

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
Université SAAD DAHLEB - BLIDA
Faculté des sciences agro-vétérinaires et biologiques
Département des sciences vétérinaires

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de docteur vétérinaire

Thème

**TOXINOTYPAGE DE
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS RESPONSABLE
DES ENTÉROTOXÉMIES ANIMALES EN
ALGÉRIE PAR MÉTHODE D'AMPLIFICATION
GÉNIQUE (PCR).**

Présenté par

Mlle Selma BRAHAMI

Soutenu le : 22/10/2009.

Devant le jury composé de :

Mr TRIKI YAMANI R. Chargé de cours, USDB Président.
Mr OUMOUNA M. Maître de conférence, USDB Examineur.
Mr DJOUDI M. Maître assistant, USDB Examineur.
Mme MERAD S. Maître assistante, Institut Pasteur d'Algérie Promotrice.
Mr MENOUERI N. Chargé de cours, USDB Co-promoteur.

2008-2009

REMERCIEMENTS

Je remercie ;

Le bon Dieu, de m'avoir donné la santé, la volonté et le courage afin de réaliser mes objectifs dans la vie, y compris ce modeste travail.

Madame Merad S., qui m'a proposé ce travail et a su rester disponible et pédagogue. J'ai trouvé en elle une incontestable patience et sagesse. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Monsieur Menoueri N., que je ne remercierai jamais assez d'avoir accepté de me guider dans l'élaboration de ce travail avec bienveillance et sagesse. Pour la qualité de son enseignement. Qu'il trouve ici le témoignage de ma profonde considération.

Monsieur Ghemati M., pour son savoir faire, sa gentillesse, sa sagesse et surtout ... sa patience !!! Qu'il trouve ici l'expression de mes sincères remerciements.

Monsieur TRIKI YAMANI R., qui m'a fait l'honneur de présider mon jury de soutenance. Hommages respectueux.

Messieurs, DJOUDI M. et OUMOUNA M., qui m'ont fait l'honneur d'accepter de faire partie de mon jury. Respectueux remerciements.

Messieurs Kadra B. et Miklos T., pour leurs précieuses aides indispensables à l'élaboration de la partie pratique de ce travail. Pour leur gentillesse et leur générosité. Respectueux hommages.

Monsieur le Professeur Kermouni S-M., pour ses aides précieuses. Pour sa disponibilité et sa gentillesse. Respectueux remerciements.

Mon enseignant favori de tous les temps, Docteur Djoudi, pour la qualité de ses cours, pour sa simplicité et sa sympathie. Merci de m'avoir transmis votre amour pour la médecine des carnivores ! Sincères remerciements.

Toute l'équipe du service ANAEROBIES de l'IPA, pour leur simplicité, leur sympathie et surtout leur savoir vivre. Vous êtes inoubliables !

Mes enseignants d'hier, d'aujourd'hui et de demain ...

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail ;

*A mes chers parents. Pour tout ce qu'ils m'ont offert,
A ma sœur, mes frères et mes belles sœurs,
A ma "Syrine" chérie,
A mes amis et tous ceux qui m'aiment,
Aux lendemains difficiles... !!!*

RESUME

Clostridium perfringens est l'agent causal de nombreuses toxi-infections animales et humaines. Il fait partie de la flore intestinale commensale. En santé animale, lors de changements brutaux, tels les changements alimentaires, il se produit une multiplication intense de la flore intestinale, souvent au profit de *C.perfringens*, amenant à l'apparition des entérotoxémies. Dans ce cadre, nous avons procédé à l'identification de trente et une souches de *Clostridium perfringens* à l'origine d'entérotoxémies animales par les techniques bactériologiques classiques (culture sur gélose Columbia® et galeries API 20A). Par la suite, ces souches ont été étudiées par la technique PCR simple (Polymerase Chain Reaction) à la recherche des gènes produisant les toxines α , β_1 , β_2 , ϵ et ι . Les produits de l'amplification sont révélés par électrophorèse sur gel d'agarose. Le gène *plc* produisant la toxine α a été retrouvé chez toutes les souches étudiées amenant à conclure que *Clostridium perfringens* de type A est le toxinotype prédominant en Algérie. De là, la technique PCR s'est montrée beaucoup plus performante, de par sa sensibilité et sa spécificité, par rapport aux méthodes microbiologiques habituelles. La prophylaxie des entérotoxémies animales étant achevée par la vaccination, la technique PCR peut se présenter alors comme outil de choix pour la fabrication de vaccins adaptés au concept épidémiologique du terrain.

Mots clés : *Clostridium perfringens* ; Entérotoxémies ; Polymerase Chain Reaction ;
Toxines ; Toxinotype.

SUMMARY

Clostridium perfringens is a causative agent of human and animal food borne infections. It is known as a normal inhabitant of the intestinal tract. In animal health, while abrupt changes, such as dietary changes, it occurs an intense proliferation of the intestinal flora, often for *C. perfringens*, leading to the emergence of enterotoxemia. In this context, thirty-one strains of *Clostridium perfringens* were identified by classical bacteriological techniques (culture on Columbia® agar and API 20A galleries). Subsequently, these strains were analyzed by simplex PCR method (Polymerase Chain Reaction) in search of genes that produce α , $\beta 1$, $\beta 2$, ϵ and ι toxins. The amplification products were revealed by agarose gel electrophoresis. The *plc* gene producing α toxin was found in all strains analyzed leading to conclude that *Clostridium perfringens* type A is the predominant toxinotype in Algeria. Hence, PCR technique has shown much more efficient, because of its sensitivity and specificity, compared to traditional microbiological methods. Prophylaxis of enterotoxemia animal being completed by vaccination, the PCR method can present itself as a first-choice tool for the fabrication of vaccines adapted to epidemiological situation.

Key words : *Clostridium perfringens* ; Enterotoxemia ; Polymerase Chain Reaction ;
Toxines ; Toxinotype.

ملخص

كلوستريديوم بارفرنجنس هو العامل المسبب للعديد من التسممات التي تصيب الحيوان و الإنسان ، و هو ينتمي إلى المجموعة البكتيرية المعوية المنادمة. في مجال الصحة الحيوانية و إثر أي تغيير مفاجئ، كالتغيير في النظام الغذائي مثلا يحدث تكاثر سريع للجرثومة المعوية هذا الأخير يعود بالفائدة لصالح كلوستريديوم بارفرنجنس مما يؤدي إلى حدوث تسممات معوية. في هذا الإطار شرعنا في إثبات هوية واحدة و ثلاثين خلية أصلية لكلوستريديوم بارفرنجنس التي عزلت من التسممات المعوية عن طريق تقنيات بكتريولوجية كلاسيكية (الزراعة على المادة الهلامية كولومبيا و تقنية الأروقة (أ 20 Api)، بعدها قمنا بدراسة هذه البكتريا باستخدام تقنية التزايد المتسلسل للبوليمراز (تضاعف السلاسل عن طريق البوليمراز) للبحث عن الجينات المنتجة للتوكسينات α ، $\beta 1$ ، $\beta 2$ ، ϵ و ι . نواتج التضاعف ثم الكشف عنها عن طريق الهجرة الكهربائية على هلامى الأغاروز. الجين *plc* المنتج للتوكسين α قد وجد في جمع الجراثيم المدروسة مما أدى إلى الاستنتاج أن كلوستريديوم بارفرنجنس صنف أ هو صنف التوكسين السائد في الجزائر، من هنا فإن تقنية تفاعل سلسلة البوليمراز هي التقنية الأكثر فعالية و ذلك بفضل دقتها و تخصصها مقارنة بالتقنيات المتداولة. يبقى التلقيح ضد الالتهابات المعوية أفضل طريقة لوقاية الحيوان، كما أن تقنية التزايد المتسلسل للبوليمراز هي الخيار الأمثل لإنتاج اللقاحات المضادة الفعالة .

الكلمات المفتاحية : كلوستريديوم بارفرنجنس، التسممات المعوية، تفاعل سلسلة البوليمراز، التوكسين، صنف التوكسين.

GLOSSAIRE

- **Anaculture** : vaccin à base d'anatoxines, utilisé pour immuniser l'organisme vivant contre certaines maladies clostridiennes.
- **Anatoxine** : exotoxine ayant perdu ses propriétés toxiques mais conservé ses propriétés antigéniques. L'anatoxine est utilisée pour la création de vaccins.
- **Antitoxine** : anticorps ayant la capacité de neutraliser une toxine spécifique.
- **Cellule VERO** : abréviation de « Verda Reno » qui signifie « Verts Reins ». Ce sont des lignées de cellules isolées à partir de cellules rénales épithéliales d'un singe vert africain (*Cercopithecus aethiops*). Les cellules VERO sont utilisées dans les cultures cellulaires.
- **Chromosome** : ensemble de gènes, le chromosome est porteur de l'information génétique.
- **Dénaturation** : opération qui consiste à séparer les deux brins d'ADN en rompant les liaisons hydrogène qui lient les bases au sein de la double hélice.
- **Dysbactériose** : perturbation de l'équilibre de la microflore intestinale.
- **Encéphalomalacie** : ramollissement de l'encéphale suite à un infarctus cérébral, ischémie cérébrale, infection, traumatisme craniocérébral ou d'autres blessures.
- **Endotoxine** : toxine produite par une bactérie lors de sa croissance ou de sa lyse.
- **Enzootie** : maladie épidémique qui touche une ou plusieurs espèces d'animaux dans une même région.
- **Exotoxine** : toxine produite par une bactérie lorsqu'elle est vivante.
- **Gangrène gazeuse** : nécrose des tissus suite à une infection microbienne à germes anaérobies qui se caractérise par une production de gaz au sein du tissu infecté.
- **Gène** : unité élémentaire de l'information génétique, il s'agit d'une séquence d'ADN qui spécifie la synthèse d'une chaîne polypeptidique ou d'un acide ribonucléique (ARN) fonctionnel.
- **Hybridation** : appariement de deux brins d'ADN par la formation de liaisons hydrogène entre les nucléotides complémentaires.
- **Locus** : emplacement physique précis et invariable sur un chromosome.
- **Mammite gangreneuse** : infection suraiguë, caractérisée par une atteinte brutale de la mamelle évoluant rapidement vers la gangrène.

LISTE DES TABLEAUX

| Tableaux | Titre | Pages |
|--------------------|---|--------------|
| Tableau I | Caractéristiques des différentes toxines élaborées par <i>Clostridium perfringens</i> . | 6 |
| Tableau II | Production des différentes toxines létales majeures par les toxinotypes de <i>Clostridium perfringens</i> . | 13 |
| Tableau III | Lésions caractéristiques observées à l'autopsie sur les ruminants morts d'entérotoxémie. | 19 |
| Tableau IV | Méthodes de recherche des toxines de <i>Clostridium perfringens</i> . | 23 |
| Tableau V | Tableau récapitulatif des 31 souches étudiées. | Annexe 2 |

LISTE DES FIGURES

| Figures | Titre | Pages |
|------------------|--|--------------|
| Figure 1 | Activités biologiques des toxines de <i>Clostridium perfringens</i> . | 13 |
| Figure 2 | Principe de la méthode PCR. | 25 |
| Figure 3 | Repiquage des souches et mise en anaérobiose. | 29 |
| Figure 4 | Ensemencement de la galerie API 20 A et mise en anaérobiose. | 31 |
| Figure 5 | Préparation du gel d'agarose. | 33 |
| Figure 6 | Dépôt des amplifiats sur le gel d'électrophorèse. | 34 |
| Figure 7 | Dispositif de la migration sur gel d'électrophorèse. | 34 |
| Figure 8 | Forme des colonies après 24 heures d'incubation sur gélose Columbia® plus 5 % de sang de cheval. | 36 |
| Figure 9 | Résultat d'identification (Galerie API 20 A, Profil : 46125023, Souche : 276). | 37 |
| Figure 10 | Profil de migration de l'ADN à l'électrophorèse (Gel I, TA : Témoin A, S : Souche). | 38 |
| Figure 11 | Profil de migration de l'ADN à l'électrophorèse (Gel II, MT : Marqueur de taille, S : Souche). | 38 |
| Figure 12 | Profil de migration de l'ADN à l'électrophorèse (Gel III, TA : Témoin A, TD : Témoin D, S : Souche). | 38 |

LISTE DES ABREVIATIONS

- **Ac** : anticorps.
- **ADN** : Acide Désoxyribonucléique.
- **Ag** : antigène.
- **AMPc** : Adénosine monophosphate cyclique.
- **Ca⁺⁺** : ion calcium.
- **Cl⁺** : ion chlorure.
- **CO₂** : dioxyde de carbone.
- **g** : gramme.
- **GEL** : gélose.
- **H₂** : dihydrogène.
- **IND** : indole.
- **K⁺** : ion potassium.
- **kDa** : kilo Dalton.
- **MgCl₂** : chlorure de magnésium.
- **μl** : microlitre.
- **μmole/l** : micromole/litre.
- **mA** : milliampère.
- **ml** : millilitre.
- **mM** : millimolaire.
- **Na⁺** : ion sodium.
- **NADH** : Nicotinamide adénine dinucléotide.
- **NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.
- **ng** : nanogramme.
- **O₂** : dioxygène.
- **PCR** : Polymerase Chain Reaction
- **pH** : potentiel hydrogène.
- **TGY** : Trypcase glucose yeast.
- **Tris** : trihydroxyméthylaminométhane.
- **UFC** : Unité formant colonie.
- **U/μl** : unité/microlitre.
- **UV** : ultraviolet.
- **V** : Volt.

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCTION..... | 1 |
| <u>CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES</u> | |
| I. ENTEROTOXEMIES | 2 |
| I.1. Définition | 2 |
| I.2. Etiopathogenie | 2 |
| I.2.1. Historique | 2 |
| I.2.2. Habitat | 2 |
| I.2.3. Morphologie | 3 |
| I.2.4. Formes de résistance: les spores | 3 |
| I.2.6. Les toxines élaborées par <i>Clostridium perfringens</i> | 4 |
| I.2.5. Caractères cultureux et biochimiques | 4 |
| I.3. Causes favorisantes et pathogénie | 14 |
| I.3.1. Facteurs extrinsèques | 14 |
| I.3.2. Facteurs intrinsèques | 15 |
| I.3.3. Pathogénie | 15 |
| I.4. Matières virulentes, modes de contagion et voies de pénétration | 16 |
| I.5. Symptômes | 17 |
| I.5.1. Forme clinique suraiguë | 17 |
| I.5.2. Forme clinique aiguë | 17 |
| I.6. Lésions | 18 |
| I.7. Diagnostic | 20 |
| I.7.1. Diagnostic épidémio-clinique | 20 |
| I.7.2. Diagnostic différentiel | 20 |
| I.7.3. Diagnostic bactériologique | 20 |
| I.8. Traitement | 25 |
| I.8.1. Traitement symptomatique | 25 |
| I.8.2. Traitement spécifique | 26 |
| I.9. Prophylaxie | 26 |
| I.9.1. Prophylaxie sanitaire | 26 |
| I.9.2. Prophylaxie médicale | 27 |

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

| | |
|--|----|
| II.1. Matériel | 29 |
| II.1.1. Echantillonnage | 29 |
| II.1.2. Appareillage et réactifs | 29 |
| II.2. Méthodes | 29 |
| II.2.1. Repiquage des souches | 29 |
| II.2.2. Etude biochimique (Galerie API 20 A) | 30 |
| II.2.3. Extraction de l'ADN | 31 |
| II.2.4. Réaction d'amplification | 31 |

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

| | |
|---|----|
| III.1. Résultats | 36 |
| III.1.1. Identification des souches re-isolées | 36 |
| III.1.2. Identification biochimique | 36 |
| III.1.3. Recherche des séquences de gènes codant pour les toxines α , $\beta 1$, $\beta 2$, ε et ι | 37 |
| III.2. Discussion | 39 |

| | |
|---|----|
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 41 |
|---|----|

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

ANNEXES.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Observées dans le monde entier, les entérotoxémies sont des affections très fréquentes en particulier chez l'espèce ovine. En Algérie, elles peuvent engendrer d'importantes pertes économiques en l'absence de mesures prophylactiques rigoureuses (Kadra et al., 1994). En effet, il s'agit de toxi-infections aiguës, d'allure enzootique, se manifestant par une mort subite. Elles sont dues à la résorption par voie sanguine de toxines produites suite à la pullulation intense dans l'intestin de bactéries commensales du genre *Clostridium*. *Clostridium perfringens* en est l'agent principal (Popoff, 1989 ; Kadra et al., 1994 ; Manteca et al., 2001 et Philippeau, 2003).

Sur le terrain, cette maladie reste encore mal contrôlée. Le diagnostic est difficile; les moyens de prévention et le traitement ne sont pas d'une grande efficacité. En effet, le diagnostic des entérotoxémies est un diagnostic de suspicion basé sur les circonstances d'apparition et les lésions observées à l'autopsie. La confirmation diagnostique de laboratoire repose soit sur des techniques bactériologiques classiques, soit sur des méthodes plus complexes recourant à la mise en évidence des toxines des germes responsables de la maladie ou plus récemment des gènes exprimant ces toxines (Latour, 2004 et Pourcher, 2007).

La détermination de l'espèce bactérienne et la connaissance du type toxinique impliquées dans les entérotoxémies sont primordiales pour un diagnostic de certitude et une prophylaxie efficace (Kadra et al., 1994).

Dans ce contexte, le travail que nous avons entrepris vise à améliorer le diagnostic des entérotoxémies à *Clostridium perfringens* de manière à pouvoir identifier d'une part l'espèce incriminée, et d'autre part les gènes exprimant les toxines létales majeures (α , $\beta 1$, $\beta 2$, ϵ , ι), et partant le type toxinique (A-E) par méthode de polymérisation en chaîne.

CHAPITRE I :
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I. ENTEROTOXEMIES

I.1. Définition

Les entérotoxémies sont des toxi-infections aiguës, voire suraiguës, "à point de départ intestinal", communes à de nombreuses espèces animales, particulièrement les ovins. Cette affection, d'allure enzootique, résulte de la résorption par voie sanguine d'exotoxines protéiques létales produites dans l'intestin lors de la multiplication de bactéries commensales du genre *Clostridium*. *Clostridium perfringens* étant l'agent bactérien déterminant de la maladie (Popoff, 1989; Kadra et al., 1999 et Manteca et al., 2001).

I.2. Etiopathogenie

Clostridium perfringens est classiquement considéré comme l'agent étiologique principal dans 83 % des cas d'entérotoxémies (Popoff, 1989; Al-Mashat et al., 1983; Bronzid, 2002 et Picard et al., 2005), même si d'autres clostridies (*C.sordellii*, *C.septicum*) sont citées (Popoff, 1989 et Manteca et al., 2001).

I.2.1. Historique

Clostridium perfringens a été cultivé et isolé pour la première fois par Achalme en 1891 chez un patient souffrant de rhumatisme (Bland et al., 2000 et Manteca et al., 2000). Welch et Nuttal (1892) puis Frankel (1893) l'étudièrent de nouveau. Ils décrivent ses principaux caractères et son pouvoir pathogène chez l'Homme comme un agent de gangrène gazeuse. Ils lui donnent le nom de *Bacillus aerogenes capsulatus* (Manteca et al., 2000).

En France, Veillon et Zuber (1898) l'isolèrent d'appendicites aiguës (Veron et al., 1989 ; et Bland et al., 2000). Son importance comme agent de gangrènes gazeuses apparut au cours de la première guerre mondiale (Bland et al., 2000).

Dalling individualisa mieux l'espèce en 1926 et classa *Clostridium perfringens* selon différents groupes toxiques. La classification de Wildson fut établie en 1933 (Manteca et al., 2000).

Mac Farlane et Knight (1941), caractérisent la toxine α . Bosworth (1943), Oakley (1949) caractérisent les autres principales toxines. Hobbs (1953) met en évidence le pouvoir entérotoxique chez l'Homme de certaines souches (Manteca et al., 2000).

I.2.2. Habitat

Clostridium perfringens est une bactérie ubiquitaire. Elle est répandue dans le milieu ambiant, isolée aisément dans l'air, l'eau douce, l'eau de mer, les poussières,

les sols, les litières, les boues. Dans la plupart des cas, il s'agit du type A (Stamatin et al., 1967; Popoff, 1989; Haagsma, 1991; Bland et al., 2000 et Lefevre, 2003).

Les autres types ont un habitat intestinal (ovins, bovins) et peuvent être isolés des sols de fermes ou sévissent des entérotoxémies à *C.perfringens* (Sterne et al., 1975). Bactérie commensale du tube digestif de l'Homme et des animaux, on peut la retrouver au niveau de la peau (Stamatin et al., 1967; Niilo, 1980; Haagsma, 1991 et Manteca et al., 2003) et occasionnellement dans le rumen (Poppof, 1989).

Le dénombrement de la flore du tube digestif d'un animal sain indique la présence de cette bactérie à des concentrations inférieures à 10^3 clostridies par ml (millilitre) de contenu intestinal. Cette concentration est similaire pour l'intestin grêle, le caecum et le colon (Stark, 1992).

I.2.3. Morphologie

Clostridium perfringens est un bacille à Gram positif, épais et large, de 4 μm de long et de 1 à 1,5 μm de large. Il se présente comme un bâtonnet droit à bords parallèles et aux extrémités carrées. Ces bacilles sont généralement isolés, parfois groupés en paires (Daube, 1992; Manteca, 2000 et Walker et al., 2004).

Il est immobile, non flagellé et acilié. Toutes les souches possèdent une capsule d'épaisseur variable (en fonction des souches), qui peut être discernée par coloration à l'encre de Chine de manière aisée sur un prélèvement (Veron et al., 1989).

I.2.4. Formes de résistance: les spores

Clostridium perfringens est capable de sporuler. Cette capacité lui permet de résister dans le milieu extérieur et de se propager directement ou par l'intermédiaire d'aliments souillés lorsque les conditions (modification de pH et de température) ne sont plus favorables à sa survie (English, 1966; Daube, 1992; Veron et al., 1989 et Walker et al., 2004). Les spores sont ovales, thermo-résistantes et peuvent être libres ou emballées dans leur sporange (Duncan et al., 1972 et 1973).

La formation de spores mûres thermo-résistantes sur des milieux usuels de croissance est généralement bloquée au stade II (formation de septum). Le déterminisme de la production de l'entérotoxine est codé par le même gène que celui de la sporulation. Ainsi, l'augmentation du taux d'entérotoxine est proportionnelle aux nombres de spores formées (Veron et al., 1989 et Duncan et al., 1972).

Clostridium perfringens sporule plus facilement dans l'intestin (Duncan et al., 1972). De plus, l'exposition à l'acidité gastrique pourrait améliorer la capacité de sporulation des souches (Wrigly et al., 1995).

I.2.5. Caractères culturels et biochimiques

Clostridium perfringens est une bactérie anaérobie stricte, aérotole'rance (sa croissance est possible en surface avec 5 % d'oxygène en présence d'un catalyseur activé par l'hydrogène). En surface d'un milieu solide au sang (généralement gélose Columbia® additionnée au sang de cheval), les colonies sont souvent rondes de 3 mm (24 heures d'incubation) à 5 mm (48 heures d'incubation) de diamètre, lisses, à bords réguliers, blanches à légèrement jaunâtres avec un centre grisâtre; elles sont entourées d'une double zone d'hémolyse (un halo clair de lyse complète et de diamètre assez faible correspondant à l'hémolyse θ , et un halo, de plus grand diamètre, trouble, de lyse incomplète correspondant à l'hémolysine α (phospholipase C). Elles sont parfois entièrement ou en partie lisses et transparentes, ou lisses à bords rhizoïdes. Les colonies sont plus rarement rough (le type C) (Bailleul, 1982 et Veron et al., 1989).

En gélose profonde, *C. perfringens* forme, en profondeur, des colonies lenticulaires et du gaz. Ces colonies disloquent la colonne de gélose, d'où la dénomination de *perfringens* (du latin: qui brise) (Veron et al., 1989).

Sur bouillon viande-foie, un trouble du milieu est observable ainsi qu'un dégagement de gaz à odeur âcre (Veron et al., 1989).

Sa température habituelle de croissance est comprise entre 34 et 37 °C, avec un optimum à 46°C. Cette température est utilisée lors de l'incubation pour enrichir les cultures. Son développement est possible pour un pH compris entre 5 et 9 (Veron et al., 1989 et Walker et al., 2004).

Il s'agit d'une bactérie produisant des gaz tels que le dioxyde de carbone et le dihydrogène (effet réducteur) et des acides (acides acétique et butyrique) lors des fermentations de nombreux glucides, en particulier le glucose (Veron et al., 1989 et Walker et al., 2004).

Elle est déficiente en catalase et en peroxydase (Daube, 1992; Manteca et al., 2000 et Walker et al., 2004). Elle est également saccharolytique et protéolytique (détruit les carbohydrates et les protéines en différents composants dont quelques uns sont toxiques) (English, 1966; Veron et al., 1989 et Walker et al., 2004).

I.2.6. Les toxines élaborées par *Clostridium perfringens*

C.perfringens est l'espèce bactérienne produisant le plus grand nombre de toxines à activité létale. Ces toxines, de nature protéique, sont excrétées hors de la bactérie et ont une activité spécifique très élevée (Popoff, 1989). Selon la littérature, 17 toxines ont été caractérisées et d'autres toxines sont encore à l'étude (Songer, 1996; Petit et al., 1999 et Manteca, 2002).

En fonction de leur létalité, ces toxines sont classées en toxines majeures et en toxines mineures (Walker et *al.*, 2004).

Les toxines majeures (α , $\beta 1$, $\beta 2$, ε et ι) sont à l'origine du typage des souches de *C.perfringens* (production variable de toxines entre souches du même toxinotype) (Daube, 1992). Ces dernières sont réparties en cinq types toxiques: type A, B, C, D et E (Lefevre, 2003 et Walker et *al.*, 2004).

Actuellement, on s'oriente vers une classification génotypique qui prend en considération toutes les toxines produites par la souche lors de la maladie observée (toxines majeures). L'activité biologique des toxines protéiques élaborées est à l'origine de lésions découvertes à l'autopsie mais il n'existe pas de tableaux lésionnels spécifiques en fonction de la production de toxines et du type de *C.perfringens* identifié (Daube, 1992).

Les toxines mineures ou facteurs létaux mineurs sont, en général, des enzymes hydrolytiques (protéases, hémolysines etc.) qui jouent un rôle secondaire dans la pathologie et potentialisent parfois l'action des toxines majeures (Popoff, 1989). Elles sont désignées par des lettres grecques: eta, kappa, theta, gamma, lambda, nu, delta et mu (η , κ , θ , γ , λ , ν , δ , μ) (Veron et *al.*, 1989; Walker et *al.*, 2004 et Greco et *al.*, 2005). Toutes ces toxines sont codées par des gènes chromosomiques ou extrachromosomiques et ont des activités biologiques et des modes d'action variés (Tableau I).

Tableau I: Caractéristiques des différentes toxines élaborées par *Clostridium perfringens* (Petit et al., 1999).

| Toxine/Enzyme | Gène | Localisation génétique | Mode d'action | Activité biologique |
|---|---------------------------|--|--|---|
| α | <i>plc</i> | Chromosome | Phospholipase C/ Sphingomyelinase | cytolytique, hémolytique, dermonécrosante, létale |
| $\beta 1$ | <i>cpb1</i> | Plasmide | Formation de pore, altération des membranes cellulaires | Cytolytique, dermonécrosante, létale. Nécrose hémorragique de la muqueuse intestinale |
| $\beta 2$ | <i>Cpb2</i> | Plasmide | Formation de pore, altération des membranes cellulaires | Cytolytique, létale. Nécrose hémorragique de la muqueuse intestinale |
| ϵ | <i>etx</i> | Plasmide | Formation de pore, altération de la perméabilité des membranes cellulaires | Œdème dans divers organes: foie, reins et SNC. Dermonécrosante, létale |
| ι (Ia) | <i>iap</i> | Plasmide | ADP-ribosylation de l'actine | Désorganisation du cytosquelette et de l'intégrité des barrières cellulaires. Dermonécrosante, létale |
| ι (Ib) | <i>ibp</i> | Plasmide | Composant de fixation | |
| Entérotoxine (CPE) | <i>cpe</i> | Chromosome/ plasmide | Formation de pores, lyse des jonctions serrées (Bruce et al., 2000 et 2001) | Cytotoxique, entérotoxique, érythémateuse, létale |
| δ | ? | ? | Hémolysine, spécifique au GM2 | Facteur de virulence accessoire |
| θ ou PfoA | <i>pfoA</i> | Chromosome | Hémolysine, spécifique au cholestérol, Oxygène sensible | Facteur de virulence accessoire |
| κ | <i>colA</i> | Chromosome | Collagénase, gelatinase | Facteur de virulence accessoire |
| λ | <i>Iam</i> | Plasmide | Protéase | Facteur de virulence accessoire |
| μ | <i>nagH</i> | Chromosome | Hyaluronidase | Facteur de virulence accessoire |
| ν | ? | ? | DNase | Facteur de virulence accessoire |
| Neuraminases (sialidases) | <i>nanH</i> , <i>I</i> | Chromosome | Neuraminidase | Facteur de virulence accessoire |
| Uréase | <i>UreA</i> - <i>C</i> | Plasmide | Uréase | Facteur de virulence accessoire |
| Autres enzymes élaborées par <i>Clostridium perfringens</i> (Veron et al., 1999) | | | | |
| Phosphatase acide | | | | |
| Sphingomyelinase | | | | |
| Thyroid stimulating factor | | | | |
| Fucosidase, oligosaccharase, désacétylase | | Enzymes détruisant la spécificité des groupes sanguins | | |
| Hémagglutinine | | | | |

I.2.6.1. La toxine α

La toxine α est une lécithinase ou phospholipase de type C hydrolysant la phosphatidylcholine (la lécithine) et de façon moindre la sphingomyeline (Nagahama et al., 1996 a et b; Smith, 1996; Billington et al., 1998; Titball et al., 1999; Lefevre et al., 2003 et Walker et al., 2004).

Cette toxine est produite par toutes les souches de *C.perfringens*, sauf cas exceptionnel de souches α négatives ou de mutants α négatifs (Songer, 1996). Elle est synthétisée en phase exponentielle de croissance (Smith, 1996; Songer, 1996 et Titball et al., 1999).

Il s'agit de la toxine majeure produite par *C.perfringens* type A, en particulier par les souches responsables de gangrènes gazeuses (souches dites classiques) alors que les souches à l'origine de toxi-infections alimentaires en produisent en quantité moindre (Veron et al., 1989b).

➤ Structure

La toxine α est une protéine de 43 kDa (kilo Dalton) de masse moléculaire. Sa fabrication est établie à partir d'un peptide signal. Elle se compose de 370 acides aminés et possède deux domaines; un domaine N terminal en hélice α , qui correspond au site enzymatique de la toxine, et un domaine C terminal en feuillets β qui est le site de fixation de la toxine à la membrane. Ces deux domaines sont réunis par une région flexible (Titball et al., 1999; Eaton et al., 2002; Shimizu et al., 2002 a et b et Popoff, 2003).

Il s'agit d'une métalloenzyme constituée d'ions Zn^{2+} indispensables à son activité enzymatique et d'ions Ca^{2+} indispensables à la fixation de l'enzyme sur les phospholipides (Titball et al., 1999).

➤ Gène codant

Le gène *plc* (encore appelé *cpa*) est à l'origine de cette toxine. Il est situé sur le chromosome près de l'origine de réplication (Daube et al., 1996; Songer, 1996; Rood, 1998 et Popoff, 2003). Il possède une séquence constante dans toutes les souches testées dans les différents toxinotypes; ainsi le gène *plc* peut être utilisé comme marqueur génétique de l'espèce *Clostridium* (Daube et al., 1994; Rood, 1998; Petit et al., 1999 et Popoff, 2003).

➤ Activité biologique

La toxine α possède une activité cytolytique, dermonécrosante et hémolytante. Elle lyse les membranes des cellules cibles (cellules riches en lécithine) comme les leucocytes, les entérocytes, modifie la perméabilité des endothéliums et provoque un

dysfonctionnement des muscles et l'agrégation des plaquettes (Veron et *al.*, 1989; Smith, 1996; Petit et *al.*, 1999; Lefevre et *al.*, 2003).

I.2.6.2. La toxine $\beta 1$

Anciennement appelée toxine β , la toxine $\beta 1$ a été renommée depuis la découverte récente de la toxine $\beta 2$ (Petit et *al.*, 1999).

La toxine $\beta 1$ est une toxine nécrosante, létale, thermolabile. Elle possède une structure phospholipidique sensible à l'action de la chaleur et à la trypsine; son activité décroît rapidement après son élaboration car elle est hydrolysée. Elle reste stable à pH basique. Elle est sécrétée en phase exponentielle de croissance (Gkiourtzidis et *al.*, 2001 et Lefevre et *al.*, 2003).

➤ **Structure**

C'est une protéine de 38 kDa de poids moléculaire. Elle est constituée de 336 acides aminés. Elle a des homologies avec la toxine α de *Staphylococcus aureus*, la toxine γ et la leucocidine (Songer, 1996 et Gibert et *al.*, 1997).

➤ **Gène codant**

La toxine $\beta 1$ est codée par un gène plasmidique *cpb1* qui n'est présent que chez les souches de type B et C. Elle est particulièrement instable lors de la culture des bactéries (Songer, 1996; Gibert et *al.*, 1997 et Walker et *al.*, 2004). Les raisons de cette instabilité ne sont pas encore élucidées (Buogo et *al.*, 1995 et Frey, 2003).

➤ **Activité biologique**

La toxine $\beta 1$ élabore des pores transmembranaires, provoquant des dommages sur les cellules cibles (entérocytes et cellules de l'endothélium). Elle atteint préférentiellement l'intestin, le cœur, les vaisseaux sanguins et les ganglions lymphatiques (Walker et *al.*, 2004).

Elle affecte les tissus nerveux en modifiant les transports ioniques à travers la membrane des cellules et provoque une fuite de K^+ (potassium) avec passage intracellulaire de Cl^- (chlore), Na^+ (sodium) et de Ca^{++} (calcium) modifiant la polarisation membranaire et provoquant de sévères dépressions (Walker et *al.*, 2004).

Il s'agit d'une toxine dermonécrosante et létale: elle provoque une nécrose hémorragique de la muqueuse intestinale (Frey, 2003). En effet, une quantité de 2 ng (nanogrammes) de la toxine est suffisante pour provoquer des lésions de dermonécrose chez le cobaye et la dose létale à 50 % sur des souris est d'environ 500 ng/kg (Songer, 1996).

Elle est l'agent toxique de la dysenterie des agneaux et est probablement responsable des ulcérations hémorragiques de la muqueuse dans des entérites dues aux types B et C chez les moutons, les bovins et les porcelets (Veron *et al.*, 1989).

L'atteinte préférentielle par ce type toxinique (B) s'explique par la diminution des sécrétions pancréatiques durant une courte période post natale ou par l'ingestion d'inhibiteurs des protéases (trypsine) contenu dans le colostrum entraînant une diminution de l'activité des enzymes protéolytiques (Daube, 1992 et Songer, 1996).

I.2.6.3. La toxine β_2

La toxine β_2 a été récemment isolée à partir d'une souche responsable d'entérite nécrotique mortelle chez des porcelets. Cette souche était du type C, mais la toxine a été retrouvée par la suite chez des souches de type A. Son type toxinique ainsi que son rôle pathogène ne sont pas encore clairement élucidés (Gibert *et al.*, 1997; Petit *et al.*, 1999; Frey, 2003; Walker *et al.*, 2004 et Greco *et al.*, 2005).

➤ Structure

La toxine β_2 est une protéine de 27,4 kDa avec un peptide signal de 30 acides aminés en position N-terminal. Elle possède 15 % de séquence identique et un faible niveau de similitude immunologique avec la toxine β_1 (Gibert *et al.*, 1997 et Petit *et al.*, 1999).

➤ Gène codant

Le gène *cpb2*, à l'origine de l'élaboration de la toxine β_2 , réside sur un plasmide instable notamment lors de l'exposition de *C.perfringens* à l'oxygène ambiant. Ainsi, 90 % des souches perdent ce gène au bout d'une heure en aérobiose. Cette particularité explique sa découverte tardive et la difficulté de sa mise en évidence (Songer, 1996; Gibert *et al.*, 1997; Frey, 2003 et Walker *et al.*, 2004).

➤ Activité biologique

Les souches de *Clostridium perfringens* produisant la toxine β_2 semblent être responsables de cas d'entérite nécrotique chez les porcelets, de typhlocolite chez le cheval, d'entérite ulcérate chez l'éléphant d'Afrique et de diarrhée chez le chien (Herholz *et al.*, 1999; Klaasen *et al.*, 1999; Bacciarini *et al.*, 2001; Thied, 2001 et Walker *et al.*, 2004).

Le pouvoir pathogène de la toxine β_2 est identique à celui de la toxine β_1 . Des pores transmembranaires sont formés et leur mécanisme d'action reste encore indéterminé (Walker *et al.*, 2004). Les lésions observées sont une nécrose et des hémorragies de l'intestin grêle. D'autres organes sont affectés: le cœur, les vaisseaux, la vésicule biliaire et les muscles lisses (Gibert *et al.*, 1997 et Manteca *et al.*, 2002).

La toxine β_2 est souvent en association avec la toxine α (Klaasen et al., 1999; Walker et al., 2004 et Sawires et al., 2005). Ceci laisse présager une interaction entre la toxine β_2 et la toxine α ou la toxine ϵ (Manteca et al., 2002 et Greco et al., 2005).

La toxine β_2 est également inactivée par la trypsine, elle est clivée en fragments de 13 et de 15 kDa entraînant ainsi une perte totale de son activité cytotoxique (Gibert et al., 1997).

1.2.6.4. La toxine ϵ

La toxine ϵ est produite par *Clostridium perfringens* type B et D (Veron et al., 1989 et Walker et al., 2004). Elle est dermonécrosante, oedématisante et létale mais non hémolytique (Songer, 1996 et Bormann et al., 2001). Elle est souvent présente lors d'entérotoxémies des petits ruminants et plus rarement chez les bovins (Daube, 1992).

➤ Structure

Elle est produite sous forme de prototoxine thermostable et atoxique de 331 acides aminés avec une masse moléculaire de 32,7 kDa (Bormann et al., 2001 et Miyakawa et al., 2003). Elle est activée en une toxine thermolabile de 30 kDa suite à l'action d'enzymes protéolytiques (trypsine, chymotrypsine et zinc métalloprotéase) qui clivent un peptide de 13 acides aminés à l'extrémité N-terminale (Donelli et al., 2003 et Frey, 2003; Lefevre et al., 2003 et Miyakawa et al., 2003).

➤ Gène codant

La toxine ϵ est codée par un gène plasmidique *etx* transférable horizontalement d'une souche à une autre. Ce plasmide est différent de celui portant le gène *cpb* (Songer, 1996; Bentancor et al., 1999; Frey, 2003 et Walker et al., 2004).

➤ Activité biologique

Le pouvoir toxique de la prototoxine ϵ se multiplie par cent, voire par mille, suite à son clivage enzymatique (Joubert et al., 1967). Il s'agit d'une perméase qui agit en augmentant la perméabilité des cellules épithéliales et endothéliales (particulièrement au niveau du cerveau). Elle augmente la perméabilité de la muqueuse intestinale altérant sa fonction d'absorption sans toutefois provoquer de lésions à son niveau (à l'inverse des toxines β) (Veron et al., 1989; Miyakawa et al., 2003 et Lefevre et al., 2004).

Elle produit des dommages sur l'endothélium vasculaire, amenant à une perte de fluide et à l'apparition d'œdème notamment du poumon, cœur, reins (reins pulpeux) et cerveau (Lefevre et al., 2003 et Walker et al., 2004).

I.2.6.5. La toxine ι

La toxine ι est la principale toxine de *Clostridium perfringens* type E décrite dans les entérotoxémies des ruminants, notamment des veaux. Actuellement, l'incidence de cette toxine en pathologie animale est faible. Chez la souris, elle est reconnue pour son activité nécrosante et létale (Popoff, 1989 et Walker et *al.*, 2004).

➤ **Structure**

Cette toxine est sécrétée sous forme de protoxine. Une hydrolyse par les enzymes protéolytiques est nécessaire à son activation (Popoff, 1989 et walker et *al.*, 2004).

Il s'agit d'une toxine binaire, formée de deux chaînes polypeptidiques, *Ia* et *Ib*, indépendantes et non reliées par une liaison covalente. Le composant *Ib*, de 98 kDa, est le composant lourd permettant la reconnaissance d'une protéine membranaire par sa portion C-terminale. Le composant *Ia*, de 45 kDa, est le composant léger et est porteur de l'activité enzymatique de la toxine par sa portion N-terminale (Popoff, 1996; Songer, 1996 et Boquet et *al.*, 1998 et Lefevre et *al.*, 2003).

Chaque composant est inactif séparément. En effet, l'association des deux composants est indispensable pour permettre la modification des onze derniers acides aminés du côté N-terminal et ainsi obtenir l'activité biologique de la toxine (Popoff, 1996; Songer, 1996 et Lefevre et *al.*, 2003). Ces sous unités expliquent la sensibilité variable de la toxine ι selon les espèces (Daube et *al.*, 1996; Songer, 1996 et Meer et *al.*, 1997).

➤ **Gène codant**

La toxine ι est codée par deux gènes *iap* et *ibp* qui sont organisés en un opéron sur le plasmide bactérien (Gibert et *al.*, 1993 et Frey, 2003).

➤ **Activité biologique**

Son activité enzymatique est celle d'une ADP-ribosyltransférase conférée par sa partie *Ia* et résulte de la fixation d'une molécule de NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) ou de NADH (Nicotinamide adénine dinucléotide) qui permet la réaction d'ADP-ribosylation des monomères d'actine aboutissant à la dépolymérisation des filaments d'actine (Daube, 1992; Sakurai et *al.*, 2003 et Walker et *al.*, 2004).

La partie *Ib* reconnaît les récepteurs cellulaires et permet l'entrée de la partie *Ia* dans le cytoplasme suite à la formation de pores transmembranaires amenant à la destruction des membranes cellulaires et à l'arrêt irréversible de la physiologie cellulaire par interaction avec les systèmes régulateurs AMPc (Adénosine

Monophosphate Cyclique) (Petit et *al.*, 1999; Frey, 2003; Lefevre et *al.*, 2003 et Walker et *al.*, 2004).

La dépolarisation du cytosquelette d'actine entraîne une désorganisation des jonctions serrées des cellules aboutissant à une augmentation de la perméabilité des entérocytes. Cette modification de la perméabilité est à l'origine d'œdèmes et de suffusions (Petit et *al.*, 1999; Frey, 2003; Lefevre et *al.*, 2003 et Walker et *al.*, 2004).

I.2.6.6. L'entérotoxine (CPE)

L'entérotoxine est produite lors du processus de sporulation de *C.perfringens* (Daube, 1992 et Walker et *al.*, 2004). Il s'agit d'un composant structural de la tunique sporale incorporé à la thèque sporale (Smith et *al.*, 1980). Seulement 6 % des souches de *C.perfringens* produisent l'entérotoxine (Songer, 1996).

Elle fut traditionnellement associée au type A. Puis la toxine et son gène *cpe* ont été retrouvées dans d'autres toxinotypes comme le toxinotype C (Songer, 1996).

➤ **Structure**

C'est un polypeptide constitué d'une chaîne de masse moléculaire de 35 kDa, thermolabile et libéré dans l'organisme lors de la lyse de la cellule végétative dans l'intestin des animaux atteints. L'activation de la toxine nécessite l'action d'enzymes protéolytiques (Daube, 1992; Popoff, 1996; Songer, 1996 et Walker et *al.*, 2004).

➤ **Gène codant**

Le gène *cpe*, codant pour l'entérotoxine, est localisé sur un locus du chromosome pour les souches de *C.perfringens* responsables de toxi-infections alimentaires humaines et sur des plasmides pour les souches non responsables de gastro-entérites (Songer, 1996 et Novaka et *al.*, 2003).

➤ **Activité biologique**

L'entérotoxine est un facteur entéropathogène qui induit une accumulation de liquides dans l'intestin de la plupart des espèces (Daube, 1992). Son mécanisme d'action moléculaire fait intervenir la reconnaissance d'un récepteur sur la bordure en brosse de la membrane des entérocytes (Popoff, 1996).

Le domaine N-terminal est le site cytotoxique tandis que le domaine C-terminal est le site récepteur sur les membranes cellulaires. L'entérotoxine s'insère dans la membrane cytoplasmique et s'associe à une protéine pour former des complexes de grande taille. Son action entraîne la formation de pores conduisant à une altération de la perméabilité des membranes, une inhibition de la synthèse des

macromolécules, une désintégration du cytosquelette et une lyse de la cellule (Popoff, 1996; Songer, 1996 et Walker et *al.*, 2004).

Elle joue un rôle pathogène certain dans les entérites animales, sans qu'on puisse affirmer qu'elle en soit le facteur primaire (Niilo, 1980). Son rôle est toutefois déterminant pour induire la maladie expérimentale chez divers animaux dont les veaux. Elle est létale et non nécrosante pour la souris (Niilo, 1980 et Daube, 1996).

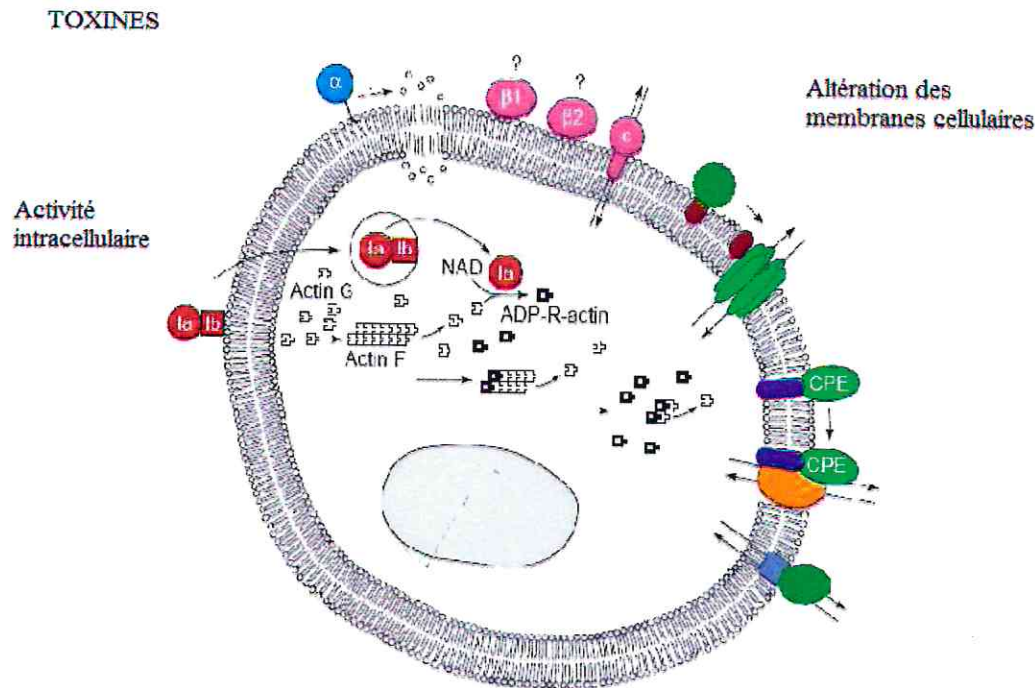


Figure 01: Activités biologiques des toxines de *Clostridium perfringens* (Petit et *al.*, 1999).

Tableau II: Production des différentes toxines létales majeures par les toxinotypes de *Clostridium perfringens* (Popoff, 1989 et Daube, 1992).

| Toxinotypes | Toxines | | | |
|-------------|----------|---------|------------|---------|
| | α | β | ϵ | ι |
| A | ++ | - | - | - |
| B | + | ++ | + | - |
| C | + | ++ | - | - |
| D | + | - | ++ | - |
| E | + | - | - | ++ |

++: Principale toxine produite.

+ : Toxine secondaire produite en général en moindre quantité.

- : Toxine non produite.

- **Opéron** : groupement de gènes et de séquences régulatrices du génome des procaryotes chez qui cette organisation est principalement rencontrée. Les gènes concourent à la réalisation d'une même fonction physiologique et sont transcrits ensemble.
- **Plasmide** : molécule d'ADN extrachromosomique, capable de réplication autonome. Les plasmides sont généralement circulaires. Ils se trouvent quasi-exclusivement dans les bactéries.
- **Polymérisation** : Formation de polymères à partir de monomères. Une ADN polymérase synthétise l'ADN à partir de déoxynucléosides triphosphates (dNTP) en utilisant un brin complémentaire d'ADN et une amorce.
- **Sporange** : structure qui produit et qui contient des spores.
- **Toxi-infection** : infection qui s'accompagne d'une intoxication produite par les toxines des germes pathogènes.
- **Typhlocolite** : inflammation du coecum qui s'est progressivement installée dans la partie ascendante du colon.
- **Volvulus** : retournement d'un tube (tube digestif en médecine) sur lui-même en faisant une boucle qui s'étrangle à la base.

LISTE DES TABLEAUX

| Tableaux | Titre | Pages |
|--------------------|---|--------------|
| Tableau I | Caractéristiques des différentes toxines élaborées par <i>Clostridium perfringens</i> . | 6 |
| Tableau II | Production des différentes toxines létales majeures par les toxinotypes de <i>Clostridium perfringens</i> . | 13 |
| Tableau III | Lésions caractéristiques observées à l'autopsie sur les ruminants morts d'entérotoxémie. | 19 |
| Tableau IV | Méthodes de recherche des toxines de <i>Clostridium perfringens</i> . | 23 |
| Tableau V | Tableau récapitulatif des 31 souches étudiées. | Annexe 2 |

LISTE DES FIGURES

| Figures | Titre | Pages |
|------------------|--|--------------|
| Figure 1 | Activités biologiques des toxines de <i>Clostridium perfringens</i> . | 13 |
| Figure 2 | Principe de la méthode PCR. | 25 |
| Figure 3 | Repiquage des souches et mise en anaérobiose. | 29 |
| Figure 4 | Ensemencement de la galerie API 20 A et mise en anaérobiose. | 31 |
| Figure 5 | Préparation du gel d'agarose. | 33 |
| Figure 6 | Dépôt des amplifiats sur le gel d'électrophorèse. | 34 |
| Figure 7 | Dispositif de la migration sur gel d'électrophorèse. | 34 |
| Figure 8 | Forme des colonies après 24 heures d'incubation sur gélose Columbia® plus 5 % de sang de cheval. | 36 |
| Figure 9 | Résultat d'identification (Galerie API 20 A, Profil : 46125023, Souche : 276). | 37 |
| Figure 10 | Profil de migration de l'ADN à l'électrophorèse (Gel I, TA : Témoin A, S : Souche). | 38 |
| Figure 11 | Profil de migration de l'ADN à l'électrophorèse (Gel II, MT : Marqueur de taille, S : Souche). | 38 |
| Figure 12 | Profil de migration de l'ADN à l'électrophorèse (Gel III, TA : Témoin A, TD : Témoin D, S : Souche). | 38 |

LISTE DES ABREVIATIONS

- **Ac** : anticorps.
- **ADN** : Acide Désoxyribonucléique.
- **Ag** : antigène.
- **AMPc** : Adénosine monophosphate cyclique.
- **Ca⁺⁺** : ion calcium.
- **Cl⁻** : ion chlorure.
- **CO₂** : dioxyde de carbone.
- **g** : gramme.
- **GEL** : gélose.
- **H₂** : dihydrogène.
- **IND** : indole.
- **K⁺** : ion potassium.
- **kDa** : kilo Dalton.
- **MgCl₂** : chlorure de magnésium.
- **μl** : microlitre.
- **μmole/l** : micromole/litre.
- **mA** : milliampère.
- **ml** : millilitre.
- **mM** : millimolaire.
- **Na⁺** : ion sodium.
- **NADH** : Nicotinamide adénine dinucléotide.
- **NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.
- **ng** : nanogramme.
- **O₂** : dioxygène.
- **PCR** : Polymerase Chain Reaction
- **pH** : potentiel hydrogène.
- **TGY** : Trypcase glucose yeast.
- **Tris** : trihydroxyméthylaminométhane.
- **UFC** : Unité formant colonie.
- **U/μl** : unité/microlitre.
- **UV** : ultraviolet.
- **V** : Volt.

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCTION..... | 1 |
| CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES | |
| I. ENTEROTOXEMIES | 2 |
| I.1. Définition | 2 |
| I.2. Etiopathogenie | 2 |
| I.2.1. Historique | 2 |
| I.2.2. Habitat | 2 |
| I.2.3. Morphologie | 3 |
| I.2.4. Formes de résistance: les spores | 3 |
| I.2.6. Les toxines élaborées par <i>Clostridium perfringens</i> | 4 |
| I.2.5. Caractères cultureux et biochimiques | 4 |
| I.3. Causes favorisantes et pathogénie | 14 |
| I.3.1. Facteurs extrinsèques | 14 |
| I.3.2. Facteurs intrinsèques | 15 |
| I.3.3. Pathogénie | 15 |
| I.4. Matières virulentes, modes de contagion et voies de pénétration | 16 |
| I.5. Symptômes | 17 |
| I.5.1. Forme clinique suraiguë | 17 |
| I.5.2. Forme clinique aiguë | 17 |
| I.6. Lésions | 18 |
| I.7. Diagnostic | 20 |
| I.7.1. Diagnostic épidémio-clinique | 20 |
| I.7.2. Diagnostic différentiel | 20 |
| I.7.3. Diagnostic bactériologique | 20 |
| I.8. Traitement | 25 |
| I.8.1. Traitement symptomatique | 25 |
| I.8.2. Traitement spécifique | 26 |
| I.9. Prophylaxie | 26 |
| I.9.1. Prophylaxie sanitaire | 26 |
| I.9.2. Prophylaxie médicale | 27 |

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

| | |
|--|----|
| II.1. Matériel | 29 |
| II.1.1. Echantillonnage | 29 |
| II.1.2. Appareillage et réactifs | 29 |
| II.2. Méthodes | 29 |
| II.2.1. Repiquage des souches | 29 |
| II.2.2. Etude biochimique (Galerie API 20 A) | 30 |
| II.2.3. Extraction de l'ADN | 31 |
| II.2.4. Réaction d'amplification | 31 |

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

| | |
|--|----|
| III.1. Résultats | 36 |
| III.1.1. Identification des souches re-isolées | 36 |
| III.1.2. Identification biochimique | 36 |
| III.1.3. Recherche des séquences de gènes codant pour les toxines α , $\beta 1$, $\beta 2$, ϵ et ι | 37 |
| III.2. Discussion | 39 |

| | |
|---|----|
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 41 |
|---|----|

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

ANNEXES.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Observées dans le monde entier, les entérotoxémies sont des affections très fréquentes en particulier chez l'espèce ovine. En Algérie, elles peuvent engendrer d'importantes pertes économiques en l'absence de mesures prophylactiques rigoureuses (Kadra et al., 1994). En effet, il s'agit de toxi-infections aiguës, d'allure enzootique, se manifestant par une mort subite. Elles sont dues à la résorption par voie sanguine de toxines produites suite à la pullulation intense dans l'intestin de bactéries commensales du genre *Clostridium*. *Clostridium perfringens* en est l'agent principal (Popoff, 1989 ; Kadra et al., 1994 ; Manteca et al., 2001 et Philippeau, 2003).

Sur le terrain, cette maladie reste encore mal contrôlée. Le diagnostic est difficile; les moyens de prévention et le traitement ne sont pas d'une grande efficacité. En effet, le diagnostic des entérotoxémies est un diagnostic de suspicion basé sur les circonstances d'apparition et les lésions observées à l'autopsie. La confirmation diagnostique de laboratoire repose soit sur des techniques bactériologiques classiques, soit sur des méthodes plus complexes recourant à la mise en évidence des toxines des germes responsables de la maladie ou plus récemment des gènes exprimant ces toxines (Latour, 2004 et Pourcher, 2007).

La détermination de l'espèce bactérienne et la connaissance du type toxinique impliquées dans les entérotoxémies sont primordiales pour un diagnostic de certitude et une prophylaxie efficace (Kadra et al., 1994).

Dans ce contexte, le travail que nous avons entrepris vise à améliorer le diagnostic des entérotoxémies à *Clostridium perfringens* de manière à pouvoir identifier d'une part l'espèce incriminée, et d'autre part les gènes exprimant les toxines létales majeures (α , β_1 , β_2 , ϵ , ι), et partant le type toxinique (A-E) par méthode de polymérisation en chaîne.

CHAPITRE I :
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I. ENTEROTOXEMIES

I.1. Définition

Les entérotoxémies sont des toxi-infections aiguës, voire suraiguës, "à point de départ intestinal", communes à de nombreuses espèces animales, particulièrement les ovins. Cette affection, d'allure enzootique, résulte de la résorption par voie sanguine d'exotoxines protéiques létales produites dans l'intestin lors de la multiplication de bactéries commensales du genre *Clostridium*. *Clostridium perfringens* étant l'agent bactérien déterminant de la maladie (Popoff, 1989; Kadra et al., 1999 et Manteca et al., 2001).

I.2. Etiopathogenie

Clostridium perfringens est classiquement considéré comme l'agent étiologique principal dans 83 % des cas d'entérotoxémies (Popoff, 1989; Al-Mashat et al., 1983; Bronzid, 2002 et Picard et al., 2005), même si d'autres clostridies (*C.sordellii*, *C.septicum*) sont citées (Popoff, 1989 et Manteca et al., 2001).

I.2.1. Historique

Clostridium perfringens a été cultivé et isolé pour la première fois par Achalme en 1891 chez un patient souffrant de rhumatisme (Bland et al., 2000 et Manteca et al., 2000). Welch et Nuttal (1892) puis Frankel (1893) l'étudièrent de nouveau. Ils décrivent ses principaux caractères et son pouvoir pathogène chez l'Homme comme un agent de gangrène gazeuse. Ils lui donnent le nom de *Bacillus aerogenes capsulatus* (Manteca et al., 2000).

En France, Veillon et Zuber (1898) l'isolèrent d'appendicites aiguës (Veron et al., 1989 ; et Bland et al., 2000). Son importance comme agent de gangrènes gazeuses apparut au cours de la première guerre mondiale (Bland et al., 2000).

Dalling individualisa mieux l'espèce en 1926 et classa *Clostridium perfringens* selon différents groupes toxiques. La classification de Wildson fut établie en 1933 (Manteca et al., 2000).

Mac Farlane et Knight (1941), caractérisent la toxine α . Bosworth (1943), Oakley (1949) caractérisent les autres principales toxines. Hobbs (1953) met en évidence le pouvoir entérotoxique chez l'Homme de certaines souches (Manteca et al., 2000).

I.2.2. Habitat

Clostridium perfringens est une bactérie ubiquitaire. Elle est répandue dans le milieu ambiant, isolée aisément dans l'air, l'eau douce, l'eau de mer, les poussières,

les sols, les litières, les boues. Dans la plupart des cas, il s'agit du type A (Stamatin et al., 1967; Popoff, 1989; Haagsma, 1991; Bland et al., 2000 et Lefevre, 2003).

Les autres types ont un habitat intestinal (ovins, bovins) et peuvent être isolés des sols de fermes ou sévissent des entérotoxémies à *C.perfringens* (Sterne et al., 1975). Bactérie commensale du tube digestif de l'Homme et des animaux, on peut la retrouver au niveau de la peau (Stamatin et al., 1967; Niilo, 1980; Haagsma, 1991 et Manteca et al., 2003) et occasionnellement dans le rumen (Poppof, 1989).

Le dénombrement de la flore du tube digestif d'un animal sain indique la présence de cette bactérie à des concentrations inférieures à 10^3 clostridies par ml (millilitre) de contenu intestinal. Cette concentration est similaire pour l'intestin grêle, le caecum et le colon (Stark, 1992).

I.2.3. Morphologie

Clostridium perfringens est un bacille à Gram positif, épais et large, de 4 μm de long et de 1 à 1,5 μm de large. Il se présente comme un bâtonnet droit à bords parallèles et aux extrémités carrées. Ces bacilles sont généralement isolés, parfois groupés en paires (Daube, 1992; Manteca, 2000 et Walker et al., 2004).

Il est immobile, non flagellé et acilié. Toutes les souches possèdent une capsule d'épaisseur variable (en fonction des souches), qui peut être discernée par coloration à l'encre de Chine de manière aisée sur un prélèvement (Veron et al., 1989).

I.2.4. Formes de résistance: les spores

Clostridium perfringens est capable de sporuler. Cette capacité lui permet de résister dans le milieu extérieur et de se propager directement ou par l'intermédiaire d'aliments souillés lorsque les conditions (modification de pH et de température) ne sont plus favorables à sa survie (English, 1966; Daube, 1992; Veron et al., 1989 et Walker et al., 2004). Les spores sont ovales, thermo-résistantes et peuvent être libres ou emballées dans leur sporange (Duncan et al., 1972 et 1973).

La formation de spores mûres thermo-résistantes sur des milieux usuels de croissance est généralement bloquée au stade II (formation de septum). Le déterminisme de la production de l'entérotoxine est codé par le même gène que celui de la sporulation. Ainsi, l'augmentation du taux d'entérotoxine est proportionnelle aux nombres de spores formées (Veron et al., 1989 et Duncan et al., 1972).

Clostridium perfringens sporule plus facilement dans l'intestin (Duncan et al., 1972). De plus, l'exposition à l'acidité gastrique pourrait améliorer la capacité de sporulation des souches (Wrigly et al., 1995).

I.2.5. Caractères culturels et biochimiques

Clostridium perfringens est une bactérie anaérobie stricte, aérotole'rance (sa croissance est possible en surface avec 5 % d'oxygène en présence d'un catalyseur activé par l'hydrogène). En surface d'un milieu solide au sang (généralement gélose Columbia® additionnée au sang de cheval), les colonies sont souvent rondes de 3 mm (24 heures d'incubation) à 5 mm (48 heures d'incubation) de diamètre, lisses, à bords réguliers, blanches à légèrement jaunâtres avec un centre grisâtre; elles sont entourées d'une double zone d'hémolyse (un halo clair de lyse complète et de diamètre assez faible correspondant à l'hémolyse θ , et un halo, de plus grand diamètre, trouble, de lyse incomplète correspondant à l'hémolysine α (phospholipase C). Elles sont parfois entièrement ou en partie lisses et transparentes, ou lisses à bords rhizoïdes. Les colonies sont plus rarement rough (le type C) (Bailleul, 1982 et Veron et *al.*, 1989).

En gélose profonde, *C. perfringens* forme, en profondeur, des colonies lenticulaires et du gaz. Ces colonies disloquent la colonne de gélose, d'où la dénomination de *perfringens* (du latin: qui brise) (Veron et *al.*, 1989).

Sur bouillon viande-foie, un trouble du milieu est observable ainsi qu'un dégagement de gaz à odeur âcre (Veron et *al.*, 1989).

Sa température habituelle de croissance est comprise entre 34 et 37 °C, avec un optimum à 46°C. Cette température est utilisée lors de l'incubation pour enrichir les cultures. Son développement est possible pour un pH compris entre 5 et 9 (Veron et *al.*, 1989 et Walker et *al.*, 2004).

Il s'agit d'une bactérie produisant des gaz tels que le dioxyde de carbone et le dihydrogène (effet réducteur) et des acides (acides acétique et butyrique) lors des fermentations de nombreux glucides, en particulier le glucose (Veron et *al.*, 1989 et Walker et *al.*, 2004).

Elle est déficiente en catalase et en peroxydase (Daube, 1992; Manteca et *al.*, 2000 et Walker et *al.*, 2004). Elle est également saccharolytique et protéolytique (détruit les carbohydrates et les protéines en différents composants dont quelques uns sont toxiques) (English, 1966; Veron et *al.*, 1989 et Walker et *al.*, 2004).

I.2.6. Les toxines élaborées par *Clostridium perfringens*

C.perfringens est l'espèce bactérienne produisant le plus grand nombre de toxines à activité létale. Ces toxines, de nature protéique, sont excrétées hors de la bactérie et ont une activité spécifique très élevée (Popoff, 1989). Selon la littérature, 17 toxines ont été caractérisées et d'autres toxines sont encore à l'étude (Songer, 1996; Petit et *al.*, 1999 et Manteca, 2002).

En fonction de leur létalité, ces toxines sont classées en toxines majeures et en toxines mineures (Walker et *al.*, 2004).

Les toxines majeures (α , $\beta 1$, $\beta 2$, ϵ et ι) sont à l'origine du typage des souches de *C.perfringens* (production variable de toxines entre souches du même toxinotype) (Daube, 1992). Ces dernières sont réparties en cinq types toxiques: type A, B, C, D et E (Lefevre, 2003 et Walker et *al.*, 2004).

Actuellement, on s'oriente vers une classification génotypique qui prend en considération toutes les toxines produites par la souche lors de la maladie observée (toxines majeures). L'activité biologique des toxines protéiques élaborées est à l'origine de lésions découvertes à l'autopsie mais il n'existe pas de tableaux lésionnels spécifiques en fonction de la production de toxines et du type de *C.perfringens* identifié (Daube, 1992).

Les toxines mineures ou facteurs létaux mineurs sont, en général, des enzymes hydrolytiques (protéases, hémolysines etc.) qui jouent un rôle secondaire dans la pathologie et potentialisent parfois l'action des toxines majeures (Popoff, 1989). Elles sont désignées par des lettres grecques: eta, kappa, theta, gamma, lambda, nu, delta et mu (η , κ , θ , γ , λ , ν , δ , μ) (Veron et *al.*, 1989; Walker et *al.*, 2004 et Greco et *al.*, 2005). Toutes ces toxines sont codées par des gènes chromosomiques ou extrachromosomiques et ont des activités biologiques et des modes d'action variés (Tableau I).

Tableau I: Caractéristiques des différentes toxines élaborées par *Clostridium perfringens* (Petit et al., 1999).

| Toxine/Enzyme | Gène | Localisation génétique | Mode d'action | Activité biologique |
|---|---------------------------|--|--|---|
| α | <i>plc</i> | Chromosome | Phospholipase C/ Sphingomyelinase | cytolytique, hémolytique, dermonécrosante, létale |
| $\beta 1$ | <i>cpb1</i> | Plasmide | Formation de pore, altération des membranes cellulaires | Cytolytique, dermonécrosante, létale. Nécrose hémorragique de la muqueuse intestinale |
| $\beta 2$ | <i>Cpb2</i> | Plasmide | Formation de pore, altération des membranes cellulaires | Cytolytique, létale. Nécrose hémorragique de la muqueuse intestinale |
| ϵ | <i>etx</i> | Plasmide | Formation de pore, altération de la perméabilité des membranes cellulaires | Œdème dans divers organes: foie, reins et SNC. Dermonécrosante, létale |
| ι (Ia) | <i>iap</i> | Plasmide | ADP-ribosylation de l'actine | Désorganisation du cytosquelette et de l'intégrité des barrières cellulaires. Dermonécrosante, létale |
| ι (Ib) | <i>ibp</i> | Plasmide | Composant de fixation | |
| Entérotoxine (CPE) | <i>cpe</i> | Chromosome/ plasmide | Formation de pores, lyse des jonctions serrées (Bruce et al., 2000 et 2001) | Cytotoxique, entérotoxique, érythémateuse, létale |
| δ | ? | ? | Hémolysine, spécifique au GM2 | Facteur de virulence accessoire |
| θ ou PfoA | <i>pfoA</i> | Chromosome | Hémolysine, spécifique au cholestérol, Oxygène sensible | Facteur de virulence accessoire |
| κ | <i>colA</i> | Chromosome | Collagénase, gelatinase | Facteur de virulence accessoire |
| λ | <i>Iam</i> | Plasmide | Protéase | Facteur de virulence accessoire |
| μ | <i>nagH</i> | Chromosome | Hyaluronidase | Facteur de virulence accessoire |
| ν | ? | ? | DNase | Facteur de virulence accessoire |
| Neuraminases (sialidases) | <i>nanH</i> , <i>I</i> | Chromosome | Neuraminidase | Facteur de virulence accessoire |
| Uréase | <i>UreA</i> - <i>C</i> | Plasmide | Uréase | Facteur de virulence accessoire |
| Autres enzymes élaborées par <i>Clostridium perfringens</i> (Veron et al., 1999) | | | | |
| Phosphatase acide | | | | |
| Sphingomyelinase | | | | |
| Thyroid stimulating factor | | | | |
| Fucosidase, oligosaccharase, désacétylase | | Enzymes détruisant la spécificité des groupes sanguins | | |
| Hémagglutinine | | | | |

I.2.6.1. La toxine α

La toxine α est une lécithinase ou phospholipase de type C hydrolysant la phosphatidylcholine (la lécithine) et de façon moindre la sphingomyeline (Nagahama et al., 1996 a et b; Smith, 1996; Billington et al., 1998; Titball et al., 1999; Lefevre et al., 2003 et Walker et al., 2004).

Cette toxine est produite par toutes les souches de *C.perfringens*, sauf cas exceptionnel de souches α négatives ou de mutants α négatifs (Songer, 1996). Elle est synthétisée en phase exponentielle de croissance (Smith, 1996; Songer, 1996 et Titball et al., 1999).

Il s'agit de la toxine majeure produite par *C.perfringens* type A, en particulier par les souches responsables de gangrènes gazeuses (souches dites classiques) alors que les souches à l'origine de toxi-infections alimentaires en produisent en quantité moindre (Veron et al., 1989b).

➤ **Structure**

La toxine α est une protéine de 43 kDa (kilo Dalton) de masse moléculaire. Sa fabrication est établie à partir d'un peptide signal. Elle se compose de 370 acides aminés et possède deux domaines; un domaine N terminal en hélice α , qui correspond au site enzymatique de la toxine, et un domaine C terminal en feuillets β qui est le site de fixation de la toxine à la membrane. Ces deux domaines sont réunis par une région flexible (Titball et al., 1999; Eaton et al., 2002; Shimizu et al., 2002 a et b et Popoff, 2003).

Il s'agit d'une métalloenzyme constituée d'ions Zn^{2+} indispensables à son activité enzymatique et d'ions Ca^{2+} indispensables à la fixation de l'enzyme sur les phospholipides (Titball et al., 1999).

➤ **Gène codant**

Le gène *plc* (encore appelé *cpa*) est à l'origine de cette toxine. Il est situé sur le chromosome près de l'origine de réplication (Daube et al., 1996; Songer, 1996; Rood, 1998 et Popoff, 2003). Il possède une séquence constante dans toutes les souches testées dans les différents toxinotypes; ainsi le gène *plc* peut être utilisé comme marqueur génétique de l'espèce *Clostridium* (Daube et al., 1994; Rood, 1998; Petit et al., 1999 et Popoff, 2003).

➤ **Activité biologique**

La toxine α possède une activité cytolytique, dermonécrosante et hémolytante. Elle lyse les membranes des cellules cibles (cellules riches en lécithine) comme les leucocytes, les entérocytes, modifie la perméabilité des endothéliums et provoque un

dysfonctionnement des muscles et l'agrégation des plaquettes (Veron et *al.*, 1989; Smith, 1996; Petit et *al.*, 1999; Lefevre et *al.*, 2003).

I.2.6.2. La toxine $\beta 1$

Anciennement appelée toxine β , la toxine $\beta 1$ a été renommée depuis la découverte récente de la toxine $\beta 2$ (Petit et *al.*, 1999).

La toxine $\beta 1$ est une toxine nécrosante, létale, thermolabile. Elle possède une structure phospholipidique sensible à l'action de la chaleur et à la trypsine; son activité décroît rapidement après son élaboration car elle est hydrolysée. Elle reste stable à pH basique. Elle est sécrétée en phase exponentielle de croissance (Gkiourtzidis et *al.*, 2001 et Lefevre et *al.*, 2003).

➤ **Structure**

C'est une protéine de 38 kDa de poids moléculaire. Elle est constituée de 336 acides aminés. Elle a des homologies avec la toxine α de *Staphylococcus aureus*, la toxine γ et la leucocidine (Songer, 1996 et Gibert et *al.*, 1997).

➤ **Gène codant**

La toxine $\beta 1$ est codée par un gène plasmidique *cpb1* qui n'est présent que chez les souches de type B et C. Elle est particulièrement instable lors de la culture des bactéries (Songer, 1996; Gibert et *al.*, 1997 et Walker et *al.*, 2004). Les raisons de cette instabilité ne sont pas encore élucidées (Buogo et *al.*, 1995 et Frey, 2003).

➤ **Activité biologique**

La toxine $\beta 1$ élabore des pores transmembranaires, provoquant des dommages sur les cellules cibles (entérocytes et cellules de l'endothélium). Elle atteint préférentiellement l'intestin, le cœur, les vaisseaux sanguins et les ganglions lymphatiques (Walker et *al.*, 2004).

Elle affecte les tissus nerveux en modifiant les transports ioniques à travers la membrane des cellules et provoque une fuite de K^+ (potassium) avec passage intracellulaire de Cl^- (chlore), Na^+ (sodium) et de Ca^{++} (calcium) modifiant la polarisation membranaire et provoquant de sévères dépressions (Walker et *al.*, 2004).

Il s'agit d'une toxine dermonécrosante et létale: elle provoque une nécrose hémorragique de la muqueuse intestinale (Frey, 2003). En effet, une quantité de 2 ng (nanogrammes) de la toxine est suffisante pour provoquer des lésions de dermonécrose chez le cobaye et la dose létale à 50 % sur des souris est d'environ 500 ng/kg (Songer, 1996).

Elle est l'agent toxique de la dysenterie des agneaux et est probablement responsable des ulcérations hémorragiques de la muqueuse dans des entérites dues aux types B et C chez les moutons, les bovins et les porcelets (Veron *et al.*, 1989).

L'atteinte préférentielle par ce type toxinique (B) s'explique par la diminution des sécrétions pancréatiques durant une courte période post natale ou par l'ingestion d'inhibiteurs des protéases (trypsine) contenu dans le colostrum entraînant une diminution de l'activité des enzymes protéolytiques (Daube, 1992 et Songer, 1996).

I.2.6.3. La toxine $\beta 2$

La toxine $\beta 2$ a été récemment isolée à partir d'une souche responsable d'entérite nécrotique mortelle chez des porcelets. Cette souche était du type C, mais la toxine a été retrouvée par la suite chez des souches de type A. Son type toxinique ainsi que son rôle pathogène ne sont pas encore clairement élucidés (Gibert *et al.*, 1997; Petit *et al.*, 1999; Frey, 2003; Walker *et al.*, 2004 et Greco *et al.*, 2005).

➤ Structure

La toxine $\beta 2$ est une protéine de 27,4 kDa avec un peptide signal de 30 acides aminés en position N-terminal. Elle possède 15 % de séquence identique et un faible niveau de similitude immunologique avec la toxine $\beta 1$ (Gibert *et al.*, 1997 et Petit *et al.*, 1999).

➤ Gène codant

Le gène *cpb2*, à l'origine de l'élaboration de la toxine $\beta 2$, réside sur un plasmide instable notamment lors de l'exposition de *C.perfringens* à l'oxygène ambiant. Ainsi, 90 % des souches perdent ce gène au bout d'une heure en aérobiose. Cette particularité explique sa découverte tardive et la difficulté de sa mise en évidence (Songer, 1996; Gibert *et al.*, 1997; Frey, 2003 et Walker *et al.*, 2004).

➤ Activité biologique

Les souches de *Clostridium perfringens* produisant la toxine $\beta 2$ semblent être responsables de cas d'entérite nécrotique chez les porcelets, de typhlocolite chez le cheval, d'entérite ulcérate chez l'éléphant d'Afrique et de diarrhée chez le chien (Herholz *et al.*, 1999; Klaasen *et al.*, 1999; Bacciarini *et al.*, 2001; Thied, 2001 et Walker *et al.*, 2004).

Le pouvoir pathogène de la toxine $\beta 2$ est identique à celui de la toxine $\beta 1$. Des pores transmembranaires sont formés et leur mécanisme d'action reste encore indéterminé (Walker *et al.*, 2004). Les lésions observées sont une nécrose et des hémorragies de l'intestin grêle. D'autres organes sont affectés: le cœur, les vaisseaux, la vésicule biliaire et les muscles lisses (Gibert *et al.*, 1997 et Manteca *et al.*, 2002).

La toxine β_2 est souvent en association avec la toxine α (Klaasen et al., 1999; Walker et al., 2004 et Sawires et al., 2005). Ceci laisse présager une interaction entre la toxine β_2 et la toxine α ou la toxine ε (Manteca et al., 2002 et Greco et al., 2005).

La toxine β_2 est également inactivée par la trypsine, elle est clivée en fragments de 13 et de 15 kDa entraînant ainsi une perte totale de son activité cytotoxique (Gibert et al., 1997).

I.2.6.4. La toxine ε

La toxine ε est produite par *Clostridium perfringens* type B et D (Veron et al., 1989 et Walker et al., 2004). Elle est dermonécrosante, oedématisante et létale mais non hémolytique (Songer, 1996 et Bormann et al., 2001). Elle est souvent présente lors d'entérotoxémies des petits ruminants et plus rarement chez les bovins (Daube, 1992).

➤ **Structure**

Elle est produite sous forme de prototoxine thermostable et atoxique de 331 acides aminés avec une masse moléculaire de 32,7 kDa (Bormann et al., 2001 et Miyakawa et al., 2003). Elle est activée en une toxine thermolabile de 30 kDa suite à l'action d'enzymes protéolytiques (trypsine, chymotrypsine et zinc métalloprotéase) qui clivent un peptide de 13 acides aminés à l'extrémité N-terminale (Donelli et al., 2003 et Frey, 2003; Lefevre et al., 2003 et Miyakawa et al., 2003).

➤ **Gène codant**

La toxine ε est codée par un gène plasmidique *etx* transférable horizontalement d'une souche à une autre. Ce plasmide est différent de celui portant le gène *cpb* (Songer, 1996; Bentancor et al., 1999; Frey, 2003 et Walker et al., 2004).

➤ **Activité biologique**

Le pouvoir toxique de la prototoxine ε se multiplie par cent, voire par mille, suite à son clivage enzymatique (Joubert et al., 1967). Il s'agit d'une perméase qui agit en augmentant la perméabilité des cellules épithéliales et endothéliales (particulièrement au niveau du cerveau). Elle augmente la perméabilité de la muqueuse intestinale altérant sa fonction d'absorption sans toutefois provoquer de lésions à son niveau (à l'inverse des toxines β) (Veron et al., 1989; Miyakawa et al., 2003 et Lefevre et al., 2004).

Elle produit des dommages sur l'endothélium vasculaire, amenant à une perte de fluide et à l'apparition d'œdème notamment du poumon, cœur, reins (reins pulpeux) et cerveau (Lefevre et al., 2003 et Walker et al., 2004).

I.2.6.5. La toxine ι

La toxine ι est la principale toxine de *Clostridium perfringens* type E décrite dans les entérotoxémies des ruminants, notamment des veaux. Actuellement, l'incidence de cette toxine en pathologie animale est faible. Chez la souris, elle est reconnue pour son activité nécrosante et létale (Popoff, 1989 et Walker et al., 2004).

➤ Structure

Cette toxine est sécrétée sous forme de protoxine. Une hydrolyse par les enzymes protéolytiques est nécessaire à son activation (Popoff, 1989 et walker et al., 2004).

Il s'agit d'une toxine binaire, formée de deux chaînes polypeptidiques, *Ia* et *Ib*, indépendantes et non reliées par une liaison covalente. Le composant *Ib*, de 98 kDa, est le composant lourd permettant la reconnaissance d'une protéine membranaire par sa portion C-terminale. Le composant *Ia*, de 45 kDa, est le composant léger et est porteur de l'activité enzymatique de la toxine par sa portion N-terminale (Popoff, 1996; Songer, 1996 et Boquet et al., 1998 et Lefevre et al., 2003).

Chaque composant est inactif séparément. En effet, l'association des deux composants est indispensable pour permettre la modification des onze derniers acides aminés du côté N-terminal et ainsi obtenir l'activité biologique de la toxine (Popoff, 1996; Songer, 1996 et Lefevre et al., 2003). Ces sous unités expliquent la sensibilité variable de la toxine ι selon les espèces (Daube et al., 1996; Songer, 1996 et Meer et al., 1997).

➤ Gène codant

La toxine ι est codée par deux gènes *iap* et *ibp* qui sont organisés en un opéron sur le plasmide bactérien (Gibert et al., 1993 et Frey, 2003).

➤ Activité biologique

Son activité enzymatique est celle d'une ADP-ribosyltransférase conférée par sa partie *Ia* et résulte de la fixation d'une molécule de NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) ou de NADH (Nicotinamide adénine dinucléotide) qui permet la réaction d'ADP-ribosylation des monomères d'actine aboutissant à la dépolymérisation des filaments d'actine (Daube, 1992; Sakurai et al., 2003 et Walker et al., 2004).

La partie *Ib* reconnaît les récepteurs cellulaires et permet l'entrée de la partie *Ia* dans le cytoplasme suite à la formation de pores transmembranaires amenant à la destruction des membranes cellulaires et à l'arrêt irréversible de la physiologie cellulaire par interaction avec les systèmes régulateurs AMPc (Adénosine

Monophosphate Cyclique) (Petit et *al.*, 1999; Frey, 2003; Lefevre et *al.*, 2003 et Walker et *al.*, 2004).

La dépolarisation du cytosquelette d'actine entraîne une désorganisation des jonctions serrées des cellules aboutissant à une augmentation de la perméabilité des entérocytes. Cette modification de la perméabilité est à l'origine d'œdèmes et de suffusions (Petit et *al.*, 1999; Frey, 2003; Lefevre et *al.*, 2003 et Walker et *al.*, 2004).

I.2.6.6. L'entérotoxine (CPE)

L'entérotoxine est produite lors du processus de sporulation de *C.perfringens* (Daube, 1992 et Walker et *al.*, 2004). Il s'agit d'un composant structural de la tunique sporale incorporé à la thèque sporale (Smith et *al.*, 1980). Seulement 6 % des souches de *C.perfringens* produisent l'entérotoxine (Songer, 1996).

Elle fut traditionnellement associée au type A. Puis la toxine et son gène *cpe* ont été retrouvées dans d'autres toxinotypes comme le toxinotype C (Songer, 1996).

➤ **Structure**

C'est un polypeptide constitué d'une chaîne de masse moléculaire de 35 kDa, thermolabile et libéré dans l'organisme lors de la lyse de la cellule végétative dans l'intestin des animaux atteints. L'activation de la toxine nécessite l'action d'enzymes protéolytiques (Daube, 1992; Popoff, 1996; Songer, 1996 et Walker et *al.*, 2004).

➤ **Gène codant**

Le gène *cpe*, codant pour l'entérotoxine, est localisé sur un locus du chromosome pour les souches de *C.perfringens* responsables de toxi-infections alimentaires humaines et sur des plasmides pour les souches non responsables de gastro-entérites (Songer, 1996 et Novaka et *al.*, 2003).

➤ **Activité biologique**

L'entérotoxine est un facteur entéro-pathogène qui induit une accumulation de liquides dans l'intestin de la plupart des espèces (Daube, 1992). Son mécanisme d'action moléculaire fait intervenir la reconnaissance d'un récepteur sur la bordure en brosse de la membrane des entérocytes (Popoff, 1996).

Le domaine N-terminal est le site cytotoxique tandis que le domaine C-terminal est le site récepteur sur les membranes cellulaires. L'entérotoxine s'insère dans la membrane cytoplasmique et s'associe à une protéine pour former des complexes de grande taille. Son action entraîne la formation de pores conduisant à une altération de la perméabilité des membranes, une inhibition de la synthèse des

macromolécules, une désintégration du cytosquelette et une lyse de la cellule (Popoff, 1996; Songer, 1996 et Walker *et al.*, 2004).

Elle joue un rôle pathogène certain dans les entérites animales, sans qu'on puisse affirmer qu'elle en soit le facteur primaire (Niilo, 1980). Son rôle est toutefois déterminant pour induire la maladie expérimentale chez divers animaux dont les veaux. Elle est létale et non nécrosante pour la souris (Niilo, 1980 et Daube, 1996).

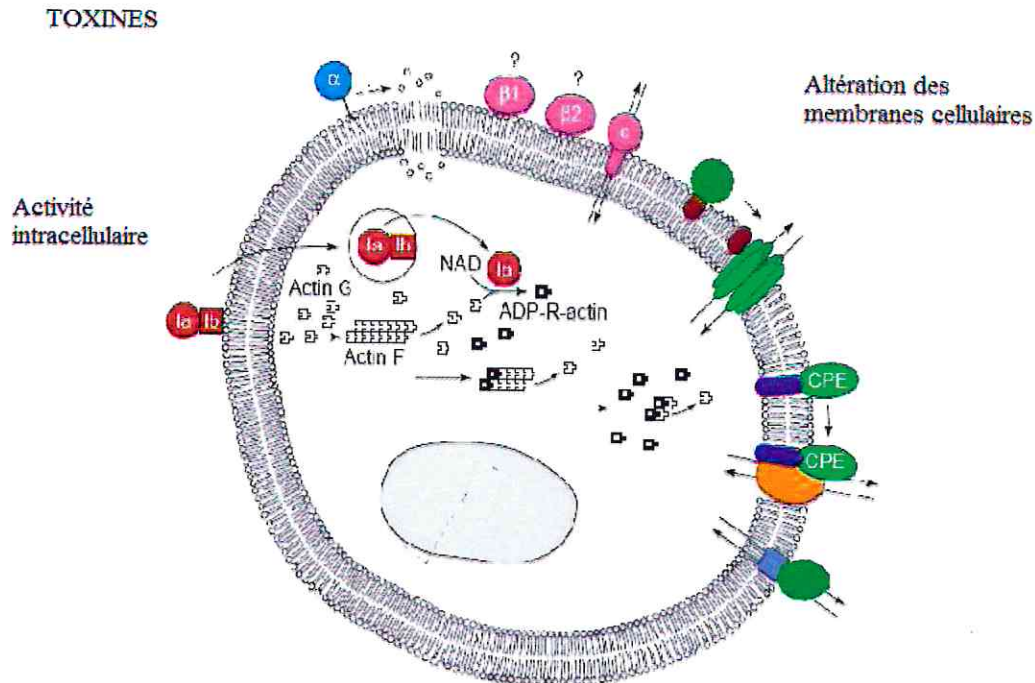


Figure 01: Activités biologiques des toxines de *Clostridium perfringens* (Petit *et al.*, 1999).

Tableau II: Production des différentes toxines létales majeures par les toxinotypes de *Clostridium perfringens* (Popoff, 1989 et Daube, 1992).

| Toxinotypes | Toxines | | | |
|-------------|---------|----|----|----|
| | α | β | ε | ι |
| A | ++ | - | - | - |
| B | + | ++ | + | - |
| C | + | ++ | - | - |
| D | + | - | ++ | - |
| E | + | - | - | ++ |

++: Principale toxine produite.

+ : Toxine secondaire produite en général en moindre quantité.

- : Toxine non produite.

I.3. Causes favorisantes et pathogénie

I.3.1. Facteurs extrinsèques

I.3.1.1. L'alimentation

L'alimentation est le principal facteur de risque responsable des déséquilibres de la flore intestinale à l'origine des entérotoxémies. Le problème réside surtout en une suralimentation des animaux en allaitement ou en engraissement soit sous la forme d'un déséquilibre quantitatif ou qualitatif, soit en raison des erreurs dans le rationnement ou dans les transitions alimentaires brutales d'une ration pauvre à une ration hyperprotidique (surtout herbage jeune) (Cottureau, 1967; Stamatin et *al.*, 1967; Ducluzeau et *al.*, 1989; Popoff, 1994 et Tartera, 2000).

I.3.1.2. Le stress

Les multiples agressions (transport, contention, traitement...) constituent une source de stress pour les animaux et, du coup, un facteur de risque d'entérotoxémie (Joubert et *al.*, 1967 et Lefevre et *al.*, 2003).

I.3.1.3. Le climat et la saison

Les cas d'entérotoxémie sont fréquents de la fin de l'automne au début de l'été suivant avec un pic au printemps. En effet, on passe d'une alimentation hivernale riche en cellulose (fourrages) à une alimentation très riche en matières protéiques (pâtures) (Mumford, 1961 et Cottureau, 1967).

Les fortes variations de températures influent également sur l'apparition des entérotoxémies. En effet, un refroidissement brusque provoque une atonie digestive, permettant la pullulation des bactéries pathogènes comme les clostridies. De nombreux cas d'entérotoxémie ont été observés suite à une nuit très froide sur des animaux aux pâturages (Cottureau, 1967).

I.3.1.4. Le parasitisme

Les parasites intestinaux (Strongles, œsophagostomes) créent, par leur action traumatisante, des portes d'entrées aux bactéries anaérobies. Les parasites hépatiques (*Fasciola hepatica*) contribuent à la défaillance hépatique en provoquant une destruction des hépatocytes et une obstruction des canaux biliaires modifiant ainsi le rôle bactéricide de la bile ainsi que le péristaltisme intestinal (Popoff, 1989 et Bronzid, 2002).

Les lésions du pancréas peuvent aussi favoriser l'apparition des entérotoxémies. En effet, la diminution de la sécrétion glandulaire exocrine et en particulier de la trypsine, inductrice ou inhibitrice de certaines toxines, peut interférer dans cette pathologie (Joubert et *al.*, 1967).

I.3.1.5. Les antibiotiques

L'utilisation excessive d'antibiotiques est un problème d'actualité. Leur administration par voie per os de manière inadaptée entraîne la sélection de certaines souches bactériennes dans le tube digestif. Les molécules les plus utilisées sont à visée Gram négatif, ce qui contribue à la sélection de bactéries Gram positif type clostridies (Joubert et *al.*, 1967).

I.3.2. Facteurs intrinsèques

I.3.2.1. L'espèce

Les entérotoxémies touchent toutes les espèces mais elles sont plus fréquentes chez les ruminants car ils présentent une prédisposition physiologique aux indigestions et une prédisposition métabolique de sensibilité aux excès d'azote alimentaire (Cottureau, 1967 et Gey, 1967).

Les ovins sont particulièrement plus touchés, ceci s'explique par le fait qu'ils sont plus exposés aux systèmes de productions intensifs et à une alimentation favorisant les entérotoxémies (Cottureau, 1967; Popoff, 1989 et Glock et *al.* 1998).

I.3.2.2. L'âge

Les entérotoxémies touchent toutes les classes d'âge, allant d'un jeune de 48 heures à l'âge adulte (animaux de réforme) (Cottureau, 1967 et Manteca et *al.*, 1994).

I.3.2.3. La race

Chez les bovins, les races à viandes sont les plus exposées à la maladie (charolaise, blonde d'aquitaine, blanc bleu belge) car étant des races à croissance rapide, elles sont soumises à une alimentation très énergétique (Cottureau, 1967 et Manteca et *al.*, 2000). Les races blanc bleu belge et charolaise sont fréquemment citées, ceci est explicable par le fait que la majeure partie des études se sont portées sur celles-ci. On retrouve cette description aussi chez les ovins tels la race south-down (Cottureau, 1967).

I.3.3. Pathogénie

La flore digestive des ruminants est constituée essentiellement de bactéries anaérobies strictes, non sporulées, cellulolytiques et amylolytiques. Les clostridies, quant-à-elles, sont présentes au sein de l'intestin mais en faible concentration (Ducluzeau et *al.*, 1989; Savage, 1989 et Popoff, 1994).

Un équilibre se forme au sein de l'écosystème intestinal, permettant une stabilité dans des conditions physiologiques et alimentaires inchangées (Contrepolis et *al.*, 1973). Cet équilibre s'oppose au développement des bactéries pathogènes, c'est « l'effet barrière » (Ducluzeau et *al.*, 1989 et Popoff, 1989).

Cet équilibre de la flore intestinale peut être modifié chez les ruminants notamment lors de perturbations au niveau du rumen. Dans ces conditions, les substrats délivrés dans l'intestin permettent de sélectionner un profil de flore différent comme les clostridies (Bronzid, 2002).

Lors de cette perturbation, *Clostridium perfringens* peut se multiplier à une vitesse élevée: l'effectif peut décupler en dix minutes, passant de 10^3 UFC (Unité Formant Colonie)/ml (Millilitre) à 10^8 UFC/ml de contenu intestinal en une heure (Bronzid, 2002).

L'élément primordial dans la prolifération des clostridies est l'atonie digestive. Les causes de cette atonie digestive sont multiples. Elles peuvent être humorales (acidose ou alcalose ruminale, acidose ou alcalose sanguine), alimentaires (alimentation intensive, changement brutale de ration, insuffisance de lest) ou toxiques (acide cyanhydrique des légumineuses). Cette atonie digestive entraîne une accumulation des matières alimentaires insuffisamment fragmentées favorisant la pullulation des clostridies et la résorption des toxines responsables des symptômes et lésions observées lors de la maladie (Manteca et *al.*, 2000).

I.4. Matières virulentes, modes de contagion et voies de pénétration

Les entérotoxémies ne sont pas des maladies contagieuses (Ferrando et *al.*, 1967 et Cottureau, 1967). Les animaux malades ou convalescents excrètent des germes en quantités abondantes (Joubert et *al.*, 1967). Toutefois, la contamination orale des animaux par *Clostridium perfringens* n'est pas à elle seule suffisante pour causer la maladie (Ferrando et *al.*, 1967 et Cottureau, 1967). Le fait que plusieurs cas apparaissent simultanément dans un élevage, est à rapprocher au fait que tous les animaux du troupeau soient soumis aux mêmes facteurs de risque. Ainsi, les entérotoxémies peuvent évoluer sous forme de cas sporadiques ou d'enzooties, pouvant atteindre 5 à 30 % des animaux (Popoff, 1989).

L'animal nouveau-né, se contamine souvent de façon directe par la mamelle souillée des allaitantes ou par le lait (Morailon et *al.*, 1966).

Quand la voie de pénétration est une effraction traumatique externe, *C.perfringens* est responsable de gangrènes phlegmoneuses, de septicémies ou de mammites gangréneuses (Stamatin et *al.*, 1967).

I.5. Symptômes

I.5.1. Forme clinique suraiguë

Il s'agit de la forme la plus classique, elle se manifeste par une mort subite. (Glock et *al.*, 1998 ; Popoff, 1989 et 1994 et Uzal, 2004). L'animal est retrouvé mort ou comateux sans aucun signe clinique précurseur (Bailleul, 1982).

I.5.2. Forme clinique aiguë

Elle est caractérisée par l'apparition brutale de symptômes souvent généraux évoluant rapidement vers la mort. L'entérotoxémie s'exprime par des signes dominants et des signes mineurs, inconstants (Bailleul, 1982 et Greenham et *al.*, 1987).

I.5.2.1. Symptômes généraux

Les animaux présentent un abattement, des difficultés locomotrices (Manteca et *al.*, 2000 et Lefevre et *al.*, 2003). Les jeunes sont souvent anorexiques et prostrés en décubitus latéral avec des tremblements généralisés (Niilo, 1973 et Lefevre et *al.*, 2003). Une diarrhée avec une tuméfaction de l'anus et des signes de déshydratation peuvent être observés (Manteca et *al.*, 2000).

I.5.2.2. Symptômes digestifs

Le syndrome diarrhéique est typique de l'entérotoxémie et est souvent présent en fin d'évolution clinique (Bailleul, 1982 et Daube, 1992). Cette diarrhée, souvent hémorragique, peut être fétide, bulleuse, de couleur blanche, jaune ou brune (Ramisse et *al.*, 1979 ; Bailleul, 1982 ; Smith, 1996 et Lefevre et *al.*, 2003).

L'existence de douleurs abdominales, de diarrhées hémorragiques, de coliques intenses séparées de phases de rémission a été relatée. Les animaux se plaignent, se débattent et se tapent sur l'abdomen (Popoff, 1994 ; Gkiourtzidis et *al.*, 2001 ; Lefevre et *al.*, 2003 et Uzal, 2004).

I.5.2.3. Symptômes nerveux

Les signes convulsifs dominent le tableau clinique, ils se manifestent par des grincements de dents, des mouvements de pédalage, du ptyalisme, des contractions des muscles notamment ceux de l'encolure, une hyperesthésie, des pertes de connaissances et des convulsions intermittentes tonico-cloniques (Lefevre et *al.*, 2003 et Uzal, 2004).

L'animal se tient à l'écart du troupeau, en opisthotonos (English, 1966 et Grisemer et *al.*, 1962). Une cécité, un nystagmus intermittent et des oscillations horizontales des yeux peuvent être observés (Grisemer et *al.*, 1962 ; Songer, 1996 et Uzal, 2004).

I.6. Lésions

Les bases lésionnelles sont indispensables pour permettre d'exclure certaines pathologies responsables de mort subite. L'autopsie doit être rapide et complète. Elle permet de mettre en évidence les lésions en rapport avec une suspicion d'entérotoxémie (Glock et *al.*, 1998 et Latour, 2004).

Tableau III : Lésions caractéristiques observées à l'autopsie sur les ruminants morts d'entérotoxémie (Latour, 2004).

| Organes cibles | Lésions caractéristiques |
|----------------------------------|---|
| carcasse | Putréfaction rapide, bon état d'engraissement, belle conformation, parfois muqueuses ictériques |
| Cavités abdominale et thoracique | Epanchement séro-hémorragique péritonéal et péricardique |
| Caillette | Muqueuse congestionnée, parfois hémorragique voire nécrotique |
| Intestin grêle | Muqueuse congestionnée, parfois hémorragique voire nécrotique Contenu intestinal liquide séro-hémorragique |
| foie | Congestionné, friable, décoloré et hypertrophié |
| Rein | Congestion de la corticale Pétéchies, hémorragies sous-capsulaire, « reins pulpeux » (ovin) |
| Cœur | Pétéchies, suffusions péricardique, endocardique, myocardique |
| Poumon | Œdème, congestion active |
| Ganglions | Adénite congestive, œdémateuse ou hémorragique |
| Cerveau | Œdème, hémorragie, « foyers d'encéphalomalacie » (ovin) |

I.7. Diagnostic

I.7.1. Diagnostic épidémio-clinique

Les signes de suspicion tiennent à l'apparition de morts subites sporadiques de sujets en très bon état, le plus souvent dans un troupeau conduit avec un régime alimentaire intensif, à l'occasion de changements brutaux.

L'association de signes généraux, digestifs et nerveux dans une évolution fatale extrêmement rapide fait partie des signes critères d'une entérotoxémie.

Les bases épidémiologiques, cliniques et lésionnelles permettent essentiellement d'exclure les maladies intervenant dans le diagnostic différentiel de mort subite. Cependant sur le terrain, ce diagnostic d'exclusion permet d'établir une hypothèse de forte suspicion d'entérotoxémie qui doit être confirmée par une analyse de laboratoire (Cottureau, 1967 et Popoff, 1989).

I.7.2. Diagnostic différentiel

Le diagnostic différentiel des entérotoxémies se fait avec toutes les maladies pouvant engendrer une mort subite. Il peut s'agir au pâturage de causes physiques (fulguration, électrocution, coup de chaleur), mécaniques (obstruction de l'œsophage, torsion ou volvulus de la caillette, ulcère de la caillette), d'affections vasculaires (hémorragies, thrombose de la veine cave), d'intoxications (végétaux toxiques, organophosphorés, azote non protéique) ou de désordres métaboliques (météorisation spumeuse ou gazeuse aiguë, hypomagnésémie, toxémie de gestation, myopathie-dyspnée, ataxie enzootique, hypocalcémie, acidose lactique aiguë, intoxication au cuivre, nécrose du cortex cérébral) (Naik et *al.*, 1977 ; Ducluzeau et *al.*, 1989 ; Manteca et *al.*, 1994 ; Schelcher et *al.*, 2002. Latour, 2004).

I.7.3. Diagnostic bactériologique

I.7.3.1. Examen bactériologique

➤ Prélèvements

Les prélèvements doivent être effectués sur un cadavre frais c'est-à-dire quelques heures après la mort afin d'éviter la prolifération des clostridies en post-mortem (Popoff, 1989).

Un échantillon de contenu digestif est recueilli dans un milieu de transport pour une culture en anaérobiose ou à défaut dans un tube sec de prise de sang, rempli à ras bord et bien bouché en limitant les bulles d'air. L'examen bactériologique peut également être entrepris sur des viscères (foie, rein, rate ...) car en fin d'évolution d'entérotoxémie, une phase septicémique est fréquente (Popoff, 1989). Néanmoins, le prélèvement de choix reste la portion d'intestin grêle avec son contenu (Carter et *al.*,

1990 et Uzal, 2004). Le prélèvement doit être acheminé le plus rapidement possible au laboratoire sous couvert du froid afin d'éviter la pullulation des germes et la destruction de certaines toxines (Philippeau et *al.*, 2003).

➤ **Isolement et identification des bactéries**

L'examen direct des bactéries s'effectue par une coloration de Gram sur contenu intestinal. La flore digestive dominante est normalement à Gram négatif et devient à Gram positif dans le cas d'entérotoxémie (Walker, 1990 et Songer, 1996).

L'isolement est délicat lorsque le prélèvement est polymicrobien. Il ne pourra s'effectuer qu'en employant des milieux sélectifs et des méthodes d'ensemencement en surface ou en masse (Walker et *al.*, 2004). Le milieu WILLIS à la néomycine est très utilisé dans ce cas. Il est composé de lactose, de rouge neutre, du jaune d'œuf, du lait écrémé et de la néomycine. La présence d'une lécithinase se traduit par l'apparition d'un halo opaque autour des colonies. La fermentation du lactose est décelée par le virage du rouge neutre. Or *C.perfringens* est la seule bactérie anaérobie qui possède une lécithinase et une lactase (Walker, 1990).

La culture sur gélose au sang est d'utilisation fréquente. Elle peut se faire sur gélose au sang ou gélose Columbia® à 5 % de sang de mouton, en chambre anaérobie, sous une atmosphère contrôlée en 24-48 heures. On observe autour des colonies de *C.perfringens* une double zone d'hémolyse: une première zone d'hémolyse totale (toxine θ ou perfringolysine) débordant peu la colonie et une seconde zone de grand diamètre d'hémolyse partielle (toxine α) (Al-mashat et *al.*, 1983 ; Veron et *al.*, 1989 et Sedallian, 1990).

➤ **Numération**

La numération est un élément indispensable pour l'interprétation des résultats. C'est l'une des indications les plus fiables de la participation de *Clostridium perfringens* aux manifestations cliniques. La mise en évidence de dysbactériose est typique des entérotoxémies (Manteca et *al.*, 1994). Des taux inférieurs à 10^3 UFC/ml de contenu intestinal de *C.perfringens* ne sont pas significatifs. A partir de 10^3 UFC/ml, il s'agit d'une bonne présomption à condition que les prélèvements aient été réalisés dans un délai inférieur à 15 heures post-mortem (Popoff, 1989). Dans cette optique, il est recommandé d'effectuer simultanément un dénombrement des colibacilles qui constitue un bon indicateur de la qualité du prélèvement (Tartera, 2000).

I.7.3.2. Recherche des toxines

➤ **Prélèvements**

La recherche de toxines est réalisée sur le contenu intestinal, les épanchements séreux, les tissus lésés ou le surnagent de culture (Popoff, 1989 et Daube, 1992).

Tableau IV : Méthodes de recherche des toxines de *Clostridium perfringens*.

| Méthodes de laboratoire | Principe | Avantages | Inconvénients |
|---|---|--|---|
| Test intra-dermique (Naik et al., 1977) | Méthode biologique reposant sur l'activité dermonécrosante des toxines sur la peau des animaux de laboratoire | Réalisation facile Lecture facile (mesure réaction cutanée) | Sensibilité et spécificité faible Utilisation de souris Pas de détection de l'entérotoxine |
| Séroneutralisation sur souris (Bailleul, 1982 et Kadra et al., 1999) | La technique repose sur la neutralisation spécifique de l'activité létale des toxines à l'aide d'antisérums sur des souris vivantes | Lecture du résultat facile Utilisation pour le toxinotypage | Sensibilité et spécificité faible Utilisation de nombreuses souris Pas de détection de l'entérotoxine |
| Méthode sur cellule Vero (Bruce et al., 1979 et Kadra et al., 1999) | Méthode semi-quantitative consistant en l'interprétation de la mortalité des cellules Vero (cellules de reins de singes) induites par les toxines | Rapide, peu coûteuse | Lecture trop subjective Sensibilité et spécificité variable |
| Contre-immuno-électrophorèse (CIEP) (Naik et al., 1977) | Technique basée sur une réaction immunologique de précipitation entre les toxines et les anticorps anti-toxines | Rapide Lecture facile des résultats (précipité) Bonne sensibilité et spécificité pour l'entérotoxine | Limitée à l'entérotoxine |
| Test d'agglutination reverse passive (Kadra et al., 1999) | Des billes de latex sont sensibilisées par un sérum purifié à partir de lapins ou moutons immunisés contre les exotoxines de <i>C.perfringens</i> | Bonne sensibilité et spécificité Lecture du résultat facile mais subjective | Réaction croisée diminuant la spécificité |
| ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Nagahama et al., 1991 et Songer, 1996) | Technique immunoenzymatique permettant de rechercher les anticorps ou les antigènes (toxines) dans un substrat choisi | Excellente sensibilité et spécificité pour toutes les toxines, rapide Pas de subjectivité du résultat | Chère, réalisation complexe |

1.7.3.3. Méthode PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR a été conçue par Kary Mullis en 1983, qui obtint pour ces travaux le prix Nobel de chimie en 1993 (Meugnier et *al.*, 2000).

Il s'agit d'une amplification sélective d'une séquence d'ADN (Acide Désoxyribonucléique) double brin servant de matrice à partir d'un couple d'amorces oligonucléotidiques s'hybridant de part et d'autre de cette séquence. Le but est de réaliser une succession de réaction de réplication afin d'obtenir de grandes quantités d'ADN suffisantes pour le détecter et l'étudier (Kadra et *al.*, 1999 et Meugnier et *al.*, 2000).

Pour avoir une réplication d'un ADN double brin, il faut agir en trois étapes: il faut dénaturer l'ADN pour obtenir des matrices simple brin (dénaturation); borner et amorcer la réplication de la séquence à amplifier à l'aide d'oligonucléotides amorces spécifiques (hybridation); réaliser la réaction de polymérisation du brin complémentaire (polymérisation). A la fin de chaque cycle, les produits sont sous forme d'ADN double brin (Meugnier et *al.*, 2000).

La méthode PCR peut être utilisée pour identifier et typer *Clostridium perfringens* dans les prélèvements notamment les fèces et le contenu intestinal (Jarrigue, 1980 et Kanakaraja et *al.*, 1998).

L'amplification effectuée en utilisant les gènes des toxines α , $\beta 1$, $\beta 2$, ϵ et l'entérotoxine peut être simple (un seul gène), duplex (deux gènes) ou triplex (trois gènes simultanément) (Kadra et *al.*, 1999).

Cette méthode est aussi très utile pour des investigations épidémiologiques des entérotoxémies. Elle trouve toute son application dans la mise en place de bons protocoles vaccinaux. Elle présente de plus l'avantage d'avoir un résultat rapide pour l'entérotoxine sans avoir besoin de faire sporuler les souches in vitro (Kadra et *al.*, 1999 et Gkiourtzidis et *al.*, 2001).

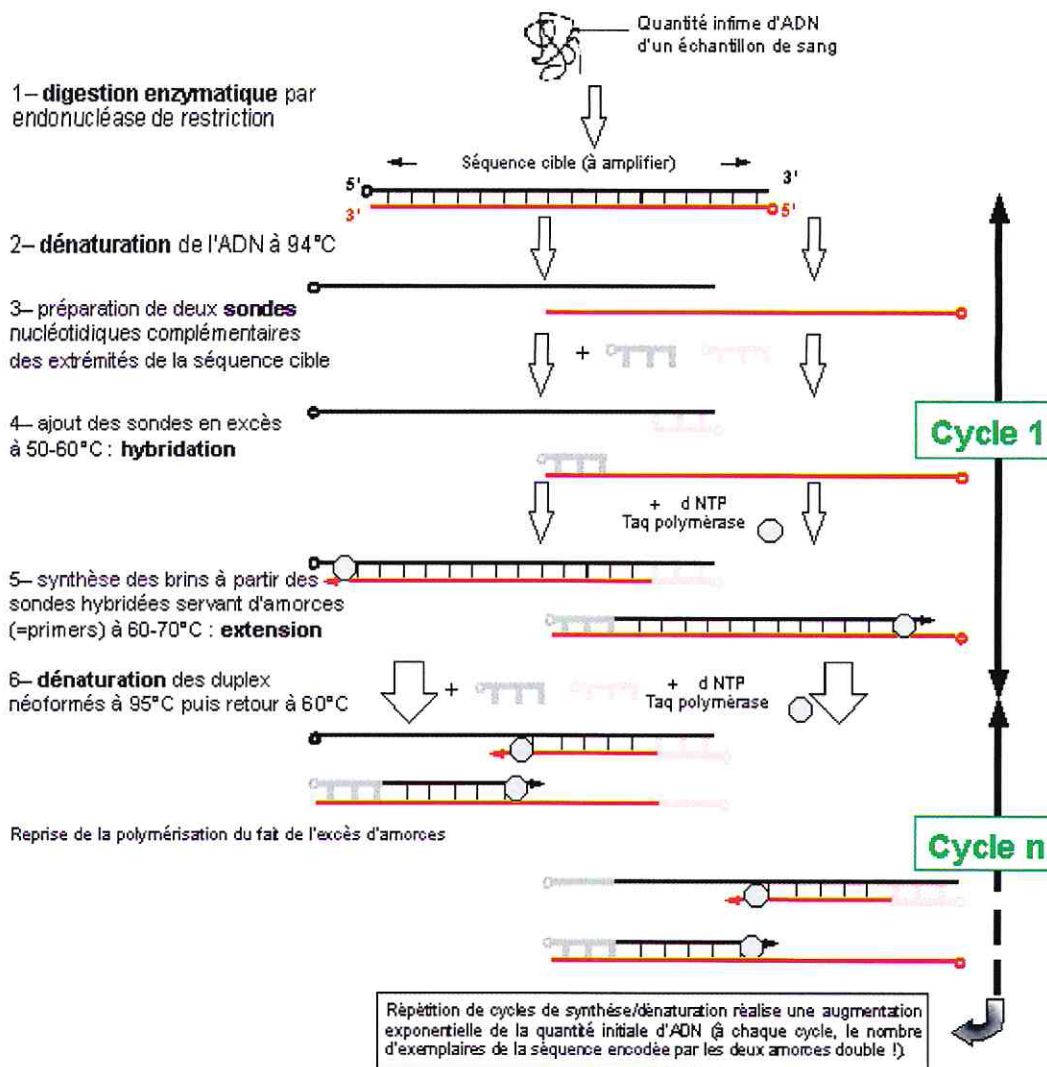


Figure 02: Principe de la méthode PCR (Unité pédagogique de Génétique Moléculaire).

I.8. Traitement

Le traitement est souvent décevant étant donné la rapidité de l'affection et l'intensité des lésions viscérales (Prévoit et *al.*, 1961).

I.8.1. Traitement symptomatique

Il consiste à soutenir l'organisme envahi par les toxines. Pour lutter contre l'état de choc dû à l'intoxication, une perfusion de sérum glucosé ou salé et l'injection de facteurs lipotropes et tonocardiaques doivent être instaurés (Popoff, 1989).

I.8.2. Traitement spécifique**➤ Sérothérapie**

Elle permet de lutter contre l'action toxigène des germes par apport d'antitoxines. Il s'agit d'injections de sérums polyvalents contenant des anticorps dirigés contre *C.perfringens* (A, B, C, D), *C.septicum*, *C.chauvei* et *C.novy*; ceci lorsque le clinicien est dans l'ignorance de l'espèce ou du type de germe en cause. La sérothérapie doit être précoce, massive et renouvelée pour être efficace. Les injections se font par voie intra veineuse ou intra péritonéale si le sérum est hétérologue ou par voie sous cutanée dans le cas contraire (Niilo, 1988). Cependant, les anticorps ne peuvent neutraliser que les toxines circulantes et non celles qui sont fixées sur les organes cibles. Par conséquent, son intérêt est très limité et son efficacité discutable (Prévot, 1961 et Popoff, 1989).

➤ Antibiothérapie

L'antibiothérapie est nécessaire pour limiter la prolifération de *Clostridium perfringens* in situ. Ce dernier est sensible à tous les antibiotiques sauf aux aminosides. En raison de leur toxicité sur le foie et les reins, l'emploi des sulfamides est à éviter. Les β -lactamines et les céphalosporines par voie orale sont actives dans la plupart des cas, cependant l'antibiotique de choix reste la famille des pénicillines. *Clostridium perfringens* a développé des phénomènes de résistances à certaines familles d'antibiotiques comme les tétracyclines, le groupe des érythromycine et lincosamine et le chloramphénicol, nécessitant une utilisation raisonnée de l'antibiothérapie (Popoff, 1989; Smith, 1996 et Songer, 1996).

I.9. Prophylaxie**I.9.1. Prophylaxie sanitaire**

La prophylaxie sanitaire découle de l'étiologie et de la pathogénie et consiste essentiellement en la mise en application des mesures d'hygiène de l'habitat et surtout une bonne gestion de l'alimentation.

I.9.1.1. Hygiène de l'habitat

Il est élémentaire, quelque soit la maladie, de désinfecter les locaux, le sol et le matériel surtout pour les jeunes animaux, d'isoler les femelles qui vont mettre bas, ainsi que de surveiller le personnel (Joubert et al., 1967).

I.9.1.2. Hygiène de l'alimentation

L'hygiène alimentaire est essentielle pour prévenir les entérotoxémies chez les animaux d'élevage. Il convient de supprimer de l'alimentation, tout aliment altéré (ensilage mal réussi, avoine chauffée), avarié ou suspect et d'éviter, par des

aménagements corrects des auges et des abreuvoirs, la pollution des aliments (Joubert et *al.*, 1967 et Katitch, 1987).

Il convient d'éviter les changements alimentaires brusques (au sevrage ou à la mise à l'herbe au printemps) ; les rations doivent être augmentées progressivement. Il faut éviter également la suralimentation, une trop faible proportion de matières cellulosiques ou des rations trop riches en protéines et/ou en glucides facilement fermentescibles. Un aliment de complément ne doit pas constitué l'essentiel de la ration, l'alimentation ne doit être ni trop abondante ni trop riche ou alors avec des taux de matières azotées brutes supérieurs à 16 % (Gey, 1967 ; Joubert et *al.*, 1967 ; Katitch, 1987 et Popoff, 1989).

La notion d'aliments lests est à prendre en compte. Une ration riche en foin donc en cellulose constitue l'aliment de lest par excellence pour les ruminants. Elle stimule la motricité digestive en particulier la rumination et la salivation servant de milieu tampon (Cottreau et *al.*, 1967).

Cependant, il est difficile dans les conduites d'élevages intensives de restreindre l'alimentation nécessaire pour optimiser la production. Les conseils sont difficiles à appliquer car ils vont à l'encontre des objectifs de production de l'éleveur (Gey, 1967).

I.9.2. Prophylaxie médicale

I.9.2.1. Séroprévention

Elle consiste en l'administration de sérums (homologues ou hétérologues monovalents ou polyvalents). La protection lors de l'administration de sérums s'installe rapidement et dure deux à quatre semaines. Cette méthode peut être utilisée en cas d'urgence mais la faible disponibilité et le coût élevé des sérums rendent l'efficacité de cette prévention très limitée (Popoff, 1989 et 1996).

I.9.2.2. Vaccination

La vaccination est utilisée lors de cas déclarés d'entérotaxémie. Elle repose en l'administration de toxines brutes inactivées, éventuellement associées à des anacultures (Popoff, 1996). De nos jours, la plupart des vaccins sont polyvalents de deux à huit valences. Ils présentent l'avantage de protéger l'animal contre les différentes clostridies toxigènes (*C. septicum*, *C. novyi*, *C. oedematiens*, *C. tetani*, *C. chauvoei* et *C. perfringens*) (Popoff, 1994; Tartera, 2000 et Lefevre et *al.*, 2003). Cependant, il serait plus efficace d'adapter la composition des vaccins aux conditions épidémiologiques (Katitch, 1987 et Popoff, 1989).

Le protocole vaccinal est identique d'un type de vaccin à l'autre; une primo-vaccination est réalisée par deux injections à 3-4 semaines d'intervalles, puis un rappel

annuel est nécessaire. Les femelles gestantes sont vaccinées deux à six semaines avant la mise bas. Cette protection est efficace pour le nouveau-né lors de la prise du colostrum. Aussi, les jeunes issus de mères vaccinés ont une première injection à la huitième semaine, à la différence de ceux issus de mères non vaccinées dont la vaccination a lieu à la deuxième semaine (Daube, 1992 et Popoff, 1994). Chez les caprins, une bonne protection immunitaire est établie si le protocole vaccinal prévoit un rappel tous les quatre mois (Popoff, 1989; Songer et *al.*, 1987 et Uzal, 2004) car la réponse immunitaire post-vaccinale est moindre chez cette espèce par rapport à l'espèce ovine et bovine pour un même vaccin (Green et *al.*, 1987).

CHAPITRE II :
MATERIEL ET METHODES

II. MATERIEL ET METHODES

Notre étude a été réalisée au CENTRE NATIONAL DE REFERENCE DES ANAEROBIES STRICTES ET DU BOTULISME de l'Institut Pasteur d'Algérie -Dely-Ibrahim- sur une période s'étalant de Février 2009 à Septembre 2009. Trente et une (31) souches de *Clostridium perfringens* ont été repiquées puis étudiées par la technique PCR en utilisant des amplifications simples (amplifiant un seul gène) suivant le protocole de l'Institut Pasteur de Paris.

II.1. Matériel**II.1.1. Echantillonnage**

Les 31 souches de *C.perfringens* proviennent de la collection de souches du service ANAEROBIES de l'Institut Pasteur (Janvier 2008 à Avril 2009). Ces dernières ont été isolées à partir de prélèvements d'animaux soupçonnés morts d'entérotoxémies (Annexe 2) puis conservées à – 80°C dans un milieu contenant 50 % de bouillon TGY® (Trypcase Glucose Yeast) (Annexe 1) et 50 % de glycérol.

II.1.2. Appareillage et réactifs (Annexe 1).**II.2. Méthodes****II.2.1. Repiquage des souches**

Chaque souche de *C.perfringens* a été prélevée du milieu de conservation puis ensemencée sur milieu Columbia® (Annexe 1) mélangé au sang de cheval citraté, par le biais d'une pipette Pasteur. Les boîtes de Petri sont incubées pendant une nuit à 37°C en anaérobiose en utilisant des Anaérocult® P humidifiés par 3ml d'eau du robinet et mis dans des sachets que l'on soude avec un soude-sac pour constituer de véritables chambres anaérobies unitaires (Figure 03).

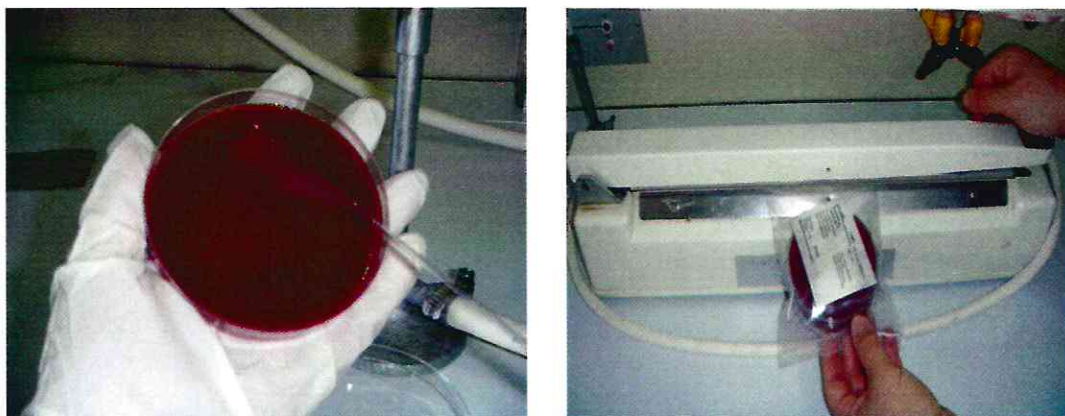


Figure 03 : Repiquage des souches et mise en anaérobiose (photos originales).

➤ Principe de l'Anaerocult® P

La composition de l'Anaerocult® P permet de fixer très rapidement tout l'oxygène (O₂) compris dans la pochette spéciale d'incubation et de réduire le milieu gélosé. Dans le même temps, une production de dioxyde de Carbone (CO₂) et d'Hydrogène (H₂) crée les conditions adéquates à la croissance des germes anaérobies.

II.2.2. Etude biochimique (Galerie API 20 A)**➤ Principe de la galerie API 20 A**

La galerie API 20 A comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés.

Les microtubes sont remplis avec une suspension bactérienne qui reconstitue les substrats.

Les métabolites produits sont mis en évidence par différents indicateurs de pH (potentiel hydrogène) ou par addition de réactifs après 24 à 48 heures d'incubation à 37°C en anaérobiose.

➤ Préparation de l'inoculum

- A l'aide d'un écouvillon stérile, prélever la culture sur gélose au sang et réaliser une suspension dans le medium égale à 3 Mac. Farland, homogénéiser la suspension.

➤ Méthode

- A l'aide d'une pipette Pasteur, inoculer les cupules de la galerie API 20 A avec le mediumensemencé, en évitant la formation de bulles et en inclinant légèrement la galerie
- Pour le test GEL (Gélatine), remplir le tube à ras
- Pour le test IND (Indole), remplir le reste du tube avec de la vaseline afin d'éviter l'évaporation de l'indole
- Placer la galerie API 20 A dans une boîte de Petri et incuber à 37°C pendant 24 à 48 heures en anaérobiose (Figure 04).

➤ Lecture et identification

- La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique.

- La fiche des résultats reproduit le dessin de la galerie API 20 A avec ses 20 tests, plus la réaction de la catalase et trois tests de morphologie : SPOR pour spore (+, -), GRAM (+, -) et COCC pour coccus (+, -).
- Ces tests sont répartis en groupes de trois, et une valeur de 1, 2 et 4 est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe le nombre correspondant à des réactions positives, on obtient 8 chiffres qui constituent le profil numérique.

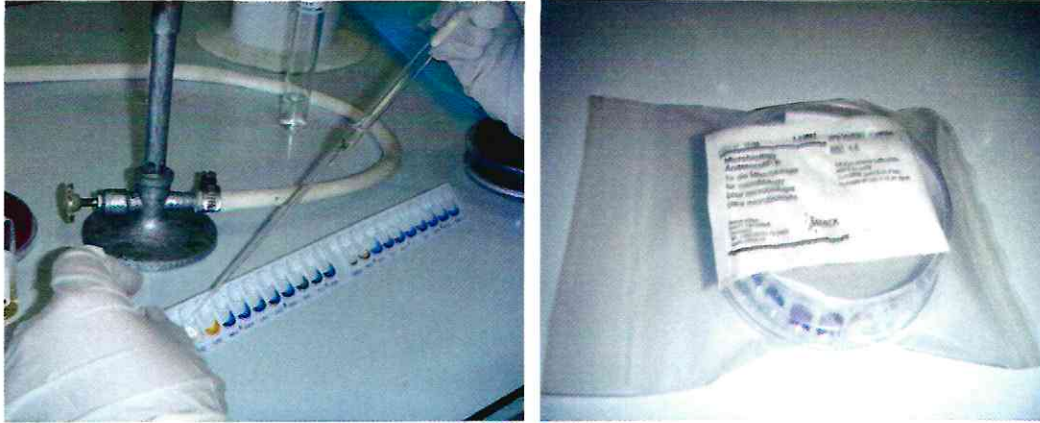


Figure 04 : Ensemencement de la galerie API 20 A et mise en anaérobiose (photos originales).

II.2.3. Extraction de l'ADN

- Pour chaque boîte de Petri, un tube Eppendorf est préparé avec 200 μ l d'InstaGen™
- Bien charger la pipette Pasteur de colonies de *C.perfringens* de chaque boîte et la décharger par la suite dans le tube Eppendorf correspondant, faire de même pour les autres échantillons
- Homogénéiser au vortex 10 sec
- Chauffer 30 min à 56 °C à l'étuve
- Homogénéiser au vortex 10 sec
- Chauffer 10 min à 95°C à l'étuve
- Centrifuger 5 min à 12 000 tr/min permettant de culotter les débris cellulaires
- Conserver le surnageant contenant l'ADN à + 4°C (échantillon).

II.2.4. Réaction d'amplification

Tout le matériel (verrerie et autre matériel) sera stérilisé par le biais de la hotte à ultra violet pendant 20 min.

L'ensemble des opérations décrites dans le mode opératoire doit s'effectuer en portant des gants à usage unique.

II.2.4.1. Préparation du Mix

Les réactifs décrits doivent être conservés et utilisés en suivant strictement les recommandations du fournisseur.

Eau distillée.....4,33 ml
 Tampon PCR 10X.....0,5 ml
 MgCl₂ (Chlorure de Magnésium).....0,15 ml
 dNTPs (Désoxyribonucléiques triphosphate).....5µl :

- 2'-deoxy-adenosine - 5'-triphosphate (dATP)
- 2'-deoxy-cytidine - 5'-triphosphate (dCTP)
- 2'-deoxy-guanosine - 5'-triphosphate (dGTP)
- 2'-deoxy-thymidine - 5'-triphosphate (dTTP)

- Concentrations finales:

Tampon PCR: 1X

MgCl₂: 1,5 mM

dNTPs : 0,1 mM

- Répartir le volume final du Mix (5 ml) dans 5 tubes de Kahn contenant chacun 1 ml
- Rajouter 10 µl (50 µmole/l) d'amorces (Annexe 1) et 10 µl (5 U/µl) de Taq polymérase, dans chaque tube de Kahn
- Répartir les Mix dans des tubes eppendorfs à 0,5 ml (25 µl), ajouter 2,5 µl de l'échantillon et 1 µl de témoin positif pour chaque toxinotype.

II.2.4.2. Amplification

- Mettre les tubes eppendorfs (préalablement identifiés, exemple: α souche 1, β1 souche 4,...) dans le thermocycleur
- Lancer l'appareil suivant le programme ci-dessous (durée environ 1 heure) (Institut Pasteur de Paris) :

| | Etape | Température de consigne | Durée programmée | Nombre de cycles |
|---|-----------------------|-------------------------|------------------|------------------|
| 1 | Dénaturation initiale | 92°C | 2 min | 1 |
| 2 | Dénaturation | 92°C | 20 sec | 30 |
| | Hybridation | 50°C | 20 sec | |
| | Elongation | 72°C | 20 sec | |
| 3 | Elongation finale | 72°C | 5 min | 1 |

- A la fin de l'amplification par polymérisation en chaîne, les tubes de PCR sont conservés au réfrigérateur jusqu'à leur dépôt sur gel d'électrophorèse.

II.2.4.3. Analyse des amplifiats par électrophorèse sur gel d'agarose

- Il est fortement recommandé de manipuler les amplifiats (ouverture des tubes de PCR, dépôts sur gel et électrophorèse) dans une zone distincte du reste des manipulations. Ceci permet de se prémunir un minimum des risques d'autocontamination (risques de faux positifs).
- **Préparation du gel à 2 % en TAE**
 - Dans un erlenmeyer, mettre 2 g d'agarose puis 100 ml de TAE 1X (Annexe 1)
 - Faire fondre au micro-onde
 - Ajouter 2 µl de Bromure d'éthidium (BET) 10 %
 - Mettre un peigne ou deux dans la cuve, homogénéiser, couler et laisser polymériser (Figure 05)
 - Une fois polymérisé, enlever les peignes, on aura des puits.
- ❖ Etant considéré comme produit hautement cancérigène, Il est fortement recommandé de réserver une pièce spécifique pour la manipulation du bromure d'éthidium et d'en contrôler l'accès aux seules personnes autorisées.

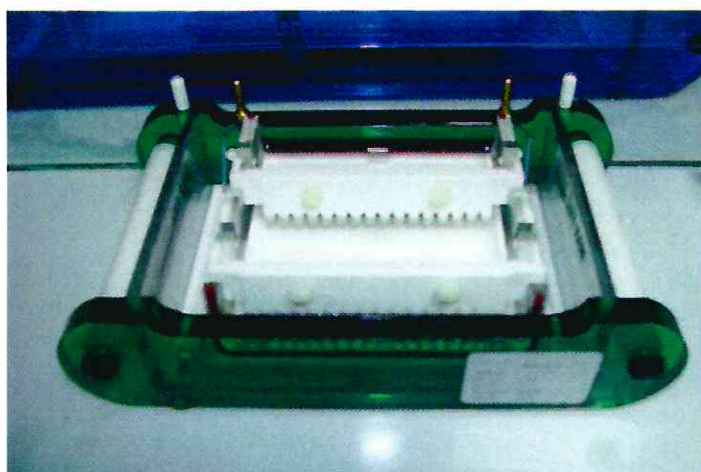


Photo 05 : Préparation du gel d'agarose (photo originale).

- **Dépôt sur gel**
 - Dans une plaque de microtitration, mettre dans chaque cupule 2 µl de bleu de bromophénol (tampon de charge) et 10 µl d'échantillon
 - Mélanger délicatement par aspiration refoulement avec le tampon de charge (Figure 06)
 - Déposer délicatement le contenu de chaque cupule dans le puits correspondant
 - Même procédure pour les témoins positifs (deux témoins sont utilisés A et D) et le marqueur de taille (2 µl)

- Verser la solution TAE 1 % (tampon d'électrophorèse) dans la cuve d'électrophorèse jusqu'à ce que le gel y baigne
 - Lorsque tous les amplifiats, les différents témoins et le marqueur de taille sont déposés sur le gel, mettre en marche le générateur de tension (82 V, 80 mA pendant 30 à 45 min) (Figure 07).
- ❖ Pour chaque souche, deux puits sont utilisés. Les amplifiats correspondant aux toxines α , ε et ι sont mis dans un même puits tandis que les amplifiats correspondant aux deux autres toxines ($\beta1$, $\beta2$) sont mis dans le puits adjacent.

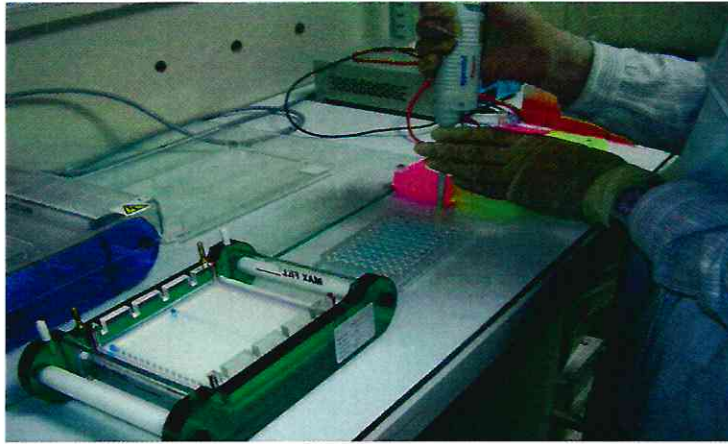


Photo 06 : Dépôt des amplifiats sur le gel d'électrophorèse (photo originale).

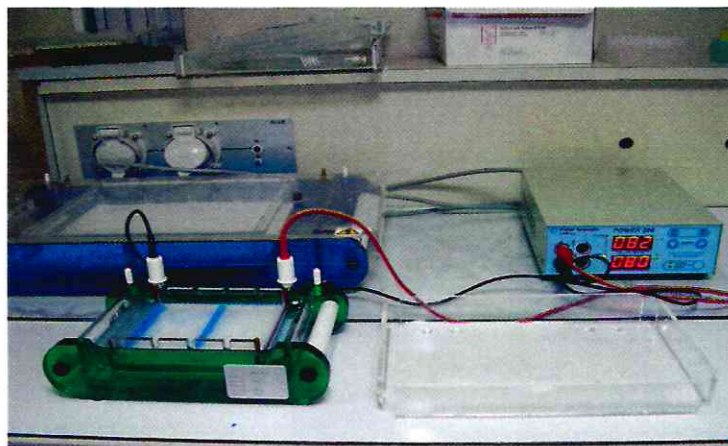


Photo 07 : Dispositif de la migration sur gel d'électrophorèse (photo originale).

➤ **Révélation du gel d'électrophorèse**

- Le gel est ensuite placé sur un transilluminateur à UV (Ultra violet) (à l'intérieur de la chambre noire) en veillant à ne pas exposer le manipulateur au rayonnement (port d'un casque à visière filtrante ou utilisation d'une planche filtrante à déposer sur le transilluminateur)

- Faire une prise de vue du gel exposé aux UV et utiliser cette prise de vue (impression ou fichier informatique) pour analyser les résultats. La prise de vue devra s'effectuer rapidement, car l'ADN est dégradé lors d'une exposition prolongée aux UV.

➤ **Expression et validation des résultats**

- Les résultats sont considérés validés si et seulement si l'ensemble des conditions suivantes sont réunies :
 - Les témoins positifs (A/B) ne présentent aucun autre fragment amplifié que leurs fragments originaux, témoignant ainsi l'absence d'une éventuelle contamination accidentelle pendant la préparation du mix et l'ajout de l'échantillon
 - L'échantillon présente un ou plusieurs fragments amplifiés visibles et de taille attendue : les conditions de PCR et la composition du mix ont permis d'amplifier spécifiquement et avec rendement suffisant les séquences cibles chez *Clostridium perfringens*.

CHAPITRE III :

RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. RESULTATS

III.1.1. Identification des souches re-isolées

Les 31 souches de *Clostridium perfringens* (provenant d'animaux soupçonnés morts d'entérotoxémies) re-isolées sur gélose Columbia® plus 5 % de sang de cheval, en anaérobiose, ont donné des cultures positives caractéristiques de l'espèce : des colonies rondes, lisses, de 3-5 mm de diamètre et entourées d'une double zone d'hémolyse (un premier halo d'hémolyse totale débordant peu de la colonie et un second halo de grand diamètre d'hémolyse partielle) (Figure 08).

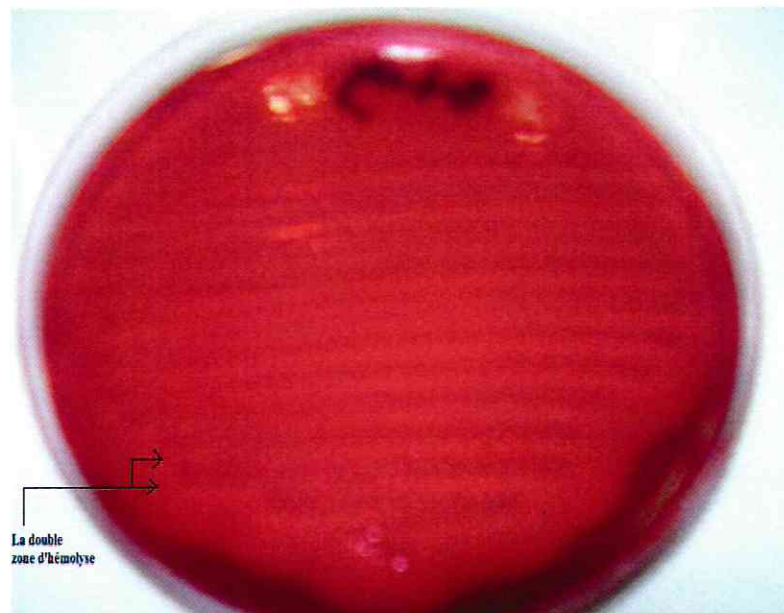


Figure 08 : Forme des colonies après 24 heures d'incubation sur gélose Columbia® plus 5 % de sang de cheval (photo originale).

III.1.2. Identification biochimique

Après une incubation de 24 heures en anaérobiose, les galeries API 20 A ont confirmé que toutes les souches étudiées étaient des *C.perfringens* (Figure 09).

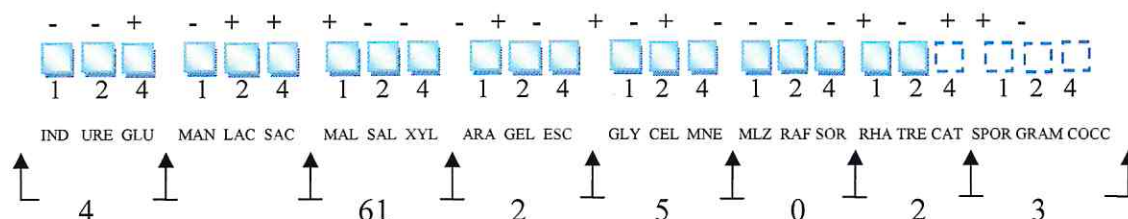


Figure 09 : Résultat d'identification (Galerie API 20 A, Profil : 46125023, Souche : 276) (photo originale).

III.1.3. Recherche des séquences de gènes codant pour les toxines α , β_1 , β_2 , ϵ et ι

Les gènes codant pour les toxines α , β_1 , β_2 , ϵ et ι ont été recherchés chez toutes les souches re-isolées (31 souches). Ces dernières ont exprimé uniquement le gène codant pour la toxine α (une seule bande à la migration à l'électrophorèse sur gel d'agarose). Aucune bande correspondant aux gènes exprimant les toxines β_1 , β_2 , ϵ et ι n'a été détectée (Figures 10, 11 et 12).

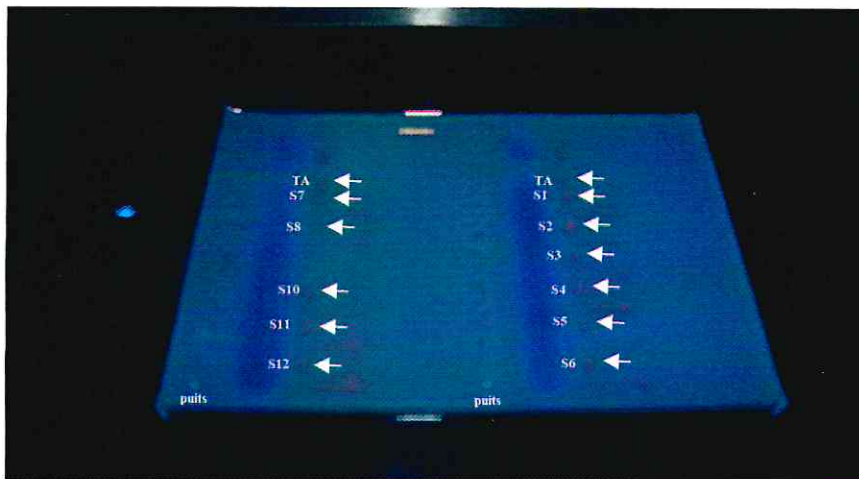


Figure 10 : Profil de migration de l'ADN à l'électrophorèse (Gel I, TA : Témoin A, S : Souche) (photo originale).



Figure 11 : Profil de migration de l'ADN à l'électrophorèse (Gel II, MT : Marqueur de taille, S : Souche) (photo originale).

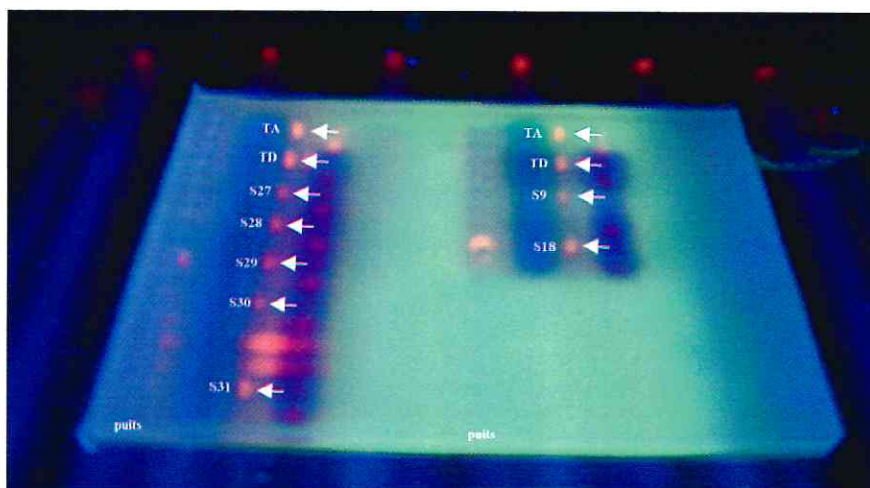


Figure 12 : Profil de migration de l'ADN à l'électrophorèse (Gel III, TA : Témoin A, TD : Témoin D, S : Souche) (photo originale).

III.2. Discussion

En santé animale, les entérotoxémies peuvent être à l'origine de pertes économiques, en l'absence de mesures prophylactiques rigoureuses. En santé publique, la présence de *Clostridium perfringens* dans les viandes animales peut être à l'origine de toxi-infections alimentaires collectives (Kadra et al., 1994 et Piatti et al., 2004).

La production des toxines létales majeures (α , $\beta 1$, $\beta 2$, ε et ι) est responsable de la pathogénicité de *C.perfringens* et est à la base de sa classification en cinq toxinotypes (A-E) (Yoo et al., 1997 et Kalender et al., 2005).

La séroneutralisation sur souris a longuement été considérée comme méthode de référence pour le toxinotypage de *C.perfringens*. Cependant, la faible disponibilité des sérums diagnostiques monovalents et leur coût excessivement cher, sont les inconvénients majeurs de cette technique. Aussi, cette méthode reste discutable sur le plan éthique car elle utilise des souris vivantes (Yoo et al., 1997 ; Kadra et al., 1999 et Piatti et al., 2004). Par la suite, d'autres techniques ont été proposées (hémagglutination passive, ELISA) mais là encore, la non disponibilité des sérums diagnostiques constitue un handicap pour leur extension (Kadra et al., 1999). A partir de là, le développement et l'utilisation de la méthode PCR comme outil de diagnostic pour la détection des toxines de *C.perfringens* et sa toxinotypie offrent d'excellents avantages par rapport aux méthodes précédentes (Yoo et al., 1997 ; Kadra et al., 1999 et Piatti et al., 2004).

Dans notre étude, nous avons procédé à l'extraction de l'ADN de 31 souches de *C.perfringens* et à son amplification par la méthode PCR simplex suivant le protocole de l'Institut Pasteur de Paris. Pour chaque souche, cinq gènes responsables de la production des protéines létales majeures (α , $\beta 1$, $\beta 2$, ε et ι) ont été recherchés. Au cours de ce travail, le gène de la toxine α a été retrouvé chez toutes les souches étudiées (31 souches) (une seule bande à la migration sur gel d'électrophorèse de 396 pb). Aucune autre bande correspondant aux gènes produisant les toxines $\beta 1$, $\beta 2$, ε et ι n'a été retrouvée. Ceci nous amène à conclure que *C.perfringens* de type A est le toxinotype prédominant. Ces résultats concordent avec les travaux réalisés par Popoff, 1984 ; Kadra et al., 1994 ; Yoo et al., 1997 ; Piatti et al., 2004 ; Kalender et al., 2005 ; Heikinheimo et al., 2005 ; Svobodova et al., 2007 et Drigo et al., 2008 et ce, dans des pays différents et sur des espèces variées (Homme, bovins, ovins, porcins, volaille).

Cependant, sur un nombre important d'études réalisées sur le typage génétique de *C.perfringens*, pratiquement aucun auteur n'a abordé la possibilité qu'il puisse y avoir une cure des plasmides bactériens porteurs des gènes exprimant les toxines $\beta 1$, $\beta 2$, ε et ι , au cours des multiples manipulations bactériologiques. Ce qui peut être à la faveur de la prédominance du toxinotype A (le gène *plc* étant porté par le chromosome bactérien).

Le toxinotype A de *Clostridium perfringens* avec sa toxine létale majeure (toxine α) sont à l'origine de l'entérite nécrotique et des entérotoxémies chez les animaux. Chez l'Homme, ils sont à l'origine des gangrènes gazeuses et des toxi-infections alimentaires collectives (food poisoning).

La toxine α est une phospholipase C qui hydrolyse la lécithine en phosphorylcholine et en diglycéride. Dans les entérotoxémies, elle est à l'origine des symptômes provoquant une hémolyse intravasculaire, des lésions des capillaires et de myonécrose, une inflammation, une agrégation des plaquettes et un état de choc entraînant la mort de l'individu (Veron et al., 1989; Smith, 1996; Songer, 1996; Yoo et al., 1997 ; Petit et al., 1999; Lefevre et al., 2003 ; Piatti et al., 2004 et Svobodova et al., 2007).

En santé animale, l'application de la technique PCR s'avère intéressante dans l'identification et le toxinotypage de *Clostridium perfringens* dans le diagnostic et la prophylaxie des entérotoxémies animales permettant ainsi le développement de vaccins adaptés à la situation épidémiologique de la région étudiée (Yoo et al., 1997 ; Kadra et al., 1999 ; Piatti et al., 2004 et Kalender et al., 2005).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le travail que nous avons mené a permis l'identification et le toxinotypage de 31 souches de *C.perfringens* à l'origine des entérotoxémies animales par la technique PCR simplex suivant le protocole de l'Institut Pasteur de Paris. Nous avons pu amplifier spécifiquement cinq gènes à l'origine de la production des toxines létales majeures α , $\beta 1$, $\beta 2$, ϵ et ι . Les résultats obtenus sont en concordance avec les travaux publiés (prédominance du toxinotype A de *Clostridium perfringens*) et montrent l'importance de cet agent dans les fortes mortalités engendrées par cette pathologie en Algérie.

Cette méthode est, certes, trop onéreuse et peu utilisable en pratique courante mais c'est une technique qui s'est révélée très performante et rapide (résultats obtenus en quelques heures) pour préciser le diagnostic des entérotoxémies. Elle s'avère être la technique de choix dans le cas des investigations épidémiologiques réalisées sur un plus grand effectif et ce, pour lutter contre les entérotoxémies animales grâce à la possibilité qu'elle offre pour la fabrication de vaccins appropriés à la situation épidémiologique du terrain.

Cependant, l'existence de l'hypothèse évoquant la possibilité d'une éventuelle cure des plasmides de *Clostridium perfringens* lors des opérations de repiquage dans les séries, laisse envisager, comme perspective, l'utilisation de techniques combinées avec la PCR, pouvant mettre en évidence l'éventuelle perte de ces plasmides, conduisant ainsi à la précision du diagnostic expérimental.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- * AL-MASHAT R.R., TAYLOR D.J. Bacteria in enteric lesions of cattle. *Vet. Rec.*, 1983, 112 : 5-10
- * BACCIARINI L.N., GRONE A., FREY J. *Clostridium perfringens* β 2 toxin in an African elephant (*Loxodonta africana*) with ulcerative enteritis. *Vet. Rec.*, 2001, 149 : 618-620
- * BAILLEUL M.N. Etude diagnostique et pathogénique des entérotoxémies chez les bovins. Thèse de doctorat vétérinaire, faculté de Médecine de Créteil, 1982, 105
- * BENTANCOR ADRIANA B., MARCELO RODRIGUEZ FERME P, LUIS D. BENTANCOR, RAMO DE TORRES. FEMS Detection of the etx gene (ϵ -toxin inducer) in plasmids of high molecular weight in *Clostridium perfringens* type D. *Immunology and Medical Microbiology.*, 1999, 24: 373-377
- * BILLINGTON S.J., WIECKOWSKI E.U., SARKER M.R., BUESCHEL D., SONGER J.G., McCLANE B.A. *Clostridium perfringens* type E animals enteritis isolates with highly conserved, silent enterotoxin gene sequences. *Infection and immunity.*, 1998, Vol 66, 9: 4531-4536
- * BLAND S., SEDALLIAN A., DUBREIL L. *Clostridium* autres que *Clostridium difficile*. Précis de bactériologie Clinique. *ESKA* ., 2000, 94 : 1569-1576
- * BORRMANN E., GUNTHER H., KOHLER H. Effect of *Clostridium perfringens* epsilon toxin on MDCK cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.*, 2001, 31: 85-92
- * BOQUET P., MUNRO P., FIORENTINI C., INGO J. Toxins from anaerobic bacteria : specificity and molecular mechanisms of action toxins from anaerobic bacteria. *Current Opinion in Microbiology.*, 1998, 1: 66-74
- * BRONZI D. Pathologie ovine Les entérotoxémies. L'Action Vétérinaire n°1608. 2002
- * BRUCE A., McCLANE., JAMES L., MCDONNEL. The effect of *Clostridium perfringens* on morphology, viability and macromolecular synthesis in Vero Cells. *J. Cell. Physiol.*, 1979, 99: 191-200
- * BUOGO C., CAPAUL S., HANI H., FREY J., NICOLET J. Diagnostic of *Clostridium perfringens* type C enteritis in pigs using a DNA amplification technique (PCR). *J. Vet. Med.*, 1995, 42: 51-58
- * CARTER G.R., COLE J.R. *Clostridium*, Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology, fifth edition, 1990, 620
- * COTTEREAU P. Toxi-infections provoquées par des aliments infectés par des germes anaérobies notamment par *W.perfringens* et *W.agni*. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 1967, 67 (9-10) : 1293-1306
- * DAUBE G. *Clostridium perfringens* et pathologies digestives. *Ann. Med. Vet.*, 1992, 136 : 5-30
- * DAUBE G., SIMON P., LIMBOURG B., MANTECA C., MAINIL., KAECKENBEECK A. Hybridization of 2,659 *Clostridium perfringens* isolates with gene probes for seven toxins (α , β , ϵ , ι , θ , μ , and enterotoxin) and for sialidase. *Am. J.Vet. Res.*, 1996, 57(4): 496-501
- * DAUBE G., SIMON P., LIMBOURG B., RENIER K., KAECKENBEECK A. Apport de la génétique moléculaire dans la caractérisation de l'espèce *Clostridium perfringens*. *Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales. Ed AUPELF-Uref. John libbey Eurotext. Paris.*, 1994: 159-175

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- * DONELLI G., FIORENTINI C., MATARRESE P., FALZANO L., CARDINES R., MASTRANTONIO P., DEAN W.P., TITBALL R.W. Evidence for cytoskeletal changes secondary to plasma membrane functional alterations in the vitro cell response to *Clostridium perfringens* epsilon-toxin. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious diseases.*, 2003, 26: 145-156
- * DRIGO I., AGNOLETTI F., BACCHIN C., BETTINI F., COCCHI M., FERRO T., MARCON B., BANO L. Toxin genotyping of *Clostridium perfringens* field strains isolated from healthy and diseased chickens. *Ital. J. Anim. Sci.*, 2008, Vol. 7: 397-400
- * DUCLUZEAU R., RAIBAUD P. Les interactions bactériennes dans le tube digestif. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 1989, 8(2) : 291-311
- * DUNCAN C.L., KINGS G.J., FRIEBEN W.R. A paracrystalline inclusion formed during sporulation of enterotoxine producing strains of *Clostridium perfringens* type A. *J. Bacteriol.*, 1973, 114, 845-859
- * DUNCAN C.L., STRONG D.H., SEBALD M. Sporulation and enterotoxin production by mutants of *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.*, 1972, 110: 378-391
- * EATON J.T., NAYLOR C.E., HOWELLS A. M., MOSS D. S., TITBALL R.W., BASAK A.K. Crystal Structure of the *C.perfringens* Alpha-toxin with the Active Site Closed by a Flexible Loop Region. *J. Mol. Biol.*, 2002, 319: 275-281
- * ENGLISH J.E. Field experience with *Clostridium* enterotoxemia in young animals. *J.A.V.M.A.*, 1966, 149(12): 1565-1570
- * FERRANDO R., COTTEREAU PH., RENAULT L., TOUCAS L., MUREAU G., LAPLASSOTE J. Entérotoxémies animales : rôle étiologique de l'alimentation et des méthodes d'élevage. *Rec. Méd. Vet.*, 1967, 143 : 1269-1280
- * FREY J. Toxines clostridiennes: Pathogénie, implications cliniques, diagnostiques et préventives. Cycle de réunions entérotoxémies, 2003-03
- * GEY B. La conception classique de la digestibilité et ses relations avec l'entérotoxémie chez les ruminants. Thèse de doctorat vétérinaire, faculté de médecine de Créteil, 1967, 71
- * GIBERT M., BOQUET P., POPPOFF M.R., PERELLE. Characterisation of *Clostridium perfringens* iota-toxin genes and expression in *Escherichia coli*. *Infec. Immun.*, 1993, 61: 5147-5156
- * GIBERT M., JOLIVET-RENAUD C., POPOFF M. Beta 2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene.*, 1997, 20: 65-73
- * GKIOURTZIDIS K., FREY J., BOURTZI-HATZOPOULOU E., ILIADIS N., SARRIS K. PCR detection and prevalence of α , β 1, β 2, ϵ , ι and enterotoxin genes in *Clostridium perfringens* isolated from lambs with clostridial dysentery. *Vet. Microbiol.*, 2001, 8: 39-43
- * GLOCK R.D., DEGROOT B.D. Sudden death of feedlot cattle. *J. Anim. Sci.*, 1998, 76: 315-319
- * GRECO G., MADIO A., BUONAVOGLIA D., TOTARO M., CORRENTE M., MARTELLA V., BUONAVOGLIA C. *Clostridium perfringens* toxin-types in lambs and kids affected with gastroenteric pathologies in Italy. *Vet. Journal.*, 2005, 170: 346-350
- * GREEN S., GREEN M.J., HILLYER M.H., MORGAN K.L. Injection site reactions and antibody responses in sheep and goats after the use of multivalent clostridial vaccines. *Vet. Rec.*, 1987, 120: 435-439

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- * GREENHAM L.W., HARBER C., LEWIS E., SCULLION F.T. *Clostridium perfringens* in pelleted feed. *Vet. Rec.*, 1987, 12: 557
- * GRISEMER R.A., KRILL W.R. Enterotoxemia in beef calves 30 years' observation. *J.A.V.M.A.*, 1962, 140(2): 154-158
- * HAAGSMA. Pathogenic anaerobic bacteria and the environment. *Rev.sci.tech.int.Epiz.*, 1991, 10 (3): 749-764
- * HEIKINHEIMO A., KORKEALA H. Multiplex PCR assay for toxinotyping *Clostridium perfringens* isolates obtained from finnish broiler chickens. *Letters in Applied Microbiology.*, 2005, 40: 407-411
- * HERHOLZ C., MISEREZ R., NICOLET J., FREY J., POPOFF M.R., GILBERT M., GERBER H., STRAUB R. Prevalence of $\beta 2$ toxigenic *Clostridium perfringens* in horse with intestinal disorders. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, 37: 358-361
- * JARRIGUE R. Principes de la nutrition et l'alimentation des ruminants. Besoins alimentaires des animaux. Valeur nutritive des aliments, Institut National de la Recherche Agronomique, 2nd édition, 1980, 621
- * JOUBERT L., PAPAGEORGIOU C. Epizootologie et prophylaxie des infections anaérobies endogènes des animaux. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 1967, 67(9-10) : 1361-1377
- * KADRA B., GUILLOU J.P., CHIKHI A. Utilisation de la méthode d'amplification génétique (PCR) pour la détermination des types toxiques de *Clostridium perfringens* et la recherche de son entérotoxine. *Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales.*, 1994, Vol. 15, 57-71
- * KADRA B., GUILLOU J.P., POPOFF M., BOURLIOUX P. Typing of sheep clinical isolates and identification of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains by classical methods and by polymerase chain reaction (PCR). *FEMS Immun. and Med. Microbiol.*, 1999, 24: 259-266
- * KALENDER H., ERTAS H.B., CETINKAYA B., MUZ A., ARSLAN N., KILIC A. Typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased sheep by multiplex PCR. *Vet. Med.- Czech.*, 2005, 50(10): 439-442
- * KANAKARAJA R., HARRISA D.L., SONGER J. G., BOSWORTH B. Multiplex PCR assay for detection of *Clostridium perfringens* in feces and intestinal contents of pigs and in swine feed. *Veterinary Microbiology.*, 1998, 63: 29-38
- * KATITCH R.V. Communications sur certaines de nos observations concernant l'épizootologie, la pathogénie et la prophylaxie des entérites provoquées par les *Clostridium perfringens* des types A et C. *Bull. Acad. Vét. De France.*, 1987, 60 : 95-101
- * KLAASEN H.L., MOLKENBOER M.J., BAKKER J., MISEREZ R., HANI H., FREY J., POPPOFF M.R., VAN DEN BOSCH J.F. Detection of $\beta 2$ gene of *Clostridium perfringens* in diarrhoeic piglets in the Netherlands and Switzerland. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1999, 24 : 325-332
- * LATOUR P. Les entérotoxémies chez les bovins : bilan bibliographique et contribution à l'amélioration du diagnostic nécropsique et bactériologique, Thèse de doctorat vétérinaire, Lyon, 2004, 174
- * LEFEVRE P.C., BLANCOU J., LHERMITTE R. Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail : Europe et régions chaudes 2. 2003, 1064-1072

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- * MANTECA CH., DAUBE G. Etude de l'entérotoxémie bovine en Belgique I. Introduction et contexte bibliographique. *Ann. Med. Vet.*, 1994, 138 : 155-164
- * MANTECA CH., DAUBE G., JAUNIAUX T., LINDEN A., PIRSON V., DETILLEUX J., GINTER A., COPPE P., KAECKENBEECK A., MAINIL J.G. A role for the *Clostridium perfringens* β 2 toxin in bovine enterotoxaemia. *Veterinary Microbiology.*, 2002, 86: 191-202
- * MANTECA C., DAUBE G., PIRSON V., LIMBOURG B., KAECKENBEECK A., MAINIL J.G. Bacterial intestinal flora associated with enterotoxaemia in belgian blue calves. *Vet. Microbiol.*, 2001, 81: 21-32
- * MANTECA CH., KAECKENBEECK C. Des postulats de Koch à l'entérotoxémie bovine : petites histoires et vieux papiers. *Ann. Med. Vet.*, 2000, 144 : 405-408
- * MANTECA CH., LINDEN A., JAUNIAUX T., GINTER A., KAECKENBEECK A., MAINIL J.G. Première évaluation des rôles pathogènes des toxines α et β 2 lors d'entérotoxémie bovine. Journées nationales des GTV Nantes, 2003, 745
- * MEER R.R., SONGER G. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *Am. J. Vet. Res.*, 1997, 58(7) : 702-705
- * MEUGNIER H., REGLI A.S., FRENEY J. Les méthodes de diagnostic moléculaire en bactériologie. Précis de bactériologie clinique. *ESKA.*, 2000, 94 : 159-192
- * MIYAKAWA F.M.E., UZAL F.A. The early effects of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in ligated intestinal loops of goats and sheep. *Vet. Res. Commun.*, 2003, 27(3) : 231-241
- * MORAILLON P., YALCIN N. Contribution à l'étude étiologique des welchioses animales. *Bull. O.I.E.*, 1967, 67, 9/10: 1329-1350
- * MUMFORD B.H. Enterotoxemia in cattle. *Aus. Vet. J.*, 1961, 37: 122-126
- * NAGAHAMA M., MICHIEUE K., SAKURAI J. Membrane-damaging action of *Clostridium perfringens* alpha-toxin on phospholipid liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1996, 1280: 120-126a
- * NAGAHAMA M., MICHIEUE K., SAKURAI J. Production and purification of *Clostridium perfringens* alpha-toxin using a protei-hyperproducing strain, *Bacillus brevis* 47. *FEMS Microbiology Letters.*, 1996, 145: 239-243b
- * NAIK H.S., DUNCAN C.L. Rapid detection and quantitation of *Clostridium perfringens* enterotoxin by counter-immuno-electrophoresis. *Appl. Microb.*, 1977, 34: 125-128
- * NILO L. *Clostridium perfringens* type C Enterotoxemia. *Can Vet.*, 1988, Vol 29, 658-664
- * NILO L. *Clostridium perfringens* in animal disease: a review of current knowledge. *Can. Vet. J.*, 1980, 21: 141-148
- * NILO L. Effect on calves of the intravenous injection of the enterotoxin of *Clostridium welchii* type A. *Jour. of Comp. Pathol.*, 1973, 83(2): 265-269
- * NOVAKA J.S., JUNEJAA V.K., MCCLANE B.A. An ultrastructural comparison of spores from various strains of *Clostridium perfringens* and correlations with heat resistance parameters. *International Journal of Food Microbiology.*, 2003, 2677: 1-9
- * PETIT L., GIBERT M., POPOFF M. R. *Clostridium perfringens* toxinotype and genotype. *Trends in microbiology.*, 1999, 104, Vol 7, n°3
- * PHILIPPEAU C., JULLIAND V., GONCALVES S. La place des entérotoxémies dans les morts subites en élevage charolais. *Journée Nationale GTV-Nantes.*, 2003, 225-240

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- * PIATTI R.M., IKUNO A.A., BALDASSI L. Detection of bovine *Clostridium perfringens* by polymerase chain reaction. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 2004, Vol 10, n° 2 : 154-160
- * POPOFF M.R. Clostridial Toxins Cycle de réunions entérotoxémies, 2003-03
- * POPOFF M.R. Entérotoxines bactériennes: structure, mode d'action et approche vaccinale. *Revue Med. Vet.*, 1996, 147(6) : 425-438
- * POPOFF M. Les affections à clostridium chez les ovins. *Bull.GTV.*, 1994, 3 : 43-50
- * POPOFF M. Les entérotoxémies. *Revue Med. Vet.*, 1989, 140 : 479-491
- * PICARD P., PHILIPPEAU C., JULLIAND V., MATHEVET P. Les entérotoxémies chez les bovines charolais de Bourgogne: les leçons de cinq ans d'étude. *Bull.G.T.V.*, 2005, 31: 39-43
- * POURCHER S. Apport diagnostique du dénombrement de *Clostridium perfringens* dans l'intestin grêle des ruminants suspects d'entérotoxémie, Thèse de doctorat vétérinaire, Lyon, 2007, 148
- * PREVOT A.R., JACOTOT H., VALLEE A. Recrudescence des infections animales à *Clostridium perfringens* A. *Bulletin de l'académie vétérinaire de France.*, 1961, 34 : 267-275
- * SAKURAI J., NAGAHAMA M., HISATSUNE J., KATUNUMA N., TSUGE H. *Clostridium perfringens* ι -toxin, ADP-ribosyltransferase: structure and mechanism of action. *Advance in Enzyme Regulation.*, 2003, 1-16
- * SAVAGE D.C. L'écosystème digestif et sa colonisation. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 1989, 8(2): 275-290
- * SAWIRES Y.S., SONGER J.G. *Clostridium perfringens*: insight into virulence evolution and population structure. *Anaerobe.*, 2005, 11 : 303-324
- * SCHELCHER F., CABANIE P. Principales causes de mort subite des bovins, *Le Point Vétérinaire.*, 2002, 228 : 20-26
- * SEDALLIAN A. Isolement et identification des bactéries anaérobies strictes. Principaux germes isolés de produits pathologiques. *Med. Mal. Infect.*, 1990, 20 : 83-88
- * SHIMIZU T., OHTANI K., HIRAKAWA K., YAMASHITA A., SHIBA T., OGASAWARA N., HATTORI M., KUHARA S., HAYASHI H. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens* an aerobic flesh eater. *Proc. Natl Acad. Sci.U.S.A.*, 2002, 99: 996-1001a
- * SHIMIZU T., SHIMA K., YOSHINO K., YONEZAWA K., SHIMIZU T., HAYASHI H. Proteome and transcriptome analysis of the virulence genes regulated by the VirR/VirS system in *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.*, 2002, 184: 2587-2594b
- * SMITH B.P., Diseases caused by *Clostridium perfringens* toxins, Large animal internal medicine. Diseases of horses, cattle, sheep and goat, 2nd edition., 1996, 2040: 768-771
- * SMITH W.P., MCDONEL J.L. *Clostridium perfringens* type A: in vitro system for sporulation and entérotoxine synthesis. *J.Bacteriol.*, 1980, 144, 1: 306-311
- * SONGER J.G. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin. Microbiol.*, 1996, Rev 9, 216-234 a
- * SONGER O.S., SONGER M.J., HILLYER M.H., MORGAN K.L. Injection site and antibody responses in sheep and goats after the use of multivalent clostridial vaccines. *Vet. Rec.*, 1987, 2: 435-439

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- * STAMATIN N., UNGUREANU C. Epizootiologie des clostridioses. *Bull. O.I.E.*, 1967, 67, 9/10: 1251-1292
- * STARK R.L., DUNCAN C.L. Purification and biochemical properties of *Clostridium perfringens* type A entérotoxine. *Inf. Imm.*, 1972, 5: 662-673
- * STERNE M., BATTY I. Pathogenic clostridia. *Butterworths, London.*, 1975
- * SVOBODOVA I., STEINHAUSEROVA I., NEBOLA M. Incidence of *Clostridium perfringens* in broilers chickens in the Czech Republic. *ACTA VET. BRNO.*, 2007, 76: 25-30
- * RAMISSE J., BREMENT A.M., POIRIER J.C., RABREAUD C., SIMONNET P. Flore microbienne isolée au cours de diarrhées néo-natales mortelles chez le veau, l'agneau et le porcelet. *Revue Med Vet.*, 1979, 130(1): 111-122
- * ROOD J.I. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. *Annu. Rev microbiol.*, 1998, 52: 333-360
- * TARTERA P. Les entérotoxémies des ruminants. L'action vétérinaire n°1524. 16 juin 2000
- * THIEDE S., GOETHE R., AMTSBERG G. Prevalence of beta2 toxin gene of *Clostridium perfringens* type A from diarrhoeic dogs. *Vet Rec.*, 2001, 149: 273-274
- * TITBALL R.W., NAYLOR C.E., BASAK A.K. The *Clostridium perfringens* α -toxin. *Anaerobe.*, 1999, 5: 51-64
- * UZAL F.A., Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *Anaerobe.*, 2004, 10:135-143
- * VERON M., LE MINOR L. *Clostridium perfringens*. Bactériologie médicale., 1989a
- * VERON M., LE MINOR L. *Clostridium*, Bactériologie médicale 2nd édition, 1989, 1107
- * WALKER P.D. *Clostridium*. Diagnostic procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology, Fifth Edition. *Academic Press.*, 1990
- * WALKER R. L., HIRSH D. C., MACLACHLAN N.J. *Clostridium*. Veterinary microbiology 2nd edition., 2004, 535
- * WRIGLEY D.M., HANWELLA H.D.S.H., THON B.L. Acid exposure enhances sporulation of certain strains of *Clostridium perfringens*. *Anaerobe.*, 1995, 1: 263-267
- * YOO H.S., LEE S.N., PARK K.Y., PARK Y.H. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology.*, 1997, Vol. 35, n° 1: 228-232

1. VERRERIE ET AUTRES MATERIEL

1. Boîtes de Petri
2. Pipettes Pasteur
3. Tubes de Kahn
4. Pipettes automatiques
5. Embous
6. Tubes Eppendorfs
7. Erlenmeyer
8. Eprouvette
9. Portoires en plastique
10. Plaques de microtitration
11. Peignes

2. APPAREILLAGE

- Fourneau
- Bain-marie: **Memmert**
- Buc bunsen
- Vortex: **Julabo**
- Réfrigérateur: **Boulanache**
- Congélateur: **ENIEM**



Etuve : THERMOSI



Incubateur : Memmert



Hotte à ultraviolets : Captair bio



Centrifugeuse : Bioblock Scientific



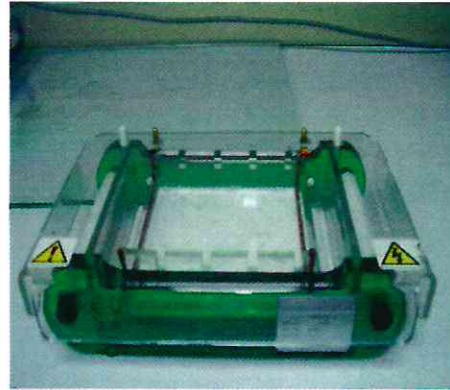
Four à micro-onde : Menumaster



Thermocycleur : TECHNE



Balance électronique



**Appareil d'électrophorèse :
MAX FILL**



**Générateur de courant :
Fisher Scientific (LABOSI)**



**Transilluminateur à UV :
Fischerbrand**

3. REACTIFS ET SOLUTIONS

1. Gélose Columbia®
2. Sang de cheval citraté
3. Anaérocult® P
4. InstaGen Matrix (Biorad)
5. Eau filtrée et stérilisée
6. Eau distillée
7. Tampon PCR 10X – MgCl₂ (1,25 ml, Invitrogen)
8. MgCl₂ (50 µmole, Invitrogen)
9. dNTP_s (25 µmole, Invitrogen)
10. Oligonucleotides amorces (25 nmole, Integrated DNA Technologies)
11. Taq ADN polymérase recombinante (5U/µl, Invitrogen)
12. Agarose electrophoresis grade (100 g, Invitrogen)
13. TAE 1X
14. Ethidium bromide en solution 10 %
15. Bleu de bromophénol
16. Témoins (ADN pure des toxintypes A et D)
17. Marqueur de taille (ØX-174-RF DNA Hae III Digest, 10 µg, Biotech)

4. Formule milieu TGY® (en g/l d'eau distillée)

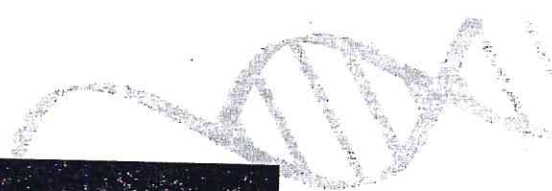
| | |
|-------------------------------|-----|
| Trypticase | 30 |
| Extrait de levure | 20 |
| Glucose | 5 |
| Thioglycolate de sodium | 0,5 |

5. Formule milieu Columbia® (en g/l d'eau distillée)

| | |
|------------------------------|----|
| Peptone bactériologique..... | 5 |
| Extrait de levure..... | 3 |
| Peptone de soja..... | 3 |
| Tryptone..... | 5 |
| Cœur-cerveau..... | 8 |
| Amidon..... | 1 |
| Chlorure de Sodium..... | 5 |
| Agar..... | 18 |

6. Formule pour le TAE 50 X

| | |
|-----------------------------|---------|
| Tris base..... | 240 g |
| Acide acétique glacial..... | 57,1 ml |
| EDTA..... | 20 g |
| H ₂ O qsp..... | 1000 ml |



28-Apr-2009

Order No. **2011511**

Ref. No. **60231904**

Sequence - PL3 α (4)

25 nmole DNA Oligo, 24 bases

5' **AAG TTA CCT TTG CTG CAT AAT CCC** -3'

| Properties | Amount Of Oligo | Shipped To |
|---|--|--|
| T_m (50mM NaCl): 55.6 °C GC Content: 41.6% Molecular Weight: 7,262.8 nMoles/OD260: 4.5 μ g/OD260: 32.6 Ext. Coefficient: 223,100 L/(mole·cm) | 7.6 = 34.10 = 0.25 OD 260 nMoles mg | AGNES TATRAI BIO-SCIENCE, LTD. ANDOR UTCA 47-49 BUDAPEST, HU H-1119 HUNGARY 3614635069 Customer No. 4205361 PO No. BIO IDT 110/C |

Secondary Structure Calculations

Lowest folding free energy (kcal/mole): 0.68 at 25 °C
Strongest Folding T_m : 12.5 °C

Oligo Base Types

| Oligo Base Types | Quantity |
|------------------|----------|
| DN Bases | 24 |

Disclaimer

See on reverse page notes (I) (II) & (III) for usage, label license, and product warranties

Modifications And Services

| Modifications And Services | Quantity |
|----------------------------|----------|
| Standard Desalting | 1 |

Fig ID 160515023 Labels - Peel Here

| | |
|--|--|
| 60231904 XX IDT A.TATRAI 160515023 4/28/2009 PL3 5'-AAG TTA CCT TTG CTG CAT AAT CCC-3' T_m = 55.6 °C , MW= 7,262.8 7.6OD ₂₆₀ 34.10nmol 0.25mg | 60231904 XX IDT A.TATRAI 160515023 4/28/2009 PL3 5'-AAG TTA CCT TTG CTG CAT AAT CCC-3' T_m = 55.6 °C , MW= 7,262.8 7.6OD ₂₆₀ 34.10nmol 0.25mg |
|--|--|

I N S T R U C T I O N S

Lyophilized contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of the oligo

Please centrifuge tubes prior to opening. Some of the product may have been dislodged during shipping.



28-Apr-2009

Order No. **2011511**

Ref. No. **60231905**

Sequence - PL7 α (2)

25 nmole DNA Oligo, 24 bases

5' **ATA GAT ACT CCA TAT CAT CCT GCT** -3'

| Properties | Amount Of Oligo | Shipped To |
|---|--|--|
| T_m (50mM NaCl): 52.5 °C GC Content: 37.5% Molecular Weight: 7,246.8 nmoles/OD260: 4.3 μ g/OD260: 31.5 Ext. Coefficient: 229,900 L/(mole·cm) | 6.9 = 30.20 = 0.22 OD 260 nMoles mg | AGNES TATRAI BIO-SCIENCE, LTD. ANDOR UTCA 47-49 BUDAPEST, HU H-1119 HUNGARY 3614635069 Customer No. 4205361 PO No. BIO IDT 110/C |

Secondary Structure Calculations

Lowest folding free energy (kcal/mole): -1.43 at 25 °C

Strongest Folding T_m : 37.6 °C

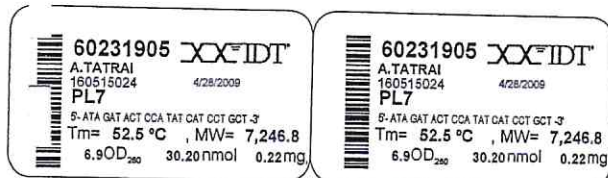
| Oligo Base Types | Quantity |
|------------------|----------|
| DNA Bases | 24 |

Disclaimer

See on reverse page notes (I) (II) & (III) for usage, label license, and product warranties

| Modifications And Services | Quantity |
|----------------------------|----------|
| Standard Desalting | 1 |

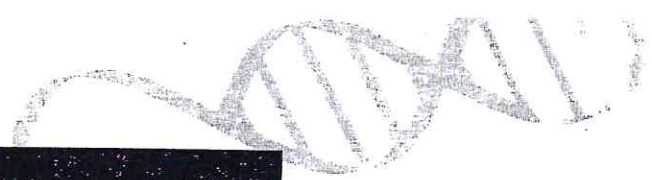
vfg_ID 160515024 Labels - Peel Here



I N S T R U C T I O N S

Lyophilized contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of the oligo

Please centrifuge tubes prior to opening. Some of the product may have been dislodged during shipping.



28-Apr-2009

Order No. **2011511**

Ref. No. **60231906**

Sequence - 463 *pa (1)*

25 nmole DNA Oligo, 30 bases

5'-CTA ATA TGT CTG TAG TTC TAA CTG CTC CTA-3'

Properties

T_m (50mM NaCl): 55.3 °C
GC Content: 36.6%
Molecular Weight: 9,122.0
nmoles/OD260: 3.5
µg/OD260: 32.3
Ext. Coefficient: 282,200 L/(mole·cm)

Amount Of Oligo

9.6 = 34.10 = 0.31
OD 260 nMoles mg

Shipped To

AGNES TATRAI
BIO-SCIENCE, LTD.
ANDOR UTCA 47-49
BUDAPEST, HU H-1119
HUNGARY
3614635069
Customer No. 4205361 PO No. BIO IDT 110/C

Secondary Structure Calculations

Lowest folding free energy (kcal/mole): -1.22 at 25 °C

Strongest Folding T_m : 38.6 °C

Oligo Base Types

DNA Bases 30

Disclaimer

See on reverse page notes (I) (II) & (III) for usage, label license, and product warranties

Modifications And Services

Standard Desalting 1

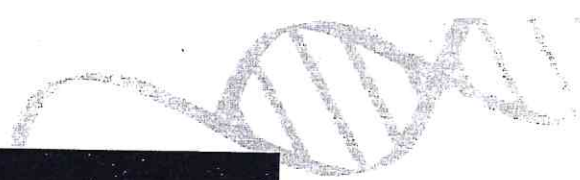
Wfg. ID 160515025 Labels - Peel Here

| | |
|--|--|
| <p>60231906 XX=IDT A.TATRAI 160515025 4/28/2009 463 5'-CTA ATA TGT CTG TAG TTC TAA CTG CTC CTA-3' T_m= 55.3 °C , MW= 9,122.0 9.6OD₂₆₀ 34.10 nmol 0.31 mg</p> | <p>60231906 XX=IDT A.TATRAI 160515025 4/28/2009 463 5'-CTA ATA TGT CTG TAG TTC TAA CTG CTC CTA-3' T_m= 55.3 °C , MW= 9,122.0 9.6OD₂₆₀ 34.10 nmol 0.31 mg</p> |
|--|--|

I N S T R U C T I O N S

Lyophilized contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of the oligo

Please centrifuge tubes prior to opening. Some of the product may have been dislodged during shipping.



28-Apr-2009

Order No. **2011511**

Ref. No. **60231907**

Sequence - 464 bp (L)

25 nmole DNA Oligo, 30 bases

5' TAT CTA CAT TTG GGG TAT CAA AAG CTA GCC -3'

Properties

Tr (50mM NaCl): 58.2 °C
GC Content: 40. %
Molecular Weight: 9,205.0
nmoles/OD260: 3.4
ug/OD260: 31.4
Ext. Coefficient: 293,600 L/(mole·cm)

Amount Of Oligo

9.7 = 33.00 = 0.30
OD 260 nMoles mg

Shipped To

AGNES TATRAI
BIO-SCIENCE, LTD.
ANDOR UTCA 47-49
BUDAPEST, HU H-1119
HUNGARY
3614635069
Customer No. 4205361 PO No. BIO IDT 110/C

Secondary Structure Calculations

Lowest folding free energy (kcal/mole): -0.63 at 25 °C

Strongest Folding Tm: 31.3 °C

Oligo Base Types

DNA Bases 30

Disclaimer

See on reverse page notes (I) (II) & (III) for usage, label license, and product warranties

Modifications And Services

Standard Desalting 1

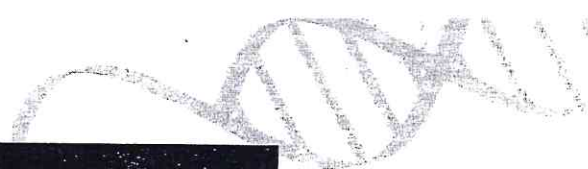
VfaJD 160515026 Labels - Peel Here

| | |
|--|--|
| <p>60231907 XX=IDT A.TATRAI 160515026 4/28/2009 464 5'-TAT CTA CAT TTG GGG TAT CAA AAG CTA GCC-3' Tm= 58.2 °C , MW= 9,205.0 9.7OD₂₆₀ 33.00 nmol 0.30 mg</p> | <p>60231907 XX=IDT A.TATRAI 160515026 4/28/2009 464 5'-TAT CTA CAT TTG GGG TAT CAA AAG CTA GCC-3' Tm= 58.2 °C , MW= 9,205.0 9.7OD₂₆₀ 33.00 nmol 0.30 mg</p> |
|--|--|

I N S T R U C T I O N S

Lyophilized contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of the oligo

Please centrifuge tubes prior to opening. Some of the product may have been dislodged during shipping.



28-Apr-2009

Order No. **2011511**

Ref. No. **60231908**

Sequence - 465 μ g, (L)

25 nmole DNA Oligo, 30 bases

5' **TTT TCT ATA TAT AAT CTT ATT TGT CTA GCA** -3'

Properties

T_m (50mM NaCl): 49.4 °C
GC Content: 20. %
Molecular Weight: 9,126.0
nmoles/OD260: 3.5
 μ g/OD260: 31.6
Ext. Coefficient: 288,700 L/(mole·cm)

Amount Of Oligo

8.7 = 30.00 = 0.27
OD 260 nMoles mg

Shipped To

AGNES TATRAI
BIO-SCIENCE, LTD.
ANDOR UTCA 47-49
BUDAPEST, HU H-1119
HUNGARY
3614635069
Customer No. 4205361 PO No. BIO IDT 110/C

Secondary Structure Calculations

Lowest folding free energy (kcal/mole): 0.33 at 25 °C

Strongest Folding T_m : 21.3 °C

Oligo Base Types

DNA Bases 30

Disclaimer

See on reverse page notes (I) (II) & (III) for usage, label license, and product warranties

Modifications And Services

Standard Desalting 1

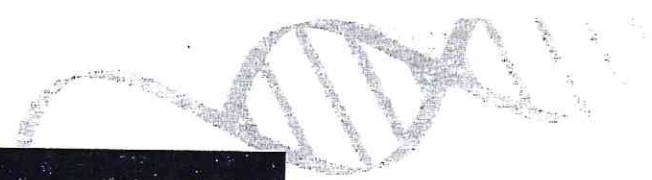
Mfg. ID 160514846 Labels - Peel Here

| | |
|--|--|
| <p>60231908 XX=IDT A.TATRAI 160514846 4/28/2009 465 5'-TTT TCT ATA TAT AAT CTT ATT TGT CTA GCA-3' T_m= 49.4 °C , MW= 9,126.0 8.7OD₂₆₀ 30.00nmol 0.27mg</p> | <p>60231908 XX=IDT A.TATRAI 160514846 4/28/2009 465 5'-TTT TCT ATA TAT AAT CTT ATT TGT CTA GCA-3' T_m= 49.4 °C , MW= 9,126.0 8.7OD₂₆₀ 30.00nmol 0.27mg</p> |
|--|--|

I N S T R U C T I O N S

Lyophilized contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of the oligo

Please centrifuge tubes prior to opening. Some of the product may have been dislodged during shipping.



28-Apr-2009

Order No. **2011511**

Ref. No. **60231909**

Sequence - 466 β_2 (2)

25 nmole DNA Oligo, 30 bases

5' AGT TTG TAC ATG GGA TGA TGA ACT AGC ACA -3'

Properties

Tr (50mM NaCl): 59.6 °C
GC Content: 40. %
Molecular Weight: 9,294.1
moles/OD260: 3.3
ug/OD260: 30.3
Ext. Coefficient: 306,600 L/(mole·cm)

Amount Of Oligo

9.7 = 31.70 = 0.29
OD 260 nMoles mg

Shipped To

AGNES TATRAI
BIO-SCIENCE, LTD.
ANDOR UTCA 47-49
BUDAPEST, HU H-1119
HUNGARY
3614635069
Customer No. 4205361 PO No. BIO IDT 110/C

Secondary Structure Calculations

Lowest folding free energy (kcal/mole): -0.96 at 25 °C
Strongest Folding Tm: 39.3 °C

Oligo Base Types

DNA Bases 30



Disclaimer

See on reverse page notes (I) (II) & (III) for usage, label license, and product warranties

Modifications And Services

Standard Desalting 1

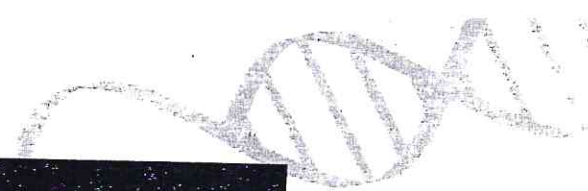
Mfg ID 160514847 Labels - Peel Here

| | |
|---|---|
|  60231909 XX=IDT A.TATRAI 160514847 4/28/2009 466 5'-AGT TTG TAC ATG GGA TGA TGA ACT AGC ACA-3' Tm= 59.6 °C , MW= 9,294.1 9.7OD ₂₆₀ 31.70 nmol 0.29 mg |  60231909 XX=IDT A.TATRAI 160514847 4/28/2009 466 5'-AGT TTG TAC ATG GGA TGA TGA ACT AGC ACA-3' Tm= 59.6 °C , MW= 9,294.1 9.7OD ₂₆₀ 31.70 nmol 0.29 mg |
|---|---|

I N S T R U C T I O N S

Lyophilized contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of the oligo

Please centrifuge tubes prior to opening. Some of the product may have been dislodged during shipping.



28-Apr-2009

Order No. **2011511**

Ref. No. **60231910**

Sequence - 497 Σ (4)

25 nmole DNA Oligo, 26 bases

5'-GTC CCT TCA CAA GAT ATA CTA GTA CC-3'

| Properties | Amount Of Oligo | Shipped To |
|---|--|--|
| T_m (50mM NaCl): 54.0 °C GC Content: 42.3% | 8.4 = 33.10 = 0.26 OD 260 nMoles mg | AGNES TATRAI BIO-SCIENCE, LTD. ANDOR UTCA 47-49 BUDAPEST, HU H-1119 HUNGARY 3614635069 Customer No. 4205361 PO No. BIO IDT 110/C |
| Molecular Weight: 7,874.2 nmoles/OD260: 4.0 ug/OD260: 31.2 Ext. Coefficient: 252,300 L/(mole·cm) | | |

Secondary Structure Calculations

Lowest folding free energy (kcal/mole): -0.3 at 25 °C
Strongest Folding T_m : 29.7 °C

Oligo Base Types

| Oligo Base Types | Quantity |
|------------------|----------|
| DNA Bases | 26 |

Disclaimer

See on reverse page notes (I) (II) & (III) for usage, label license, and product warranties

Modifications And Services

| Modifications And Services | Quantity |
|----------------------------|----------|
| Standard Desalting | 1 |

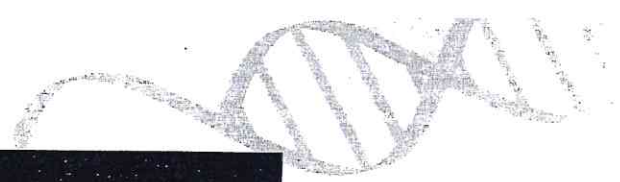
497-D 160514848 Labels - Peel Here

| | |
|--|--|
| <p>60231910 XX IDT[®] A.TATRAI 160514848 4/28/2009 497 5'-GTC CCT TCA CAA GAT ATA CTA GTA CC-3' T_m= 54.0 °C, MW= 7,874.2 8.4OD₂₆₀ 33.10nmol 0.26mg</p> | <p>60231910 XX IDT[®] A.TATRAI 160514848 4/28/2009 497 5'-GTC CCT TCA CAA GAT ATA CTA GTA CC-3' T_m= 54.0 °C, MW= 7,874.2 8.4OD₂₆₀ 33.10nmol 0.26mg</p> |
|--|--|

I N S T R U C T I O N S

Lyophilized contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of the oligo

Please centrifuge tubes prior to opening. Some of the product may have been dislodged during shipping.



28-Apr-2009

Order No. **2011511**

Ref. No. **60231911**

25 nmole DNA Oligo, 24 bases

Reference - 498 E (2)

5'- CCT AGG AAA AGC TAA ATA ACT AGG -3'

Properties

T_m: 50mM NaCl): 50.7 °C
GC Content: 37.5%
Molecular Weight: 7,402.9
nMoles/OD260: 4.0
ug/OD260: 29.5
Ext. Coefficient: 250,800 L/(mole·cm)

Amount Of Oligo

7.5 = 29.80 = 0.22
OD 260 nMoles mg

Shipped To

AGNES TATRAI
BIO-SCIENCE, LTD.
ANDOR UTCA 47-49
BUDAPEST, HU H-1119
HUNGARY
3614635069
Customer No. 4205361 PO No. BIO IDT 110/C

Secondary Structure Calculations

Lowest folding free energy (kcal/mole): -1.36 at 25 °C
Strongest Folding T_m: 37.5 °C

Oligo Base Types

| Oligo Base Types | Quantity |
|------------------|----------|
| DNA Bases | 24 |

Disclaimer

See on reverse page notes (I) (II) & (III) for usage, label license, and product warranties

Modifications And Services

| Modifications And Services | Quantity |
|----------------------------|----------|
| Standard Desalting | 1 |

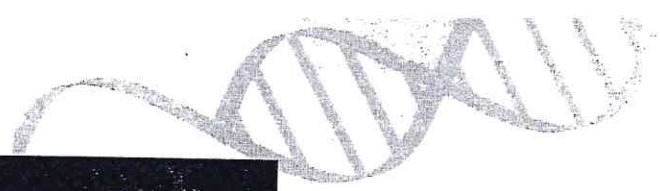
Mfg. ID 160514849 Labels - Peel Here

| | |
|---|---|
| 60231911 XX=IDT A.TATRAI 160514849 4/28/2009 498 5'- CCT AGG AAA AGC TAA ATA ACT AGG -3' T _m = 50.7 °C , MW= 7,402.9 7.5OD ₂₆₀ 29.80nmol 0.22mg | 60231911 XX=IDT A.TATRAI 160514849 4/28/2009 498 5'- CCT AGG AAA AGC TAA ATA ACT AGG -3' T _m = 50.7 °C , MW= 7,402.9 7.5OD ₂₆₀ 29.80nmol 0.22mg |
|---|---|

I N S T R U C T I O N S

Lyophilized contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of the oligo

Please centrifuge tubes prior to opening. Some of the product may have been dislodged during shipping.



04-May-2009

Order No. **2011834**

Ref. No. **60238503**

Sequence - CPlotaF2 *ivera* (A)

25 nmole DNA Oligo, 20 bases

5'- AAT GGT CCT TTA AAT AAT CC -3'

| Properties | Amount Of Oligo | Shipped To |
|---|--|---|
| <i>T_m</i> (50mM NaCl): 45.1 °C GC Content: 30. % Molecular Weight: 6,075.0 nmoles/OD260: 5.1 ug/OD260: 30.8 Ext. Coefficient: 197,300 L/(mole·cm) | 6.7 = 33.90 = 0.21 OD 260 nMoles mg | AGNES TATRAI BIO-SCIENCE, LTD. ANDOR UTCA 47-49 BUDAPEST, HU H-11119 HUNGARY 3614635069 Customer No. 4205361 PO No. REMAKE NO C |

Secondary Structure Calculations

Lowest folding free energy (kcal/mole): 0.96 at 25 °C
Strongest Folding Tm: 10.1 °C

| Oligo Base Types | Quantity |
|------------------|----------|
| DNA Bases | 20 |

Disclaimer

See on reverse page notes (I) (II) & (III) for usage, label license, and product warranties

| Modifications And Services | Quantity |
|----------------------------|----------|
| Standard Desalting | 1 |

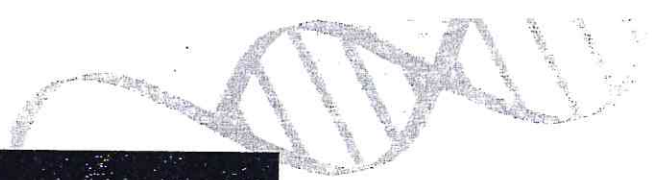
Mfg-ID 160517779 Labels - Peel Here

| | |
|---|---|
| 60238503 XX=IDT A.TATRAI 160517779 5/4/2009 CPlotaF2 5'- AAT GGT CCT TTA AAT AAT CC -3' Tm= 45.1 °C , MW= 6,075.0 6.7OD ₂₆₀ 33.90 nmol 0.21 mg | 60238503 XX=IDT A.TATRAI 160517779 5/4/2009 CPlotaF2 5'- AAT GGT CCT TTA AAT AAT CC -3' Tm= 45.1 °C , MW= 6,075.0 6.7OD ₂₆₀ 33.90 nmol 0.21 mg |
|---|---|

I N S T R U C T I O N S

Lyophilized contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of the oligo

Please centrifuge tubes prior to opening. Some of the product may have been dislodged during shipping.



04-May-2009

Order No. **2011834**

Ref. No. **60238504**

Sequence - CplotaR (2)

25 nmole DNA Oligo, 20 bases

5'-TTA GCA AAT GCA CTC ATA TT-3'

Properties

Tr (50mM NaCl): 47.4 °C
GC Content: 30. %
Molecular Weight: 6,075.0
nmoles/OD260: 5.1
ug/OD260: 31.1
Ext. Coefficient: 195,100 L/(mole·cm)

Amount Of Oligo

6.6 = 34.10 = 0.21
OD 260 nMoles mg

Shipped To

AGNES TATRAI
BIO-SCIENCE, LTD.
ANDOR UTCA 47-49
BUDAPEST, HU H-1119
HUNGARY
3614635069
Customer No. 4205361 PO No. REMAKE NO C

Secondary Structure Calculations

Lowest folding free energy (kcal/mole): -1.42 at 25 °C
Strongest Folding Tm: 42.4 °C

Oligo Base Types

DNA Bases 20



Disclaimer

See on reverse page notes (I) (II) & (III) for usage, label license, and product warranties

Modifications And Services

Standard Desalting 1

MF-ID 160517780 Labels - Peel Here

| | |
|---|---|
|  60238504 XX=IDT A.TATRAI 160517780 5/4/2009 CplotaR 5'-TTA GCA AAT GCA CTC ATA TT-3' Tm= 47.4 °C , MW= 6,075.0 6.6OD ₂₆₀ 34.10nmol 0.21mg |  60238504 XX=IDT A.TATRAI 160517780 5/4/2009 CplotaR 5'-TTA GCA AAT GCA CTC ATA TT-3' Tm= 47.4 °C , MW= 6,075.0 6.6OD ₂₆₀ 34.10nmol 0.21mg |
|---|---|

I N S T R U C T I O N S

Lyophilized contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of the oligo

Please centrifuge tubes prior to opening. Some of the product may have been dislodged during shipping.

LES TABLEAUX BRUTSTableau V : Tableau récapitulatif des 31 souches étudiées.

| N° d'ordre | N° Souche | Origine | Culture | Identification | PCR | | | | | Type toxinique |
|---------------|--------------|---------------------------------|---------|----------------|----------|-----------|-----------|---------------|---------|-------------------|
| | | | | | α | $\beta 1$ | $\beta 2$ | ε | ι | |
| 1 | 276 | Contenu intestinal Mouton | + | Cp | + | - | - | - | - | A |
| 2 | 257 | Idem | + | Cp | + | - | - | - | - | A |
| 3 | 254 | Idem | + | Cp | + | - | - | - | - | A |
| 4 | 272 | Idem | + | Cp | + | - | - | - | - | A |
| 5 | 271 | Idem | + | Cp | + | - | - | - | - | A |
| 6 | 273 | Idem | + | Cp | + | - | - | - | - | A |
| 7 | 280 | idem | + | Cp | + | - | - | - | - | A |
| 8 | 143 | Organe (intestin) PC | + | Cp | + | - | - | - | - | A |
| 9 | 179 | Organe (cœur) MM | + | Cp | + | - | - | - | - | A |
| 10 | 277 | Contenu intestinal Mouton | + | Cp | + | - | - | - | - | A |
| 11 | 278 | Idem | + | Cp | + | - | - | - | - | A |
| 12 | 255 | Idem | + | Cp | + | - | - | - | - | A |
| 13 | 180 | Organe (foie) MM | + | Cp | + | - | - | - | - | A |
| 14 | 144 | Organe (foie, rate) PC | + | Cp | + | - | - | - | - | A |
| 15 | 145 | Organe (intestin) PC | + | Cp | + | - | - | - | - | A |

| | | | | | | | | | | |
|----|-----|---------------------------------|---|----|---|---|---|---|---|---|
| 16 | 131 | Organe (foie, rate) Lapin | + | Cp | + | - | - | - | - | A |
| 17 | 138 | Organe (foie, rate) PC | + | Cp | + | - | - | - | - | A |
| 18 | 140 | Idem | + | Cp | + | - | - | - | - | A |
| 19 | 148 | Idem | + | Cp | + | - | - | - | - | A |
| 20 | 149 | Organe (intestin) PC | + | Cp | + | - | - | - | - | A |
| 21 | 146 | Organe (foie, rate) PC | + | Cp | + | - | - | - | - | A |
| 22 | 147 | Organe (intestin) PC | + | Cp | + | - | - | - | - | A |
| 23 | 139 | Organe (intestin) PC | + | Cp | + | - | - | - | - | A |
| 24 | 184 | Organe (rein) MC | + | Cp | + | - | - | - | - | A |
| 25 | 185 | Organe (rumen) MC | + | Cp | + | - | - | - | - | A |
| 26 | 186 | Organe (foie) MC | + | Cp | + | - | - | - | - | A |
| 27 | 188 | Organe (intestin) MC | + | Cp | + | - | - | - | - | A |
| 28 | 177 | Organe (rein) MM | + | Cp | + | - | - | - | - | A |

| | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----------------------------|---|----|---|---|---|---|---|---|
| 29 | 181 | Organe (caillette) MM | + | Cp | + | - | - | - | - | A |
| 30 | 183 | Organe (caillette) MC | + | Cp | + | - | - | - | - | A |
| 31 | 191 | Organe (reins) MC | + | Cp | + | - | - | - | - | A |

Cp : *Clostridium perfringens*

PC : Poussin de chaire

MM : Mouflon à manchettes

MC : Mouflon corse