



L'ENTEROTOXINE COLIBACILLAIRE THERMOSTABLE (ST) D'ORIGINE BOVINE EST SIMILAIRE A CELLES D'ORIGINE PORCINE ET HUMAINE

Ch. Gerday, J. van Beeumen, M. Herman, J. Olivy, N. Gerardin-Otthiers, D.
Art, E. Jacquemin, A. Kaeckenbeeck

► To cite this version:

Ch. Gerday, J. van Beeumen, M. Herman, J. Olivy, N. Gerardin-Otthiers, et al.. L'ENTEROTOXINE COLIBACILLAIRE THERMOSTABLE (ST) D'ORIGINE BOVINE EST SIMILAIRE A CELLES D'ORIGINE PORCINE ET HUMAINE. Annales de Recherches Vétérinaires, 1984, 15 (1), pp.133-137. hal-00901487

HAL Id: hal-00901487

<https://hal.science/hal-00901487>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

L'ENTEROTOXINE COLIBACILLAIRE THERMOSTABLE (ST) D'ORIGINE BOVINE EST SIMILAIRE A CELLES D'ORIGINE PORCINE ET HUMAINE

Ch. GERDAY¹, J. Van BEEUMEN², M. HERMAN¹, J. OLIVY¹, N. GERARDIN-OTTHIERS¹, D. ART³, E. JACQUEMIN³ et A. KAECKENBEECK³

1: Laboratoire de Biochimie musculaire, Institut de Chimie, Sart Tilman, 4000 Liège, Belgique

2: Laboratorium voor Microbiologie en Microbiële Genetica, Faculteit Wetenschappen, Rijks Universiteit Gent K.L. Ledeganckstraat, 35, 9000 Gent, Belgique

3: Laboratoire de Pathologie des Maladies Bactériennes, Faculté de Médecine Vétérinaire, 45, rue des Vétérinaires, 1070 Bruxelles, Belgique

Summary

HEAT STABLE ENTEROTOXINS OF BOVINE ORIGIN ARE SIMILAR TO THOSE OF PORCINE AND HUMAN ORIGINS. — The heat-stable enterotoxins produced by strains S126A and 510 of bovine origin have been purified to homogeneity. Their amino acid sequences are identical and correspond to that of the heat stable enterotoxin isolated from porcine origin: Asn-Thr-Phe-Thr-Cys-Cys-Glu-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Ala-Gly-Cys-Tyr.

De nombreux travaux ont été consacrés ces dernières années à la purification de l'entérotoxine thermostable à partir de souches de colibacilles d'origines diverses (Stravric *et al.*, 1978; Alderete et Robertson, 1978; Kapitan *et al.*, 1979; Staples *et al.*, 1980; Takeda *et al.*, 1979; Gerday *et al.*, 1980). Aucun cependant n'a produit d'évidence convaincante de l'homogénéité chimique des substances obtenues, de sorte que les propriétés décrites, correspondant à des produits partiellement purifiés, étaient très différentes. Chaque souche produisait apparemment sa propre toxine différant des autres par la composition en acides aminés et le poids moléculaire. Il apparaît cependant établi que deux isotypes différents peuvent être produits par la même souche (Burgess *et al.*, 1980) ou par des souches légèrement différentes (Whipp *et al.*, 1981), l'une des toxines est active chez les souris et les porce-

lets nouveau-nés, l'autre est inactive chez le souris mais active chez les porcs sevrés. Ceci est confirmé par les travaux de So et Mc Carthy (1980) relatifs à la séquence des acides nucléiques codant les deux formes de la toxine thermostable STI et STII.

L'existence, d'autre part, de deux formes génétiquement distinctes de STa a été démontrée par So et Mc Carthy (1980) et Moseley *et al.* (1983). Les deux gènes hétérologues ont été désignés STIa et STIb; utilisés comme sondes, ils permettent de détecter par hybridation du DNA, la majorité des différentes souches d'*E. coli* produisant ST.

Au niveau des produits de traduction, la première entérotoxine thermostable caractérisée de manière non équivoque par détermination de sa séquence en acides aminés a été isolée par

Chan et Giannella (1981) à partir d'une souche pathogène d'origine humaine. Le produit actif est un polypeptide de 18 acides aminés contenant six résidus de demi-cystine. Une seconde entérotoxine de souche humaine (Aimoto *et al.*, 1982) et l'entérotoxine thermostable de souche porcine (Lallier *et al.*, 1982) ont également été caractérisées de même que partiellement l'entérotoxine thermostable de souche bovine (Saeed *et al.*, 1983). En utilisant d'autres méthodes de préparation (Gerday *et al.*, résultats en cours de rédaction), nous avons pu également purifier l'entérotoxine thermostable à partir de la souche S126A (O8:K99:K85:H2). La composition en acides aminés est identique à celle proposée par Saeed *et al.* (1983).

Nous avons voulu compléter nos observations en isolant la toxine thermostable d'une autre souche bovine (O9:K30:K99) et en déterminant la séquence en acides aminés.

Matériel et Méthodes

Cultures, Mesures d'activité et Purification

Les cultures de la souche 510 (O9:K30, K99) et les mesures d'activité ont été réalisées selon les techniques décrites précédemment (Gerday *et al.*, 1980). La méthode de purification est identique à celle établie pour la souche S126A (Gerday *et al.*, résultats non publiés). Elle comprend les étapes suivantes: concentration du surnageant stérilisé provenant de 10 l de culture sur membrane Millipore PSAC; absorption d'une partie des pigments de la solution, concentrée vingt fois, par filtration sur Silicagel G; fractionnement à l'acétone 1:1 (vol/vol) puis 9:1 (vol/vol); chromatographie sur DEAE cellulose à pH 2,8 et chromatographie à haute pression (HPLC) sur colonne, type tamis moléculaire, Shodex Q802 (Showa Denko, Tokyo, Japon).

Analyse de la composition en acides aminés

Elles ont été réalisées à partir d'hydrolysats de 24 h par HCl 6N des toxines oxydées à l'acide performique (Hirs, 1956), ou carboxyméthylées (Gerday *et al.*, résultats en cours de rédaction).

L'analyseur d'acides aminés, Dionex DC300 était équipé d'une colonne de résine Dionex DC5A (0,4 x 15 cm).

D'une manière générale, 2 n moles des toxines hydrolysées étaient utilisées par analyse.

Séquence en acides aminés

La séquence en acides aminés des toxines carboxyméthylées a été réalisée manuellement comme décrit précédemment (Gerday *et al.*, résultats en cours de rédaction) à l'aide d'un réactif d'Edman modifié, 4 N,N - diméthylaminoazobenzène - 4' - isothiocyanate (DABITc) et de la méthode de double couplage (Wittman-Liebold et Lehmann, 1980). La structure a pu être vérifiée et complétée grâce à l'emploi d'un nouveau type d'appareil automatique de détermination de séquences utilisant des réactifs en phase gazeuse (Hunkapiller et

Hood, 1983). Dix nanomoles de toxine carboxyméthylée ont été utilisées à cet effet.

Résultats

Le profil de la chromatographie sur colonne Shodex Q802 (8 x 500 mm) du produit actif obtenu après chromatographie sur DEAE cellulose est représenté à la figure 1. Cette étape correspond au stade ultime de la purification de la toxine provenant de la souche 510 d'origine bovine.

Les résultats sont tout à fait comparables à ceux obtenus avec la souche S126A. Le tableau 1 reprend les activités relatives des fractions obtenues. Comme avec la souche 126A, la majeure partie de l'activité est contenue dans la fraction 4. Sa composition en acides aminés, obtenue à partir du produit oxydé à l'acide performique est la suivante: Asx 1,6, Thr 0,9, Glx 0,9, Pro 1,1, Gly 1,1, Ala 2,1, Leu 1,0, Tyr 1,5, Phe 0,8, Cys 5,5. Le tableau 2 reprend la séquence en acides aminés de la toxine bovine comparée à celles obtenues à partir des souches humaines et porcines.

Discussion

Les toxines thermostables de deux souches (S126A et 510) d'origine bovine ont été purifiées jusqu'à homogénéité à l'aide d'une méthode originale. Les deux produits obtenus sont des peptides longs de 18 résidus d'acides aminés présentant la même composition en acides aminés. La détermination des séquences confirme qu'il s'agit de la même chaîne polypeptidique qui est de plus identique à celle isolée de souches d'origine porcine. Elle montre cependant certaines différences par rapport aux toxines isolées de souches humaines. Seule reste indéterminée, pour ces entérotoxines thermo-stables, la position des ponts disulfure. Aucun SH libre n'a en effet pu être mis en évidence.

La relative facilité de purification de l'entérotoxine thermostable à l'aide de la méthode décrite par ailleurs (Gerday *et al.*, résultats en cours de rédaction) permet d'offrir une alternative valable au produit obtenu de manière synthétique (Klipstein *et al.*, 1983). La similitude structurale des entérotoxines thermostables obtenues de souches d'origines diverses, déjà suggérée par différents tests immunologiques (Franz et Robertson, 1981), permet également d'envisager la mise au point rapide d'une méthode thérapeutique spécifique efficace chez de nombreuses espèces.

Accepté pour publication le 27 juillet 1983.

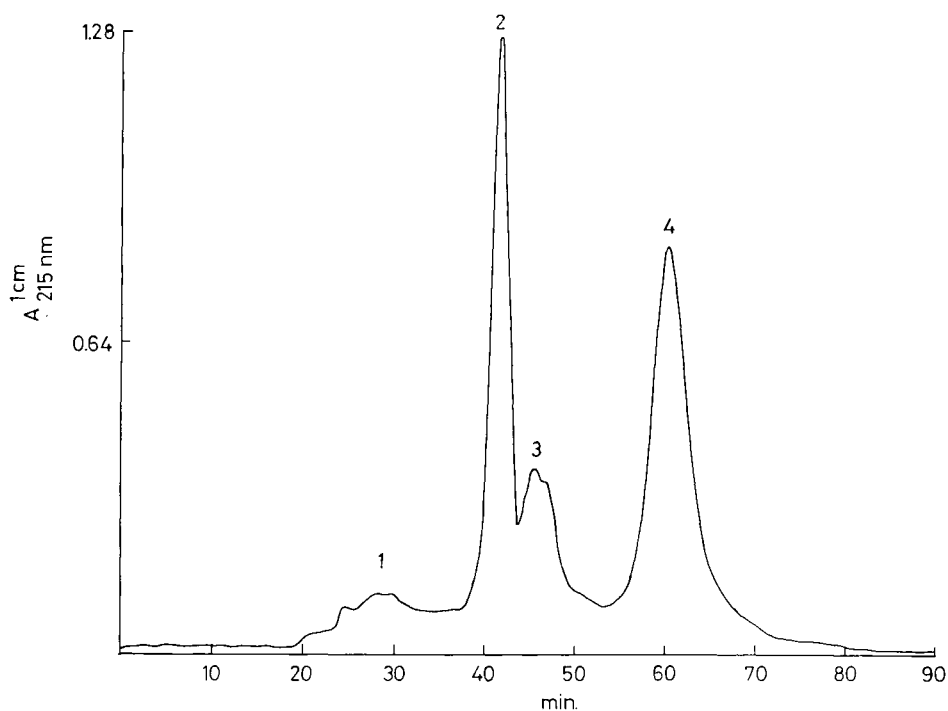


Fig. 1. — Chromatographie HPLC sur colonne type tamis moléculaire, Shodex Q802 (0,8 x 50 cm), de la fraction active obtenue après chromatographie sur DEAE cellulose. Eluant: acide acétique 0,1 ‰. Débit: 0,4 ml/min. Le pic 4 contient la plus grande partie de l'activité entérotoxique.

Tableau 1. — Entérotoxine thermostable: souche 510 d'origine bovine. Résultats de la chromatographie sur colonne HPLC Shodex Q802 (8 x 500 mm) de la fraction active obtenue après fractionnements du concentrat de 10 l de bouillon de culture à l'acétone 1:1 puis 9:1 (vol/vol) et chromatographie sur DEAE cellulose (pH 2,8)

	Fractions (fig. 1)		
	2	3	4
Quantité totale (mg) ^a	0,50	0,14	0,40
Dose minimale active (ng) ^b	2,60	0,45	0,15
Unités totales	$0,19 \times 10^8$	$0,30 \times 10^8$	$2,70 \times 10^8$
Activité (%)	6,0	9,4	84,6

a: obtenue par pesée des fractions lyophilisées

b: dose minimale active chez le souriceau: 1 unité

Tableau 2. — Séquences en acides aminés des entérotoxines thermostables de différentes origines

Humaine ¹	Asn-Thr-Phe-Tyr-Cys-Cys-Glu-Leu-Cys-Cys-Tyr-Pro-Ala-Cys-Ala-Gly-Cys-Asn
Humaine ²	Asn-Ser-Ser-Asn-Tyr-Cys-Cys-Glu-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys-Tyr
Porc ^{3,4}	Asn-Thr-Phe-Tyr-Cys-Cys-Glu-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Ala-Gly-Cys-Tyr
Boeuf ^{5,6}	Asn-Thr-Phe-Tyr-Cys-Cys-Glu-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Ala-Gly-Cys-Tyr

1 : Chan et Giannella, 1981 ; 2 : Aimoto *et al.*, 1982 ; 3 : Lallier *et al.*, 1983 ; 4 : Takao *et al.*, 1983 ; 5 : Gerday *et al.*, 1983 ; 6 : Gerday *et al.*, ce travail.

→ Méthodes manuelle au DABITc

← Digestion carboxypeptidase A + Y

----- Méthode automatique

Remerciements

Nous tenons à remercier M. le Professeur G. Hamoir pour l'intérêt qu'il a manifesté pour ce travail ; Monsieur S. Collin et Mlle F. Edelman, pour leur collaboration efficace.

Ce travail a été en partie subsidié par l'Institut pour l'Encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture (IRSIA).

Il a été rendu possible grâce à la collaboration de travailleurs détachés par le Ministère de l'Emploi et du Travail que nous remercions.

Résumé

Les entérotoxines thermostables colibacillaires provenant des souches S126A et 510 d'origine bovine ont été purifiées jusqu'à homogénéité. Leurs séquences en acides aminés sont identiques et correspondent à celle de la toxine thermostable isolée de souches d'origine porcine : Asn-Tyr-Phe-Thr-Cys-Cys-Glu-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Ala-Gly-Cys-Tyr.

Références

- AIMOTO S., TAKAO T., SHIMONISHI Y., HARA S., TAKEDA T., TAKEDA Y., MIWATANI T., 1982. Amino acid sequence of a heat-stable enterotoxin produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, **129**, 257-263.
- ALDERETE J.F., ROBERTSON D.C., 1978. Purification and chemical characterization of the heat-stable enterotoxin produced by porcine strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **19**, 1021-1030.
- BURGESS M.N., MULLAN N.A., NEWSOME P.M., 1980. Heat-stable enterotoxins from *Escherichia coli* P16. *Infect. Immun.*, **28**, 1038-1040.
- CHAN S.H., GIANNELLA R.A., 1981. Amino acid sequence of heat-stable enterotoxin produced by *Escherichia coli* pathogenic for man. *J. Biol. Chem.*, **256**, 7744-7746.
- FRANZ J.C., ROBERTSON D.C., 1981. Immunological properties of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxins. Development of radioimmunoassay specific for heat stable enterotoxins with suckling mouse activity. *Infect. Immun.*, **33**, 193-198.
- GERDAY Ch., OLIVY J., DANIEL F., SCHÆNAERS F., KAECKENBEECK A., 1980. Isolement et caractérisation de l'entérotoxine thermostable (ST) d'*Escherichia coli* d'origine bovine. *Ann. Med. Vét.*, **124**, 527-533.
- HIRS C.H.W., 1956. The oxydation of ribonuclease with performic acid. *J. Biol. Chem.*, **219**, 611-621.

- HUNKAPILLER N.W., HOOD L.E., 1983. Protein sequence analysis: Automated microsequencing. *Science*, **219**, 650-659.
- KAPITANY R.A., FORSYTH G.W., SCOOT A., Mc KENZIE S.F., WORTHINGTON R.M., 1979. Isolation and partial characterization of two different heat-stable enterotoxins produced by bovine and porcine strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **24**, 965-966.
- KLIPSTEIN F.A., ENGERT R.F., HOUGHTEN R.A., 1983. Properties of synthetically produced *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Infect. Immun.*, **39**, 117-121.
- LALLIER R., BERNARD F., GENDREAU M., LAZURE C., SEIDAH N.G., CHRETIEN M., ST PIERRE S.A., 1982. Isolation and purification of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin of porcine origin. *Anal. Biochem.*, **127**, 267-275.
- MOSELEY S.L., HARDY J.W., IMDADUL HUQ M., ECHEVERRIA P., FALKOW S., 1983. Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding a heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **39**, 1167-1174.
- SAEED A.M.K., SRIRANGANATHAN N., COSAND W., BURGER D., 1983. Purification and characterization of heat-stable enterotoxin from bovine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **40**, 701-707.
- SO M., MC CARTHY B.J., 1980. Nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn 1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **77**, 4011-4015.
- STAPLES S.J., ASHER J.E., GIANNELLA R.A., 1980. Purification and characterization of heat-stable enterotoxin produced by a strain of *Escherichia coli* pathogenic for man. *J. Biol. Chem.*, **255**, 4716-4721.
- STAVRIC S., JEFFREY D., KONOWALCHUK J., 1978. Production and partial purification of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. In: S.D. Acres (ed), *Proceeding of the second international Symposium on Neonatal Diarrhea*, pp. 93-106. VIDO Saskatoon.
- TAKEDA Y., TAKEDA T., YANO T., YAMAMOTO K., MIWATANI T., 1979. Purification and partial characterization of heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **25**, 978-985.
- WHIPP S.C., MOON H.W., ARGENZIO R.A., 1981. Comparison of enterotoxic activities of heat-stable enterotoxin from class 1 and class 2 *Escherichia coli* of swine origin. *Infect. Immun.*, **31**, 245-251.
- WITTMAN-LIEBOLD B., LEHMANN A., 1980. New approaches to sequencing by micro and automatic solid phase technique. In: C.H.R. Birr, (ed), *Methods in peptide and protein sequence analysis*. Elsevier, North-Holland Amsterdam, 49-72.