

## ETUDE DES PLASMIDES DE VIRULENCE DE CENT SOUCHES PESTEUSES ISOLEES A MADAGASCAR

par

N. RASOLOFONIRINA, Ph. MICHEL, V. ANDRIANAHA, P. COULANGES

La Peste existe à Madagascar depuis 1898, mais l'étude de son épidémiologie est plus récente, puisqu'elle remonte à son apparition sur les Hauts Plateaux en 1921.

Les études menées par le Laboratoire Central de la Peste situé dans l'Institut Pasteur, ont permis depuis 1926 l'isolement de plus de 500 souches dont la plus grande partie est conservée.

Ce laboratoire isole actuellement dix à vingt souches par an.

La zone d'endémie a une population de 2800000 habitants environ (3). L'incidence de la peste y est de l'ordre de 1 pour 5000 à 1 pour 10000.

Toutes les souches de *Yersinia* hébergent des DNA plasmidiques et la virulence de *Yersinia pestis* est liée à un plasmide particulier: le plasmide 42-47 Md (4) codant pour deux types de protéines (6):

- 1 — Les antigènes V et W qui induisent la calcium dépendance et la résistance à la bactéricidie intracellulaire (8).
- 2 — Les protéines de la membrane externe qui induisent également la résistance à la bactéricidie intracellulaire ainsi que la sérorésistance.

Une protéine de 36 Kd, qui paraît proche de l'antigène V et donc liée au plasmide 47 Md, pourrait être à l'origine du développement d'une immunité à médiation cellulaire (5) (7) (9).

Le plasmide 42-47 Md paraît essentiel à l'expression de la virulence.

D'autres plasmides peuvent exister ou coexister :

- Un plasmide 6 Md (1) (2) codant pour la pesticine, bactériocine associée à la fibrinolysine et à la coagulase, dont le rôle dans l'invasion est mal connu.
- Un plasmide 61 Md (3) (4) codant pour une toxine murine à tropisme pour les mitochondries des cellules cardiaques de souris et de rat. Cette toxine ne semble pas jouer de rôle déterminant dans la virulence.
- Il faut noter enfin qu'il existe d'autres facteurs de virulence non associés à la présence d'un plasmide tels l'antigène F1, la synthèse des purines et l'expression d'un phénotype pigmenté.

Dans le rapport présenté, nous avons étudié les plasmides de 100 souches pesteuses isolées au Laboratoire Central durant deux périodes :

1955 — 1959

1984 — 1987

### *MATERIEL ET METHODES*

Les souches conservées en ampoules scellées à -20° C sont relancées par deux passages en Bouillon Cerveau-Cœur IP, à 28° C. Après 3 jours du deuxième passage, deux géloses pentes TCS sont ensemencées à 28° C.

Après 72 heures, 2 ôses pleines de la culture permettent l'extraction du DNA selon une adaptation des techniques de MEYERS (6) et PORTNOY (8).

15 µl de chaque extrait sont soumis à une électrophorèse de deux heures environ à 50mA constants, en tampon Tris Borate, sur gel d'agarose 0,7 p. 100.

Le gel est révélé dans une solution de Bromure d'Ethidium (1 mg/l), lavé à l'ED, et photographié sous UV.

Nous n'avons retenu dans cette analyse plasmidique que les résultats concordants après deux cultures-extractions indépendantes.

### *RESULTATS ET DISCUSSIONS (tableau n° 1)*

Dans la première période : 1955-1959 : 45 des 62 souches étudiées présentent le plasmide 42-47 Md, soit 73 p. 100.

Dans la seconde période 1984-1987 : 30 des 38 souches étudiées présentent ce plasmide, soit 79 p. 100.

Si nous considérons l'expression des plasmides non liés à la virulence, celle du 6 Md seul domine, puisqu'elle concerne 17 p. 100 de toutes les souches étudiées, soit les deux tiers des souches non virulentes.

Ainsi, l'évolution de l'expression de la pathogénicité semble relativement stable durant ces deux périodes distantes de près de 20 ans.

L'étude comparative de l'origine géographique des souches virulentes (tableau 2) permet de noter un déplacement sensible des souches virulentes vers le Centre du Pays cependant cette observation doit être pondérée par deux considérations :

- 1 — Les voies de communication facilitant l'expédition des souches du Centre, vers Tananarive.
- 2 — Les moyens variables dont dispose chaque circonscription médicale pour les prélèvements et expédition.

**Cette étude devra être poursuivie puisque deux éléments peuvent influencer ces résultats :**

- l'expression de la virulence pourrait être atténuée par la conservation et l'étude de souches très anciennes (1926-1940) pourrait apporter une réponse sur ce point.
- la virulence est réversible et l'étude du curage du plasmide 42-47 Md sera entreprise par passages sur souris,

— enfin, deux études complémentaires sont programmées :

- 1 — celle de l'expression des protéines membranaires des souches dont l'étude plasmidique est réalisée,
- 2 — A partir de 1988 en corrélation avec cette étude, celles de la réaction humorale et de l'antigénémie sérique, vont débiter.

Ce travail a fait l'objet d'une subvention de la Commission des Communautés Européennes

Contrat N° TSD — H. 403.

TABLEAU I

Les Plasmides de virulence à vingt ans d'intervalle.

ANNEE	1955	1956	1957	1958	1959
Nb. souches	13	11	19	13	6
Plasmide 42 - 47 +	7	9	15	10	4
%	54	82	79	77	67
% 1955 - 1959 : 45/62 = 73 %					

ANNEE	1984	1985	1986	1987
Nb. souches	7	15	1	14
Plasmide 42 - 47 +	5	12	1	12
%	71	80		86
% 1984 - 1987 : 30 / 38 = 79 %				

TABLEAU II

## Origine géographique des souches virulentes

Période	1955-1959		1984-1987	
	Régions	1955-1959	%	1984-1987
Nord Centre N.	7	16	4	14
Nord-Est	7	16	2	6
Centre- Centre Sud	22	44	22	74
Centre Ouest	9	19	2	6
TOTAL	45	100	30	100

## RESUME

Une étude des plasmides de virulence (42-47 Md) a été réalisée sur cent souches de *Y. pestis* isolées en laboratoire Central de la Peste de l'Institut Pasteur de Madagascar.

Aucune différence significative n'a été mise en évidence dans l'expression de la virulence des souches isolées à vingt ans d'intervalle (1955-1984), et plus de 70 p. 100 des souches étudiées possèdent ce plasmide.

Enfin, un déplacement géographique de l'épidémie vers le Centre de Madagascar, demandera à être confirmé.

## BIBLIOGRAPHIE

1. BRUBAKER RR., SURGALLA M.J. (1961) — Pesticin I — Pesticin-bacterium interrelationships and environmental factors influencing activity  
*J. Bacteriol.*, **29**, 940-949.
2. BRUBAKER RR., (1984). — Molecular biology of the dead black death  
*ASM. News*, **50**, 240-245.
3. COULANGES P. (1978). — La Peste à Madagascar  
*Arch. Inst. Pasteur Madagascar*, **46**, **1**, 397-426.
4. FERBER D.N., BRUBAKER R.R. (1981). — Plasmids in *Yersinia pestis*  
*Inf. Im.*, **31**, 839-841.
5. MAZIGH D. in Thèse d'Etat ès Sciences (1985) Paris.  
Etude des déterminants moléculaires de la virulence de *Yersinia enterocolitica* et de leurs rôles dans l'induction d'une immunogénicité croisée contre *Yersinia pestis*.
6. MEYERS J.A., SANCHEZ D., ELWELL L.P., FALKOW S. (1976). — Simple agarose gel electrophoresis method for the identification and characterization of plasmid desoxyribonucleotid acid  
*J. Bacteriol.*, **127**, 1529-1532.
7. PORTNOY D.A., FALKOW S. (1981). — Virulence associated plasmids from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis*  
*J. Bacteriol.*, **148**, **3**, 877-883.
8. PORTNOY D.A., BLANK HF., KINGSBURY D.T., FALKOW S. (1984). — Genetic analysis of essential plasmid determinants of pathogenicity in *Yersinia pestis*.  
*J. Inf. Diseases*, **148**, 297-304.
9. WAKE A., MARUYAMA T., AKIYAMA K., YAMAMOTO M. (1983) — The role of virulence antigens (VW) in the protection of mice against *Yersinia pestis* infection. *Curr. Microbiol.*, **8**, 73-77.