v) dans la solution mère de tampon Tris - Glycine diluée 2,5 fois.

- Solution n°3

Ferricyanure de potassium à 0,03g% (P/V)

- Solution n°4

Persulfate d'ammonium 0,48g% (P/V), solution préparée extemporanément avec du persulfate préalablement démaiché (au dessiccateur) les trois premières solutions sont d'abord mélangées et dégazées au speed - vac pendant 15 à 20 mn avant d'ajouter la quatrième.

La concentration finale en Acrylamide est obtenue par dilution convenable de la solution n°1.

Mise en oeuvre de la technique d'électrophorèse

L'électrophorèse unidimensionnelle des protéines est réalisée sur gel de polyacrylamide.

Le gel ainsi préparé est coulé dans des moules verticaux de 16cm de long sur 18 cm de large.

Les chambres d'électrophorèse contiennent du tampon tris 0,25 M et de la glycine 1,92 M pH 8,5 dilués extemporanément au 1/10.

L'échantillon protéique est concentré dans le sucre glace environ une heure et additionné de 10% (v/v) d'une solution aqueuse de bleu de bromocrésol (3 gouttes) à 0,5% et est déposé sur le gel à l'aide d'une micropipette Gilson (2 à 50 µg de protéines contenues dans un volume de 20 à 100µl). Un courant de 4 - 5mA par gel est appliqué, jusqu'à migration de l'indicateur sur une longueur de gel de 10cm (générateur à 150V).

Après 3 heures de migration, les bandes protéiques sont visualisées par deux méthodes différentes.

Coloration et décoloration des protéines:

- coloration au bleu de Coomassie des protéines :

Les gels sont démoulés et colorés pendant deux heures dans une solution de bleu de coomassie (CBB) R à 0,25% contenue dans un petit bac dans un mélange méthanol/acide acétique /eau distillée dans les proportions suivantes 5/1/4.

- Décoloration des bandes :

Elle s'effectue en éliminant le liquide colorant et en rinçant rapidement le gel à l'eau. Le gel est ensuite plongé dans la solution de décoloration constituée par un mélange méthanol/acide acétique /eau distillée dans les proportions suivantes 3/1/10 pendant 24 heures à 37°C, en changeant trois fois le bain. Un morceau de mousse ou de kleenex peut servir à absorber le bleu.

Après la décoloration les rapports de migration des bandes protéiques sont déterminés par mesure (longueur de la bande/longueur du gel).

Coloration au périodate par la réaction de Schiff

Pour la mise en évidence des glycoprotéines, nous avons utilisé la méthode préconisée par CHIPPENDALE et BECK (CHIPPENDALE et BECK, 1966) après un séjour d'une heure dans la solution suivante :

Acide périodique	2g
Acide acétique	6g
Eau distillée QSP	200ml

Le gel est rincé une heure dans de l'eau distillée, puis placé dans le réactif de Schiff pendant encore une heure. Il est ensuite stocké dans une solution de métabisulfite de sodium à 1% à l'obscurité jusqu'à disparition de l'excès de colorant : les protéines présentant une partie glycosylée apparaissent fortement colorées en rouge.

Dosage des fractions protéiques

Dans un tube à essai, 1,5 ml de réactif de BRADFORD sont mélangés à 1,5 ml d'échantillon fractionné. L'ensemble est vortexé et laissé trois minutes avant de procéder à la lecture des densités optiques à 260nm. Un témoin (Blank) est réalisé avec le tampon d'élution correspondant. La cuve est toujours bien nettoyée à l'acétone avant de changer d'échantillon. Dans la mesure où les quantités supposées de protéines s'avèrent faibles après ce dosage, la détermination des concentrations en fractions protéiques peut être réalisée par comparaison à une gamme étalon d'albumine à 0,5mg/l utilisée à des concentrations de 2 4 6 8 10µg/ml.

1.2.3. Etudes immunologiques :

1.2.3.1. Activités biologiques des protéines totales sur souris blanches et des fractions protéiques sur cobayes :

- Activité biologique des protéines totales sur souris blanches :

Il est réalisé sur 9 souris deux pour les protéines extracellulaires, deux pour les protéines intracellulaires et deux pour les protéines du corps bactérien.. Un témoin est retenu pour chaque compartiment.. Ces dernières reçoivent par voie sous - cutanée 200µl d'extrait total protéique additionné de 200µl de solution de CaCl₂ à 5%. Les animaux sont suivis quotidiennement. A la mort, un frottis de sang est réalisé à partir d'une ponction cardiaque pour confirmer l'activité de l'extrait protéique obtenu après extraction.

Les souris témoins ne reçoivent que le milieu de culture à titre de comparaison avec les essais.

- Activité biologique des fractions protéiques sur cobayes :

Il est réalisé à partir de huit lots de deux cobayes pour le milieu extracellulaire, deux lots de deux cobayes pour le milieu intracellulaire et de deux lots de deux cobayes pour le corps bactérien.

La procédure est identique à la précédente.

1.2.3.2. Etude du pouvoir immunogène des fractions protéiques :

Test d'immunisation sur cobaye

Les fractions solubles sont formolées (5 ml de fraction est mélangé à 0,03 ml de formol à 40% donnant une dilution finale de 6‰), tandis que les fractions liées au corps bactérien ne sont pas formolées, car non toxiques, puis inoculées à des cobayes par voie intramusculaire profonde à raison de 200µl/animal.

Ainsi, 8 fractions extracellulaires, deux intracellulaires et deux du corps bactérien sont inoculées à 4 cobayes à chacune ; les deux cobayes témoins par compartiment, reçoivent une injection de milieu de culture stérile.

Le sang de tous les animaux est prélevé avant l'inoculation, une et deux semaines après l'inoculation pour apprécier l'évolution des anticorps sériques (cinétique des anticorps) : Les animaux inoculés sont suivis journalièrement pendant une période 14 jours (les commémoratifs sont notés sur chaque animal et à la mort, un diagnostic est réalisé), à l'issue de chaque semaine des prélèvements de sang pour récolte de sérums à tester par ELISA anticorps, sont réalisés.

Test d'épreuve :

La souche d'épreuve utilisée est la souche sénégalaise originaire de Thiès, pathogène et revivifiée par culture de 15 à 18 heures.

Au bout de deux semaines du test d'immunisation, les animaux survivants reçoivent par voie intra - musculaire profonde une dose de 200µl d'une suspension bactérienne additionnée de 200µl de CaCl₂ à 5%. L'évolution de la tumeur s'y observant aisément au point d'inoculation. Tous les animaux inoculés sont suivis régulièrement pendant une période de deux semaines.

A l'issue du test d'immunisation, les animaux survivants font l'objet de prise de sang pour la recherche d'anticorps sériques par le test ELISA anticorps.

1.2.3.3. Suivi de la cinétique des anticorps et dosage des immunoglobulines :

Les sérums de cobaye sont récoltés pendant les trois périodes : avant inoculation, une semaine après inoculation et deux semaines après l'inoculation des fractions protéiques, et sont soumis à des tests séro - immunologiques tels que l'Enzym linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), le dosage des classes d'immunoglobulines IgG et IgM pour une étude de la cinétique des titres et teneurs en anticorps anti - *Cl. Chauvoei* produits au cours de l'immunisation.

Les sérums de cobayes ayant reçu les parties protéiques issues de la dissociation des glycoprotéines du corps bactérien sont testés comme précédemment dans la perspective du choix de la fraction protéique la plus immunogène de *Cl. chauvoei*.

- Principe des tests ELISA

A l'issue du test d'épreuve, le suivi de la dynamique des anticorps produits au cours de l'immunisation est réalisé grâce à la méthode ELISA indirecte

Les tests sérologiques sont utilisés pour mettre en évidence, la présence d'anticorps ou d'un antigène dans le sérum ou le plasma d'un animal suspect par la formation d'un complexe immunitaire anticorps - antigène.

Parmi eux, les tests ELISA pour le dosage des anticorps ou des antigènes sont couramment employés.

Ces tests ELISA mettent à profit la propriété que possèdent certains matériaux insolubles, notamment les polystyrènes, de fixer des molécules protéiques telles que les anticorps et les antigènes par le biais de liaisons chimiques réversibles.

De nombreuses variantes des tests ELISA existent et peuvent être classées sur la base des différents critères. Le critère méthodologique est couramment employé et permet de distinguer:

- Les tests par capture de l'anticorps
- Les tests par capture de l'antigène
- Les tests en sandwich avec deux anticorps

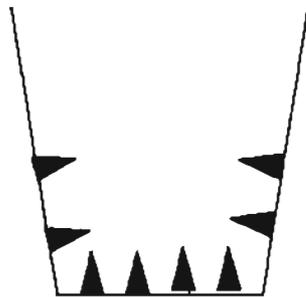
Dans chaque cas, le principe et le protocole sont similaires.

Le choix du test est fonction des types d'anticorps ciblés (polyclonaux purifiés ou non par affinité monoclonale unique ou non) ou du niveau de pureté de l'antigène et du type de plaque de microtitration (adsorption élevée pour petite molécule ou pour grosse molécule protéique)

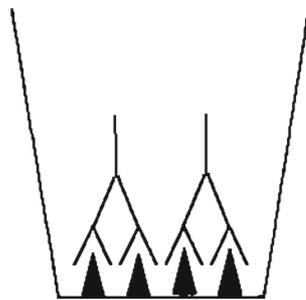
Test Micro - ELISA de détection d'anti corps sériques anti - *Cl. Chauvoei* :

- Schéma général

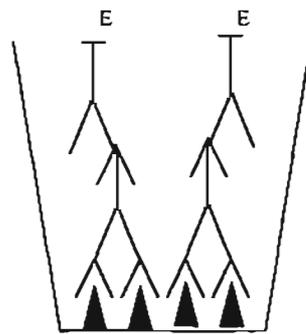
Schéma général des tests ELISA de détection d'anticorps sériques



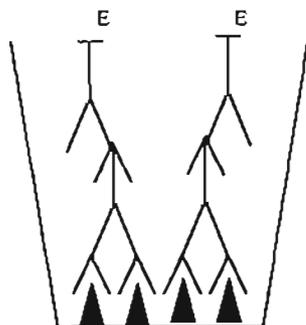
① Fixation de l'antigène



② Formation du complexe antigène - anticorps



③ Fixation de l'antisérum marqué à l'enzyme



④ Révélation du complexe immun par apparition d'une coloration verte

- Principe

Il s'agit de mettre en évidence la présence éventuelle d'anticorps spécifiques dans le sérum d'un animal suspect.

. Dans un premier temps, les parois internes des cupules d'une plaque ELISA sont sensibilisées par adsorption de l'antigène *C1 chauvoei*.

. la seconde étape met en contact le sérum à tester avec l'antigène adsorbé et conduit à une réaction antigène anticorps si le sérum renferme des anticorps spécifiques.

Un antiserum spécifique du sérum à tester et marqué par une enzyme (un conjugué) est ajouté dans un troisième temps pour se fixer au complexe antigène - anticorps déjà formé.

Enfin, une quatrième étape consiste à révéler cette fixation par adjonction d'un chromogène de l'enzyme du conjugué (peroxydase).

La coloration qui se développe est proportionnelle à l'intensité des réactions antigène - anticorps de la deuxième et de la troisième étape. Elle peut être appréciée à l'œil nu ou mesurée avec précision par un spectrophotomètre qui l'exprime en densité optique (D.O.).

Il est à noter que les conditions optimales de travail devront être définies par des essais ou titrages réalisés avec des sérums témoins positifs et négatifs connus :

Quantité de réactif par cupule, dilution standard pour le criblage des sérums, temps de réaction et température d'incubation pour chaque étape, méthode de lavage des cupules etc. Le trajet optique pour la lecture des D.O au spectrophotomètre dépendra des chromogènes utilisés comme révélateur.

- Récolte et stockage des sérums

Le sang prélevé à l'oreille de l'animal sur tube sec (sans anticoagulant) doit être traité de la manière suivante pour la récolte du sérum à utiliser dans les tests ELISA.

Les tubes contenant le sang sont laissés au repos à la température du laboratoire et à l'abri du soleil pendant 8 à 12 heures au maximum.

. Centrifuger à 3000 tours/mn pendant 10mn (1500g)

. Le sérum est recueilli (surnageant) dans un ou plusieurs cryotubes à l'aide d'une micro - pipette de 1000 µl litres en y ajoutant éventuellement un préservatif (benzoate de sodium à 1‰).

Les numéros d'identification sont portés sur les cryotubes et les sérums sont ainsi stockés à - 20°C ou à - 80°C au congélateur.

On évitera de décongeler les sérums plus de deux fois.

- Préparation des tampons

Les différents réactifs biologiques ci - dessus mentionnés ne sont pas utilisés purs. Ils doivent être dilués dans des milieux appropriés pour être portés aux concentrations de travail définies par les essais.

- Tampon de dilution de l'antigène

Na₂CO₃ 1,55 g
NaHCO₃ 2,93 g
Eau distillée 1000ml

Au besoin, le p H à 9,6 est ajusté avec une solution 1N de NaOH ou une solution à 10% d'acide orthophosphorique. Ce tampon peut se conserver une semaine à + 4°C.

- Tampon PBS PH 7,2 à 7,5 pour le lavage, le blocage et la dilution des sérums et du conjugué

NaCl	8,0g
Na ₂ HPO ₄	1,4g
KH ₂ PO ₄	0,2g
KCl	0,2g
Eau distillée	1000 ml

Ajuster le pH à 7,2 - 7,5 comme ci - dessus.

Ce tampon additionné de 0,5% d'albumine de mouton servira de blocage : cette préparation est extemporanée.

- Pour les lavages, du tween 80 (un détergent) est ajouté à raison de 5 ml /litre de tampon sans albumine.

- Les sérums et le conjugué sont dilués avec le tampon + tween + 0,5% d'albumine (adjonction extemporanée de l'albumine).

- Tampon PH 4,0 de dilution du révélateur

Na - Citrate	5,65g
Acide Citrique H ₂ O	6,45g
Eau distillée stérile	500 ml

Ajuster à PH 4,0 comme précédemment. Cette solution se conserve à +4°C pendant une semaine.

- Solution de Tetra Méthyl Benzydine (TMB) = chromogène de l'enzyme

Tampon PH 4,0	10 ml
TMB	100 µl
H ₂ O ₂ à 30%	100 µl

L'arrêt de la réaction, est obtenu avec l'acide phosphorique 1M et la lecture à 450 nm

Préparation de l'antigène de sensibilisation des plaques

L'antigène *C. chauvoei* utilisé dans l'expérimentation a été préparé comme suit :

- Culture du germe sur milieu viande foie glucosé
- Fractionnement par la chromatographie en phase liquide (CPL). La protéine antigénique est représentée par la fraction obtenue qui a été concentrée à l'aide de sucre glace.

L'antigène (fraction protéique préparée est aliquotée puis conservée à - 20°C jusqu'à son utilisation.).

Préparation du conjugué

Préparation du conjugué :

- Réactifs

Peroxydase
 Solution d'antiglobulines
 Tampon carbonate - bicarbonate 0,05M, pH 9,6
 Tampon PO₄, 0,01M, pH 7,8
 Solution stock A: NaH₂PO₄ 0,2M
 Solution stock B: Na₂HPO₄ 0,2M
 Tampon de travail A 42,5ml

B 475,5ml

Compléter à 10 litres avec de l'eau distillée et ajuster le pH à 7,8 avec de l'acide phosphorique à 10P100

- . Solution de NaCl, 2M
- . DE52 - cellulose
- . Séphadex G50

- Conjugaison :

Ratio: protéines des antiglobulines: 10 mg/ml dans un volume x
peroxydase: 1mg/ml dans un volume 10x

On procède par les étapes suivantes:

1. la quantité requise d'antiglobulines est diluée dans le tampon carbonate bicarbonate pH 9,6. Dialyser une nuit à +4°C contre le même tampon pH 9,6
2. Le même jour, du séphadex G50 est équilibré à pH 7,8 avec le tampon 0,01MPO₄, puis la colonne de chromatographie est remplie puis le gel est laissé se tasser une nuit à +4°C (en fermant l'ouverture supérieure).
3. Dans les mêmes conditions, une colonne de DE 52 - cellulose (une petite colonne) est préparée, également.
4. A la fin de la dialyse les antiglobulines, sont transférées dans la solution 10x de peroxydase et laissées en dialyse pendant 24 heures à + 4°C.
5. Au bout de ce temps, le conjugué est récolté et la peroxydase non fixée, éliminée par filtration à travers le gel de sephadex G50. Le conjugué est contenu dans les premiers éluats.
6. Le conjugué ainsi élué doit être à nouveau purifié puisqu'il refferme toujours des fractions non désirées : Globulines non marquées et insuffisamment marquées ; globulines surmarquées.

Les fractions non désirées sont éliminées par la chromatographie sur échangeur d'anions (DE52).

. Le conjugué est versé dans la colonne de DE52, puis du tampon PO₄ pH 7,8, est ajouté.

. A partir de la solution 2M de NaCl, des dilutions de 0,1 - 0,25 - 0,4 - et 0,8M de NaCl sont préparées dans la tampon PO₄.

. l'élution est entamée avec le premier tampon NaCl 0,1M, puis le second (0,25M), ainsi de suite (gradient de tampon NaCl - Phosphate) en récoltant séparément les éluats issus des différents tampons.

. A la fin de la chromatographie, une petite quantité de chaque éluat est prélevée et diluée au 1/100. Pour chaque dilution d'éluat, la densité optique (D.O) à 280nm et à 495 nm est mesurée. L'éluat qui donne le résultat ci dessus représente la fraction à conjugaison optimale. Cette dernière fraction est recueillie les autres éluats jetés :

do à 495 nm/ do à 280nm = 2,5 à 7,0

Le conjugué ainsi purifié est ensuite concentré sur filtre Amicon puis additionné de 0,02% d'une solution d'Azide de sodium.

Il est ensuite titré et stocké à + 4°C après l'avoir dilué au 1/2 dans de la glycérine pure.

Titrage du conjugué :

Consiste à déterminer le titre optimum de son utilisation

Substrat de révélation :

C'est le Tetra Méthyl Benzidine (TMB), en mélange à parties égales avec de l'eau oxygénée à 30% qui est utilisé comme révélateur de l'enzyme du conjugué.

Réalisation du test.

Il comporte les étapes suivantes :

- Sensibilisation des plaques : (plaques dynatec Immunolon nd M129B, 96puits, fonds plats)

L'antigène *Cl. chauvoei* (fraction protéique) purifié par la chromatographie en phase liquide et concentré est dilué à 1‰ avec du tampon carbonate bicarbonate pH 9,6. Cette solution antigénique est répartie dans la plaque ELISA à raison de 100µl/cupule. On scelle et on homogénéise par agitation douce et on laisse incuber une nuit à + 4°C.

Les cupules de la rangée verticale I de la plaque serviront de témoin « Blank » au moment de la lecture et ne sont pas sensibilisées.

Le lendemain, la plaque est vidée et rincée rapidement (un rinçage) avec un tampon de lavage PBS - Tween 20. la plaque est ensuite égoutée sur éponge.

- Blocage :

Le blocage consiste à parfaire la saturation des pores des parois internes des cupules pour éviter la fixation non spécifique d'anticorps sur l'antigène de sensibilisation.

Le tampon de blocage est le PBS - Tween additionné de 0,5% d'albumine provenant d'une espèce animale autre que celle dont le serum est testé.

Ce tampon est distribué à raison de 150µl par cupule sensibilisée. L'incubation a lieu à 37°C sous agitation pendant trente minutes.

Réaction antigène - anticorps

Après le temps de blocage, la plaque est vidée. Les sérums dilués (dilution unique au 1/200) sont distribués à raison de 100 µl/ cupule et deux cupules par sérum.

Le milieu de dilution des sérums est le tampon PBS - Tween 20 sans albumine. Chaque plaque a reçu en même temps que les sérums à tester, un sérum témoin positif et un négatif de référence choisi parmi nos animaux d'expériences.

L'incubation a lieu à 37°C pendant 30 mn sous agitation.

A la fin de l'incubation, la plaque est vidée puis rincée rapidement et ensuite trempée deux fois 5 mn dans le tampon PBS - Tween 20. Après le dernier trempage la plaque est égoutée sur éponge.

Réaction du conjugué.

Le conjugué est porté à la dilution de travail retenue lors des titrages (ici, 1‰). Le milieu de dilution est le tampon PBS Tween additionné de 0,5% d'albumine.

La dilution du conjugué est extemporanée.

Le conjugué dilué est distribué à raison de 100µl/cupule sensibilisée. L'incubation est faite dans les mêmes conditions que pour les sérums.

Au bout de ce temps, la plaque est vidée rapidement, rincée puis trempée trois fois 5 minutes avant d'être égoutée.

Révélation et lecture des plaques

Le mélange Tetra Méthyl Benzidine (TMB) eau oxygénée, indiqué plus haut comme révélateur est distribué à raison de 100 µl/ cupule, y compris la rangée verticale 1.

L'incubation a lieu à 37°C pendant 20 minutes, sous agitation et à l'obscurité.

Au bout de ce temps, la réaction est arrêtée avec une solution 1M d'acide orthophosphorique à raison de 100µl / cupule.

La lecture des résultats est faite par un spectrophotomètre muni d'un filtre de 450nm de longueur d'onde. L'intensité de la coloration de chaque cupule de la plaque est exprimée en densité optique (D.O).

Interprétation des résultats

La D.O moyenne de deux cupules de chaque sérum testé représente le résultat de ce sérum. Ce résultat peut être converti en pourcentage de positivité (PP) par rapport à la densité optique moyenne des cupules du témoin de référence de la plaque.

La D.O ou le pp représentant le seuil de positivité peut être défini à partir de plusieurs centaines de sérums négatifs provenant d'une zone indemne en comparaison avec le témoin de référence positif. Dans ce cas, il sera appliqué à l'ensemble des plaques.

Le seuil peut également être déterminé pour chaque plaque à partir des densités optiques de ses propres témoins positif et négatif.

Dans la présente étude, c'est la valeur 0,100% de D.O qui est retenue comme seuil de positivité.

Dosage direct des classes d'immunoglobulines

- Principe :

Cette méthode consiste à déterminer la teneur en immunoglobulines G et en immunoglobulines M du sérum.

Les immunoglobulines supposées présentes dans le sérum ou le calibrateur peuvent entraîner une agglutination immunologique avec le conjugué spécifique de l'animal.

L'intensité de l'agglutination est proportionnelle à la concentration en immunoglobulines de l'échantillon (essai sérums) et peut être mesurée par turbidimétrie (BAUDHIER, S and DAB, F, 1996).

Technique de BAUDHIER

Dans la mise en oeuvre de ce test, le conjugué anti IgG de chèvre est utilisé à 2,4 g/l

Le tampon tris de dilution du conjugué IgG pH 7,2 est à 72 mmoles/l

Le polyéthylène glycol 6000 à 1,5%

Le conjugué anti IgM de chèvre est utilisé à 4,5 g/l

Le tampon tris de dilution du conjugué IgM pH 7,2 est à 84 mmoles

Le polyéthylène glycol 6000 est à 1,8%.

Procédure manuelle du test

Il s'agit d'un dosage direct.

Les sérums et les conjugués sont dilués selon le tableau indiqué :

	Blanc sérum	Etalon	Dosage
Eau distillée	1000 µl	500 µl	500 µl
Tampon		250 µl	250 µl
Antisérum		250 µl	250 µl
Etalon de dosage	10 µl	10 µl	10 µl

L'ensemble est incubé à 37°C pendant 10mn et la lecture est faite à :
570 nm (550 à 600nm) pour les IgG et à 340 nm pour les IgM.

Les concentrations normales en immunoglobulines sont estimées chez le cobaye à une valeur de 2,8 g/l (SCHALM, G. W, 1975).

IgG 2,065 + ou - 0,14 g/l

IgM 0,4 + ou - 0,01g/l

Procédé de calculs

La différence d'absorbance est calculée sur la base de la formule suivante :

Absorbance du calibrateur = Absorbance calibrateur - Absorbance sérum. La concentration est obtenue par interpolation de la différence d'absorbance (Absorbance de l'échantillon) dans la courbe de calibration.

Possibilité d'automatisation du test :

Des appareillages pour des gammes variées existent pour la mise en oeuvre de ce test, sont disponibles et peuvent être acquis sur commande.

1.2.3.4. Westernblot de détection d'anticorps sériques anti *C1 chauvoei*

La technique du Westernblot est basée sur la possibilité d'un transfert complet et quantitatif des protéines du gel PAGE SDS sur des membranes de nitrocellulose (TOWLLEIN, H et al, 1979 ; NEAL, B, 1981).

L'avantage de cette technique est sa sensibilité et une conservation facile de ses réactifs la rendant utilisable pour des études séro - immunologiques (GERSHONI, J et al, 1983 ; JHONSON, T, 1983 ; PASTOR, M, 1989).

- Principe

Les protéines bactériennes sont séparées par électrophorèse sur gel PAGE -SDS et ensuite transférées sur feuille de nitrocellulose.

Ces dernières sont divisées en bandes qui sont d'abord bloquées afin de saturer les sites libres de la protéine.

Après blocage, le sérum est ajouté entraînant la formation d'un complexe antigène - anticorps (si le sérum testé renferme des anticorps spécifiques).

L'antisérum spécifique du sérum est ajouté au complexe antigène – anticorps.
L'enzyme (peroxydase) est ajoutée à la fin et la révélation est obtenue grâce au Diaminobenzidine (DAB) mélangé à l'eau oxygénée (H₂O₂).

Une réaction positive est caractérisée par l'apparition de bande colorée en marron ou grise.
Cette technique commence par une électrophorèse sur gel PAGE, suivie du transfert du gel et se termine par le Western.

Electrophorèse sur gel PAGE - SDS

L'électrophorèse a été réalisée par minigel avec une résolution de 12,5% d'acrylamide.

- Préparation des tampons

Tris 1,5 M pH 8,8

Trizma HCL ----- 18,45g

Tris Base ----- 76,95g

Le pH est ajusté à 8,8 et la solution complétée à 500 ml avec de l'eau distillée.

Tris 0,5 M pH 6,8

Trisma HCL ----- 35,1g

Tris Base ----- 3,35g

Le pH est ajusté à 6,8 et la solution complétée à 500 ml avec de l'eau distillée.

Sodium Dodecyl Sulfate SDS 10%

- Lauryl sulfate ----- 50g

La solution est complétée à 500ml avec de l'eau distillée.

Acrylamide : Bis acrylamide 30 : 0,8

Acrylamide ----- 150g

Bis acrylamide ----- 1g

La solution est complétée à 500ml avec de l'eau distillée.

Persulfate d'ammonium (APS) 10%

APS ----- 0,2g dans 2 ml d'eau distillée et conservation en endroit obscur.

Tampon de migration

Glycine ----- 14,91g

Tris Base ----- 3,03g

Lauryl sulfate -- 1g La solution est complétée à 1000ml avec de l'eau distillée.

Tampon de résolution 12,5 %

Tris 0,5 M pH 8,8 ----- 5,6 ml

Acrylamide : Bis acrylamide ----- 8,4 ml

SDS 10% ----- 200 µl

Eau distillée ----- 5,8 ml

La solution est mélangée en évitant la formation de bulles d'air et rajouter

APS 10% ----- 100 µl

TEMED ----- 10 µl

Tampon de concentration

Tris 0,5M pH 6,8	-----	4 ml
Acrylamide : bis acrylamide	-----	2,4 ml
SDS 10%	-----	160µl
Eau distillée	-----	10 µl
La solution est mélangée en évitant la formation de bulles d'air et rajouter		
APS 10 %	-----	160 µl
TEMED	-----	12 µL

Réalisation de la technique d'électrophorèse sur gel PAGE - SDS

Le matériel comprenant les lames de verre, les spacers, les peignes, est soigneusement nettoyé à l'éthanol à 70°.

Une fois le montage fait, le gel de résolution est déposé le long du verre et est ensuite recouvert d'eau distillée à sa partie supérieure pour la polymérisation qui dure trente minutes.

Le gel de concentration préparé est placé sur la partie supérieure à la place de l'eau distillée et les peignes placés immédiatement et l'ensemble est laissé polymérisé pendant une heure au bout de laquelle, les peignes sont enlevés.

L'antigène à faire migrer, mélangé au bleu de charge est porté à ébullition pendant trois minutes et est par la suite déposé dans le puit à raison de 130 µl/gel en prenant soin de réserver une rangée pour le marqueur moléculaire.

L'appareil est placé dans la cuve renfermant le tampon de migration qui est renfermé. Le générateur est allumé à 200 volts et la migration démarrée.

L'électrophorèse est arrêtée quand le marqueur moléculaire aura migré jusqu'au bas du gel (environ 1 heure 10 mn).

Transfert du gel sur membrane de nitrocellulose

- Tampon de transfert 10x

NaCl	-----	29,22 g
EDTA	-----	6,724g
Tris Base	-----	12,11g
Le pH est ajusté à 7,0 et le mélange complété à 1000 ml avec de l'eau distillée		

- technique du transfert

Deux feuilles de nitrocellulose nécessaires pour chaque gel, sont trempées une fois dans la solution tampon transfert pendant une heure.

6 morceaux de papier buvard sont utilisés pour chaque gel débarassé de ses impuretés et déposés dans le tampon transfert.

Le gel est ensuite lavé trois fois/10 mn dans le tampon transfert.

Le transfert est ensuite réalisé en « Sandwich » selon la procédure suivante :

Papier aluminium

Feuille en plastique

Plateau de verre épais

3 Papiers carrés

Feuille de nitrocellulose

GEL

Feuille de nitrocellulose

3 Papiers carrés

Plateau de verre épais

Feuille en plastique

Papier aluminium

L'ensemble sandwich est mis en incubation à la température du laboratoire pendant trois jours.

Blocage

Le « sandwich » est déemballé, et tout est jeté à l'exception des feuilles de nitrocellulose.

Le tampon de blocage est préparé (3% de BSA dans PBS ou du lait écrémé) : 100ml de tampon de blocage est utilisé pour chaque feuille à bloquer.

Les feuilles de nitrocellulose sont laissées à 37°C dans le tampon de blocage pendant une heure sous agitation continue.

Après incubation, les feuilles sont lavées trois fois dans le tampon de lavage composé de tween PBS.

Les feuilles sont prêtes à être utilisées ou peuvent être séchées et conservées à - 20°C si le test est différé.

Westernblot

Le tampon de dilution est préparé (BSA 1% dans PBS) de même que la fiche de travail en ayant soin de prévoir un témoin positif.

Les sérums à tester sont décongelés sous la hotte et le plateau est préparé.

La procédure est la suivante :

. capture de l'anticorps sérique

2,5 ml de tampon de dilution est ajouté dans chaque puit. Les feuilles de nitrocellulose découpées en bandes à l'aide de scalpel sont numérotées vers le bas au crayon, l'antigène se trouvant vers le haut de la bande.

Les bandes sont mises dans les puits correspondant et 20 µl de sérum à tester est ajouté.

Le plateau est recouvert de plastique et est mis en incubation à 37°C à l'étuve sous agitation continue pendant une heure.

Le sérum a été dilué au 1/100 dans le cas de nos tests.

. Capture de l'antisérum spécifique

Après incubation, le sérum dilué est jeté et les bandes lavées avec le tampon de lavage trois fois/10 mn sous agitation continue à la température du laboratoire.

Un troisième lavage rapide est réalisé et les bandes laissées 5 mn sous agitation constante. L'antisérum dilué comme précédemment au 1/100 est ajouté à raison de 2 ml dans chaque puit et l'incubation comme précédemment pendant une heure.

. Capture de la peroxydase

Procéder comme pour l'antisérum en diluant cette fois ci au 1/500.

L'incubation a lieu dans les mêmes conditions que précédemment pour une durée de 45 mn.

. Révélation

Après incubation, la peroxydase diluée est jetée et les puits lavés trois fois /10 mn avec un lavage supplémentaire de 5 mn.

La solution révélatrice est préparée : 0,5% DAB.

Cette solution est versée dans chaque puit et de l'eau oxygénée est ajoutée pour avoir la concentration finale de 0,5% (50 μ l H₂O₂ dans 100ml de DAB).

Il est à noter que le révélateur après l'ajout de la peroxydase s'altère avec le temps. Le mélange révélateur est versé dans chaque puit et le plateau recouvert de plastique est laissé sous agitation à la température du laboratoire pendant 5 mn.

Une réaction positive est caractérisée par l'apparition sur les bandes de nitrocellulose de tâches marron à grises sur les témoins positifs.

Les bandes sont lavées 3 à 5 fois avec de l'eau distillée pour l'arrêt de la réaction, et laissées sécher sur feuilles de papier et collées sur des fiches de Westernblot.

Nos sérums anti F19 et anti F3a sont ainsi testés pour confirmer les résultats obtenus en ELISA.

1.2.3.5. Séparation des anticorps correspondant aux antigènes les plus immunogènes par électrophorèse sur acétate de cellulose

- Principe :

L'électrophorèse consiste à déposer une très petite quantité (entre 10 et 40 μ l) d'une solution protéique sur un support poreux (bande d'acétate de cellulose, papier filtre, gel d'acrylamide) dont les extrémités trempent dans une solution tampon appropriée où plongent deux électrodes.

Si l'on applique une différence de potentielle aux deux extrémités du support, les molécules protéiques sont soumises à l'action d'un champ électrique et se déplacent à travers le support. En fin d'électrophorèse, les différentes fractions ainsi séparées sont fixées par la chaleur à l'emplacement qu'elles occupent puis colorées.

On obtient ainsi une bande colorée que l'on peut soumettre à l'analyse photométrique et tirer de celle-ci une approximation quantitative satisfaisante des constituants du mélange étudié (ORNSTEIN, L, 1964 ; DAVIS, B, J, 1964).

Mise en oeuvre de la technique

Deux ponts de papier de 205 x 80mm en whatmann numéro 3 ou de papier filtre ordinaire, épais, ayant de bonnes propriétés d'aspiration capillaire, ont été utilisés.

Ces ponts sont humectés de tampon et repliés autour de deux baguettes de verre fournies. Les baguettes sont insérées dans les cuves du chevalet en appliquant les ponts de papier contre les parois inclinées.

Les bandes d'acétate de cellulose sont humectées (le dépôt est fait sur la face la plus nette) en les laissant tomber à plat à la surface du tampon. Elles sont laissées ainsi 1 minute et entièrement plongées ensuite.

Les bandes sont essorées entre deux papiers filtre : le dépôt peut se faire à ce moment, à plat à 4 cm du bout cathodique de la bande (1 à 2 μ litre de sérum).

Les bandes sont disposées en travers du chevalier en humectant légèrement les extrémités afin qu'elles adhèrent aux ponts (le dépôt toujours du même côté). Le deuxième jeu est ensuite maintenu par des baguettes par dessus les bandes et fixé à l'aide des crochets élastiques.

En pressant d'une main sur une baguette, on tirera les bandes du côté opposé pour les étaler horizontalement.

Le chevalet est placé dans la cuve.

- Mise en marche

Le générateur est branché et réglé pour obtenir 5 mA pour 6 bandes. Les volts sont mesurés aux extrémités horizontales des bandes (environ 150 volts) et aux électrodes (environ 200 volts).

Le couvercle est renfermé dans la cuve et la migration entamée.

- Fin de l'expérience - Coloration

Le générateur est arrêté et les bandes retirées fixées dans un bain de 5% d'acide trichloracétique (5 mn).

Elles sont plongées aussitôt dans la solution colorante pendant 1/4 d'heure, sous agitation douce.

Les bandes sont ensuite décolorées en plusieurs bains. Elles sont rendues transparentes par deux moyens :

- a) par séchage et par imprégnation dans de l'huile de vaseline ou du baume de Canada et par pressage entre deux plaques de verre pour photométrie.
- b) dès la sortie du dernier bain de lavage, les bandes sont posées sur une plaque de verre pour l'élimination des bulles et sont aspergées par de l'acide acétique jusqu'à transparence et portées à l'étuve à 10°C, toujours verticalement.

Pour l'éluion, les solvants de l'acétate de cellulose sont utilisés par exemple avec 90% de chloroforme additionné de 10% éthanol (v/v).

Dans la pratique, la migration a eu lieu à 220 volts/32mn ; la coloration utilisée est le rouge ponceau.

Pour la décoloration : on utilise de l'acide acétique à 5%. après décoloration, le gel est plongé soit dans du méthanol soit dans de l'éthanol.

Si le gel a été plongé dans le méthanol, il est nécessaire de prendre soin d'incuber une minute et 30 secondes (1mn 30 sec) ; si par contre le gel a été plongé dans de l'éthanol on incube 2mn 10. Pour la diaphanisation :

37.5 ml de méthanol et 2.5ml de diacétone alcool et 10 ml d'acide acétique pur sont mélangés.

- Lecture au densitomètre

La lecture peut se faire sur bande transparisée ou non.

Le lecteur est branché et la bande est introduite à l'emplacement prévu à cet effet, sous la tête de lecture.

L'épaisseur du trait lumineux est réglé à 1mm environ et la largeur du trait lumineux (largeur de la bande et la couleur du filtre en fonction du colorant.

La tête de lecture se déplace le long du protéinogramme fixé pas à pas par pression sur un bouton de télécommande.

Il existe un commutateur de déplacement rapide vers la gauche ou vers la droite.

Le spot est amené sur la fraction la plus dense (albumine, dans le protéinogramme). La valeur maximale des densités optiques (DO) est réglée vers la division 80 du galvanomètre.

Le spot est ensuite ramené à la position de réglage qui est le zéro.

La tête de lecture est avancée coup par coup et chaque valeur est notée.

- Interprétation des résultats :

La courbe correspondant aux valeurs obtenues est tracée et la surface de chaque pic est calculée à l'aide de la formule suivante $S = h \times b$

S = surface en m²

h hauteur en mm

b largeur prise à 55% du sommet.

A partir des surfaces obtenues, on peut déduire les % de chaque fraction protéique. La protéinémie connue est exprimée en g/l.

Selon SCHALM (SCHALM, 1975), les valeurs normales sont :

Ig	%	(c) en g/l
Alpha 1 globulines	9	0,27
Alpha 2 globulines	21	0,63
Gamma globulines	23	0,69
Béta globulines	47	1,41

1.2.4. Choix et analyse moléculaire de l'antigène immunogène candidat

1.2.4.1 Choix de l'antigène le plus immunogène :

Montrer comment ont été choisies les deux fractions envoyées à l'institut Pasteur et le choix définitif de l'une d'elles (caractéristiques).

I.2.4.2. Structure et composition en acides aminés de la fraction choisie :

- Digestion enzymatique :

L'échantillon protéique en gel de polyacrylamide est digéré dans 400 µl d'une solution de tampon Tris - HCl 0,05M à pH 8,6 dans 0,03% de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) à une température de 35°C pendant 18 heures en présence de 0,4 µg d'endoprotéase lysine C. Les peptides dérivés de la protéine 19 choisie, sont par la suite séparés par la technique de Chromatographie en phase liquide sous haute performance (HPLC).

- Séparation des peptides par la technique HPLC :

La chromatographie en phase liquide à haute performance constitue une méthode performante en raison de son pouvoir élevé de séparation des peptides de faible poids moléculaire. Cette technique est spécifique, très sensible, rapide et automatisable (DOUROUGH et al, 1975). La chromatographie à haute pression est normalement conduite à la température ambiante et, les possibilités de dégradation thermique sont éliminées.

Le chromatographe utilisé par CALVIN et al (1974) était équipé d'un détecteur ultra - violet (UV) à 254 nm.

L'utilisation de détecteurs ultra violet/visible (uv/vis) a permis d'atteindre des seuils de sensibilité élevés. Différents types de colonnes sont utilisés en fonction de la nature du ou des composés à analyser.

Ainsi les peptides ont été ensuite séparés sur colonne de DEAE sépharose A comme phase stationnaire et de l'acétonitrile 2 à 45% en l'FA à 0,1% comme phase mobile.

- Microséquençage protéique :

La méthode d'Edmann très sensible est utilisée pour la détermination de la séquence en acides aminés d'une protéine. Elle consiste en une dégradation séquentielle à partir de l'extrémité NH₂ terminal.

Les résidus acides aminés sont par la suite identifiés par la HPLC, donnant alors la structure primaire de la protéine.

Un séquenceur de type 473 A Biosystèmes appliqués en 22 cycles, a été utilisé pour la détermination de la séquence du fragment 14 de la fraction 19.

II. Résultats – Discussion

À l'issue de nos différentes manipulations, les résultats suivants ont été obtenus et vont faire l'objet de discussion par rapport à ceux trouvés par d'autres auteurs.

II.1. Etudes bactériologiques générales :

- Caractères culturaux :

La culture de *Cl. Chauvoei* sur le milieu anaérobie viande foie glucosé a donné au bout de 24 heures un trouble important, accompagné d'une production de gaz.

L'examen du frottis à l'état frais a révélé des bacilles en forme de chaînes parfois isolés.

L'observation du frottis coloré par la méthode de Gram a donné des bacilles à Gram positif.

On peut noter que *Cl. Chauvoei* est un bacille qui pousse très rapidement avec production de gaz sur milieu anaérobie viande foie glucosé en une période très courte en 6 heures (in LEON LEMINOR, 1989).

- Caractères biochimiques

La souche de *Clostridium chauvoei* étudiée fermente certains sucres : le glucose, le lactose, le maltose et le saccharose. L'absence d'hydroxyde de la salicilline a été observée confirmant d'autres auteurs (LEON LEMINOR et al, 1989).

Etude des protéines bactériennes :

- Séparation et identification des protéines bactériennes par chromatographie en phase liquide (CPL).

. Protéines extracellulaires :

Les résultats sont rapportés dans le tableau I suivant :

Tableau I : Fractionnement des protéines totales du milieu extracellulaire.

N° échantillon	Densités optiques (DO)
1 (Dépôt)	0
2 + phosphate 2mM	0,213
3 + phosphate 2mM	0,331
4 + phosphate 2mM	0,290
5 + phosphate 5 mM	0,171
6 + phosphate 5 mM	0,172
7 + phosphate 5 mM	0,323
8 + phosphate 10mM	0,344
9 + phosphate 10 mM	0,361
10 + phosphate 10 mM	0,125
11 + NaCl 25mM + phosphate 10 mM	0,02
12 + NaCl 25 mM + phosphate 10 mM	0,211
13 + NaCl 25 mM + phosphate 10 mM	0,396
14 + NaCl 50 mM + phosphate 10 mM	0
15 + NaCl 50 mM + phosphate 10 mM	0,03
16 + NaCl 50 mM + phosphate 10 mM	0,168
17 + NaCl 100mM + phosphate 10 mM	0
18 + NaCl 100 mM + phosphate 10 mM	0,114
19 + NaCl 100 mM + phosphate 10 mM	0,157
20 + NaCl 250 mM + phosphate 10 mM	0
21 + NaCl 250 mM + phosphate 10 mM	0,201
22 + NaCl 250 mM + phosphate 10 mM	0
23 + NaCl 500 mM + phosphate 10 mM	0,025
24 + NaCl 500 mM + phosphate 10 mM	0
25 + NaCl 500 mM + phosphate 10 mM	0

Ces résultats obtenus indiquent que des fractions protéiques renferment des quantités importantes de protéines. Celles-ci sont : les fractions 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 18, 19 et 21.

Afin de procéder à une évaluation des densités optiques, une représentation graphique des valeurs des densités optiques en fonction du gradient tampon phosphate - NaCl utilisé a été effectuée : les résultats sont rapportés dans la figure 1.

Figure n°1: Fractionnement des Proteines extracellulaires de *Cl. Chauvoei* par CPL.

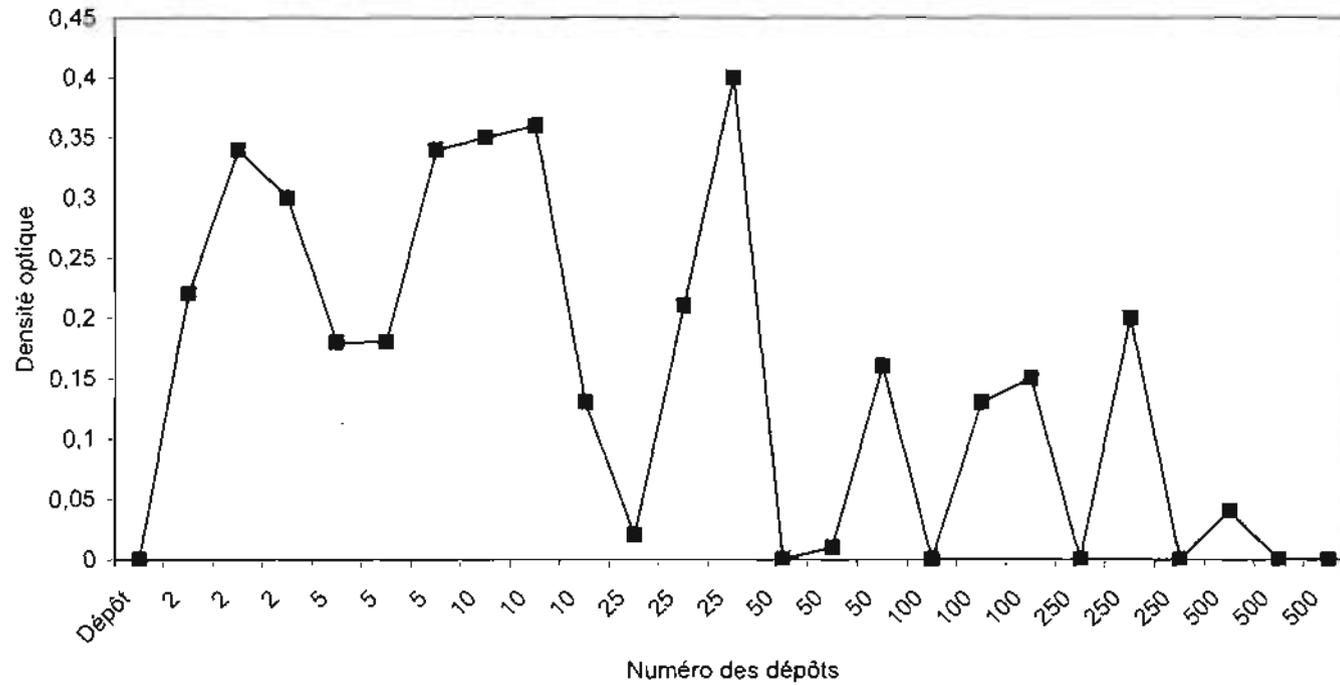


Fig 1 : Représentation graphique des densités optiques en fonction du gradient tampon Phosphate - NaCl à partir de la colonne de Sépharose A pour le milieu extracellulaire de *Cl. chauvoei*.

Il ressort de ce graphique que, plusieurs pics dont les plus importants sont sélectionnés en fonction de leur gradient d'éluion. Les fractions correspondantes à ces pics sont utilisées pour l'étude immunologique.

Les huit fractions correspondantes à ces pics sont les suivantes :

3 - 7 - 8 - 9 - 13 - 16 - 19 et 21.

. Protéines intracellulaires :

Le fractionnement a donné les résultats rapportés dans la tableau II suivant :

Tableau II : Fractionnement des protéines totales du milieu intracellulaire

N° échantillon (foie intracellulaire)	Densités optiques
1 (Dépot)	0
2 + Phosphate 2mM	0,003
3 + Phosphate 2mM	0,004
4 + Phosphate 2mM	0,004
5 + Phosphate 5mM	0,002
6 + Phosphate 5mM	0,013
7 + phosphate 5mM	0,003
8 + Phosphate 10mM	0,003
9 + Phosphate 10mM	0,003
10 + Phosphate 10mM	0,002
11 + NaCl 25mM + phosphate 10mM	0,008
12 + NaCl 25mM + phosphate 10mM	0,240
13 + NaCl 25 mM + phosphate 10mM	0,005
14 + NaCl 50mM + phosphate 10mM	0,187
15 + NaCl 50mM + phosphate 10mM	0,003
16 + NaCl 50mM + phosphate 10mM	0,011
17 + NaCl 100mM + phosphate 10mM	0,017
18 + NaCl 100mM + phosphate 10mM	0,015
19 + NaCl 100mM + phosphate 10mM	0,002
20 + NaCl 250mM + phosphate 10mM	0,001
21 + NaCl 250mM + phosphate 10mM	0,003
22 + NaCl 250mM + phosphate 10mM	0,001
23 + NaCl 500mM + phosphate 10mM	0
24 + NaCl 500mM + phosphate 10mM	0
25 + NaCl 500mM + phosphate 10mM	0

Les résultats indiquent la présence de fractions protéiques moins importantes dans le milieu intracellulaire.

Ces fractions au nombre de deux, renferment des quantités importantes de protéines si l'on considère les valeurs des densités optiques obtenues.

La représentation graphique des valeurs des densités optiques (DO) en fonction du gradient d'éluion à partir de la colonne de DEAE sépharose A est rapportée sur la figure 2.

Figure n°2: Fractionnement des Proteines intracellulaires de *Cl. Chauvoei* par CPL

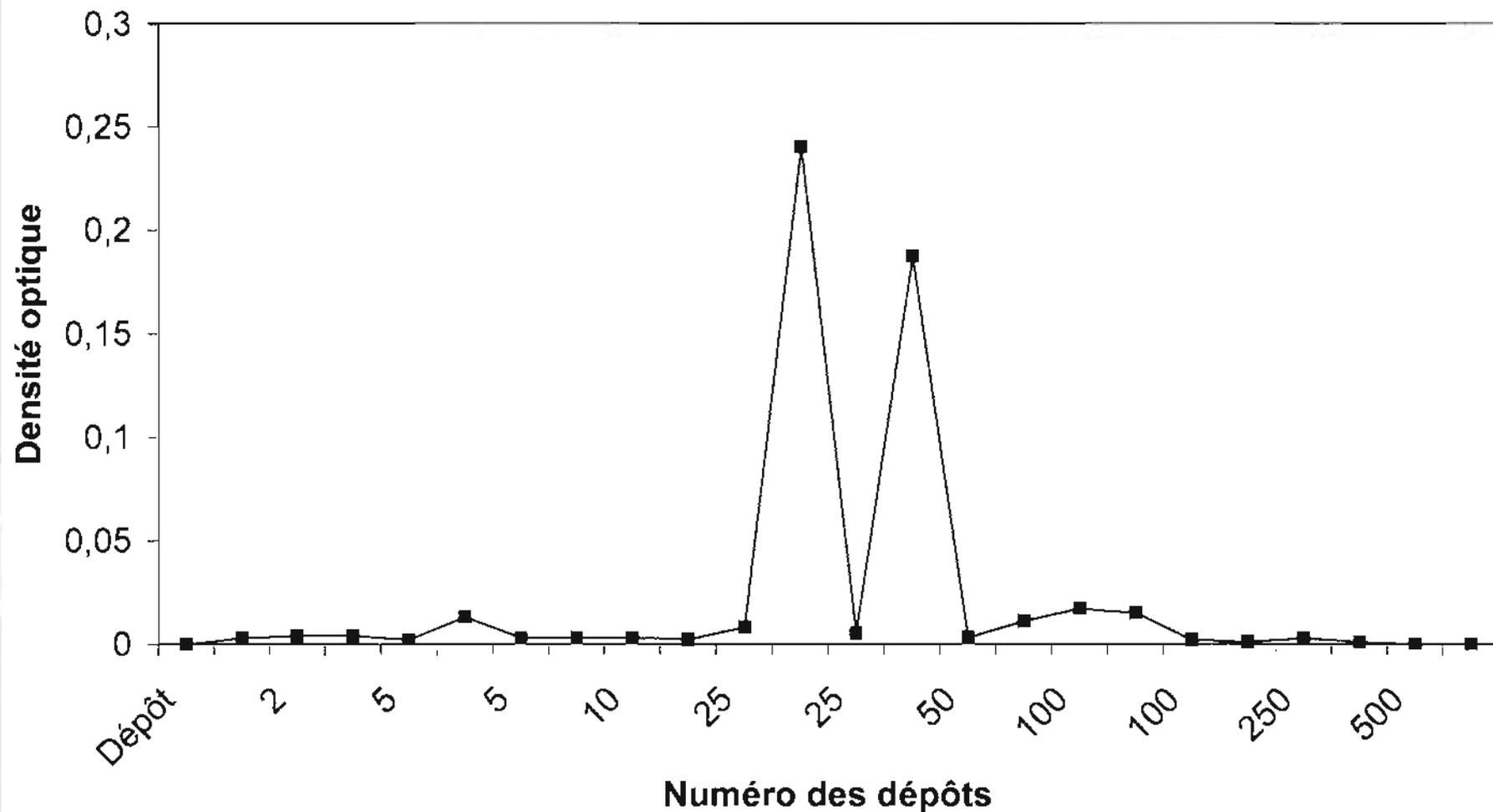


Figure 2 : Représentation graphique des DO en fonction du gradient d'éluion à partir de la colonne de DEAE sépharose A Cl ~ 6B des protéines fractionnées du milieu intracellulaire

Ce graphique montre l'existence de deux pics qui sont retenus pour l'étude immunologique. Il s'agit des pics numéro 2a (12) et 2b (14).

. Protéines liées au corps bactérien :

Les résultats sont rapportés dans le tableau III suivant:

Tableau III : Fractionnement des protéines totales liées au corps bactérien

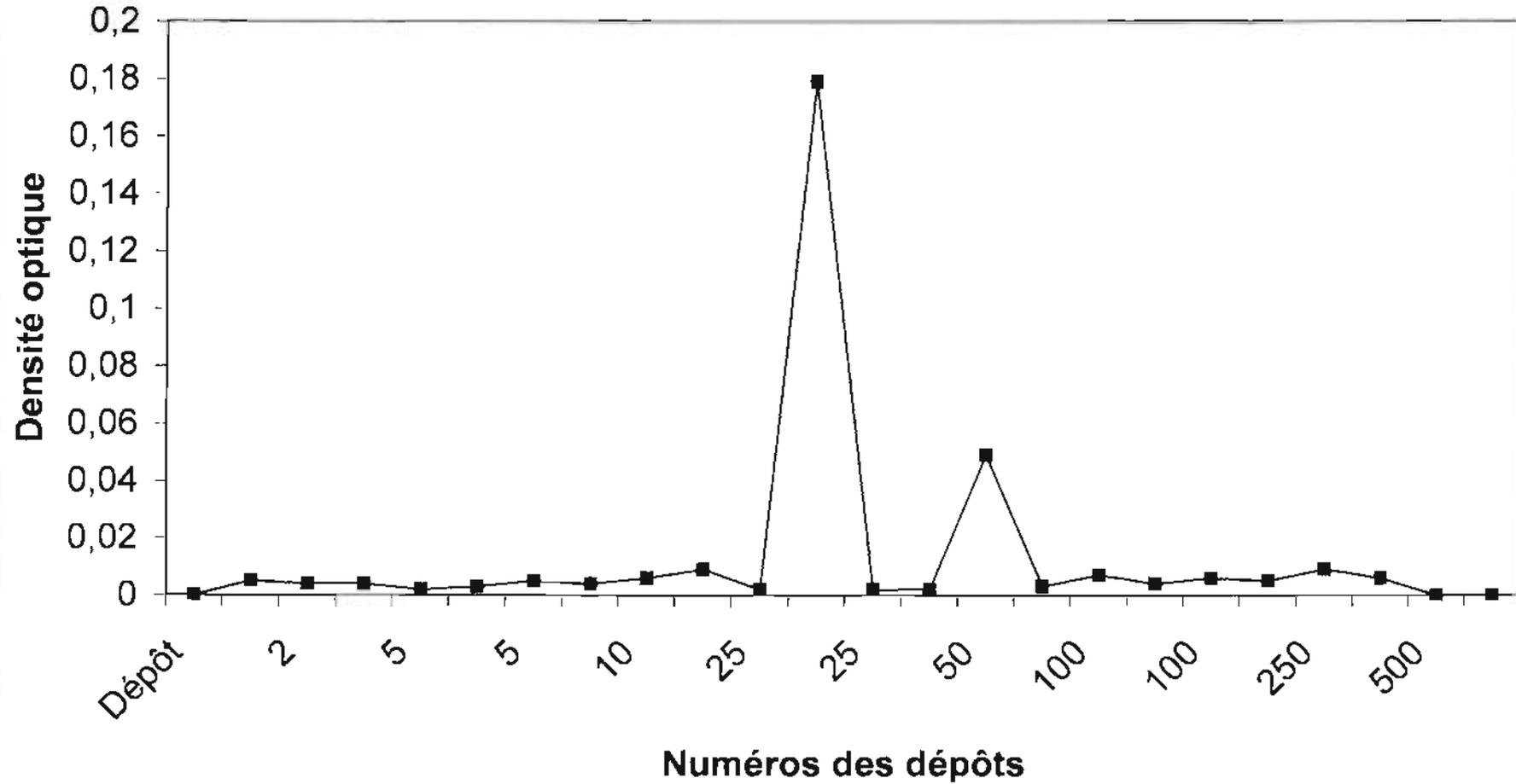
N° échantillon (foie intracellulaire)	Densités optiques
1 (Dépot)	0
2 + Phosphate 2mM	0,005
3 + Phosphate 2mM	0,004
4 + Phosphate 2mM	0,004
5 + Phosphate 5mM	0,002
6 + Phosphate 5mM	0,003
7 + phosphate 5mM	0,005
8 + Phosphate 10mM	0,004
9 + Phosphate 10mM	0,006
10 + Phosphate 10mM	0,009
11 + NaCl 25mM + phosphate 10mM	0,002
12 + NaCl 25mM + phosphate 10mM	0,179
13 + NaCl 25 mM + phosphate 10mM	0,002
14 + NaCl 50mM + phosphate 10mM	0,002
15 + NaCl 50mM + phosphate 10mM	0,049
16 + NaCl 50mM + phosphate 10mM	0,003
17 + NaCl 100mM + phosphate 10mM	0,007
18 + NaCl 100mM + phosphate 10mM	0,004
19 + NaCl 100mM + phosphate 10mM	0,006
20 + NaCl 250mM + phosphate 10mM	0,005
21 + NaCl 250mM + phosphate 10mM	0,009
22 + NaCl 250mM + phosphate 10mM	0,006
23 + NaCl 500mM + phosphate 10mM	0
24 + NaCl 500mM + phosphate 10mM	0
25 + NaCl 500mM + phosphate 10mM	0

Ces résultats indiquent un faible nombre de fractions renfermant des quantités importantes de protéines.

Ces fractions sont au nombre de deux (3a et 3b) au niveau du corps bactérien.

La représentation graphique des densités optiques (DO) en fonction du gradient de tampons a été effectuée sur la figure 3.

Figure n°3: Fractionnement des Proteines corps bactérien de *Cl. Chauvoei* par CPL



Deux pics ont été obtenus correspondant aux fractions suivantes: 3a (12) et 3b (15)
Ces deux fractions sont retenues pour l'étude immunologique.

- Purification des fractions protéiques par électrophorèse sur gel PAGE

Les fractions ayant assuré une bonne protection sont retenues pour l'identification du profil protéique :

Pour le milieu extracellulaire ce sont les fractions suivantes: 3 - 7 - 19 - 21

Pour le milieu intracellulaire, il s'agit des fractions 2a et 2b.

Pour le corps bactérien, il s'agit des fractions 3a et 3b

Les résultats sont rapportés dans le tableau IV suivant

Les rapports de migration des bandes sont rapportés dans le tableau IV suivant :

Tableau IV : Electrophorèse sur gel PAGE à 7,5% des fractions protéiques bactériennes

N° fraction	Milieu	Rapport de Migration (RM)
3a (extrait purifié)	Corps bactérien	0,480
19 (extrait purifié)	extracellulaire	0,204
2a (extrait purifié)	intracellulaire	0,122
19 (extrait brut)	extracellulaire	
3a (extrait brut)	Corps bactérien	
2a (extrait brut)	intracellulaire	

Une photo des bandes obtenues (fig 4) après la migration permet de commenter les différents profils protéiques.

Les résultats sont rapportés sur la figure 4

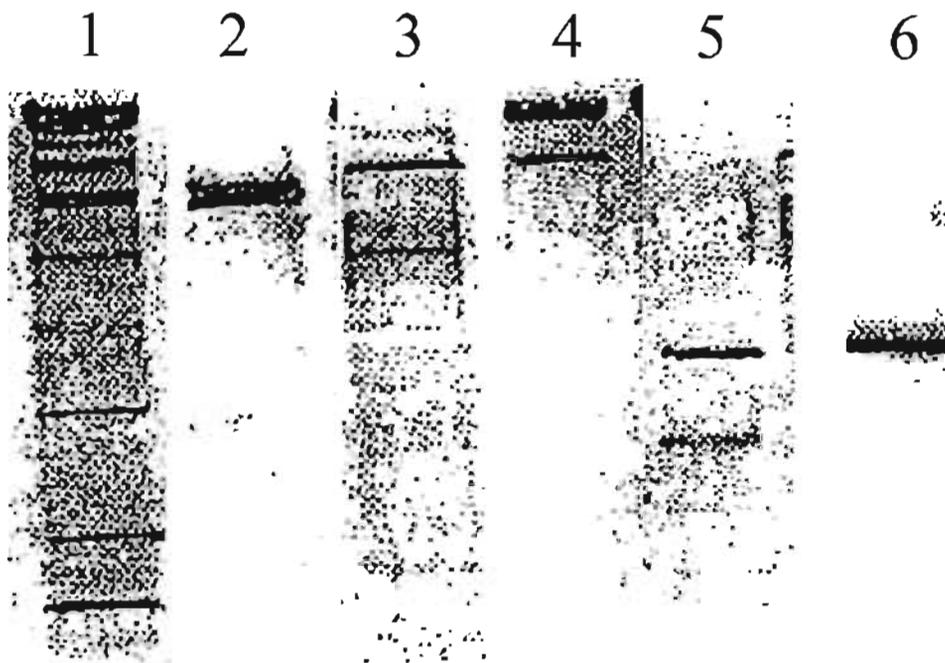


FIG N°4 : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide à 7,5% des extraits protéiques bruts et des fractions protéiques purifiées sur colonne anionique de sépharose A CL6B des milieux extracellulaires, intracellulaire et du corps bactérien de *Cl. Chauvoei*

1 = Extraît protéique brut (protéines totales) du milieu extracellulaire

2 = Fraction 19 du milieu extracellulaire

3 = Extraît protéique brut (protéines totales) du milieu intracellulaire

4 = Fraction 2a du milieu intracellulaire

5 = Extraît protéique brut (protéines totales) du corps bactérien

6 = Fraction 3a du corps bactérien

Les résultats confirment la pureté des fractions 19 du milieu extracellulaire, 2a du milieu intracellulaire et 3a du corps bactérien.

L'extrait protéique brut du milieu extracellulaire, montre l'existence de 13 bandes environ dont la 2 (fraction 19).

L'extrait protéique brut du milieu intracellulaire, a donné deux bandes dont la 4 (fraction 3a). L'extrait protéique brut du corps bactérien montre deux bandes dont la 6 (fraction 2a).

On peut dire que les fractions 19, 2a et 3a ont été bien séparées à travers la colonne anionique de sépharose A CL6B.

- Extraction et purification des fractions protéiques liées au corps bactérien :

La protéine de la fraction 3a dissociée et séparée sur colonne HPLC est soumise à des tests d'immunisation sur cobayes au même titre que les autres fractions :

Il est à noter que les modifications des protéines par des traitements physiques (comme la chaleur) ou chimiques, qui entraînent des changements de conformation, peuvent dans certains cas (mais non constamment) modifier ou diminuer l'immunogénicité (ARNON, R, 1974).

Ceci a été observé dans la dissociation des glycoprotéines de la paroi avec la fraction 3a du corps bactérien de *Clostridium chauvoei* qui a donné avant dissociation une valeur en DO/ELISA /Ac de 0,325 et après dissociation une valeur en DO de 0,300 avec une baisse de l'immunogénicité de l'ordre de 0,025, ce qui corrobore les observations de ARNON, R.(1974).

Les modifications chimiques sont souvent complexes car elles portent simultanément sur plusieurs sites antigéniques. L'utilisation de fragments de protéines obtenus après digestion enzymatique a permis d'importants progrès, car bien souvent chaque fragment (isolable par chromatographie) ne porte qu'un ou deux déterminants antigéniques et il est alors possible d'étudier la séquence des acides aminés qui la composent (BENJAMIN et al, 1996)

- Dosage des protéines totales

Les résultats sont rapportés dans le tableau V suivant :

Tableau V : Dosage des protéines totales par BRADFORD

Milieux	(C) en protéines totales en $\mu\text{g/ml}$	volume disponible en ml
Extracellulaire	560,7	20
Intracellulaire	370,1	5
Corps bactérien	397,4	4

Ces résultats indiquent des valeurs plus élevées en protéines totales dans les milieux extracellulaire et le corps bactérien par rapport au milieu intracellulaire de *Cl. Chauvoei*.

- Dosage des protéines fractionnées :

Étalonnage de la solution d'albumine à 0,5 mg/ml aux concentrations suivantes :

1 - 4 - 6 - 8 - et 10. Les densités optiques obtenues à partir des différentes concentrations de la solution d'albumine donnent la courbe d'étalonnage de BRADFORD rapportée dans le tableau 6 suivant :

Tableau VI : Etalonnage de la solution d'albumine

(C) Albumine en µg/ml	2	4	6	8	10
D.O 595nm	0,021	0,043	0,070	0,080	0,112

La représentation graphique de la courbe étalon d'albumine est sur la figure 5

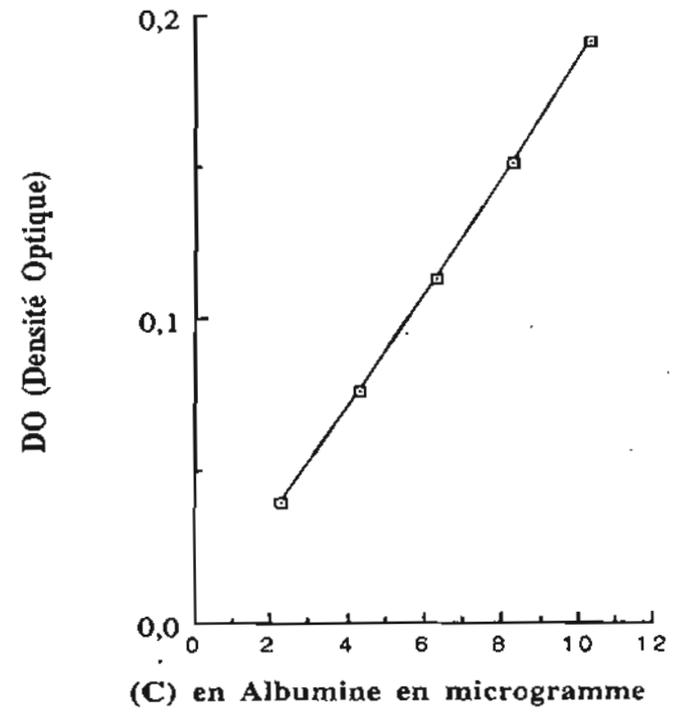


Fig5: courbe étalon d'albumine

La correspondance des D.O des fractions lues à 595 nm à partir de la gamme étalon d'albumine donne les concentrations en protéines des fractions qui sont représentées dans le tableau VII suivant :

Tableau VII : Concentrations en fractions protéiques des trois compartiments

Milieu	Fractions	D.O moyenne à 595 nm	(C) en protéines en g/ml
Extracellulaire	3	0,331	58
	7	0,323	75
	19	0,157	30
	21	0,201	35
Intracellulaire			
	2a	0,240	34
	2b	0,187	30
Corps bactérien	3a	0,179	30
	3b	0,049	20

L'on constate que les protéines sont plus concentrées dans le milieu extracellulaire, ce qui confirme les valeurs obtenues après l'extraction des protéines totales.

II.3. Etude de l'activité biologique des protéines totales et des fractions protéiques sur animaux de laboratoire

- Test de l'activité biologique des protéines totales sur animaux de laboratoire :

Les résultats sont rapportés dans le tableau VIII suivant :

Tableau VIII : Activité biologique des protéines totales sur souris blanches

N° animal	Activité biologique	observations
Milieu extracellulaire		
E1	M	M 10 heures après inoculation
E2	M	M 10 heures après inoculation
Milieu intracellulaire		
F1	M	M 24 heures après inoculation
F2	M	M 24 heures après inoculation
Corps bactérien		
E1	M	M 10 heures après inoculation
E2	M	M 10 heures après inoculation
Témoins		
T1	S	S
T2	S	S
T3	S	S

E = Essai

T = témoin

M = mort

S = survivant

La mortalité induite par la souche a été vérifiée dans les milieux intra, extracellulaire et du corps bactérien : elle s'est avérée plus efficace pour les milieux extracellulaire et du corps bactérien (la mort est plus rapide chez la souris inoculée), que dans le milieu intracellulaire.

- Test de l'activité biologique des fractions protéiques sur cobaye :

Huit lots de deux cobayes pour le milieu extracellulaire, deux lots de deux cobayes pour le milieu intracellulaire et deux lots de deux cobayes pour le corps bactérien sont inoculés par voie intramusculaire profonde et ont donné les résultats suivants qui sont rapportés dans le tableau IX :

Tableau IX: Activité biologique des fractions protéiques sur cobayes

N° animal	Activité biologique	Fraction inoculée
Milieu extracellulaire		
E1	M	3
E2	M	
E3	M	7
E4	M	
E5	S	8
E6	S	
E7	S	9
E8	S	
E9	S	13
E10	S	
E11	S	16
E12	S	
E13	S	19
E14	S	
E15	S	21
E16	S	
Milieu intracellulaire		
E1	S	2a
E2	S	
E3	M	2b
E4	M	
Corps bactérien		
E1	S	3a
E2	S	
E3	S	3b
E4	S	
Témoins		
T1	S	
T2	S	
T3	S	

E = Essai

T = témoin

M = mort

S = survivant

Les résultats du test sur cobaye de l'activité biologique des fractions ciblées ont montré que certaines fractions entraînent la mort. Ceci peut s'expliquer par une activité toxique de ces fractions. C'est le cas des fractions 3 et 7 du milieu extracellulaire et de la fraction 2b du milieu intracellulaire.

Par contre d'autres fractions n'entraînent pas la mort des cobayes, par conséquent ne sont pas dotées d'activité toxique.

II.4. Etude immunologique des fractions protéiques :

- Immunisation des cobayes :

. Protocole d'immunisation :

Les fractions protéiques obtenues après chromatographie sur colonne en phase liquide sont choisies en fonction de l'importance de la hauteur de leur pic de la densité optique.

Ces fractions sont soit formolées ou non à l'exception des fractions issues du corps bactérien qui ne sont pas formolées car non dotées d'activité toxique puis inoculées à des cobayes en s/c ou en voie intra musculaire profonde à raison de 200 µlitres/animal.

Les fractions suivantes ont été retenues :

3 - 7 - 8 - 9 - 13 - 16 - 19 - 21 pour le milieu extracellulaire, 2a - 2b pour le milieu intracellulaire et 3a - 3a dissociée - 3b pour le corps bactérien de *Cl. chauvoei*.

Deux cobayes reçoivent la fraction formolée à 6 ‰ et deux autres, la fraction non formolée pour les animaux devant recevoir les fractions issues du milieu extracellulaire et du milieu intracellulaire.

Deux cobayes sont témoins et ne reçoivent que du milieu de culture ce qui fait un total de 58 cobayes dont $4 \times 8 + 2 = 34$ pour le milieu extracellulaire, de $4 \times 2 + 2 = 10$ pour le milieu intracellulaire, de $4 \times 3 + 2 = 14$ pour le corps bactérien (pour le corps bactérien les fractions ne sont pas formolées car non dotées d'activité toxique).

Le sang de tous les animaux est prélevé avant l'inoculation, une et deux semaines après l'inoculation pour apprécier l'évolution des anticorps sériques (cinétique des anticorps) : Les animaux inoculés sont suivis journalièrement pendant une période 14 jours (les commémoratifs à savoir boiterie ou abattement sont notés sur chaque animal et à la mort, un diagnostic est réalisé), à l'issue de chaque semaine des prélèvements de sang pour récolte de sérums à tester par ELISA/Ac, sont réalisés.

- Immunisation à l'aide des fractions protéiques exocellulaires

. Fractions non détoxifiées au formol

Les résultats sont rapportés dans le tableau X suivant pour les animaux ayant reçu les fractions antigéniques non détoxifiées au formol :

Tableau X: Immunisation de cobayes contre les fractions protéiques non détoxifiées

N° animal	Test d'innocuité	Test d'épreuve	observation
E1 E1'(3)	M M		3 est une fraction toxique
E2 E2'(7)	M M		7 est une fraction toxique
E3 E3'(8)	S S	M M	
E4 E4'(9)	S S	M M	
E5 E5'(13)	S S	M M	
E6 E6'(16)	S S	M M	
E7 E7'(19)	S S	S S	19 est une fraction atoxique
E8 E8'(21)	S S	S S	21 est une fraction atoxique
2 témoins	S S	M M	

E = essai

T = témoin

M = mort

S = survivant

() = fraction inoculée

Les résultats montrent que certains animaux n'ont pas pu supporter l'inoculation, c'est le cas de ceux ayant reçu la fraction 3 ou 7 qui peuvent ainsi être dotés d'une activité toxique.

Par contre, d'autres animaux ne semblent pas avoir développé une réaction immunitaire les permettant de résister au test d'épreuve : c'est le cas des fractions 8, 9, 13 et 16.

Par ailleurs quatre animaux ont développé une bonne réaction immunitaire. Ils ont résisté à la dose d'épreuve : c'est le cas de ceux ayant reçu les fractions 19 et 21.

. Fractions détoxifiées au formol :

Les résultats sont rapportés dans le tableau XI suivant pour les animaux ayant reçu les fractions détoxifiées au formol.

Tableau XI : Immunisation de cobayes contre les fractions protéiques détoxifiées

N° animal	test d'innocuité	test d'épreuve	Observation
E1 E1'(3)	S S	S S	la fraction 3 protège si détoxifiée au formol
E2 E2'(7)	S S	S S	la fraction 7 protège si détoxifiée au formol
E3 E3'(8)	S S	M M	
E4 E4'(9)	S S	M M	
E5 E5'(13)	S S	M M	
E6 E6'(16)	S S	M M	
E7 E7'(19)	S S	S S	la fraction 19 protège si détoxifiée ou non au formol
E8 E8'(21)	S S	S S	la fraction 21 protège si détoxifiée ou non au formol
2 témoins	S S	M M	

E = essai

T = témoin

M = mort

S = survivant

() = fraction inoculée

L'analyse des résultats montre que certains animaux ayant reçu la fraction détoxifiée parviennent à développer une bonne réaction immunitaire justifiée par leur résistance à la dose d'épreuve : c'est le cas des fractions 3, 7, 19 et 21.

Par contre, il est constaté que les animaux ayant reçu les fractions 8, 9, 13, 16 n'ont pas pu développer une réaction immunitaire. Ces fractions ne sont pas immunogènes.

D'après les résultats du test d'immunisation sur cobaye, des fractions obtenues à partir du milieu extracellulaire, permettent de mettre en évidence quatre fractions qui sont capables de protection : les fractions 3, 7, 19 et 21.

Les fractions 3 et 7 sont des fractions toxiques qui, une fois détoxifiées, sont capables d'entraîner le développement d'une bonne protection chez le cobaye.

Cependant les fractions 19 et 21 sont atoxiques et peuvent développer une bonne protection chez le cobaye.

Les sérums d'animaux ayant reçu les fractions 8, 9, 13 et 16 n'ont pas été utilisés pour les tests sérologiques dans la mesure où ils n'ont pas donné de résultat positif (les animaux ayant reçu ces fractions n'ont pas pu supporter la dose d'épreuve).

Dans le choix d'un bon immunogène, il est important de noter que c'est l'antigène dépourvu d'activité toxique qui est le mieux indiqué pour des essais de vaccination.

- Immunisation à l'aide de fraction protéiques endocellulaires :

Les résultats sont rapportés dans le tableau XII suivant pour les animaux ayant reçu les fractions 2a et 2b non détoxifiées au formol :

-fractions non détoxifiées au formol :

Tableau XII : Immunisation de cobayes contre les fractions protéiques non détoxifiées

N° animal	Test d'innocuité	Test d'épreuve	Observations
2a	S S	S S	atoxique
2b	M M		toxique
témoins	S S	M M	

M = mort

S = survivant

Les résultats montrent que les animaux ayant reçu la fraction 2a atoxique ont bien supporté l'inoculation maladie, ce qui n'est pas le cas pour ceux inoculés avec la fraction 2b toxique qui y ont succombé.

- fractions détoxifiées au formol :

Les résultats sont rapportés dans le tableau XIII suivant pour les animaux ayant reçu les fractions 2a et 2b détoxifiées au formol

Tableau XIII: Immunisation de cobayes contre les fractions protéiques détoxifiées

N° animal	Test d'innocuité	Test d'épreuve	Observations
2a	S S	S S	atoxique et immunogène
2b	S S	S S	toxique et immunogène
2 témoins	S S	M M	

M = mort

S = survivant

Ces résultats montrent l'existence de deux fractions dont l'une est atoxique et immunogène (la fraction 2a) et l'autre toxique et immunogène (la fraction 2b).

- Immunisation à l'aide de fractions protéiques du corps bactérien :

Les résultats sont rapportés dans le tableau XIV suivant pour les animaux ayant reçu les fractions 3a, 3a dissociée (3ad) et 3b.

Tableau XIV : Immunisation de cobayes contre les fractions protéiques

N° animal	Test d'innocuité	Test d'épreuve	Observations
3a	S S	S S	immunogène
3ad	S S	S S	immunogène
3b	S S	S S	immunogène
2 témoins	S S	M M	

M = mort

S = survivant

Ces résultats indiquent que les fractions 3a et 3b du corps bactérien ont bien développé une réaction immunogène.

- Etude de la cinétique des anticorps par ELISA. et dosage des IgG et des IgM par turbidimétrie.

Test ELISA des fractions immunisantes ciblées.

Les sérums récoltés sur les animaux pendant les périodes d'avant inoculation, d'une semaine et de deux semaines après inoculation sont soumis à des tests ELISA pour évaluer la cinétique des anticorps produits au cours des tests d'immunisation.

. Immunogénicité des fractions protéiques exocellulaires

Les résultats sont rapportés dans le tableau XV suivant :

Tableau XV : Titre (DO) Ac des sérums de cobayes vaccinés contre les fractions protéiques exocellulaires

N°animal	Avant inoculation		1 semaine après inoculation		2 semaines après inoculation	
	DO	Significat	DO	Signif	DO	Signif
3	0,055	-	0,157	+	0,320	++
7	0,035	-	0,141	+	0,293	++
19	0,070	-	0,147	+	0,320	++
21	0,058	-	0,135	+	0,274	++
Témoin	+ 0,100 - 0,036	+		+	+	
Blank	0,000	-		-	-	

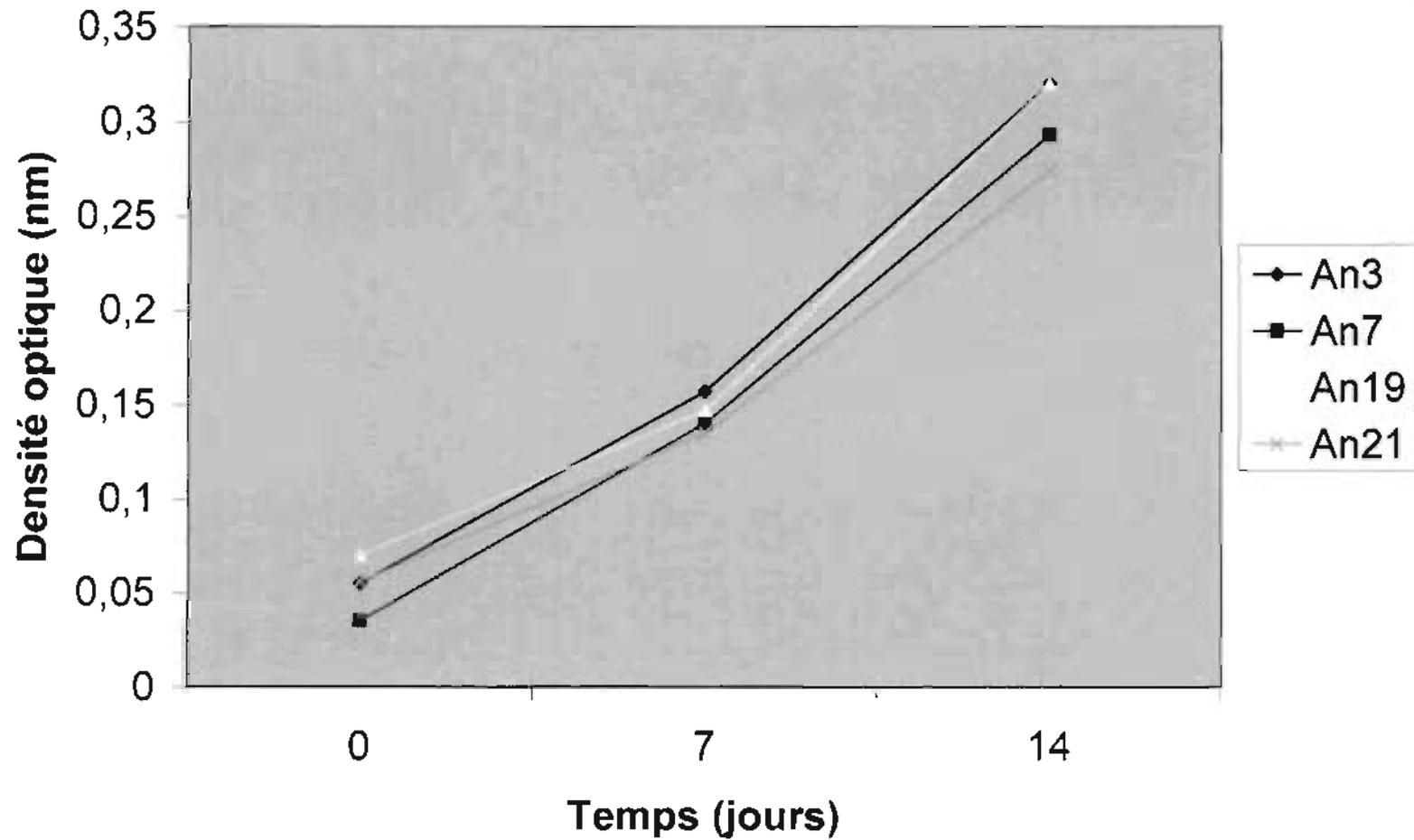
DO = densité optique

Blank = tampon seul

Les résultats témoignent d'une production croissante d'anticorps avec le temps. Les titres sont élevés comparés au seuil de positivité (0,100). Un maximum a été obtenu avec le sérum des animaux ayant reçu la fraction 3 ou la fraction 19 du milieu extracellulaire.

La représentation graphique des DO en fonction du temps donne la cinétique des anticorps de cobayes immunisés contre les fractions 3, 7, 19 et 21 du milieu extracellulaire de *Cl.chauvoei*, correspondant à la figure 6

Figure n°6 : Elisa anti *Clostridium chauvoei* du milieu extracellulaire



. Immunogénicité des fractions protéiques endocellulaires

Les résultats sont rapportés dans le tableau XVI suivant :

Tableau XVI : Titre (DO) Ac des sérums de cobayes vaccinés contre les fractions protéiques endocellulaires

N° animal	Avant inoculation		1 semaine après inoculation		2 semaines après inoculation	
	DO	Signif	DO	Signif	DO	Signif
2a	0,030	-	0,148	+	0,300	++
2b	0,046	-	0,162	+	0,315	++
Témoin	+ 0,100 - 0,036	+		+		+
Blank	0,000	-		-		-

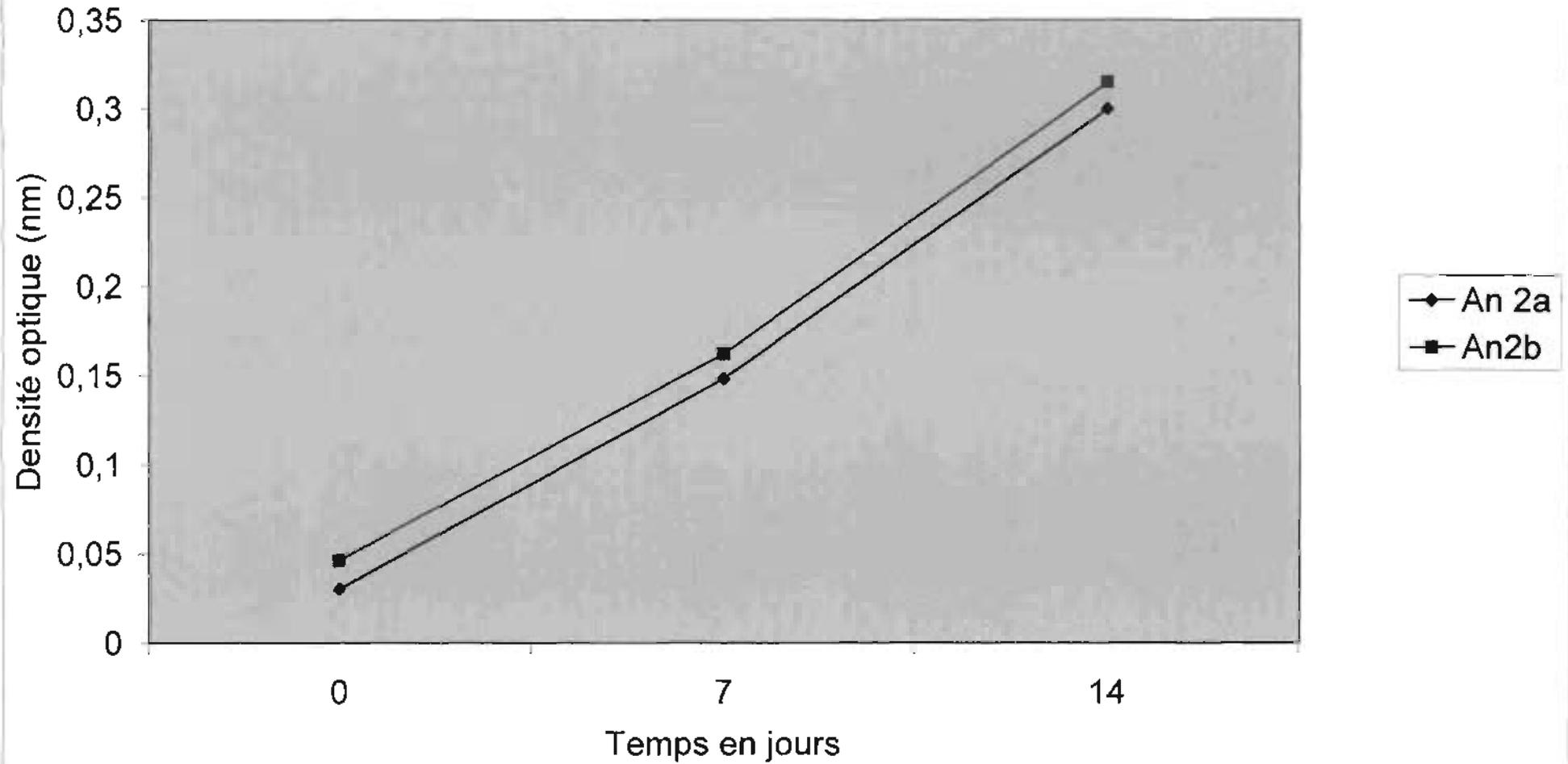
Blank = tampon seul

DO = densité optique

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

La représentation graphique des DO en fonction du temps donne la cinétique des anticorps de cobayes immunisés contre les fractions 2a et 2b du milieu intracellulaire de *C. Chauvoei*.

FIG n°7: ELISA/Ac anti Clostridium chauvoei du milieu intracellulaire



Immunogénicité des fractions protéiques du corps bactérien

Les résultats sont rapportés dans le tableau XVII suivant :

Tableau XVII : Titre (DO) Ac des sérums de cobayes vaccinés contre les fractions protéiques du corps bactérien

Animal	Avant inoculation		1 semaine après inoculation		2 semaines après inoculation	
	DO	Signif	DO	Signif	DO	Signif
3a	0,044	-	0,159	+	0,325	++
3ad	0,051	-	0,146	±	0,300	++
3b	0,061	-	0,121	+	0,247	++
Témoins	+ 0,100 - 0,036	+		+		+
Blank		-		-		-

Blank = tampon seul
DO = densité optique

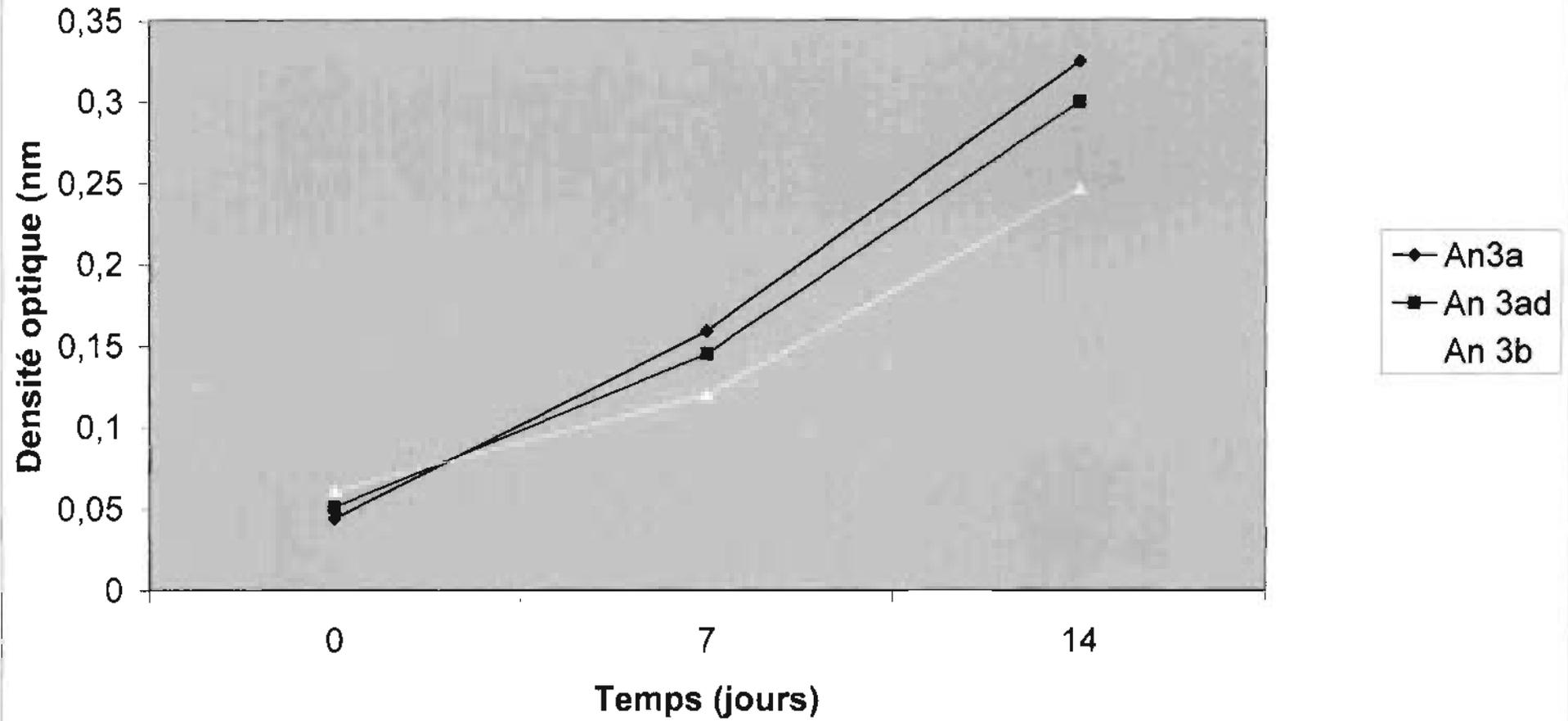
Ces résultats montrent que les animaux ayant reçu les fractions 3a et 3b ont développé une bonne protection immunitaire qui s'est avérée beaucoup plus importante pour ceux ayant reçu la fraction 3a non dissociée du corps bactérien.

La fraction 3a ayant subi la dissociation des glycoprotéines a donné un titre en anticorps plus faible, une situation qui vient corroborer les observations faites par ARNON, R. sur le fait que les modifications des protéines par des traitements physiques (comme la chaleur) ou chimiques entraînent des changements de conformation qui dans certains cas (mais non certainement) peuvent modifier ou diminuer l'immunogénicité (ARNON, R., 1974).

Ceci a été observé dans la dissociation des glycoprotéines de la paroi avec la fraction 3a du corps bactérien de *Clostridium chauvoei* qui a donné avant dissociation une valeur en DO/ELISA anticorps de 0,325 et après dissociation une valeur en DO de 0,300 avec une baisse significative de l'immunogénicité de l'ordre de 0,025.

La représentation graphique des DO en fonction du temps donne la cinétique des anticorps de cobayes immunisés contre les fractions 3a, 3a dissociée et 3b du corps bactérien de *C. chauvoei*.

Figure n°8:ELISA anti Clostridium chauvoei du corps bactérien



- Cinétique des classes d'immunoglobulines IgG et IgM

Le dosage des classes d'immunoglobulines a donné les résultats suivants :

. Milieu extracellulaire

Les résultats sont rapportés dans le tableau XVIII suivant :

Tableau XVIII : Dosage des classes d'immunoglobulines de cobayes du milieu extracellulaire :

N° animal	(c) Ig en g/l avant inoculation	(c) Ig en g/l 7j après inoculation	(c) Ig en g/l 14j après inoculation
An3 IgG	0,990	2,94	5,90
An3 IgM	1,70	1,30	0,30
An7 IgG	1,042	3,30	6,40
An7 IgM	2,03	1,35	0,85
An19 IgG	1,116	3,45	7,39
An 19 IgM	2,140	1,054	0,42
An 21 IgG	0,956	3,11	5,99
An21 IgM	1,528	1,02	0,37

La représentation graphique est rapportée dans la figure 9.

Les résultats obtenus montrent une augmentation des concentrations en immunoglobulines G avec le temps. Ces valeurs sont plus élevées chez les animaux ayant reçu les fractions 3 et 19. Les concentrations obtenues avec les immunoglobulines M sont plus faibles que celles obtenues avec les Immunoglobulines G : ces immunoglobulines M ont tendance à baisser avec le temps, ce qui justifie les observations faites par BACH, (1982.)

. Milieu intracellulaire

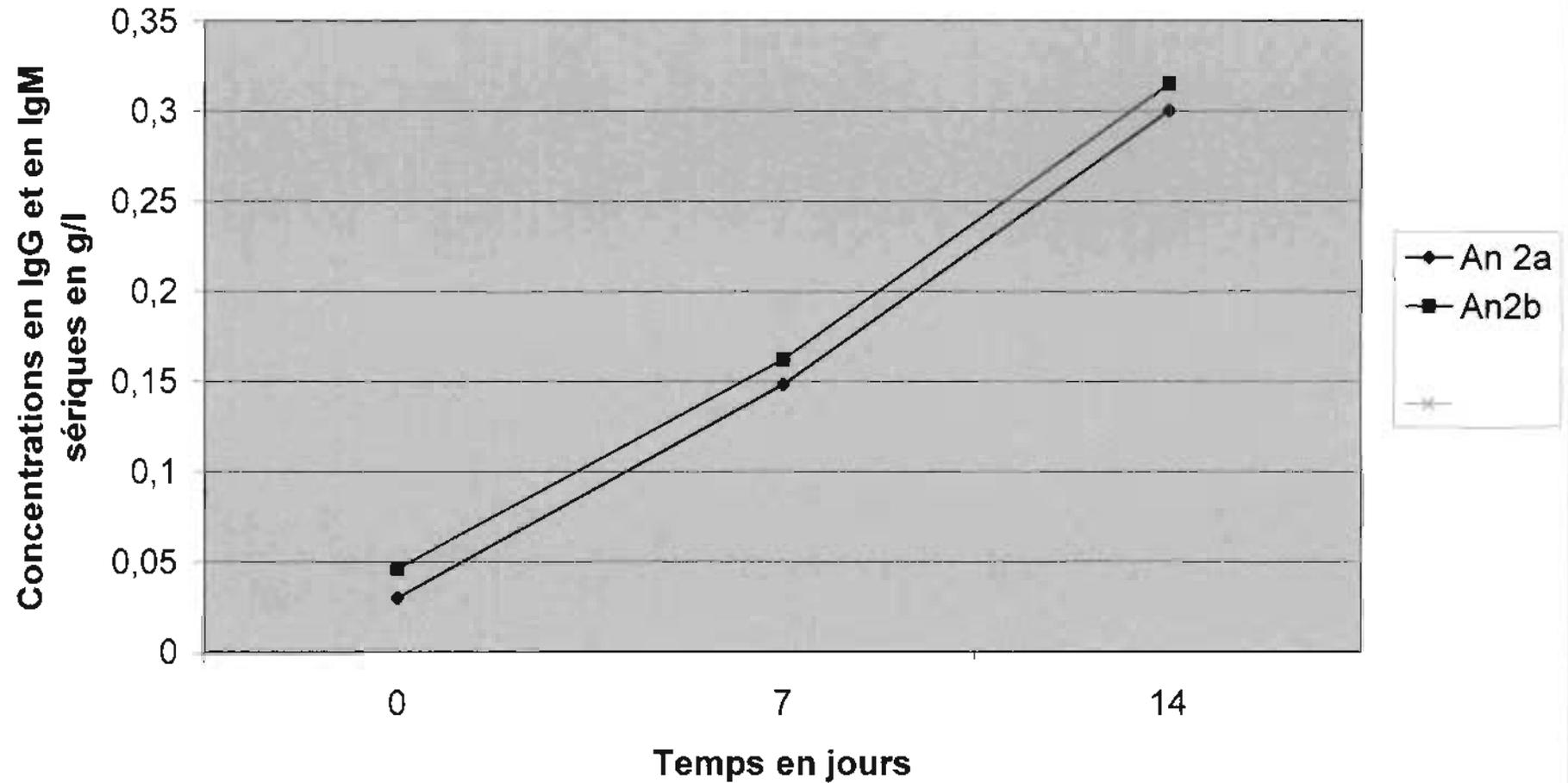
Les résultats sont rapportés dans le tableau XIX suivant :

Tableau XIX : Dosage des classes d'immunoglobulines de cobayes du milieu intracellulaire :

N° animal	(c) Ig en g/l avant inoculation	(c) Ig en g/l 7j après inoculation	(c) Ig en g/l 14j après inoculation
An 2a IgG	2,098	4,61	6,75
An 2a IgM	1,420	1,005	0,35
An 2b IgG	1,02	3,17	6,25
An 2b IgM	1,320	0,932	0,32

La représentation graphique est rapportée dans la figure 10.

Cinétique des IgG et des IgM anti Clostridium chauvoei du milieu intracellulaire



On note comme précédemment une augmentation des concentrations en IgG avec le temps avec des valeurs élevées en fin d'immunisation.

Les IgM ont évolué en sens inverse avec des valeurs plus faibles que celles obtenues avec les IgG.

. Corps bactérien

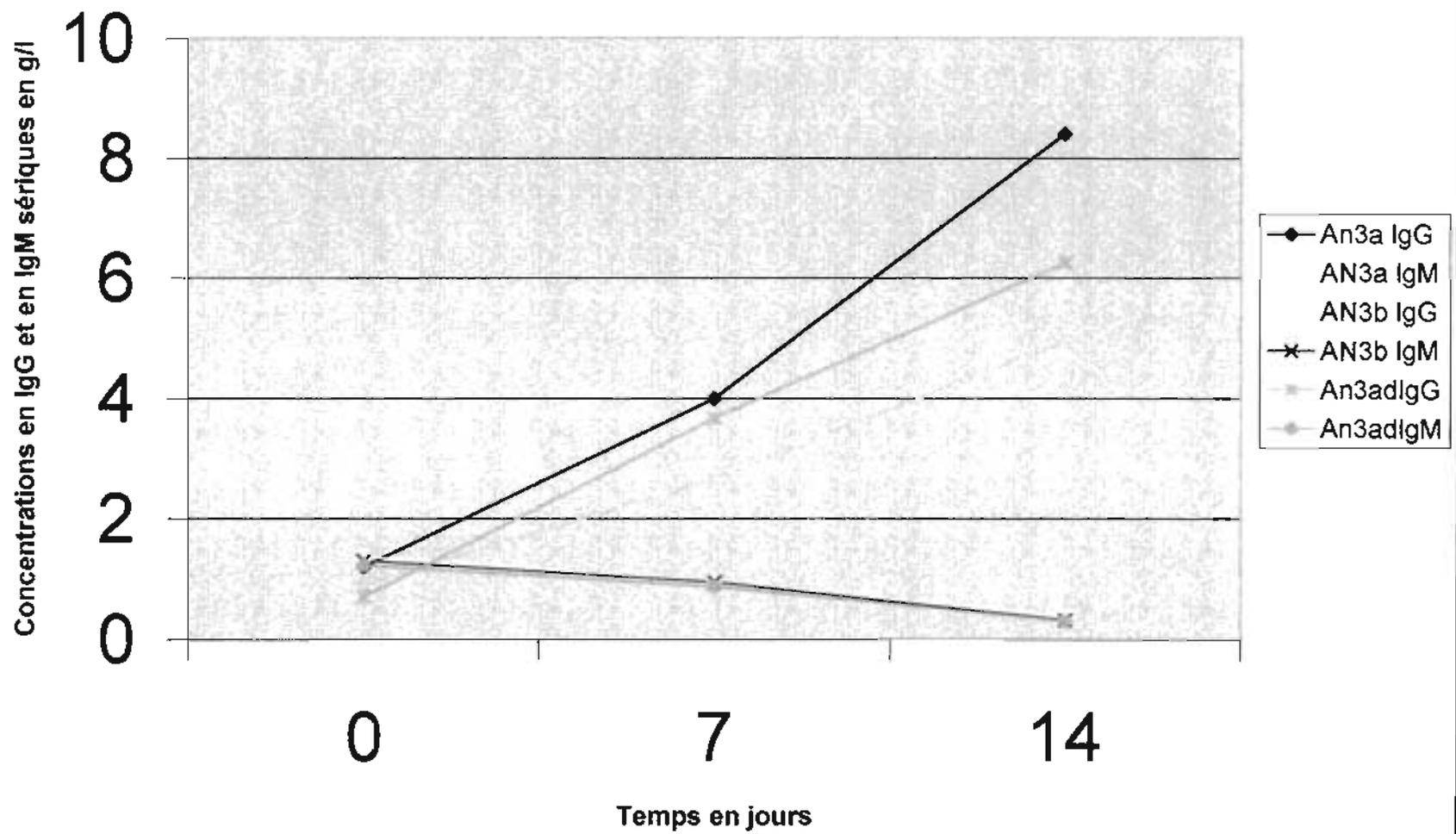
Les résultats sont rapportés dans le tableau XX suivant :

Tableau XX : Dosage des classes d'immuoglobulines de cobayes du corps bactérien :

N° animal	(c) Ig en g/l Avant inoculation	(c) Ig en g/l 7 j après inoculation	(c) Ig en g/l 14 j après inoculation
An 3a IgG	1,20	4,000	8,41
An 3a IgM	1,37	0,950	0,37
An 3a Dissocié IgG	0,700	3,67	6,25
An 3a Dissocié IgM	1,23	0,87	0,30
An 3b IgG	0,910	2,67	4,94
An 3b IgM	1,300	0,948	0,31

La représentation graphique est rapportée dans la figure 11

Fig 11: Cinétique des IgG et des IgM anti *Clostridium chauvoei* du corps bactérien



Les valeurs obtenues avec la fraction 3a s'avèrent plus élevées que celles de la fraction 3b en ce qui concerne les immunoglobulines G.

La fraction 3a dissociée a donné des valeurs en IgG plus faibles, ce qui justifie encore les observations de ARNON et al (1974).

Westernblot sur sérums de cobayes vaccinés contre les fractions 19 exocellulaire et 3ad du corps bactérien et contrôle de ces deux fractions protéiques.

Les résultats sont rapportés dans la figure 12

Ac	Ac
antiP19	antiP3ad :
+	+
P19	P3ad

1

2



Figure 14 : Test de Western Blot sur sérums de cobayes vaccinés contre la fraction 19 exocellulaire et contre la fraction 3ad du corps bactérien de *Cl. Chauvoei*.

La figure 12, montre la présence de bandes marron (réaction positive) sur la protéine 19 et sur la fraction 3ad, ce qui confirme les résultats obtenus en ELISA anticorps.

Séparation des anticorps correspondant aux antigènes les plus immunogènes par électrophorèse

. Le milieu extracellulaire

Les résultats sont rapportés sur le tableau XXI :

Tableau XXI : Teneurs en g/l des immunoglobulines sériques de cobayes obtenues en électrophorèse sur acétate de cellulose (sérum récoltés 14 jours après immunisation).

Globulines	An 3	An7	An19	An21
$\alpha 1$	0,56	0,66	0,72	0,57
$\alpha 2$	1,30	1,55	1,68	1,34
β	1,46	1,70	1,84	1,47
γ	2,96	3,48	3,76	3,01

Par comparaison aux valeurs normales, une augmentation notable des teneurs en fractions immunoglobuliniques est notée. Ceci justifie l'action immunogène des fractions protéiques exocellulaires inoculées aux cobayes.

Les résultats sont rapportés dans la figure 13

21 19 7 3



FIG N°13 : Electrophorèse sur acétate de cellulose des immunoglobulines sériques de cobayes vaccinés contre les fractions 3 - 7 - 19 et 21 du milieu extracellulaire de *Cl. chauvoei*

On constate l'apparition de bandes correspondant respectivement aux globulines sériques qui ont été synthétisées au cours du test d'immunisation. On a noté l'ordre d'apparition croissante le α 1, les α 2 les β et les γ globulines.

Les bandes obtenues avec les sérums de cobaye immunisés contre la fraction 19, semblent plus concentrées en fractions immunoglobulines que les autres, justifiant ainsi les résultats obtenus en ELISA et en immunoturbidimétrie.

. Le milieu intracellulaire et le corps bactérien

Les résultats sont rapportés dans le tableau XXII

Tableau XXII : Electrophorèse sur acétate de cellulose des immunoglobulines de cobayes vaccinés contre les fractions 2a et 2b du milieu intracellulaire et contre les fractions 3a et 3b du corps bactérien de *Cl. Chauvoei*.

Globulines	An 2a	An 2b	An 3a	An 3ad	An 3b
α 1	0,64	0,59	0,79	NF	0,48
α 2	1,49	1,38	1,85	NF	1,12
β	1,63	1,52	2,03	NF	1,22
γ	3,34	3,10	4,14	NF	2,49

An = Animal
NF = non fait

Comparés aux valeurs normales, ces résultats montrent une augmentation sensible des fractions immunoglobulines sériques de cobayes, justifiant l'action immunogène des fractions endocellulaires 2a, 2b et 3a, 3b du corps bactérien.

Les résultats sont rapportés sur la figure 14.

Il est constaté l'apparition de bandes correspondant respectivement aux globulines sériques qui ont été synthétisées au cours du test d'immunisation : il est à noter un ordre d'apparition croissante les $\alpha 1$, les $\alpha 2$, les β et les γ globulines.

Les bandes obtenues à partir de sérums de cobayes vaccinés contre la fraction 3a semblent plus concentrées en fractions immunoglobulines : ce qui justifie les résultats obtenus en ELISA/ et en immunoturbidimétrie.

II.5. Analyses moléculaires des fractions protéiques

Les analyses ont été effectuées en deux étapes :

Une digestion enzymatique par l'endoprotéaselysine C

La séparation par la technique HPLC sur DEAE C18 comme phase stationnaire et de l'Acétonitrile 2 à 45 % en TFA 0,1% comme phase mobile.

Séparation des peptides de la protéine 19 exocellulaire :

Les résultats de la séparation sont rapportés dans la figure 15

2b 2a 3a 3b

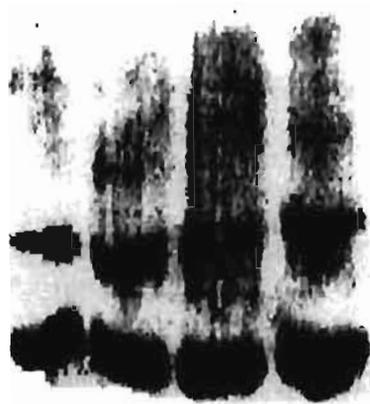


FIG N°14: Electrophorèse sur acétate de cellulose des immunoglobulines de cobayes vaccinés contre les fractions 2a et 2b du milieu intracellulaire et les fractions 3a et 3b du corps bactérien de *Cl. chauvoei*

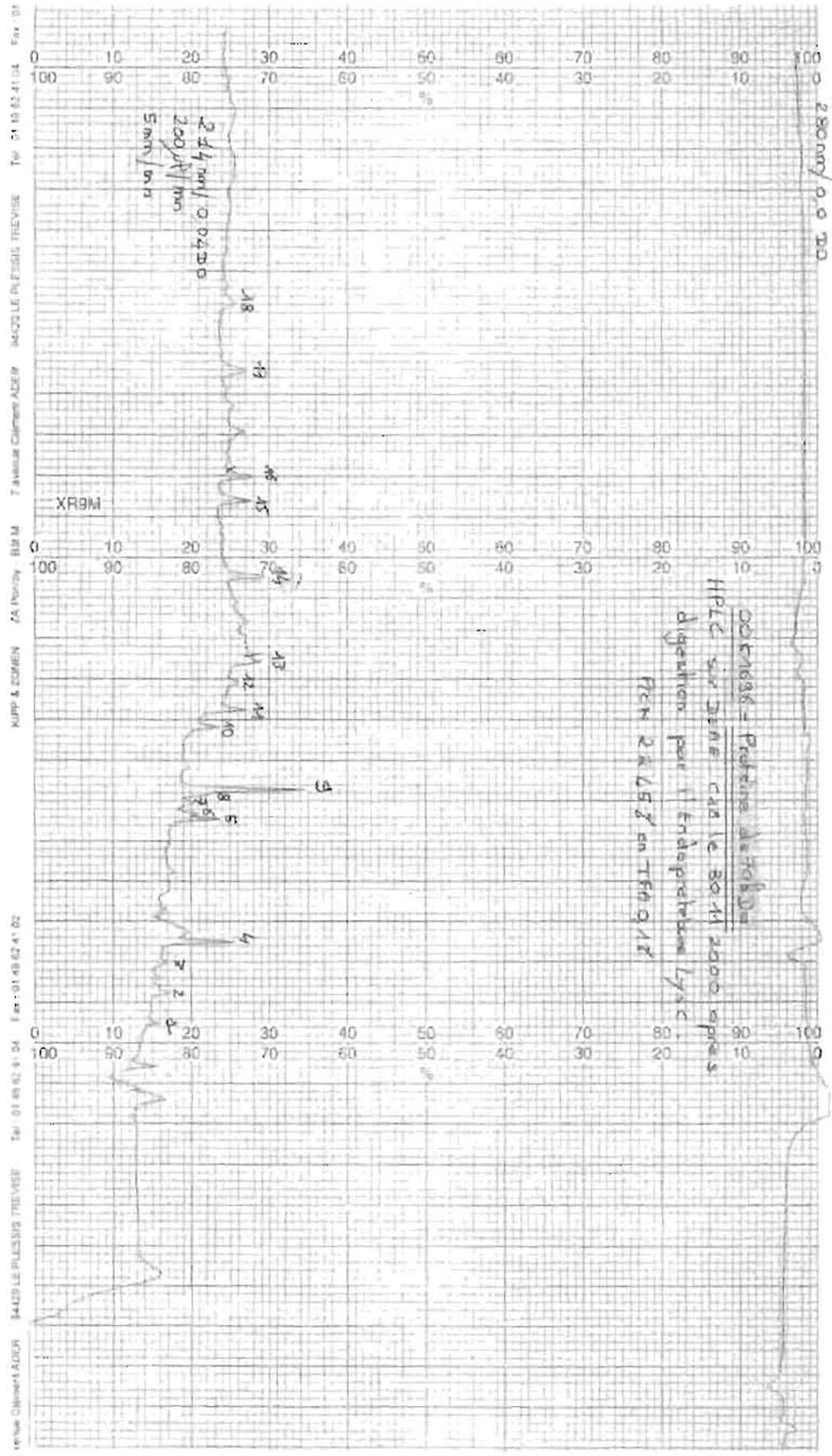


Figure 15: HPLC de la protéine 19 exocellulaire de *C. chauvoei*

Il est constaté l'apparition de 18 pics de densités optiques différentes.
Le pic n° 14 a fait l'objet d'un microséquençage.

Echantillon standard :

Un échantillon standard a été utilisé à titre comparatif avec la fraction 19.
La séparation des acides aminés du peptide standard a donné les temps de rétention et les valeurs des densités optiques suivants :

Les résultats sont rapportés dans le tableau XXIII :

Tableau XXIII : Chromatographie HPLC de l'échantillon standard (19 acides aminés)

Numéro acide aminé	Index alphabétique	Nom	Temps de rétention en mn	Densité optique D.O
1	D	Asp	4,00	1,08
2	N	Asn	4,30	1,02
3	S	Ser	5,30	0,71
4	Q	Gly	5,50	0,86
5	T	Thr	5,75	0,80
6	G	Gly	6,00	0,78
7	E	Glu	6,50	1,03
8	H	His	7,75	0,81
9	A	Ala	8,30	0,77
10	R	Arg	10,00	0,87
11	Y	Tyr	10,50	0,80
12	P	Pro	12,75	0,79
13	M	Met	13,50	0,88
14	V	Val	13,80	0,77
15	W	Tryp	16,00	0,90
16	F	Phe	16,80	0,84
17	I	Ile	17,00	0,79
18	K	Lys	17,50	0,99
19	L	Leu	18,00	0,90

Les résultats montrent que certains acides aminés ont une densité optique maximale : c'est le cas de l'Aspartate, de l'Asparagine, de la Glutamine, de l'Arginine, du Tryptophane, de la Lysine et de la Leucine.

Cette densité optique devient minimale pour la Sérine, la Tyrosine, la Méthionine et la Valine.

Des valeurs moyennes de ces densités optiques sont notées pour le reste des acides aminés.
La valeur du temps de rétention est minimale pour l'Aspartate et est maximale pour la Leucine.

La représentation graphique de cette séparation est indiquée dans la Figure 16 :

- Les résidus acides aminés du fragment 14 de la protéine 19 du milieu extracellulaire de *Cl. chauvoei*

Le fragment 14 de la protéine 19 séparé par la technique HPLC a donné les résultats suivants qui sont rapportés dans le tableau XXIV suivant :

Tableau XXIV : HPLC sur les résidus acides aminés du fragment 14 de la protéine 19 exocellulaire.

Numéro	Liste alphabétique	nom	Temps de rétention en mn	Densité Optique (DO)	(c) en picomoles
1	G	Gly	6,09	1,23	8,99
2	L	Leu	18,05	1,21	7,80
3	V	Val	14,03	1,16	6,95
4	L	Leu	18,05	1,21	7,69
5	I	Ile	17,51	1,02	6,68
6	T	Thr	5,89	0,57	1,78
7	L	Leu	18,05	1,02	5,13
8	S	Ser	5,34	0,55	1,24
9	Q	Gln	5,63	0,72	5,10
10	H	His	7,98	0,45	1,89
11	L	Leu	18,05	0,89	3,80
12	Q	Gln	5,63	0,59	1,54
13	K	Lys	17,79	0,67	1,42

Ce tableau donne les valeurs des temps de rétention des résidus acides aminés du fragment 14 de la protéine 19 du milieu extracellulaire de *Cl. chauvoei* obtenus après la chromatographie HPLC.

Etude comparative des résidus du standard et du fragment 14 de la protéine 19 exocellulaire :

En comparant les résultats de la HPLC, du standard et de ceux du fragment 14 de la protéine 19, les résultats sont rapportés dans le tableau XXV suivant :

Tableau XXV : Comparaison des DO et Tr du standard et du fragment 14 de la protéine 19 exocellulaire

Numéro AcideAminé	Nom AcideAminé	Temps de rétention Standard en minutes	Temps du fragment 14 de rétention protéine 19 en minutes	DO standard	DO fragment 14 de la protéine 19
1	Glycine	6,00	6,09	0,78	1,23
2	Leucine	18,00	18,05	0,90	1,21
3	Valine	13,80	14,03	0,77	1,16
4	Leucine	18,00	18,05	0,90	1,21
5	Isoleucine	17,00	17,51	0,79	1,02
6	Thréonine	5,75	5,89	0,80	0,57
7	Leucine	18,00	18,05	0,90	1,02
8	Sérine	5,30	5,34	0,71	0,55
9	Glutamine	5,50	5,63	0,86	0,72
10	Histidine	7,75	7,98	0,81	0,45
11	Leucine	18,00	18,05	0,90	0,89
12	Glutamine	5,50	5,63	1,03	0,59
13	Lysine	17,50	17,79	0,99	0,67

Ces résultats montrent que les temps de rétention des résidus acides aminés du standard et de ceux de la protéine 19 sont sensiblement identiques.

A temps de rétention égal, certains résidus acides aminés de la protéine 19 ont des valeurs de densité optique plus élevées que celles des témoins : c'est le cas de la Glycine de la Leucine, de la Valine et de l'Isoleucine.

Des valeurs des densités optiques plus faibles sont notées pour le reste des acides aminés : c'est le cas de la Thréonine, de la Sérine, de la Glutamine, de l'Histidine et de la Lysine.

. Microséquençage peptidique du fragment 14 de la protéine 19 exocellulaire :

La séquence du fragment 14 de la protéine 19 exocellulaire de *Cl. chauvoei* obtenue est la suivante :

« GLVLITLSQHLQK » :

correspondant aux acides aminés suivants

Gly (Glycine) – Leu (Leucine) – Val (Valine) – Leu – Ile (isoleucine) – Thr (Threonine) – Leu – Ser (Sérine) – Gln (Glutamine) – His (Histidine) – Leu – Gln – Lys (Lysine) -

.Le poids moléculaire de cette protéine 19 déterminé par électrophorèse est égal à 70 KDa.

Cette séquence du fragment 14 de la protéine 19 est caractérisée par une prédominance d'acides aminés aliphatiques (leucine, Isoleucine, Glycine, Valine), formant 55% du total.

Les aminoacides alcools (Sérine, Thréonine) forment 15% du total, de même que les aminoacides basiques (Lysine, histidine).

II.6. Sondes nucléaires dérivées de la région peptidique d'intérêt

A partir de la séquence peptidique , il a été possible grâce au logiciel DNASIS d'étudier la séquence probable d'une sonde nucléaire aléatoire.

Par comparaison avec les codons les plus probables du gène *Clostridium*, il a été possible d'en déduire la séquence nucléique d'une sonde dégénérée.

La comparaison est obtenue à l'aide du tableau XXVI.

Gly	leu	Val	Leu	Ile	Thr	Leu	Ser	Gln	His	Leu	Gln	Lys
GGW	YTW	GTW	YTW	ATW	ACW	YTW	WSH	CAA	CTW	YTW	CAA	AAR
...
<u>GGT</u>	<u>TTA</u>	<u>GTT</u>	<u>TTA</u>	<u>ATT</u>	<u>ACT</u>	<u>TTA</u>	<u>TCT</u>	<u>CAA</u>	<u>CAT</u>	<u>TTA</u>	<u>CAA</u>	<u>AAA</u>
<u>GGC</u>	<u>TTC</u>	<u>GTC</u>	<u>TTC</u>	<u>ATC</u>	<u>ACC</u>	<u>TTC</u>	<u>TCC</u>	<u>CCC</u>	<u>CAC</u>	<u>TTG</u>	<u>CAG</u>	<u>AAG</u>
<u>GGA</u>	<u>CTT</u>	<u>GTA</u>	<u>CTT</u>	<u>ATA</u>	<u>ACA</u>	<u>CTT</u>	<u>TCA</u>			<u>CTT</u>		
<u>GGC</u>	<u>CTC</u>	<u>GTC</u>	<u>CTC</u>		<u>ACG</u>	<u>CTC</u>	<u>TCG</u>			<u>CTC</u>		
	<u>CTA</u>		<u>CTA</u>			<u>CTA</u>	<u>AGT</u>			<u>CTA</u>		
	<u>CTG</u>		<u>CTG</u>			<u>CTG</u>	<u>AGC</u>			<u>CTG</u>		

En fonction des correspondances suivantes

- R = A ou G
- Y = C ou T
- K = G ou T
- M = A ou C
- S = C ou G
- W = A ou T
- B = pas A
- D = Pas C
- H = Pas G
- V = Pas T

L'on déduit la séquence nucléique qui est la suivante :

GGW/ YTW/ GTW/ YTW/ ATW/ ACW/ YTW/ WSH/ CAA/ CTW/ CAA/ AAR

Cette sonde dégénérée permettra d'isoler une partie du gène qui peut être utilisée comme sonde pouvant cloner le gène complet de *Cl chauvoei*.

Par hybridation cette sonde permettra d'identifier le gène du chromosome bactérien qui code pour l'antigène immunogène (la fraction 14 de la protéine 19) de *Cl chauvoei*.

Le gène ainsi identifié est isolé, sera utilisé pour la construction de la souche vaccinale recombinante bivalente

II.2. Conclusions générales :

La recherche de l'antigène soluble la plus immunogène de *Cl chauvoei*, candidat à la construction d'une souche recombinante bivalente contre les deux maladies charbonneuses du bovin est entreprise par la mise en œuvre de diverses techniques.

La souche de *Cl chauvoei* utilisée pour les recherches a été isolée d'un foyer de charbon symptomatique, il y'a quelques années dans la région de Thiès au Sénégal.

A cet effet, une méthode de revivification et de caractérisation bactérienne est réalisée. L'extraction des protéines totales par la méthode biochimique de centrifugation, de chromatographie et d'électrophorèse est appliquée aux produits de trois compartiments d'une culture bactérienne (extracellulaire, intracellulaire et corps bactérien).

Au total, 16 fractions protéiques sont trouvées dans le compartiment exocellulaire, 2 dans le milieu endocellulaire et 2 dans le corps bactérien.

Par la technique de MORNER, il a été possible de dissocier les glycoprotéines du corps bactérien.

Chacune de ces fractions protéiques a servi à inoculer un lot de 3 cobayes pour révéler leur propriété biologique et immunologique liées à la production d'anticorps.

Les cobayes inoculés sont suivis par le test ELISA anticorps et dosés par immunoturbidimétrie : des IgM en faible quantité et des IgG en grande quantité sont révélés.

En fonction de ces données, les produits les plus immunogènes de *Cl chauvoei* ont été identifiés comme étant une protéine excrétée dans le milieu de culture identifiée comme étant la protéine 19. L'autre est une protéine de structure du corps bactérien de valeur immunologique sensiblement les mêmes.

La protéine 19 a définitivement été retenue pour la suite des recherches en raison de son accessibilité plus immédiate.

Le fragment 14 de la protéine 19 a été microséquencé après digestion enzymatique par l'endoprotéasylase C et séparation des peptides par HPLC.

La séquence du fragment 14 a permis d'obtenir une sonde nucléique dégénérée destinée à l'identification par hybridation du gène codant pour la protéine 19

Perspectives de recherche

Les résultats obtenus dans le cadre du présent travail, orientent vers une poursuite des recherches dans le domaine de la biologie moléculaire à savoir la fabrication de la sonde nucléique à partir de la séquence peptidique du fragment 14 de la fraction 19 exocellulaire de *Cl. Chauvoei*.

La sonde obtenue, permettra d'identifier le gène du chromosome de la bactérie par la technique de l'hybridation moléculaire.

Le gène identifié et isolé sera recombiné au plasmide de *Bacillus anthracis* dans la construction de la souche vaccinale recombinante bivalente.

La souche vaccinale obtenue sera caractérisée et soumise à un coût de qualité (stabilité, innocuité, efficacité).

Si les tests sont concluants, la souche sera utilisée pour une production de vaccin recombinant qui sera évaluée en station d'abord, en milieu médical ensuite, avant d'avoir l'autorisation d'une production commerciale.

BIBLIOGRAPHIE

Références bibliographiques:

- ARNON, R. 1974.
Conformation and physio chemical factor influencing antigenicity
In I. BRENT et HOLBOROW, J
Progress in Immunology II, Vol 2 Amsterdam North Holland ed p 5.
- BARNARD, J.P; FRIEDLANDER, A.M. 1999.
Vaccination against Anthrax with attenuated recombinant strain of *Bacillus anthracis* that produce protective antigen
Infection and Immunity, 67(2): 562 - 567.
- BARTKUS, J. M and LEPPLA, S, H .1989.
transcriptional regulation of the protective antigen gene of *Bacillus anthracis*
Infect Immune 57: 2295 - 2300.
- BEAIL, F,A; TAYLOR, M,J. 1962.
Rapid lethal effects in rats of a third component found upon fractionating the toxin of *B.anthraxis*.
J.Bact. 83: 1274 - 1280.
- BAUDHER, S and DAB, F.1996.
Standardisierung der bestimmung von 14 proteinen in sérum auf der basis de neues FCC/ BCR/CAP.
Internationalien referenzmabaton, CRM, J. Lab. Méd 20 (3), 145 – 152.
- BENJAMINI, E ; MICHAEL, D ; YOUNG, I, D. 1972.
Antigenic determinants of proteins of defined sequences.
Contemp. Trop. Microbiol. Immunol., 58 - 85.
- BLANCOU, J,M .1974.
Etude d'un vaccin mixte contre le charbon le charbon bactérien et le charbon symptomatique Rev.Elev.Méd vét.pays. Trop 27 (2): 183 - 187.
- BLANCOU, J,M; RAKOTOARIVELO, J; SERREL, H .1971.
Note sur les premiers cas de charbon symptomatique à Madagascar Rev. Elev. Med. Vet; Pays Trop 24 (1) : 19 - 24.
- M, BRADFORD. 1976.
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - Dye binding.
Analytical. Biochemistry 72, 248 - 254.
- BRIDGE, M, C; MOGG, A; TEFLER, J, L; LEVIS, M, S; MILLER, J; TUCBOL, P, C; BAILLIE, L.1998.
Protective efficacy of a recombinant protective anrigen against B. anthracis challenge and assesement of immunological Y marker
Vaccine 16 (8): 810 - 817.
- BRITTEN, DAVIDSON. 1989.
Modèle de contrôle génétique, Science: 165, 347 – 349.
- BROOME, S and W, GILBERT. 1978.
Immunological screening method to detect specific translation products. Proc. Natl Acad. Sci. USA: 75: 2746 - 2749.

BROSSIER, F ; WEBER, M ; MOCK, M and SIRARD, J, C. 2000
Role of toxin functional domains in Anthrax pathogenesis *Infection and immunity*, 1781 - 1786. AMS.

BYRNE, M, P; SMITH, T, J; MONTGOMERY, V, A; SMITH, L, A. 1998.
Purification potency and efficacy of the botulinum neurotoxin type A binding domain from *Pichia pastoris* as a recombinant vaccine candidate
Infection and Immunity, **66** (10): 4817.

BURDOV, A, N. 1962.
Simultanéous immunization of farms animals against aérobic and anérobic infections: combined vaccine against anthrax, malignant oedema and blackleg trudy *Osesoyuz. inst.eksp.vet*
26: 139 - 144.

CATALDI, A; A, FOUET and M, MOCK. 1992.
Regulation of pag' gene expression in *Bacillus anthracis* use of pag - lac Z transcriptionnal fusion. *FEMS, Lett*, **98**: 89 - 94.

CIMMONS, M. 1998.
DoD move forward with anthrax vaccination program . *ASM news* **64**, 128 - 129.
CHO, H, J. 1971
Demonstration of complement fixing antibody in the sera of vaccinated with combined living blackleg anthrax - vaccine. *canad.J. Comp.méd* **35**(4): 155 - 159.

CHIPPENDALE, G,M et BECK, S.D. 1966.
Staining of glycoproteins *J.insect.physiol.* **12**, 1629 1638.

COLLINS, J, R. 1953.
Etude des constituants des micopolyosides et des glycoprotéines.
Anal. Chim. Acta in traité de biochimie générale, P Boulanger et al Tn°1.

CALVIN, BM ; EMDAHL B AND HANKS, AR. 1974.
Determination of carboxie by High Pressure Liquid Chromatography
Journal of AOAC vol 5, 003 PP? 648 - 652.

DAI, Z; SIRARD, J,C; MOCK, M and T, M. 1995.
The Atx gene product activates transcription of the anthrax toxin genes and is essential for virulence
Molecular Microbiol **11**: 1171 - 1181.

DAVIS, B, J. 1964.
Disc electrophoresis: methods and application to human serum protein *Anal New York Acad. Sci*: 121 - 404.

DELPY, L, P. 1952.
Méthodes d' immunisation active contre les pasteurelloses septicémiques *Off. int. Epiz* vingtième session rapport n° 248.

DOUGLAS, CIVELI et HERBERT. 1984.
Revue sur les exemples de polyprotéines, *Ann. Rev. Biochem.*, **53**, 665 - 715.

DOUROUGH, H,W and THORSTERSON JH. 1975.
Analysis for carbomates.
Journal of chromatographic sciences
Vol 13, PP , 212 -224.

DRAGON, DC; RENNISE, P. 1995.

The ecology of anthrax spores: tough but not invincible: *Can. vet.J* 36 295 - 300.

FARCHAUS, J, W; REBOT, W, J; JENDREKS; LITTLE, S, F. 1998.

Fermentation, purification and characterization of protective antigen from a recombinant, avirulent strain of *Bacillus anthracis*

Applied environmental Microbiology 64 (3): 986 - 991.

FISH, D; MAHLANDI, B, G; DOBBS, J, P; LINCOLN, R, E. 1968.

Purification and properties of in vitro produced anthrax toxin components

J. Bacteriol, 95 : 907 - 918 IST (1969) A synthrax, vaccin mixte vivant, stabilisé, avirulent contre les charbon symptomatique et bacteridien (documents IST).

FRUTH BRUNO.1962.

Quantitative analysis by spot tests.

FREIR, W; LAWRENCE, F; HOPE, J; and CASSIDY, R, M. 1974.

Analysis of carbamates insecticides by fluorogenes labelling in high speed Liquid Chromatography.

Canada, Vol 12, p Journal of chromatographic sciences.

FRANKEL, J; C, JELLINCK.1951.

Studies on glycoproteins

Acta. Soc. Med, 68, 2.

GERSHONI, J, M and PALADI, G E. 1983

Protein blotting : principles and applications.

Anal. Biochem. 131, 1 - 15.

HAMBLETON, P, J; A, CARMAN and J, M. 1984.

Anthrax, the disease in relation to vaccines

Vaccine: 125 - 132.

HANBY, W, E and H, N, RYDON. 1946.

The capsule substance of *B. anthracis*. *Biochemie.J.* 40: 297 - 309.

HEKTOEN, L et COLE, A, G. 1928.

Etude des glycoprotéines des milieux biologiques

J. Infectious diseases, 42, 1.

HIDLANAN, TOBOKTA J. 1949.

Etude des constituants des glycoprotéines

J. Exped. Med. 51, 319 - 327.

IVINS, B, E; EZZEL, J, W; JEMSKI, K, W; HEDLUND, J, D and LEPPLA, S, H. 1986.

Immunisation studies with attenuated strains of *Bacillus anthracis*

Infect immune, 52: 454 - 458

IVINS, B, E; WELKOS, S, L; KNUDSON, G, B; LITTLE, S, F. 1990.

Immunization against anthrax with aromatics compounds dependant (PRO) mutants of *Bacillus anthracis* and with recombinant strain of *Bacillus subtilis* that produce Anthrax protective antigen .

IVINS, B, E; WELKOS, S, L; LITTLE, S, F ; CUMMINS, M, H; NELSON, G, O. 1992.

Immunization against anthrax with the anthrax protective antigen combined with adjuvants.

Infected Immun., 60, 662 - 668.



- JHONSON, J, M; YUEN, L; DENEIL, R , E and CONSIGL, R 1983
Efficient transfert of proteins from acetic urea and isoelectric – focusing gels to nitrocellulose membrane filters with retention of protein antigenicity.
Biochemistry, **133**, 126 – 131.
- KEISS, P ; KHALIF, A, S ; SCHUPP, J ; TRAVIS, SE ; RICHMOND, K, L ; ADAIR, D, M ; HUGUES, J; KUSHIE, C, R; JACKMAN, P. 1997.
Molecular evolution ad diversity in *Bacillus anthracis* as detected by Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP).
J. Bacteriol., **179**, 818 – 824.
- LEPPLA, S, H. 1995.
Anthrax toxins, *handb.nat toxins* **8**: 543 - 572.
- LEPPLA, S, H. 1988.
Production and purification of anthrax toxin *Methods Enzymol.* **165**: 103 - 116.
- LEPPLA S, H. 1991.
The anthrax toxin complex, P 277 - 278. in J, A Alouf and J, Freer (ed), source book of bacterial proteins toxins. Academic Press, New York.
- LEPPLA, S, H. 1982.
Anthrax toxin oedeme factor a bacterial adenylate cyclase that increase cyclic AMP concentrations of eukaryostics cells.
Proc. Natl. Acad. Sci, USA, **79** : 3162 – 3166.
- LETT, ROSENFELD et EVANS. 1986.
Utilisation d'une maturation alternative pour engendrer des produits multiples à partir d'une seule unité de transcription.
Ann. Rev. Biochem., **55**, 1091 – 1117.
- LUCHESI, F. 1941.
The treatment of Anthrax.
JAMA, **116**, 1506 – 1506.
- LITTLE, S, F. 1996.
Characterization of lethal factor binding and cell receptor binding division of protective antigen of the anthracis using monoclonal antibodies.
J. Microbiol., **142**, 707 ~ 715.
- LINDBERG, E ; BLUE, G et WARNER, I. 1956.
Studies on sialic acids.
Acta. Doc. Med. Uppsaliensis, **61**, 1.
- LEDBERGER, E ; et LEDBERGER, M. 1953.
Chromatography.
Elsevier.Pub. Comp. Ed., Amsterdam Holland.
- LEVENE ET MORY. 1958.
Chemical Structures on glycoproteins.
J. Biochem., **28**, 287.
- L, LEMINOR. 1989.
bactériologie médicale, 2^{ème} édition.

- MATTAR, N. A; CORTILIAS, T.L; DIGENARS, M, S and STEFANINI DE GUZMAN, A , M. 1999.
Immunogenic power cellular and extracellular antigen of *Clostridium chauvoei* strains isolated in San Luis
Journal of anaérobe.
- MAIZEL, J, W.Jr. 1964.
Preparation electrophoresis in acrylamide gels Ann. N.Y.Acad.Sc., **211**, 381 - 390.
- MILLER, J; BRIDGE, B,W; MANCHEE, R, J; MOURE, P and BAILLIE, L, W. 1998.
Production and purification of recombinant protective antigen and protective efficacy against *B. anthracis*
Letters in Applied Microbiology Jan **26**(1): 56 - 6.
- MEYNELL, E and G, G, MEYNELL 1964.
The role of serum and carbone dioxide in capsule formation by *Bacillus anthracis*.
J. Gen. Microbiol **34** : 153 - 164.
- MASSAMINE, H. 1956.
Compte rendu 3^{ème} congrés international de biochimie, Bruxelles, 72.
- MASSAMINE, H ; OKAKO , S I ; TOBOKA. 1943.
Etude de la nature des liaisons mucopolyosides proteins.
J. Expd. Med, **45**, 121.
- MASSAMINE , H ; YOSIZAKA , Z et MART, M TOBOKA. 1951.
Etude de la nature des liaisons mucopolyosides proteines.
J. Expd. Med, **53**, 237.
- MORNER, C, T. 1889.
Classification des glycoproteines .
Arch. Physiol. **1**, 210.
- MORNER. 1955.
Quelques applications de la chromatographie sur papier à l'étude des glycoprotéines des milieus biologiques ;
3^{ème} Colloque hospital saint Jean, (209).
- MICHEL, C; POUSSOT, A; CHABASSOL, C. 1973.
Diagnostic bactériologique rapide de *Bacillus anthracis* par immunofluorescence.
Bull. Acad. Vét, **46** : 333 - 342.
- NEAL BURNETTIE, W 1981
Westernblotting electrophoretic transfert of proteins from sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radio coordinated proteins A.
Anals. Biochem, **112**, 195 - 203
- NEUBERGER, A. 1928 .
Etude de la nature des liaisons mucopolyosides protéines.
Biochem. J. **32**, 1435.
- ORNSTEIN, L. 1964.
Disc electrophoresis : back ground and theory
AnnalsNew york Acad. Sci, **121**: 321.

PASTOR, M, J; LAVLADA, M, D; SANCHEZ, VISCAINE, J, M and ESCRIBUANE, J, M
1989

Detection of African swine fever virus antibodies by immunoblotting assay,
Can, J, Vet, Res, **53**, 105 – 107

PATRA, G; VAISSAIRE, M; WEBER, M; LEVY, le DOUGET and MOCK, M. 1998.
Molecular characterization of *Bacillus* strains involved in outbreaks of anthrax in France in
1997 J. Clin. Microbiol **36** : 3412 - 3414.

PEZARD, C; BERCHE, P and MOCK, M. 1991.
Contribution of individuals components to virulence of *Bacillus anthracis*
Infect. immun, **59** : 3472 - 3477.

PEZARD, C; WEBER, M; SIRARD, J, C, BERCHE, P. 1995.
Protective immunity induced by *Bacillus anthracis* deficient strains.

PEZARD, C; E, DUFFLOT and M, MOCK. 1993.
Construction of *Bacillus anthracis* mutant strains producing a single toxin component.
J. Gen. Microbiol: 2459 - 2463.
Infect Immun **63**: 1369 - 1372.

PEZARD, C; LABRUYERE, E; MOCK, M. 1994.
La maladie du charbon: Données récentes sur *Bacillus anthracis*
Bull. Soc. Fr. Microbiol: **9** (1), 7 - 10.

POMERANTSEV, A, P. 1995.
Anthrax prophylaxis antibiotics resistant strain. STI – AR in combination with urgent
antibiotherapy
Comm – Oral International Workshop on Anthrax, Winchester.

POMERANTSEV, A, P ; STATUSTON, N, A ; MACKOV, Y, V ; MARION, I, J. 1997.
Expression of hemolysin AB gene in *Bacillus anthracis* vaccine strain ensure protection
against experimental haemolytic anthrax infection vaccine
15, 1846 – 1850

POULET, P. 1972.
Etude comparée de *B. anthracis* et de *B. cereus*: rapports antigéniques et application au
diagnostic différentiel.
Thèse Vét. Alfort.

REMISSE, V; PATRA, G; GARRIGUE, H; GUESDON, J, L; MOCK, M. 1996.
Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiply PCR analysis of
sequence on plasmid PXO1 and PXO2 and chromosomal DNA
FEMS, Microbiol. Lett, **145**, 9 – 16.

RIMINGTON, C. 1931.
Etude des glycoprotéines
Biochem. J **25**, 1062.

RIMINGTON, C. 1929.
Revue générale de biochimie.
Biochem. J. **23**, 430 – 1921.

J. C. SIRARD, M. WEBER, E. DUFFLOT, M. R. POPOFF and M. MOCK. 1997.
A recombinant *Bacillus anthracis* strain producing the *Clostridium perfringens* I_b component
induces protection against iota toxins.
infect immune **6566**; 2029 - 2033.

- STEFANINI DE GUZMAN, A , M. 1999.
Immunological study of *Clostridium chauvoei* strains isolated in San luis
Journal Anaerobe.
- STEFANINI DE GUZMAN, A , M. 1999.
Clostridium chauvoei: Immunological characterization of four antigenic preparations
J. Anaerobe.
- STEFANINI DE GUZMAN, A , M. 1999.
Study of activities of *Clostridium chauvoei* alpha and beta toxin in regional strains
J. Anaerobe.
- STEFANINI DE GUZMAN, A , M. 1998.
A cellular extract of *Clostridium chauvoei* a possible vaccine against blackleg
Biocell
- SIMPSON, R. M. 1964.
A study of the immunity produced in cattle by simultaneous inoculation with a number of
vaccines
Bull.epizoo.Dis.Afr, 12: 405 - 428.
- STARTEW, I, S. 1939.
Simultaneous prophylactic inoculation of cattle with anti anthrax glucoside vaccine and slack
leg formol vaccine
Sov, yet, vet: 4 : 29 - 30.
- SIEIRO, F; ASTARLOA, F. 1964.
A potency test in Guinea pigs for the evaluation of *Clostridium chauvoei* bacterins Am. J .
Vet.Res 25 (109): 1785 - 1787.
- SCHALM, O. W. 1975.
veterinary haematology: Norma values in blood of laboratory for bearing and miscellaneous
zoo and wild animals 15 bn 0- 8121 -0470 - 6.
- SJOSTEDT, A; ERICKSSON, U; REMISSE, V; GUARIGUE, H. 1997.
Detection of *Bacillus anthracis* spores in soil by PCR.
FEMS. Microbiol. Ecol., 23, 159 – 168.
- STANLEY, J,L and SMITH, H. 1961.
Purification of factor I and recognition a third factor of Anthrax toxin.
J. Gen. Microbiol. 26 : 49 - 66.
- SAMBROCK, J ; FRITSCH, E. F. and MOCK, M. 1989.
Molecular Cloning a laboratory manual, 2nd ed.
Cold Spring harbor laboratory, Cold Spring harbor, N. Y.
- SMITH, F ; ARDER. M.1954.
Studies on glycoproteins
J. ANV. Chem . Soc.73,5829
- SWOFFORD, D,L; OLSEN, G, L; WADDELL,P, J; HILLIS, D, M. 1996.
Phylogenetic interference in HILLIS, D, M; MONT,C and MABLE, B,K (éditions)
Molecular systematics, second edition Sinauer Associate, sunder and Massachuchetts, pp, 407
- 514

THORNE, C, B.1960.

Production of toxins in vitro by *B. anthracis* and its separation into two components
J.Bact. 79 : 450 - 455

TOWLEIN, M; STAEHELM, T; GORDON, J 1979

Electrophoretic transfert of protéins from gels to nitrocellulose sheets : procedure and some application.
Proc. Natl. Acad.Sci; USA, 76, 4360 - 4354.

VODKIN, M, H: and S. H, LEPLA. 1983.

Cloning of the protective antigen gene of *Bacillus anthracis*. Cell: 34: 693 - 696.

WELKOS, S, L and FRIED, A,m. 1988.

Pathogenesis and genetic control of resistance to the sterne strain of *Bacillus anthracis*
Microb.pathog 4: 53 - 69

WERNER, J .1952.

Studies on glycoproteins from mucous epithellium and epithelial secretions.
Acta. Soc. Med. ,58,1.

