

Etude électrophorétique et immunoélectrophorétique des antigènes de *Neisseria meningitidis*

B. PROST,¹ M. VANDEKERKOVE² & J. NICOLI³

Les antigènes de Neisseria meningitidis peuvent être séparés par électrophorèse en deux groupes que l'on retrouve dans tous les types sérologiques : un groupe de polyosides acides et un groupe de protéines.

En immunoélectrophorèse, les polyosides réagissent avec les seuls antisérums spécifiques de type et sont donc le support de la spécificité de type immunologique. Les méningocoques du type B renferment des polyosides de mobilité électrophorétique analogue, mais aucun anticorps précipitant n'a pu être mis en évidence. Il existe une protéine basique commune à tous les types sérologiques et cinq antigènes protéiques mineurs dont la signification doit encore être précisée.

La méthode immunoélectrophorétique, simple, permet la confirmation du diagnostic du type sérologique ou l'identification de certaines souches de méningocoques non typables par les méthodes usuelles.

La structure antigénique du méningocoque a fait l'objet de travaux déjà anciens (Rake & Sherp, 1933; Menzel & Rake, 1942). La présence d'un polyoside spécifique du type sérologique, déjà connue dans le groupe C (Watson, Marinetti & Sherp, 1958), a récemment été confirmée (Bideau, 1968; Gotschlich, Liu & Artenstein, 1969; Bideau et al., 1970). Il est possible de mettre rapidement en évidence les constituants antigéniques du méningocoque par des techniques simples d'électrophorèse et d'immunoélectrophorèse.

Ces techniques ont permis l'identification, à côté d'un polyoside acide spécifique de type, d'une protéine basique commune à tous les types de l'espèce *Neisseria meningitidis*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les méningocoques étudiés, des types A, B, C, X, Y, appartiennent à la collection du Centre international OMS de référence pour les méningocoques.

¹ Pharmacien, Maître ès sciences, Laboratoire de Biochimie des micro-organismes, Centre de Recherches du Service de Santé des Troupes de Marine, Marseille, France.

² Bactériologiste des Hôpitaux, Directeur du Centre international OMS de référence pour les méningocoques, Centre de Recherches du Service de Santé des Troupes de Marine, Marseille.

³ Maître de recherche du Service de Santé des Armées, Laboratoire de Biochimie des micro-organismes, Centre de Recherches du Service de Santé des Troupes de Marine, Marseille.

Obtention des antigènes bactériens

Après culture sur milieu solide (Mueller-Hinton, 1941), les germes sont repiqués en milieu liquide de Watson et Sherp (1958); les fioles sont incubées à 37°C sous agitation continue et les germes recueillis à la 18^e heure.

Après centrifugation et lavage en tampon glycolle 0,05 M, pH 2,6, les antigènes sont extraits par un tampon tris-HCl 0,05 M, pH 9,0, pendant 48 heures à +4°C.

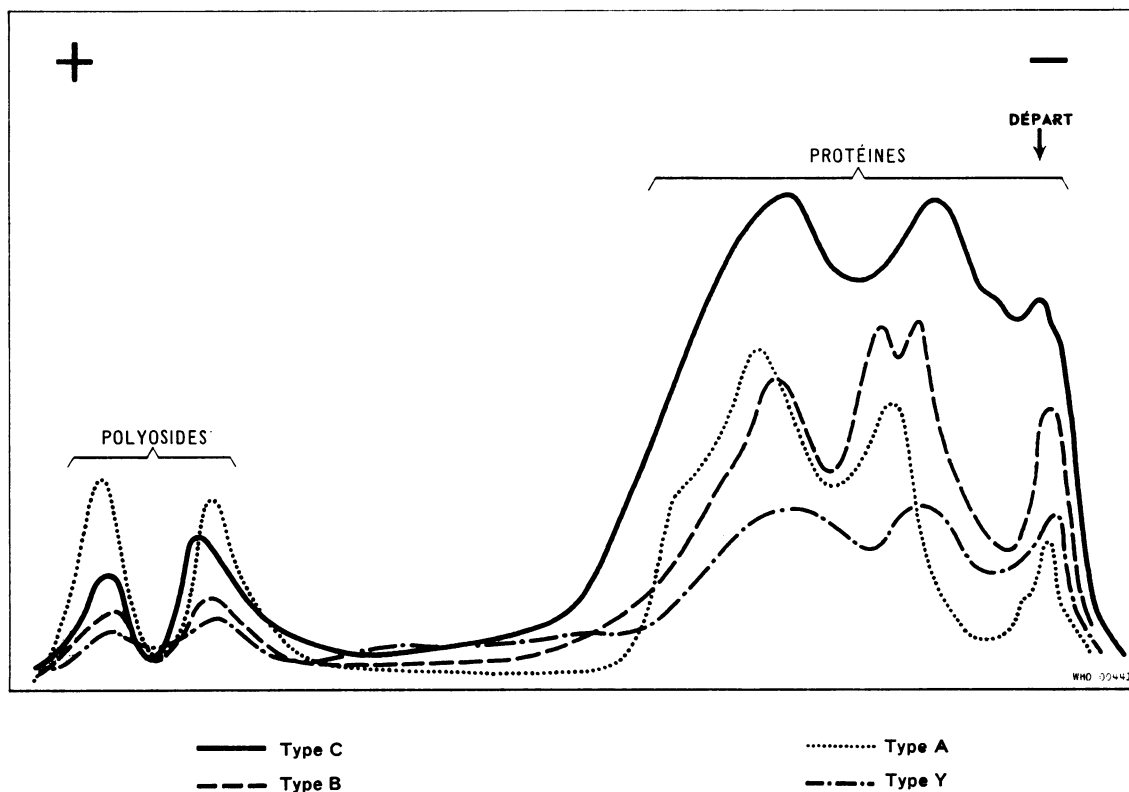
La suspension bactérienne est centrifugée à 28 000 *g* pendant 10 minutes, puis à 100 000 *g* pendant 2 heures, pour sédimenter le lipopolysaccharide endotoxique; le surnageant constitue la solution d'antigènes (Bideau, 1968; Bideau et al., 1970). Il a été montré en microscopie électronique que le matériel extrait correspondait à la solubilisation de la couche superficielle trilamellaire de la paroi du germe (Cesarini et al., 1967).

Electrophorèse ; immunoélectrophorèse

Les tests sont pratiqués sur acétate de cellulose gélifié (Cellogel) en tampon Véronal-EDTA de pH 9 et de force ionique 0,05¹ sous 280 volts pendant 30 minutes.

¹ Diéthylbarbiturate de sodium: 5,15 g; sel tétrasodique de l'acide éthylène-diamine tétraacétique: 2,60 g; eau: *q. s.* pour 1 litre.

FIG. 1
ELECTROPHORÈSE DES ANTIGÈNES MÉNINGOCOCCIQUES SUR ACÉTATE DE CELLULOSE GÉLIIFIÉ^a



^a Courbes densitométriques des électrophorogrammes obtenues sur appareil Vitatron.

La révélation des composés glucidiques est obtenue par le Bleu Alcian, celle des protéines par l'Amidoschwarz ou le Rouge Ponceau.¹ La décoloration est réalisée par le mélange: méthanol, acide acétique, eau (50; 5; 45), et la transparisation par l'acide lactique à 5% dans le mélange décolorant.

Les immunoelectrophorèses sont effectuées dans des conditions identiques à celles de l'électrophorèse: après migration, l'antisérum est déposé dans des gouttières placées longitudinalement de part et d'autre de la zone de migration.

Après une diffusion de 24 heures en chambre humide, les bandes sont lavées pendant 12 à 18 heures dans une solution physiologique et colorées par l'Amidoschwarz.

¹ Colorant: 0,1 g (Bleu Alcian) ou 0,5 g (Amidoschwarz ou Rouge Ponceau); méthanol: 50 ml; acide acétique: 10 ml; eau: 40 ml.

Préparation des antisérums

1. Le sérum antibactérien possédant la spécificité de type et d'espèce est préparé en injectant successivement à un lapin par voie intraveineuse, à une semaine d'intervalle, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2 et 2,5 ml d'une suspension dense de germes vivants. Une saignée d'épreuve est pratiquée 8 jours après. Si le taux d'anticorps est insuffisant, on pratique 1 ou 2 injections supplémentaires avec 2 ml de suspension avant la saignée totale.

2. Nous avons pu disposer de sérums antibactériens de cheval porteurs de la seule spécificité de type (monospécifiques) grâce à l'obligeance du docteur Le Minor que nous remercions vivement (sérums A, B, C).

3. Le sérum anti-endotoxine est préparé sur lapin par 4 injections intraveineuses hebdomadaires de 0,2, 0,3, 0,4 et 0,5 ml de la solution antigénique alcaline. On pratique une saignée 28 jours après.

RÉSULTATS

Les électrophorogrammes des antigènes des cinq types sérologiques sont sensiblement comparables. Les fractions protéiques sont séparées en deux groupes: une bande cathodique au niveau ou légèrement en arrière du réservoir de dépôt et une nappe anodique en avant de ce réservoir. Cette nappe anodique peut être résolue en un système de 2 à 3 bandes. Les polysaccharides se présentent sous forme de 2 bandes majeures migrant en avant du front protéique (fig. 1).

Le chélateur présent dans le tampon ne joue pas, dans cette séparation, de rôle favorisant, en dépit du fait qu'il permet au lysozyme d'atteindre son substrat, la couche de muréine sous-jacente à la couche superficielle antigénique (Respake, 1956; Audiffren et al., 1967).

En immunoélectrophorèse, deux sérums ont été utilisés: un sérum antibactérien spécifique du type immunologique et un sérum antibactérien polyvalent.

La spécificité de l'espèce *N. meningitidis* se traduit par un arc de précipitation commun à tous les types sérologiques et qui correspond très exactement à la bande protéique basique cathodique en arrière du dépôt de migration.

La spécificité de type est liée aux deux bandes polysidiques acides: l'arc de précipitation est soit symétrique, très concave vers les antigènes, soit prolongé rectilignement jusqu'aux premières bandes protéiques anodiques. Dans tous les cas, un arc unique de précipitation est mis en évidence (fig. 2) à l'exception du type B pour lequel aucune précipitation n'a pu être obtenue en dépit de l'existence dans l'électrophorogramme de 2 bandes polysidiques analogues à celles des autres types.

Aucune réaction croisée n'a été mise en évidence entre les antisérums spécifiques de type et les polysides hétérotypiques.

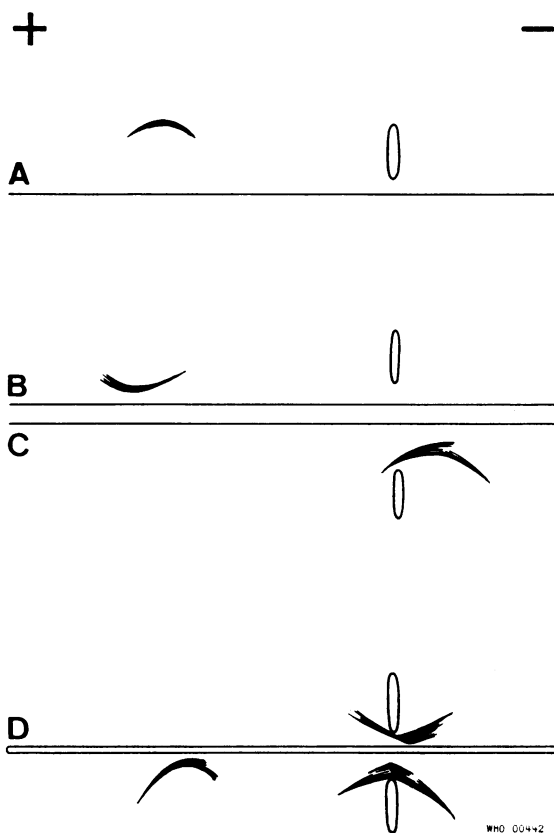
Le sérum anti-endotoxine préparé à partir du matériel antigénique alcalin permet la révélation de 4 arcs antigéniques mineurs correspondant aux protéines anodiques (fig. 3). Il n'est pas exclu que ces antigènes mineurs correspondent pour partie à des protéines cytoplasmiques, mais il est plus probable qu'ils correspondent à des déterminants antigéniques de la paroi proprement dite, masqués dans l'ultra-structure normale de la couche superficielle de cette paroi.

CONCLUSION

La technique immunoélectrophorétique met clairement en évidence la diversité des antigènes liés au méningocoque.

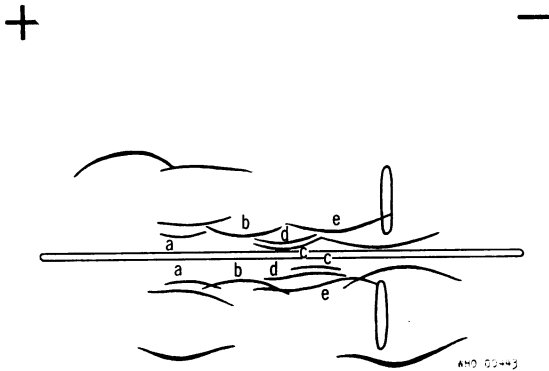
Deux antigènes majeurs sont extraits simplement par une solution alcaline dont on a montré qu'elle disséquait la couche superficielle de la paroi du germe (Cesarini et al., 1967). L'un correspond au polyside spécifique du type, tel qu'il a été isolé (Gotschlich, Liu & Artenstein, 1969; Bideau et al., 1970). Le polyside brut se fixe sur les hématies et

FIG. 2
IMMUNOÉLECTROPHORÈSE
DES ANTIGÈNES MÉNINGOCOCCIQUES



- A: Solution antigénique du méningocoque de type A. Révélation par l'antisérum spécifique du type A. Mise en évidence d'un arc unique de précipitation correspondant aux deux bandes polysidiques.
- B: Solution antigénique du méningocoque de type C. Révélation par l'antisérum spécifique du type C. Mise en évidence d'un arc de précipitation unique antipolysidique.
- C: Solution antigénique du méningocoque de type B. Révélation par un sérum anti-A possédant la spécificité de type et d'espèce. Mise en évidence d'un arc de précipitation unique correspondant à la protéine basique.
- D: Solution antigénique de méningocoques de type B (en haut) et de type A (en bas). Révélation par un sérum anti-A porteur de la spécificité de type et d'espèce. Mise en évidence de l'antigène commun aux types A et B et du seul polyside spécifique de type A.

FIG. 3
IMMUNOÉLECTROPHORÈSE
DES ANTIGÈNES MÉNINGOCOCCIQUES DU TYPE A



Révélation par trois antisérums: en bas, un sérum anti-antigène de groupe; dans la gouttière centrale, un sérum anti-endotoxine préparé à partir de l'antigène alcalin A; en haut, un sérum spécifique du type A. L'arc de précipitation anti-polyosidique paraît dédoublé par dissolution partielle du précipité. Le sérum anti-endotoxine révèle, à côté de l'antigène de groupe et de l'antigène polyosidique, cinq antigènes protéiques mineurs: a, b, c, d, e.

est le support d'une réaction d'hémagglutination indirecte dans le sérodiagnostic des méningococcies (Vandekerckove et al., 1968). Il est distinct du lipopolysaccharide par sa structure chimique bien qu'il ne soit pas exclu que les deux molécules portent un motif antigénique voisin.

Le deuxième antigène majeur est un antigène protéique; il a été retrouvé dans les cinq types sérologiques étudiés. L'importance éventuelle de cet antigène tient au fait qu'il est, pour l'instant, le seul antigène de groupe qui ait été mis en évidence dans la paroi du méningocoque; on sait par ailleurs que l'immunité naturelle paraît suivre souvent une infection par des méningocoques non typables (Goldschneider, Gotschlich & Artenstein, 1969) et est vraisemblablement liée à de tels antigènes de groupe.

La signification des antigènes mineurs de nature protéique doit être précisée.

Cette méthode immunoelectrophorétique simple a permis le diagnostic du type sérologique de méningocoques non typables par les méthodes usuelles. Elle constitue une méthode d'appoint sûre pour l'identification de ces germes.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé avec l'aide de l'Organisation mondiale de la Santé (Centre international OMS de référence pour les méningocoques) et sous contrat de la Direction des Recherches et Moyens d'Essais (France).

Nous remercions très vivement M^{me} Nicole Gaborit et M^{lle} Elisabeth Carme pour leur excellente aide technique.

SUMMARY

ELECTROPHORETIC AND IMMUNOELECTROPHORETIC STUDY OF *NEISSERIA MENINGITIDIS* ANTIGENS

Soluble cell-wall antigens of *Neisseria meningitidis* A, B, C, X and Y were found to be separable by electrophoresis into two main groups: an acid polysaccharide group and a basic protein group.

Immunoelectrophoretic testing showed that the polysaccharides react solely with type-specific antisera; it is they that underlie the indirect haemagglutination reaction used in meningococcal serodiagnosis. In every run a single precipitation line was obtained, with the exception of those with type B for which no precipitating antibody could be detected despite the presence of two polysaccharide bands similar to those yielded with the other

serotypes. No cross-reactions were observed between type-specific antisera and heterotypic polysaccharides.

There is a basic protein common to all the meningococcal serotypes tested—the first such common antigen from the cell wall to be noted. There are also 5 minor protein antigens whose significance has yet to be determined.

The authors conclude that the immunoelectrophoretic technique constitutes a useful and simple method for confirming a diagnosis as to serological type or for identifying certain meningococcal strains not typable by the usual methods.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Audiffren, P., Vandekerkove, M., Faucon, R. & Nicoli, J. (1967) *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **161**, 394-396
- Bideau, J. (1968) *Etude de la couche superficielle de la paroi de Neisseria meningitidis*, Marseille (Thèse)
- Bideau, J., Berthon, S., Vandekerkove, M. & Nicoli, J. (1970) *Méd. trop.* (Sous presse)
- Bideau, J., Filippi, R., Bergot, J. & Nicoli, J. (1970) *Méd. trop.* (Sous presse)
- Cesarini, J. P., Vandekerkove, M., Faucon, R. & Nicoli, J. (1967) *Ann. Inst. Pasteur*, **113**, 833-841
- Goldschneider, I., Gotschlich, E. C. & Artenstein, M. S. (1969) *J. exp. Med.*, **129**, 1327-1348
- Gotschlich, E. C., Liu, T. Y. & Artenstein, M. S. (1969) *J. exp. Med.*, **129**, 1349-1366
- Menzel, A. E. O. & Rake, G. (1942) *J. exp. Med.*, **77**, 437-452
- Mueller, J. H. & Hinton, J. (1941) *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, **48**, 330-333
- Rake, G. & Sherp, H. W. (1933) *J. exp. Med.*, **58**, 341-360.
- 361-374
- Respake, G. (1956) *Biochim. biophys. Acta (Amst.)*, **22**, 189
- Vandekerkove, M., Bideau, J., Nicoli, J. & Faucon, R. (1968) *Ann. Inst. Pasteur*, **115**, 212-217
- Watson, R. G., Marinetti, G. W. & Sherp, H. W. (1958) *J. Immunol.*, **81**, 337-344
-