

À PROPOS D'UN NOUVEAU TYPE DE TOXINE BOTULIQUE

ABOUT A NOVEL TYPE OF BOTULINUM TOXIN

Par Michel R. POPOFF¹

(Communication présentée le 6 février 2014)

RÉSUMÉ

Un nouveau type de toxine botulique a été identifié (type H) qui représente une nouvelle entité pathologique mais aussi une nouvelle menace potentielle pour l'homme. La non divulgation des informations scientifiques et la non distribution de la nouvelle souche à d'autres laboratoires experts posent le problème de la confidentialité de nouvelles données sensibles et de la stratégie de sécurité à adopter dans les laboratoires de diagnostic et de recherche sur la manipulation de nouveaux agents pouvant se révéler très pathogènes.

Mots-clés : Clostridium botulinum, toxine botulique, botulisme.

SUMMARY

A novel type (type H) of botulinum toxin has been identified, which represents a novel pathology and also novel potential threat for human. The non disclosure of scientific information and non distribution of the novel strain to other expert laboratories raise the question of confidentiality of new sensitive data and security strategy to be developed in the diagnosis and research laboratories regarding the handling of new potentially very virulent pathogens

Key words: Clostridium botulinum, botulinum neurotoxin, botulism.

INTRODUCTION

Le botulisme est une affection neurologique de l'homme et des animaux, qui se caractérise par une paralysie flasque. Chez l'homme, c'est actuellement une maladie rare mais sévère dont on recense 20 à 40 cas annuels en France (Carlier *et al.* 2007 ; Mazuet *et al.* 2011). Par contre, l'incidence est plus élevée chez les animaux notamment les bovins, les oiseaux d'élevage et les oiseaux sauvages, essentiellement des canards.

En France, l'origine du botulisme humain est le plus souvent d'origine alimentaire. Les intoxications alimentaires sont connues depuis l'Antiquité, mais le botulisme n'a pas été reconnu comme une entité pathologique distincte jusqu'au milieu du 18^e siècle. Le plus ancien document à ce sujet est un texte indien des 15-16^e siècles qui relate la préparation d'un toxique, probablement de la toxine botulique, à partir de contenu intestinal de mouton. Les premiers cas de botulisme ont été identifiés par des médecins allemands en 1735. Mais la première description détaillée des symptômes du botulisme a été rapportée par l'Allemand Kerner en 1755 et 1789. Le nombre de cas s'accroît à la fin du 18^e-début 19^e siècle, essentiellement à la suite de consommation de saucisses. Ainsi

cette maladie fut désignée « maladie des saucisses », puis elle reçut le nom de botulisme, provenant du terme latin « botula » boudin. Entre 1820 et 1822, Kerner rapporte 150 cas dont 80 mortels. Les recherches s'orientent vers la présence de toxiques pouvant se former dans les saucisses ou apportés par les épices et les condiments. Dès cette époque, Kerner prévoyait l'utilisation de cette toxine paralysante dans le traitement d'affections neurologiques se traduisant par des spasticités excessives de certains muscles ou par des hypersécrétions de certains fluides. Dès 1833, il est noté que l'intoxication par les saucisses en Allemagne est similaire à celle causée par des poissons fumés dans certaines régions de la Russie. Puis, de nombreux cas de botulisme suite à la consommation de poissons fumés et séchés ont été signalés, notamment en Allemagne.

La nature bactérienne de cette affection ainsi que la toxine botulique ont été identifiées à la fin du 19^e siècle. Van Ermengem isole pour la première fois en 1897 une bactérie anaérobie toxigène d'un jambon, et de l'intestin et la rate d'une des trois victimes d'un groupe de 30 musiciens qui l'avaient consommé. Il montra que les filtrats de culture administrés expérimentalement à des animaux reproduisaient les paralysies flasques et

(1) Unité des Bactéries anaérobies et Toxines, Institut Pasteur, 75724 Paris cedex 15.
Courriel : mpopoff@pasteur.fr

entraînaient la mort. Quelques années plus tard, en 1904, Landman isola une souche d'une conserve de haricots, qui avait causé un foyer de botulisme en Allemagne. C'était la première fois que cette maladie était reliée à la consommation de végétaux et non plus de viande ou de poisson. Leuch (1910) de « l'Institut Royal des Infections » à Berlin trouva sur la base d'absence de neutralisations croisées que les deux souches, celle isolée du jambon et celle de la conserve de haricots, produisaient des toxines distinctes. De la fin du 18^e siècle et au début du 19^e siècle, de nombreux cas ont été rapportés aux USA, principalement après la consommation de conserves de végétaux traitées par la chaleur, qui étaient un nouveau mode de conservation des aliments, suite notamment aux travaux de Pasteur. Il apparut que la toxine botulique produite par les souches américaines était différente de celle des souches européennes. Les souches des conserves de végétaux ont été désignées type A, et celles de jambon type B.

Les souches isolées de poulets atteints de botulisme aux USA et de bovins en Australie ont été identifiées comme appartenant à un nouveau type, qui a été désigné type C par Bergson et Sedon (1932).

Le botulisme issu de la consommation de poisson à New York et en Ukraine fut dénommé de type E par Gunnison et collaborateurs (1936-1937) parce que les souches isolées de ces foyers étaient identiques entre elles, mais produisaient une toxine botulique antigéniquement différente de celles identifiées jusqu'alors.

Le type F a été identifié au Langeland, Danemark, en 1958 chez deux personnes qui avaient consommé un pâté de fabrication familiale.

C. botulinum type G a été isolé en 1970 du sol en Argentine par Gimenez et Cicarelli.

Le botulisme a été d'abord reconnu comme étant une intoxication d'origine alimentaire. Mais en 1940-1945, le botulisme par blessure a été identifié suite à une contamination de plaie comme dans le cas du tétanos. En 1976, une nouvelle forme de botulisme a été identifiée chez des jeunes enfants consistant en un botulisme par colonisation intestinale. Les sujets se contaminent par l'ingestion de spores de *C. botulinum* qui dans certaines circonstances, notamment chez les jeunes enfants, germent et donnent lieu à une multiplication bactérienne et à la production de toxine botulique dans le contenu intestinal. Le botulisme par colonisation intestinale a été ensuite reconnu chez des adultes soumis à des facteurs de risques perturbant la microflore digestive (Popoff, 2014).

UN NOUVEAU TYPE DE TOXINE BOTULIQUE

En 2013, S. Arnon et ses collègues ont isolé une souche de *C. botulinum* à partir des selles d'un nouveau-né atteint de botulisme. Cette souche produit deux types de toxine botulique, une toxine botulique de type B et une toxine d'un nouveau type,

dénommé H sur la base de sa toxicité chez la souris et de l'absence de sa neutralisation par les sérums contre les types de toxine botulique connus jusqu'à présent. Le gène de cette toxine de type H a été cloné et séquencé. Sa séquence se révèle être distincte de celle des toxines des autres types. Le type H serait un hybride entre le type F et B (Dover *et al.* 2013; Barash *et al.* 2014).

Ainsi actuellement, on distingue huit types de toxine botulique (A à H) sur la base de leurs propriétés antigéniques à l'aide de sérums neutralisants : un type de toxine est défini par sa capacité à être neutralisé par un sérum d'un type donné et non par les autres sérums. Chaque type de toxine botulique est divisé en sous-types d'après les variations de séquence d'acides aminés (**tableau 1**). Les gènes des toxines botuliques ont été séquencés dans un grand nombre de souches, et leurs séquences en acides aminés montrent des variations de 2 à 16% à l'intérieur de chaque type.

Les souches de *Clostridium* produisant les toxines botuliques forment un groupe bactérien très hétérogène. L'espèce *C. botulinum* comprend quatre groupes qui, sur le plan phénotypique et génétique, correspondent en réalité à des espèces bactériennes distinctes. Mais comme la caractéristique majeure de ces bactéries est la production d'une toxine paralysante très puissante, elles sont dénommées *C. botulinum*, ce qui facilite leur interprétation au niveau médical. Cependant, les souches du groupe IV sont dénommées *Clostridium argentinense*, et des souches atypiques d'autres espèces de *Clostridium* synthétisent aussi des toxines botuliques, c'est le cas de souches de *Clostridium butyricum* et de *Clostridium baratii* (**tableau 1**).

La plupart des souches ne produisent qu'un seul type de toxine botulique, mais certaines produisent deux types de toxines (souches bivalentes) (Popoff *et al.* 2013). La souche identifiée comme produisant le nouveau type de toxine botulique H est une souche bivalente, elle synthétise les toxines B et H. Une souche a été décrite comme contenant trois gènes de toxine botulique (A2, F4 et F5) (Dover *et al.* 2013).

DÉBAT SUR LA TRANSMISSION DES INFORMATIONS

La découverte d'un nouveau type de toxine botulique a été récemment publiée (Barash *et al.* 2014; Dover *et al.* 2014), mais les auteurs en accord avec l'éditeur du journal refusent de communiquer les données génétiques (séquence nucléotidique et séquence en acides aminés) et la distribution de la souche à la communauté scientifique pour un motif de sécurité. Étant donné que ce nouveau type de toxine botulique n'est pas neutralisable par les sérums antibotuliques existants, il représente une menace. Les auteurs et l'éditeur estiment que cette souche ou les informations la concernant pourraient être détournées à des fins malveillantes. Deux éditoriaux dans le numéro de la revue qui publie les deux articles sur le nouveau type de toxine botulique insistent sur cet aspect sécuritaire de ne pas délivrer ces

Clostridium Producteurs de neurotoxine	Groupe I	Groupe II	Groupe III	Groupe IV <i>C. argentinense</i>	<i>C. butyricum</i>	<i>C. baratii</i>
Type de toxine	A B, F, H souches protéolytiques	E B, F souches Non-protéolytiques	C, D	G	E	F
Sous type	A1, A2, A3, A4, A5 B1, B2, B3 bivalent B (Ba, Bf, Ab) F1, F2, F3, F4, F5, H	E1, E2, E3, E6, E7, E8 Non-protéolytique B F6	C, D, C/D, D/C	G	E4, E5	F7
Proteolyse	+	-	-	+	-	-
Température de croissance ^a Optimum Minimum	30-40°C 10-12°C	25-37°C 2.5-3°C	37- 40°C 15°C	30-37°C	30-37°C 10°C	30-45°C
Concentration de NaCl prévenant la croissance ^a	10%	5%		6.5%		
Thermorésistance des spores ^a	D _{121°C} =0.21 min	D _{82.2°C} =2.4-231 min	D _{104°C} =0.1-0.9 min	D _{104°C} =0.8-1.12 min	D _{100°C} <0.1 min	
Botulisme	human		animal		human, animal?	
Clostridium apparenté non-toxinogène	<i>C. sporogenes</i>		<i>C. novyi</i> <i>C. hemolyticum</i>	<i>C. subterminale</i> <i>C. proteolyticus</i> <i>C. schimacherense</i>	<i>C. butyricum</i>	<i>C. baratii</i>

Tableau 1 : Diversité et principales propriétés des *Clostridium* producteurs de neurotoxine botulique.

informations (Hooper *et al.* 2014; Relman, 2014). Ils estiment que l'accès aux données scientifiques et à la souche ne sera possible que lorsque des contremesures (sérum neutralisants spécifiques) auront été développées. Mais la sérothérapie ne constitue pas un traitement efficace contre le botulisme, son effet curatif se limite à son administration en tout début d'apparition des symptômes. Autrement dit, il n'existe toujours pas de traitement spécifique du botulisme, y compris des types de botulisme connus jusqu'à présent. Dans la logique de cette approche, on peut prétexter que la caractérisation des variants de toxines botuliques (identification de nouveaux sous-types), qui est de plus en plus fréquente, soit aussi confidentielle et que la publication des séquences et la distribution des souches soient bloquées, ces variants représentant de nouvelles menaces. La découverte de nouvelles toxines, de nouvelles bactéries pathogènes, de nouveaux virus doit-elle faire l'objet de conditions strictes de sécurité allant jusqu'à interdire les échanges d'information et de matériel dans la communauté scientifique ? En l'occurrence, l'embargo sur la divulgation de ces données empêche les autres laboratoires spécialistes du domaine de confirmer et d'approfondir ces premiers résultats. Si d'autres nouveaux types de toxine botulique existent, d'autres laboratoires les mettront en évidence tôt ou tard. Un échange d'information et de souches sera nécessaire pour comparer et valider leurs investigations.

Si les toxines botuliques représentent une menace réelle en bioterrorisme, elles sont aussi des médicaments très largement utilisés qui génèrent des profits conséquents aux compagnies

productrices. Des nouveaux types ou des variants de toxine botulique pourraient avoir des avantages thérapeutiques particuliers. Ainsi la protection d'un nouveau type pour des raisons de sécurité pourrait assurer aussi une protection commerciale très avantageuse. Les bonnes intentions en sécurité ne sont pas toujours dénuées d'affairisme.

Actuellement, le débat sur la sécurité porte également sur les manipulations conduisant à des « gains de fonction » pouvant se traduire par l'émergence de nouveaux virus, bactéries, toxines très pathogènes ou multirésistantes aux antibiotiques ou antiviraux. Par exemple, le virus de la grippe espagnole a été « ressuscité » et constitue une menace certaine s'il est entre les mains de personnes malveillantes. Par recombinaison génétique, il est possible de générer de nouveaux pathogènes comme des virus qui franchissent les barrières d'espèce ou des bactéries multirésistantes et productrices de toxines très puissantes ou atypiques. Ces travaux sont conduits pour répondre à des questions de biologie et notamment pour permettre une meilleure compréhension des mécanismes de pathogénicité. Ils sont nécessaires et il n'est pas envisageable d'interdire certains sujets de recherche. Par contre, demeure la question : ces activités de recherche doivent-elles être encadrées, si oui, comment et par qui ? Des réflexions sont actuellement menées pour une meilleure prise en compte par les chercheurs des risques éventuels de leurs travaux et sur l'opportunité d'une mise en place d'une commission d'éthique (Rey *et al.*, 2013; Wain-Hobson, 2013).

BIBLIOGRAPHIE

- Barash J.R. & Arnon S. S. A Novel Strain of *Clostridium botulinum* That Produces Type B and Type H Botulinum Toxins. *J Infect Dis.* 2014;209: 183–191.
- Carlier J.P., Espié E., Popoff M.R. Le botulisme en France, 2003-2006. *Bull Epidemiol Hebd.* 2007 ;31–32: 281-4.
- Dover N., Barash J.R., Hill K.K. Davenport K. W., Teshima H., Xie G., Arnon S.S. *Clostridium botulinum* Strain Af84 Contains Three Neurotoxin Gene Clusters: *bont/A2*, *bont/F4* and *bont/F5*. *PLoS One* 2013; 8: e61205.
- Dover N., Barash J.R., Hill K.K., Xie G., Arnon S.S. Molecular characterization of a novel botulinum neurotoxin type h gene. *J Infect Dis.* 2014; 209: 192–202.
- Hooper D.C. & Hirsch M.S. Novel *Clostridium botulinum* Toxin and Dual Use Research of Concern Issues. *J Infect Dis.* 2014 ; 209: 167.
- Mazuet C., Bouvet P., King L.A., Popoff M.R. Le botulisme humain en France, 2007-2009. *BEH* 2011;6: 49–53.
- Popoff M.R. Botulinum neurotoxins: more and more diverse and fascinating toxic proteins. *J Infect Dis.* 2014;209: 168–9.
- Popoff M.R. & Bouvet P. Genetic characteristics of toxigenic *Clostridia* and toxin gene evolution. *Toxicon* 2013; 75:63–89.
- Relman D.A. « Inconvenient truths » in the pursuit of scientific knowledge and public health. *J Infect Dis.* 2014; 209: 170–2.
- Rey F., Schwartz O., Wain-Hobson S. Gain-of-function research: unknown risks. *Science* 2013; 342: 311.
- Wain-Hobson S. Pandemic influenza viruses: time to recognize our inability to predict the unpredictable and stop dangerous gain-of-function experiments. *EMBO Mol Med.* 2013; 5: 1637–41.