

APPROCHE INNOVANTE D'ÉVALUATION DU STATUT SANITAIRE DES POISSONS PAR DÉVELOPPEMENT D'UN SÉRUM SPÉCIFIQUE POUR IMMUNODÉTECTION DES CHRYSOPHSINES DANS LES MUCUS

Wael BELLILA¹, Ammar MAROUANI, Sonia FEKIH-ZAGHBIB, Monia EL BOUR³, Andrea SANTULLI et Balkiss BOUHAOUALA-ZAHAR^{1,2}

¹ Laboratoire des Venins et molécules thérapeutiques (LVMT – LRO8), 13, Place Pasteur BP74, 1002 Tunis Belvédère.

² Faculté de médecine de Tunis, Université de Tunis-El Manar, Tunis Romana 1068, Tunis BP94, Tunisie.

³ Laboratoire de Biodiversité et biotechnologie marines (INSTM Salammbô), 28 rue du 2 mars 1934 Tunis Tunisie.

RESUME

L'objectif innovant du test mis en place consiste à développer un immunotraceur, pour détection immunoenzymatique des chrysopsines afin de statuer de l'état de santé des poissons en aquaculture. Ce travail rapporte le développement d'un sérum et d'un anticorps polyclonal préparé chez le lapin pour détecter les chrysopsines de mucus de poissons.

ABSTRACT

The innovative objective of the work undertaken was to develop an immunoassay tracer for immuno enzymatic detection of chrysopsins and their monitoring for fish's health statement in fish farming areas. Thus, herein we obtained a serum and a polyclonal antibody following rabbit immunization able of detecting fish mucus chrysopsins.

INTRODUCTION

L'Aquaculture fait de nos jours l'objet de nombreuses études de surveillance pour le risque d'infections étant donné que les poissons en élevage, sont sous influence étroite de stress environnant. Aussi, en réponse à un stress ou une infection, une batterie de composés protéiques sont libérés dans les tissus du poisson exposés au risque et en particulier dans leur mucus. Ce dernier étant considéré la première barrière immunitaire vis-à-vis des agents pathogènes. Parmi ces composés les peptides antimicrobiens (PAM) notamment, les piscidines-like ont été décrits comme marqueurs du stress et du risque infectieux. Ainsi, nous avons récemment démontré que les Chrysopsines sont présents dans le mucus de poissons sauvages et d'aquaculture et constituent des indicateurs potentiels de l'état de santé du poisson avec un large spectre d'activité bactéricide contre les bactéries Gram (-) et Gram (+) (Fekih-Zaghib et al., 2013). La raison pour laquelle nous avons procédé à l'élaboration d'un anticorps polyclonal pour leur immunodétection dans les mucus des poissons.

MATERIEL ET METHODES

1. **Identification et séparation de Chrysopsins :** trois échantillons de chrysopsines ont été purifiées à partir de mucus de *Dicentrarchus Labrax* (Bar) par MALDI-TOF selon le protocole standard.
2. **Protocole d'immunisation du lapin :** par des émulsions « Peptide C-Terminal » des chrysopsines conjuguées au peptide KLH et l'adjuvant de Freund. Le programme s'est déroulé sur 48 jours et a consisté en une injection de

400µg (en sous cutanée) et 4 rappels avec des doses croissantes du peptide synthétique. Avant chaque injection un volume de sang est prélevé. Trois jours après le dernier rappel, le lapin est saigné et le sang / sérum récupéré.

3. **Purification des anticorps spécifiques par chromatographie d'affinité :** suite à la préparation d'un gel de Sepharose-CNBr couplée au peptide correspondant pour l'extrémité C-terminale des Chrysopsins, la colonne a été utilisée pour la séparation par chromatographie d'affinité des anticorps spécifiques à partir du sérum du lapin immunisé. Le rendement de la colonne a été déterminé par dosage Bradford.
4. **Suivi immuno-enzymatique par ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) :** Des tests ELISA ont été utilisés pour évaluer la capacité de liaison des anticorps spécifique au peptide C-Terminal des Chrysopsines.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. **Identification de trois isoformes de chrysopsines par MALDI-TOF :**

Les chrysopsines ont été importées pour la première fois à partir de mucus de poisson du Japon et isolées pour la première fois en Tunisie à partir du loup (*Dicentrarchus labrax*) en aquaculture (Fekih-Zaghib et al., 2013). Afin de vérifier la présence des trois isoformes au sein du mucus du loup en élevage, un spectre MALDI-TOF a été réalisé sur la fraction « a » (eluée à 33-35% d'acétonitrile) issue de la purification par HPLC du mucus (Fekih-Zaghib et al., 2013). L'analyse des masses a permis de révéler la présence des trois isoformes de Chrysopsines

(Fig.1). Le peptide C-terminal conservé a été ensuite synthétisé (Protéogenix service) et couplé

au peptide KLH pour l'immunisation du lapin.

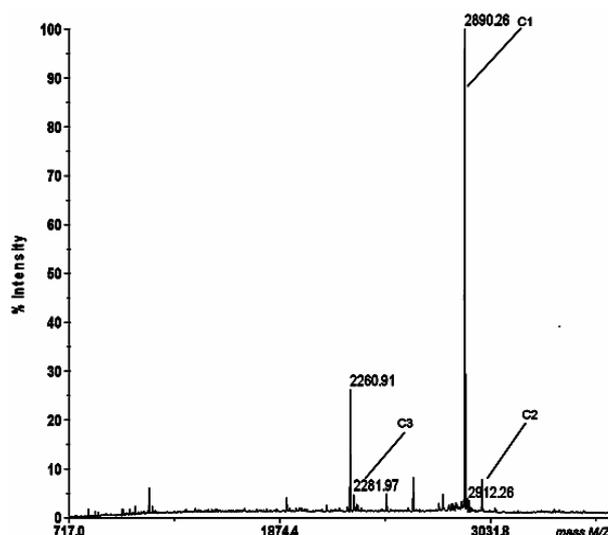


Figure 1 : Séparation et identification de trois isoformes de Chrysothripsines dans le mucus de *Dicentrarcus labrax* d'aquaculture (Bar) par MALDI-TOF

2. **Rendement de purification de l'anticorps polyclonal par chromatographie d'affinité:**

Aux termes du programme d'immunisation, le sang total a été collecté (70ml) et le sérum a été prélevé et

analysé. La purification des anticorps polyclonaux spécifiques des chrysothripsines a été réalisée par chromatographie d'affinité sur gel de Sepharose couplé au Peptide C-terminal des Chrysothripsines.

Tableau I : La capacité de rétention sur gel sépharose du peptide C-terminal de la chrysothripsine (NR, non retenu)

Rendement VS ABS (NR1+NR2)[%]	82,57
Rendement VS Quantité (NR1+NR2)[%]	82,79
Rendement VS ABS (NR total)[%]	80,20
Rendement VS Quantité (NR total)[%]	81,08

Les rendements de purification par affinité sont de 19% environ et dénotent de près de 81% d'anticorps non spécifiques présents dans le sérum de lapin. Ces résultats sont comparables aux rendements de purification des anticorps spécifiques en général. Après élution des anticorps retenus sur la colonne sépharose-chrysothripsine, l'éluat d'anticorps E3 a été dosé par le test de Bradford. Nous avons remarqué que les rendements sont encore plus faibles que ceux attendus puisque la concentration sont que de 0.35 mg/ml (output) alors que la concentration du sérum de départ était estimée à 37mg/ml 'input).

3. **Technique immuno enzymatique E.L.I.S.A :**

Le sérum brut et l'éluat d'anticorps spécifiques ont été testés par ELISA pour leur capacité de reconnaissance du peptide C-terminal de la chrysothripsine, préalablement immobilisé dans les puits d'une plaque Maxisorp (NUNC). A une dilution 1/1000 le sérum présente un titre de reconnaissance élevé. Ce titre est légèrement supérieur à celui de E3 (à 5µg/ml). Ce résultat démontre la spécificité du sérum et de l'anticorps polyclonal obtenus (Fig. 2). Un plan d'expérience sera réalisé afin d'optimiser le test et définir le seuil de détection de l'anticorps

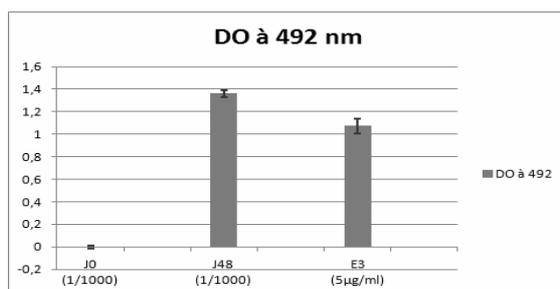


Figure 2 : Détection des anti-chrysopsins dans le sérum total (J48) et dans l'éluât N°3 (E3) dans les échantillons M1, M2

CONCLUSION

La capacité de rétention de la colonne de Sépharose-CNBr conjugué au peptide C-terminal de la chrysopsine est estimée à 81,08% (Tab. I). Le rendement total des anticorps anti-chrysopsin mesuré sur 5 éluats est estimé à 0,31% du sérum. La nature peptidique et le faible poids moléculaire des chrysopsines expliquent le rendement obtenu qui reste satisfaisant compte tenu du caractère polyclonal du sérum de départ (Tab. I).

Ainsi, nous avons détecté la présence des anti-chrysopsins dans le sérum total (J48) et dans l'éluât E3.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été mené dans le cadre du projet transfrontalier BIOVecQ PS1.3_08 co-financé par l'UE.

BIBLIOGRAPHIE

- FEKIH-ZAGHBIB S., FILDIER A., BARREK S. and BOUHAOUALA-ZAHAR B. (2013) - A complementary LC-ESI-MS and MALDI-TOF approach for screening antibacterial proteomic signature of farmed European Sea bass mucus, *Fish & Shellfish Immunology* 35: 207-212.