

Evaluation Du Degré d'induction d'anticorps par Le vaccin monovalent subunitaire (capsule), de la souche pathogène O8 d'Escherichia Coli des poulets de chair à travers un test de microagglutination

F .A Faradji*¹ , D. Traoré¹ , K. Maiga¹, A. H Babana¹ ; Lin Weijing², Liu Fuan²

¹ Laboratoire de recherches microbiologiques et biotechnologie microbienne, Faculté des Sciences et Techniques, Université des Sciences, des Techniques et Technologies de Bamako

² Laboratoire des pathologies aviaires, Faculté de médecine animale, Université d'Agriculture de la Chine du sud, Guangzhou Tianhe

³Laboratoire de Microbiologie-Immunologie Université d'Agriculture de la Chine du sud, Guangzhou Tianhe

Auteur de correspondance : Alfatou3@gmail.com

RÉSUMÉ La colibacillose est une maladie causée par les souches pathogènes d'E. coli, rencontrées dans l'environnement ou dans le tractus digestif. Il existe différentes formes de serotypes responsables d'entérites récurrentes chez animaux et les oiseaux. Le traitement curatif reste de nos jours inefficace. Cet article étudie un vaccin monovalent de subunitaire obtenu à partir des polysaccharides qui composent la capsule bactérienne de la forme pathogène O8 d'E. coli chez les poulets de chair. Après extraction de la capsule bactérienne cultivée sur du bouillon de viande, les capsules sont récupérées par la méthode du composé cétylméthyl -ammonium bromure-alcool absolu ensuite les polysaccharides capsulaires ont été conjugués à la protoxine de tétanos par le composé N' éthyle-N' 3-diamne carbodiamide. Après des tests de pouvoir immunogène et d'innocuité, les résultats ont prouvé que : ce vaccin a une couverture immunitaire comparable à celui du vaccin mis au point à partir des bactéries entières.

Mots clés : vaccin monovalent, subunitaire, E. coli, polysaccharides, O8

I. INTRODUCTION :

La forme pathogène de E. coli se trouve en général dans l'environnement ; notamment dans l'eau, le sol, l'air etc.... On la trouve également dans le tube digestif. Les souches pathogènes existent sous plusieurs formes de serotypes ; alors on peut déduire qu'elle est la cause de plusieurs formes d'entérite chez les animaux et les oiseaux.

Il y'a plusieurs serotypes, ce qui fait que certains documents (4, 5) rapportent 141 types d'antigènes O ; 89 types d'antigènes K ; 49 types d'antigènes H ; et d'autres rapportent 146 types d'antigènes O ; 91 types d'antigènes K ; et 49 types d'antigènes H : parmi ceux-ci, autres chercheurs ont rapporté que les serotypes infectant la volaille notamment le poulet,

est ceux des antigènes O1 ,O2, O8 , O78 (4, 5) dans le journal universel sur les pandémies (4), en plus ces serotypes sont les uns des plus virulents. Ces quelques années, en république populaire de Chine, il a été recherché et rapporté des souches comme O1, O78, O7, O73, O88 etc.... qui sont aussi des principales causes de la maladie chez la volaille et rendent le traitement curatif et la prévention aveuglement compliqués .

Certes, les serotypes diffèrent selon les lieux, mais, les symptômes restent quand même presque identiques (4, 5).

La maladie s'avère tellement dangereuse qu'il va falloir éliminer les facteurs la déclenchant au moment de la maitrise et la prévention.

il faut également protéger les poulets sains tout en les séparant des malades et en les vaccinant par des vaccins conçus avec les souches des serotypes locaux, la vaccination à partir des souches locales, peut déclencher l'immunité chez la volaille et joue un rôle très important dans la prévention de la maladie(5).

Concernant l'aspect thérapeutique, le journal d'élevage et vétérinaire de Heilong a rapporté que cette maladie n'est pas très sensible au traitement curatif, et c'est ce qui explique son état récurrent puisque d'autres recherches avaient prouvé qu'avant et après l'immunisation, à un moment donné le rôle des médicaments est limité (6).

Certainement, le microbe du coli bactériose aviaire possède une sensibilité par rapport au sérum et les médicaments, mais il y'a quelques-uns qui développent rapidement une résistance face au traitement curatif ; alors, l'immunisation des sujets reste la meilleure méthode de prévention et protection contre la maladie(3). L'idée de résoudre ce problème de résistance et récurrence est : l'objectif principal de notre recherche.

C'était pendant la période des années 70, qu'a commencé cette recherche hors de la Chine.

En 1976, Deb J. R et al. ont étudié le vaccin mort des serotypes O78, O88 et O8, on a noté des résultats économiques très remarquables, à l'avantage des industries et entreprises avicoles, qui l'ont utilisé, et il a même eu un impact positif sur la société d'alors. Dès lors, ces résultats ont été le point de départ de plusieurs recherches dans le monde à ce sujet.

Plus tard, plusieurs recherches ont été unanime sur le fait que : la forme pathogène de la bactérie de E. coli possède des cils ayant une propriété attractive de la surface cellulaire de leur hôte, leur permettant de créer toutes les conditions d'infestation. Ce phénomène d'attraction du microbe, empêche non seulement à l'hôte de se défendre, mais aussi il fait face à une invasion rapide ; le motif est : les bactéries découvertes sur la forme clinique ont des relations serrées avec la propriété d'attraction.

Ces quelques années, à l'intérieur aussi bien qu'à l'extérieur de la Chine, le sujet de la production de vaccin de sous-unité polyvalent, a fait l'objet de plusieurs recherches.

En 1978, Naveh. M W et al ont fait des recherches sur la propriété attractive des bactéries pathogènes, ensuite a commencé l'étude de vaccin de sous-unité à partir des cils bactériens (fimbria) contre la colibactériose aviaire.

En 1981 Beachey . E. H a commencé la conjugaison des sous-unités ;que compose la bactérie E. coli, et en a fait un vaccin de sous-unité ; et dès lors, cela a fait l'objet de plusieurs recherches.

En 1985 Grymah .S. E. et al. A fait la recherche sur la forme pathogène du serotype O1 E. coli à partir des sous unité du fimbria microbien.

En 1986 a commencé l'étude du vaccin de polyvalent contre la coli bactériose aviaire.

En ce qui concerne la capsule bactérienne elle-même, dans les années 80, la plupart des journaux ont simplement rapporté le vaccin de sous-unité polyvalent de la pasteurellose. C'est en 1994 que le doctorant Ly Puhong(3) a fait cette étude de la capsule bactérienne de E. coli comme stimulateur d'immunité contre cette maladie de coli bactériose aviaire.

L'antigène polysaccharidique que possède la bactérie E. coli, notamment « K » antigène est l'un de ses principaux antigènes superficiels, puisque dans le cas de la défense immunitaire de l'organisme, il joue un rôle « anti-attraction », ainsi que le rôle d'anti-complément et anticorps, alors il influence l'action de la phagocytose des cellules phagocytaires ; il influence enfin la réponse immunitaire des anticorps superficiels de la bactérie en question ; c'est pourquoi l'utilisation des antigènes capsulaires de la forme pathogène du microbe E. coli pour attiser la défense immunitaire de l'organisme des poulets, est une méthode de haut niveau permettant à ces antigènes capsulaires de provoquer à sa juste valeur, la formation d'anticorps permettant d'éliminer l'action attractive ces agents pathogènes et consolider l'immunité humorale qui est un facteur de lutte contre des possibilités d'invasion.

Les résultats de certaines expériences ont prouvé que l'antigène capsulaire est incomplet (1, 2), puisqu'à lui seul sa réponse immunitaire n'est pas très efficace ; c'est ainsi que d'autres chercheurs ont trouvé l'idée de le combiner à un adjuvant ; ou bien, le conjuguer avec une protéine en « cross-linkage » pour en obtenir un antigène complet. Ce procédé permet à l'antigène de relever plus haut son immunogénicité.

En 1995, les résultats de recherche de HUANG Jujian (7), ont montré que : l'immunité produite par les polysaccharides capsulaires conjugués avec l'antitoxine du tétanos par cross-linkage, est meilleur par rapport à celle provoquée par l'antigène capsulaire tout court.

II. MATERIEL ET METHODE

2.1 MATERIEL

2.1.1.Principaux équipements

- Super appareil bain-marie à thermostat et agitateur (HZS-H)

Spectrophotomètre type-752-C ;

- Centrifugeuse type K-70, Etuve, thermostat, réfrigérateur etc....

2.1.2 - E. coli : souches bactériennes de sérotype O8

2. 1.3 - Animaux de laboratoire.

- Les poulets expérimentaux (chitiza); ayant déjà été immunisés par instillation oculaire et nasale contre la maladie de Newcastle, la bronchite infectieuse, et contre la coccidiose pour les poussins de 4 jours avec l'eau de boisson; contre la maladie de Goumoro pour les poussins de 7 jours ; ensuite, ils ont reçu le rappel contre la coccidiose pour les poussins atteignant les 10 jours, et également la rappel contre la maladie de Newcastle pour les poussins de 21 jours par injection intramusculaire.

2.1.4 - Milieu de culture spécifique enrichi en bouillon de viande de bœuf, et préparé suivant la méthode de routine

2.2 METHODOLOGIE

2.2.1 Extraction de la capsule bactérienne E. coli O8

2.2.2- Composition du vaccin (souches homogènes et hétérogènes)

2.2.3- Evaluation de l'immunogénicité et de sécurité de l'inoculation

(voir Article intitulé : Evaluation de l'immunogénicité d'un vaccin de sous-unité polyvalent à base de glycoprotéines capsulaires des souches pathogènes d'E. coli)

1.2.4- Test de micro-agglutination avec évaluation de la capacité des anticorps à éliminer les antigènes.

2.2.4.1 : Préparation du sérum positif :

Avec le vaccin de sous unitaire monovalent, il , l'on a procédé à une immunisation de lapins adolescents physiologiquement sains, la concentration est de (6x10⁸UFC). Chaque lapin a reçu 1ml par tête et par échéance. L'immunisation se fait en trois échéances : à la première échéance, l'on a ajouté aux vaccins, du folin complet comme adjuvant ensuite, l'injection a eu lieu dans la plante des pattes arrière et sous les aisselles. Concernant les deux dernières échéances, l'on a ajouté du folin incomplet comme adjuvant, et injecté sous-cutané au niveau de l'abdomen. La première et la deuxième échéance sont distantes de quatre semaines ; la deuxième et la troisième échéance sont distantes de deux semaines. Une semaine après la troisième échéance, l'on a procédé à une prise de sang veineux, pour ensuite en extraire le sérum. A l'aide de la méthode d'agglutination microscopique, on a évalué l'effet produit : du sang a ensuite été pris au niveau du cœur pour en extraire le sérum qui a été conservé pour utilisation ultérieure.

Par la même un certain lot de poulets a été immunisé, pour ensuite recueillir le sérum afin d'effectuer un control de routine

2. 2. 4.2 : Control du sérum.

Après la première et la deuxième immunisation des poulets expérimentaux, il été retenus 5 têtes de poulets immunisés, chez qui l'on a pris après : le 3eme, 8eme, 13eme, 18eme, 23eme, 30eme, 38eme, 40eme, et 60eme jour 0,5 ml de sang, et le volume reste le même pour chaque prise ; ce sang a été placé à la température ambiante afin de recueillir le sérum de manière naturelle pour utilisation ultérieure.

2.2. 4. 3 : Mise au point de l'antigène.

La souche O8 en instance a été ensemencée sur du agar enrichi avec du sang à 37°C pendant 24heures. Après culture, l'on a lavé les mousses des bactéries avec une solution saline rationnelle stérilisée ; après lavage répété trois fois de suite, on a récupéré la solution de lavage et centrifugé deux fois de suite à 2500 rpm en 20mm ; le surnageant a été versé, ensuite le dépôt de masse a été et dilué avec une solution saline rationnelle à une proportion de 1 : 6

puis conservé au réfrigérateur à 4°C pour utilisation ultérieures.

2.2.4.4 : Détermination des conditions optimales de réactions entre l'anticorps et l'antigène (voir méthode de routine).

2.2. 4. 5 : Détermination de la concentration optimale de l'antigène, à induire une réponse immunitaire : proportion de dilution antigène-anticorps.

III. RÉSULTATS

3.1/ Tableau n° 1 : Comparaison des réponses immunitaires des vaccins à bactéries entières et des vaccins de sous-unité capsulaires (1er et 2ème Immunisation respective), par les souches bactériennes homologues.

Vaccin	échéance	Nbr de poulets expérimentés	Nbr de poulets morts	Complètement normaux	Avec pathologies	% couvertures
vaccin bact entières mortes O ₈	1 ^{ère} imm	10	2	4/8	4/8	71
	2 ^{ème} imm	10	1	5/9	4/9	85
Vaccin capsulaire O ₈	1 ^{ère} imm	10	2	0/8	8/8	80
	2 ^{ème} imm	10	3	2/7	5/7	70
Témoins séropositifs		10	7	0 /3	3/3	

Préparation du séropositif

Tableau n° 2 : Préparation du sérum positif O₈ (bactéries entières et polysaccharide capsulaire)

:

Vaccin	Concentration du vaccin	Adjuvant	Site d'inoculation référentielle	Nbr de séance d'immunisation	Intervalle entre les immunisations	Dose du vaccin	Matériel biologique (Animal de labo)
Vaccin monovalent à bactéries entières mortes O ₈	6 X 10 ⁹ CFU	Formaline complete	La plante des 2 pattes arrières et les 2 aisselles	1 ^{ère} fois	1 ^{er} jour	1 ml	SCent
		Formaline incomplete	Sous cutanée de l'abdomen	2 ^{ème} fois	2 semaines après	1 ml	
		Formaline incomplete	Sous cutanée de l'abdomen	3 ^{ème} fois	4 semaines après	1 ml	
		Formaline incomplete + immunofortifiant	Sous cutanée de l'abdomen	4 ^{ème} fois	10 jours après	1 ml	
		Formaline incomplete + immunofortifiant	Sous cutanée de l'abdomen	5 ^{ème} fois	12 semaines après	1 ml	
Vaccin	Concentration du vaccin	Adjuvant	Site d'inoculation référentielle	Nbr de séance d'immunisation	Intervalle entre les immunisations	Dose du vaccin	Matériel biologique (Animal de labo)
Vaccin de subunité monovalent à polysaccharide Capsulaire	O ₈ concentration 20 fois supérieure	Formaline complete	La plante des 2 pattes arrières et les 2 aisselles	1 ^{ère} fois	1 ^{er} jour	1 ml	SCent
		Formaline incomplete	Sous cutanée de l'abdomen	2 ^{ème} fois	2 semaines après	1 ml	
		Formaline incomplete	Sous cutanée de l'abdomen	3 ^{ème} fois	4 semaines après	1 ml	
		Formaline incomplete + immunofortifiant	Sous cutanée de l'abdomen	4 ^{ème} fois	10 jours après	1 ml	
		Formaline incomplete + immunofortifiant	Sous cutanée de l'abdomen	5 ^{ème} fois	12 semaines après	1 ml	

3.2/ Résultat de test de micro agglutination pour évaluer la capacité des anticorps à éliminer les antigènes.

Tableau n° 3 : Résultat d'évaluation de la dilution optimale des anticorps induits par l'antigène de subunité serotype O₈ (polysaccharides capsulaires).

Concentration de l'anticorps	1 : 2	1 : 2 ²	1 : 2 ³	1 : 2 ⁴	1 : 2 ⁵	1 : 2 ⁶	1 : 2 ⁷	1 : 2 ⁸
1 : 2	+++	+++	+++	++	++	++	++	++
1 :	+++	+++	+++	++	++	++	++	++
1 :	+++	+++	++	++	++	++	++	++
1 :	++	++	++	++	++	++	++	++
1 :	++	++	++	++	++	+	+	+
1 :	++	+	++	++	+	+	+	-
1 :	+	+	+	+	-	+	+	-
1 :	-	-	+	+	-	+	-	-
2 ⁸								

Tableau n° 4: Résultat d'évaluation de la dilution optimale des anticorps induits par les antigènes de vaccin à bactéries entières serotype O8 (vaccin mort)

Concentration de l'anticorps	1 : 2	1 : 2 ²	1 : 2 ³	1 : 2 ⁴	1 : 2 ⁵	1 : 2 ⁶	1 : 2 ⁷	1 : 2 ⁸
Concentration								
1 :	++	+++	+++	+++	++	++	++	++
1 :	++	+++	+++	+++	++	++	++	++
1 :	++	++	+++	++	++	++	++	++
1 :	++	++	++	++	++	++	++	++
1 :	+	+	++	++	+	++	++	+
1 :	+	+	+	+	-	+	+	+
1 :	+	+	+	-	-	-	-	-
1 :	+	+	-	-	-	-	-	-
2 ⁸								

+++ Au fond des creusets de microagglutination, il y'a des grosses pièces agglutinantes.

++ Au fond des creusets de microagglutination, l'on remarque de petites suspensions d'antigènes, relativement plus grandes que les dépôts minuscules ; alors, à leurs bordures on voit des pièces agglutinantes bien évidentes

+ Au fond des creusets de microagglutination, l'on remarque des dépôts d'antigènes, et à leurs bordures, il y'a des pièces agglutinantes relativement évidentes.

-Au fond des creusets de microagglutination, les antigènes se présentent sous forme de petites pièces rondes.

3.3 Resultats de détection des anticorps

Tableau n° 5 : Comparaison entre le titre des anticorps des deux vaccins à la première immunisation

Sérotype		Vaccin bact entière O ₈		Vaccin subunitaire Capsulaire O ₈	
		1	2	1	2
Nombre de jours d'immunisation	3	32	16	16	-
	8	64	32	64	16
	13	256	64	256	64
	18	1024	128	256	256
	23	512	64	256	512
	30	256	-	256	256
	38	128	-	-	256
	48	64	32	512	256
	60	64	32	256	256

Tableau n° 6 : Comparaison entre le titre des anticorps des deux vaccins à la deuxième immunisation

Sérotype		Vaccin bact entière O ₈		Vaccin subunitaire Capsulaire O ₈	
		1	2	1	2
Nombre de jours d'immunisation	3	128	32	-	-
	8	128	128	8	8
	13	-	-	16	8
	18	256	512	64	16
	23	128	128	64	16
	30	-	128	64	16
	38	32	128	-	-
	48	64	128	64	64
	60	32	32	64	64

IV. INTERPRETATION ET DISCUSSION

3.1 (Tableau 1) ; A la première échéance avec le vaccin bactéries entières mortes, les deux morts étaient une mort subite causée par un stress. Ce stress a dû susciter de symptômes d'autres affections respiratoires chez les quatre poulets présentant des pathologies : néanmoins, les ensemencements bactériens sont négatifs ; quant au sujet mort après la deuxième échéance, c'est belle et bien les symptômes de la maladie qui l'ont fait succomber après la deuxième immunisation.

Concernant le vaccin à capsule bactérienne ; parmi les deux et trois poulets morts successivement à la première et deuxième immunisation, il y a un seul qui a succombé suite à la contamination par le colibacter, les trois autres présentent une hyperémie du larynx, hémorragie des glandes mais les ensemencements bactériens sont négatifs ; les poulets présentant des pathologies se sont remis

leur souffrances ainsi la protection contre la colibacillose arrive à un taux approximatif de 75%. Pour le vaccin à capsule bactérienne

3. 2/ (Tableau 3, 4) Selon le test de la microagglutination sur l'évaluation de la concentration optimale de l'antigène, l'on peut aussitôt remarquer que : pour, différents antigènes et différents sérum, les concentrations d'entrée en réaction sont aussi différentes.

Pour l'induction des anticorps par les antigènes du vaccin de sous-unité (Tableau 4), la concentration est : O₈ : 2⁴. Pour l'induction des anticorps par les antigènes du vaccin entiers morts, la concentration est : O₈ : 2³. Cela signifie alors que le degré de dilution de l'anticorps avec l'antigène à une séquence de 1-8 fois peuvent procurer

une réponse immunitaire.

3.3/ Pour ce qui est de la capacité d'élimination des antigènes par les anticorps, (voir tableaux 5 , 6), les résultats ont prouvé une similarité en matière de production d'anticorps des deux types de vaccin, d'où les mêmes capacités de digestion des antigènes

V. CONCLUSION

En se référant aux résultats de l'échéance d'immunisation, le phénomène du vaccin de subunité polyvalent est toujours jugé bon. Qu'importe le type de vaccin (subunité trivalent ou trivalent à bactéries entières mortes) ; force est de reconnaître que l'efficacité des deux immunisations successives est meilleure par rapport à celle d'une immunisation unique et que la capsule bactérienne aussi contient des éléments pouvant attiser une réponse immunitaire ; son pouvoir immunitaire peut même dépasser celui du vaccin mort des bactéries

REFERENCES

- [1] YU Xiatin : Rédaction du journal sur le colibactériose des oiseaux domestiques. Diagnostic et méthode de prévention contre les infections de la volaille ; 1990(1) p :37.
- [2] XU Zhideng Rédaction du journal sur le diagnostic du colibactériose et les méthodes de prévention ; 1989(4) p : 25-26.
- [3] LY Puhong : Etude sur la pathogénicité d'E. coli, et l'élaboration d'un vaccin de subunité à partir des sous unités de l'agent pathogène ; 1994 Thèse de doctorat PHD à l'Université d'Agriculture de la Chine du sud
- [4] Deb J R, et al. Lab Trials with inactivated vaccines against E.coli (Ovs, Kso) infection in fowls. Resch Veterinary Science. 1976, 20: 131-138
- [5] Naveh M V, et al. Adhérence pili in avian strain of Escherichia coli: effect on pathogenicity. 1978, (28) : 651-661
- [6] Beachey . E. H a commencé la conjugaison des sous-unités ;que compose la bactérie E. coli, et en a fait un vaccin de sous-unité ; et dès lors, cela a fait l'objet de plusieurs recherches.
- [7] Grymah J E, et al. Immunogenicity of an oil-emulsified Escherichia Cole (serotype apili vaccine in chickens. Avian Diseases 1985(29) 1018-108
- [8] Grymah J E, et al. Immunogenicity of Escherichia Cole multivalent pili vaccine in chickens. Avian Diseases, 1986 (30) : 687-689
- [9] HUANG Pujian *Recherche sur les glycoprotéines que contiennent les capsules des bacilles d'E. coli pour des fins immunitaires.* Université d'Agriculture du sud de la Chine Thèse de doctorat