



UNIVERSITE DE LIEGE
FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE
DEPARTEMENT DES MALADIES INFECTIEUSES ET PARASITAIRES
SERVICE DE BACTERIOLOGIE

Implication de la toxine beta2 de *Clostridium perfringens* dans le syndrome de l'entérotoxémie bovine.

The beta2 toxin of *Clostridium perfringens*: its place in the cattle enterotoxaemia syndrome.

Maude Lebrun

**THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE
Docteur en Sciences Vétérinaires**

ANNEE ACADEMIQUE 2017-2018

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je tiens d'abord à remercier ma promotrice, le Pr Annick Linden de m'avoir lancée sur le chemin de la recherche et de l'encadrement étudiant. Ainsi que mon co-promoteur, le Pr Jacques Mainil qui m'a ouvert les portes de son laboratoire durant ces sept années à l'Université de Liège. Merci à toute cette belle équipe de bactériologie ! Un merci particulier pour Jean-Noël Duprez et sa bonne humeur légendaire, autant que ses colères et à Annick pour ces moments décalés et la découverte d'Harry Potter.

Je remercie également profondément le Pr Moreno Galleni, le Dr Patrice Filée et toute leur équipe du Centre d'Ingénierie des Protéines de m'avoir accueillie et guidée dans leur laboratoire, à la découverte de la construction génétique, la production et la purification des protéines. C'était une toute nouvelle page pour moi et grâce à vous c'était aussi une expérience aussi instructive qu'agréable.

Merci également et chronologiquement au Dr Bernard Taminiaux qui m'a aidée à lire et à comprendre le séquençage génétique mais également ouvert les portes de la métagénomique et des flores bactériennes complexes, proche de la science-fiction.

Un merci spécial thèse à ces deux savants fous qui m'ont permis d'aller jusqu'au bout et également fait comprendre que la recherche fondamentale n'était pas pour moi-même si je suis très contente d'y avoir goûté: Patrice Filée et Bernard Taminiau. Surtout les gars, continuez comme ça !

Je voudrais également remettre la petite histoire de ma thèse dans son long, très long contexte en rappelant au lecteur innocent que les premiers résultats de ce travail ont été enregistrés sur disquette au départ d'un i Mac bleu roi. Machine au combien sympathique mais désormais obsolète qui équipait nombre de bureaux de l'ULg

Cela veut dire que certains de mes proches ont entre-temps définitivement quitté notre plat pays, et que d'autres y sont nés. Je ne suis pas croyante donc j'ai un sérieux doute sur le fait qu'ils l'entendent un jour mais tant pis. Merci à mes parents, grands-parents et à Dédée qui m'ont appris à ouvrir les yeux et les oreilles sur le monde et les gens qui y vivent, à profiter de ce qu'il nous offre.

Merci à ma petite famille de têtes de mules (dont je suis) qui est toujours-là, thèse ou pas, les jours avec et les jours sans. On a encore beaucoup de belles choses à vivre ensemble.

Merci à ma frangine et sa petite famille à elle : tous ceux de la maison d'à côté. Courage, les travaux se terminent...

Merci à mon parrain et ma marraine, discrets mais toujours présents.

Un merci aussi aux amis d'ici et d'ailleurs. Celles rencontrées et précieusement gardées au cours de mes pérégrinations scolaires : Céline, Virginie, Francisca, Alexandra, Vanessa et Marie-Hélène. Ma famille « judo club athois », qui à côté des tatamis m'a aussi fait découvrir aussi l'esprit de la fête : Dandan, Cinette, Thierry, Marjo, Caro, Virgi, ... Les amis de David qui sont devenus les miens aussi

Merci aussi à mes collègues d'avant et de maintenant, pour leur enthousiasme et leur curiosité. Merci de m'avoir fait confiance et laissé du temps pour terminer cette thèse aussi.

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

A	adénine
A260	absorbance à une longueur d'onde de 260
a.a.	acide(s) aminé(s)
ADP	adenosine diphosphate
ADN - DNA	acides désoxyribonucléiques
Amp	ampicilline
Amy	amylase
Arg	arginine
ARN – RNA	acides ribonucléiques
ARNm - mRNA	ARN messenger
ATCC	American type culture collection
aty	atypique
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BCA	biCinchoninic acid Assay
BHI	brain heart infusion
Bla	beta-lactamase
C	cytosine
<i>C.</i>	<i>Clostridium</i>
°C	degré Celsius
Ca	calcium
Cam	chloramphénicol
CFU – UFC	colony forming unit – unité formant colonie
CIVD	coagulation intravasculaire disséminée
CIP	centre d'ingénierie des protéines
Cl	chlore
CL50	concentration létale 50 (50% de mortalité à cette concentration)
CO ₂	gaz carbonique – dioxyde de carbone
<i>Con(s)</i>	<i>consensus</i>
<i>cpa</i> – CPA - α	<i>Clostridium perfringens</i> toxine alpha (gène – protéine)
<i>cpb</i> – CPB - β	<i>Clostridium perfringens</i> toxine beta (gène – protéine)
<i>cpb2</i> – CPB2 – β 2	<i>Clostridium perfringens</i> toxine beta2 (gène – protéine)
<i>cpb2FM</i> – CPB2FM	<i>Clostridium perfringens</i> toxine beta2 forme mature (gène – protéine)
<i>cpe</i> – CPE	<i>Clostridium perfringens</i> entérotoxine (gène – protéine)
<i>cna</i> – CpCna	<i>Clostridium perfringens</i> protéine liant de collagène, adhésine au collagène (gène – protéine)
CSF	culture fluid supernatant, surnageant de culture
Cys	cystéine
DL50	dose létale 50 (50% de mortalité à cette dose)
DRM's	detergent resistant membrane microarrays, microzones membranaires résistantes aux détergents
DS	diarrhée sporadique
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	éthylène diamine tétra-acétique
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EN	entérite nécrotique
<i>etx</i> – ETX - ϵ	<i>Clostridium perfringens</i> toxine epsilon (gène – protéine)
G	guanine
GTP	guanosine triphosphate
GTPase	guanosine triphosphatase
GST	glutathion S - transférase

h	heure
H ₂	hydrogène
H ₂ PO ₄	dihydrogénophosphate
HBS	haemorrhagic bowel syndrom
HCl	Acide chlorhydrique
Housekeeping genes	gènes de ménage
<i>iap/ibp</i> – Ia/Ib - 1	<i>Clostridium perfringens</i> toxine iota (gène – protéine)
Ile	isoleucine
IPTG	isopropylthiogalactosidase
IS	séquence d'insertion
J.C.	Jésus Christ
JHS – SJH	jejunal haemorrhagic syndrome– syndrome jéjunal hémorragique
K	potassium
KCl	chlorure de potassium
Kan	kanamycine
kb	kilobase nucléotidique
kDa	kilodalton
KO	knock out, délété
LB	Luria Bertani
Leu	leucine
LHM	Long Horn male
μ	micro
μg	microgramme
μM	micromolaire
M	molaire
mg	milligramme
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
ml	millilitre
min	minute
mM	millimolaire
Mol%	pourcentage utilisé basé sur les moles
N ₂	azote
Na	sodium
NaCl	chlorure de sodium
NBT-BCIP	nitro blue tetrazolium / 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
<i>netB</i> – NetB	<i>Clostridium perfringens</i> toxine B de l'entérite nécrotique (gène protéine)
ng	nanogramme
(NH ₄) ₂ SO ₄	sulfate d'ammonium
ORF	open reading frame – phase de lecture ouverte
PAF - FAP	platelet activating facteur – facteur d'activation des plaquettes
Pb	paire de bases
PBS	phosphate buffered saline – tampon phosphate salin
PCR	polymerase chain reaction
PDG	peptidoglycan
PFO	perfringolysine O
<i>Pfu</i>	polymérase de <i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>Pfx</i>	polymérases de <i>Thermococcus sp. Souches recombinantes</i>
pH	potentiel hydrogène
PLA2	phospholipase A2

<i>plc</i> - PLC	phospholipase C (gène – protéine)
PLD	phospholipase D
PMN	polymorphonucléaires neutrophiles
PVDF	polyvinylidène difluoride
rpm	rotation par minute
SDS	sodium dodécylsulfate
SDS-PAGE	électrophore en gel de polyacrylamide avec sodium dodécylsulfate
SNC	système nerveux central
<i>sp.</i>	<i>species</i>
Spc	spectinomycine
T	thymidine
<i>Taq</i>	polymérase de <i>Thermus aquaticus</i>
TCA	trichloroacetic acid
<i>tcp</i>	<i>transfer clostridial plasmid</i>
Tm	température de melting (PCR)
Tris	trishydroxyméthylaminométhane ou 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol
Trp	tryptophane
UDP	uridine (uracil) diphosphate
UI	unité internationale
UV	ultra violet
WB	Western Blot
2XYT	milieu riche à base d'extrait de levure (yeast extract) et tryptone à double concentration (2x)

LISTE DES TABLES ET FIGURES

1. INTRODUCTION ET REVUE DE LITTÉRATURE

1 À 3 - INTRODUCTION GÉNÉRALE

- Table 1: Ancêtre commun au subphylum <i>Bacillus-Clostridium</i>	18
- Table 2: Hétérogénéité des souches de <i>Clostridium sp</i>	18
- Table 3: Toxinotypes des clostridies neurotoxiques et leurs cibles respectives.....	19
- Table 4: Clostridioses histo- et cytotoxiques.....	20
- Table 5: Clostridioses digestives des animaux de rente.....	21
- Table 6: Clostridium et oncologie.....	23
- Table 7: Toxinotypes de <i>C. perfringens</i>	24
- Table 8: Tableau récapitulatif des toxines majeures de <i>C. perfringens</i>	38

4 - CATTLE ENTEROTOXAEMIA AND CLOSTRIDIUM PERFRINGENS: DESCRIPTION, DIAGNOSIS AND PROPHYLAXIS

- Table 1: <i>Clostridium perfringens</i> conventional toxinotypes.....	43
- Table 2: Relationship between <i>Clostridium perfringens</i> toxinotypes and pathologies.....	44
- Table 3: Publications on cattle enterotoxaemia since 1980 (previous references were listed in Manteca and others 1994) showing the pathology, toxinotype, type of animal and country reported.....	44

3. PARTIE EXPÉRIMENTALE

1 - TYPAGE ET SÉLECTION DES SOUCHES DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS ISSUES DE BOVINS MORTS D'ENTÉROTOXÉMIE EN VUE DU CLONAGE DU GÈNE CPB2.

- Table 1: Amorces utilisées pour amplifier <i>cpb2</i> et tailles théoriques des amplicons.....	65
- Table 2: Conditions d'amplification avec les amorces [P319-P320], [P385-P320], [P319-P393], [P385-P393].....	65
- Table 3: Comparaison de la détection de <i>cpb2</i> par hybridation et PCR (Herholz et al., 1999) sur les souches anciennes.....	66
- Table 4: Résultats de la détection du gène <i>cpb2</i> par PCR (Herholz et al., 1999) sur les souches anciennes et récentes de <i>C. perfringens</i> isolées de bovins entérotoxémiques.....	67
- Table 5: Amorces dessinées lors de cette étude pour amplifier le gène <i>cpb2</i> d'origine bovine sur base de la séquence publiée par Gibert et associés (1997).....	69
- Figure 1: Position des amorces P385, P393 (Gibert et al., 1997) et P319, P320 (Herholz et al., 1999) par rapport au gène <i>cpb2</i>	64
- Figure 2: ADN génomique et mégaplasmidique après purification de souches de bovins entérotoxémiques (WIZARD).....	68
- Figure 3: PCR toxine CPB2 (souche 47001-C12) – Essais avec différentes paires d'amorces et différentes conditions de PCR.....	69
- Figure 4: Position des amorces β -tox,1 β -tox 2, β -tox 3, β -tox 4 et β -tox 5 par rapport au gène <i>cpb2</i>	70

2 - PURIFICATION OF THE RECOMBINANT BETA2 TOXIN (CPB2) FROM AN ENTEROTOXAEMIC BOVINE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS STRAIN AND PRODUCTION OF A SPECIFIC IMMUNE SERUM

- Table 1: Bacterial strains used in this study.....	77
- Table 2: Vectors used in this study.....	77
- Table 3: Purification process.....	80
- Table 4: Beta2 genotype (PCR <i>cpb2fm</i>) and phenotype (Western blot, cattle immune serum) of <i>C. perfringens</i> field strains from enterotoxaemic cattle.....	85
- Figure 1: pBLTS72- <i>cpb2fm</i> vector.....	77
- Figure 2: pAC7- <i>cpb2fm</i> vector.....	78
- Figure 3: Insertion mechanism of <i>cpb2fm</i> sequence by double crossing-over from pAC7 vector into <i>B. subtilis</i> 168 chromosome.....	78
- Figure 4: CPB2 amino acid sequences alignment underlying the different allelic sequences. Global alignment of 6 CPB2 proteins (CLUSTALW).....	82
- Figure 5: Comparative CPB2FM production in <i>B. subtilis</i> with pBLTS72 plasmid or by genomic integration. 5.1 and 5.2, SDS-PAGE ; 5.3: Western Blotting.....	83
- Figure 6: Comparative CPB2 production in <i>B. subtilis</i> 168 pBLTS72- <i>cpb2fm</i> and in <i>C. perfringens</i>	84
- Figure 7: Purified CPB2FM.....	84
- Figure 8: Verification of CPB2FM antiserum on purified CPB2FM protein and on wild <i>C. perfringens</i> strains supernatants.....	85
- Figure 9: Verification of equine CPB2 antiserum on purified CPB2FM protein and on wild <i>C. perfringens</i> strains supernatants.....	85
- Figure 10: PCR <i>cpb2fm</i> on <i>C. perfringens</i> strains from enterotoxaemic cattle.....	86

3 - CONSTRUCTION DE DEUX PROTÉINES TRONQUÉES SUR BASE DES FRAGMENTS N- ET C-TERMINAUX DE CPB2FM.

- Table 1: Souches utilisées pour le clonage et la production des protéines tronquées N et C-terminales.....	92
- Table 2: Amorces utilisées pour l'amplification des portions N et C-terminales.....	92
- Table 3: Plasmides utilisés pour le clonage et l'amplification des portions N et C-terminales.	92
- Table 4: Conditions de production de CPB2Nt_BlaP.....	97
- Table 5: Conditions de production de GST_CP2Ct.....	98
- Figure 1: Position des amorces pour la construction de <i>cpb2Nt_BlaP</i> par rapport au gène <i>cpb2fm</i>	94
- Figure 2: Position des amorces pour la construction de GST_ <i>cpb2Ct</i> par rapport au gène <i>cpb2FM</i>	94
- Figure 3: CPB2Nt-BlaP purifiée.....	100
- Figure 4: GST-CPB2 Ct purifiée et co-purification d'une GRoEL.....	100
- Figure 5: Détection par Western Blot de GST_CP2Ct grâce aux anticorps contre CPB2FM.....	101
- Figure 6: Détection de CPB2FM avec les anticorps contre GST_CP2Ct.....	102

- Figure 7: Détection de CPB2FM avec les anticorps contre CPB2-Nt_BlaP.....**102**

4 - THE EXPRESSION OF CLOSTRIDIUM PERFRINGENS CONSENSUS BETA2 TOXIN IS ASSOCIATED WITH BOVINE ENTEROTOXAEMIA SYNDROME.

- Table 1: Genotypic and expression data from the 128 toxinotype-A *C. perfringens* isolates.....**112**
- Figure 1: Western blot with supernatant of *C. perfringens* from healthy cattle (slaughterhouse, control group).....**113**
- Figure 2: Western blot with supernatant of *C. perfringens* from enterotoxaemic cattle (necropsy, enterotoxaemic group).....**113**

5 - ENTEROTOXAEMIA-LIKE SYNDROME AND CLOSTRIDIUM PERFRINGENS IN VEAL CALVES

- Table 1: PCR results on 77 *Clostridium perfringens* isolates from calves affected with an enterotoxaemia-like syndrome (cases) and on 15 *C perfringens* isolates from control calves for the *cpb2* gene family and for the *cpb2^{con}* and *cpb2^{aty}* gene variants.....**119**

6 - SÉQUENÇAGE DE GÈNES CPB2 D'ORIGINE BOVINE.

- Table 1: Amorces utilisées pour l'amplification des fragments d'ADN à séquencer.....**123**
- Table 2: Conditions de PCR pour l'amplification des fragments d'ADN à séquencer.....**124**
- Table3: Comparaison de souches classées selon leurs résultats PCR ou leur séquençage.**130**
- Figure 1: Comparaison des séquences en amont du peptide signal (~200 pb) de différents clusters de *cpb2*.....**125**
- Figure 2: Arbre phylogénique sur 190pb en amont du peptide signal avec une séquence type par cluster.....**126**
- Figure 3: Comparaison d'une séquence de chaque cluster.....**127**
- Figure 4: Alignement de plusieurs séquences par cluster.....**128**
- Figure 5: Comparaison sur 470 ou 706 pb des ORF de différents clusters de *cpb2* sous forme graphique.....**131**
- Figure 6: Comparaison sur 706 pb des ORF de différents clusters de *cpb2* sous forme d'arbre phylogénique.....**131**
- Figure 7: Traduction du début de l'ORF : absence de codon stop chez les souches de cette étude, malgré la présence de 6 A au lieu de 7.....**132**
- Figure 8 : Prédiction de la structure secondaire (hélices alpha et feuilletts beta) de CPB2 de différentes origines, dont des souches bovins.....**132-133**

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ - ABSTRACT	1
PRÉAMBULE.....	11
INTRODUCTION GÉNÉRALE ET REVUE DE LITTÉRATURE.....	15
1. CLOSTRIDIUM : DÉFINITION, SYSTÉMATIQUE ET IMPLICATIONS.....	17
1.1. Définition	
1.2. Systématique	
1.3. Implications	
2. CLOSTRIDIUM PERFRINGENS : DÉFINITIONS.....	24
2.1. Ecologie	
2.2. Toxines	
3. PATHOLOGIES ASSOCIÉES À CLOSTRIDIUM PERFRINGENS ET SES DIFFÉRENTS TOXINOTYPES.....	39
3.1. Pathologies humaines et animales	
3.2. Toxinotypes et implications en médecine vétérinaire	
4. CATTLE ENTEROTOXAEMIA AND CLOSTRIDIUM PERFRINGENS : DESCRIPTION, DIAGNOSIS AND PROPHYLAXIS - L'ENTÉROTOXÉMIE BOVINE: DESCRIPTION, ÉPIDÉMIOLOGIE, DIAGNOSTIC ET PROPHYLAXIE.....	41
OBJECTIFS	53
PARTIE EXPÉRIMENTALE : 6 ÉTUDES	57
<i>ÉTUDES 1-2-3 : PRODUCTION DE LA TOXINE BETA2 D'ORIGINE BOVINE ET D'ANTICORPS POLYCLONAUX SPÉCIFIQUES.....</i>	<i>59</i>
1. TYPAGE ET SÉLECTION DES SOUCHES DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS ISSUES DE BOVINS MORTS D'ENTÉROTOXÉMIE EN VUE DU CLONAGE DU GÈNE <i>CPB2</i>	61
1.1. Introduction	
1.2. Matériel et méthode du typage des souches de <i>C. perfringens</i> isolées de bovins atteints d'entérotaxémie	
1.3. Résultats	
1.4. Discussion	
1.5. Conclusion et perspectives	
2. PURIFICATION OF THE RECOMBINANT BETA2 TOXIN (CPB2) FROM AN ENTEROTOXAEMIC BOVINE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS STRAIN AND PRODUCTION OF A SPECIFIC IMMUNE SERUM.....	73
3. CONSTRUCTION DE DEUX PROTÉINES TRONQUÉES SUR BASE DES FRAGMENTS N- ET C-TERMINAUX DE CPB2FM.....	89
3.1. Introduction	
3.2. Matériel et méthodes	
3.3. Résultats et discussion	

3.4. Conclusion

ÉTUDES 4-5-6 : ÉTUDE ÉPIDÉMIOLOGIQUE DE LA TOXINE BETA2 CHEZ LES BOVINS DANS LE CONTEXTE DE L'ENTÉROTOXÉMIE105

4. THE EXPRESSION OF CLOSTRIDIUM PERFRINGENS CONSENSUS BETA2 TOXIN IS ASSOCIATED WITH BOVINE ENTEROTOXAEMIA SYNDROME.....**107**
5. ENTEROTOXAEMIA-LIKE SYNDROME AND CLOSTRIDIUM PERFRINGENS IN VEAL CALVES.....**117**
6. SÉQUENÇAGE DE GÈNES *CPB2* D'ORIGINE BOVINE.....**121**
 - 6.1. Introduction
 - 6.2. Matériel et méthodes
 - 6.3. Extraction
 - 6.4. Résultats
 - 6.5. Discussion et conclusion

DISCUSSION GÉNÉRALE**137**

PLACE DE cpb2-CPB2 DANS LE CONTEXTE CLINIQUE ET BACTÉRIOLOGIQUE DE L'ENTÉROTOXÉMIE BOVINE.....**139**

1. PARTIE EXPÉRIMENTALE.....**139**
 - 1.1. Clonage du gène *cpb2* et production *in vitro* de la toxine CPB2
 - 1.2. Les différents allèles du gène *cpb2*
 - 1.3. Expression de CPB2 par les souches porteuses du gène
 - 1.4. L'alternative à la production de la protéine native
 - 1.5. Implication de *cpb2-CPB2* dans l'entérototoxicité bovine
2. ÉTUDE DE L'ENTÉROTOXÉMIE.....**145**
 - 2.1. Aspects bactériologiques de l'entérototoxicité bovine
 - 2.2. Aspects toxiques de l'entérototoxicité bovine

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....**149**

BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE.....**153**

RÉSUMÉ - ABSTRACT

RÉSUMÉ

L'entérotoxémie bovine est un syndrome aigu à suraigu caractérisé par une mort subite et des lésions nécrohémorragiques au niveau de l'intestin grêle. Sous l'influence de facteurs déclenchants encore mal connus, l'entérotoxémie est associée à une multiplication exponentielle de *Clostridium perfringens* dans des portions souvent limitées de l'intestin grêle et une production de toxines à actions locales et systémiques.

Parmi les nombreuses toxines potentiellement impliquées dans la genèse des lésions, la toxine beta2 (CPB2) mérite une attention particulière. Elle a été découverte chez des porcelets atteints d'entérite nécrotique (Gibert et al., 1997). Par la suite, de nombreuses études ont permis de la mettre en évidence chez d'autres espèces animales dans des circonstances pathologiques diverses ainsi que chez des animaux sains. Deux allèles du gène *cpb2* ont rapidement été définis : *cpb2* consensus, associé initialement aux souches porcines, capables d'exprimer CPB2 et *cpb2* atypiques, mis en évidence dans les autres espèces et a priori incapable d'exprimer la toxine (Jost et al. 2005). Les souches qui produisent la CPB2 sont, donc, largement distribuées, mais l'implication de cette toxine dans les pathologies intestinales n'est pas encore élucidée. Chez les bovins, les résultats d'une étude réalisée dans notre laboratoire sur anses intestinales ligaturées ont suggéré une action synergique entre la toxine alpha et la toxine CPB2 pour expliquer les lésions hémorragiques observées dans le modèle (Manteca et al., 2002). C'est dans le prolongement de cette étude que le présent travail a débuté en 2000.

L'objectif général était de déterminer si la toxine CPB2 est ou non associée à des cas d'entérotoxémie bovine rencontrés sur le terrain. Avant de réaliser ces enquêtes cas/témoins, il a fallu au préalable produire une toxine CPB2 d'origine bovine, la purifier et se doter d'outils de détection spécifiques du gène *cpb2* et de la toxine. L'ensemble du travail a été organisé en 6 études.

Etude 1 - Une souche de *C. perfringens*, isolée d'un bovin mort d'entérotoxémie, et porteuse du gène *cpb2* a été choisie pour cloner le gène d'intérêt. Des amorces spécifiques ont été dessinées afin d'amplifier la séquence codant pour la forme mature de la protéine : CPB2FM, sans son promoteur, ni son peptide signal.

Etude 2 - Cette séquence a ensuite été insérée (i) dans un plasmide d'expression utilisable à la fois en *Escherichia coli* (*E. coli*) et en *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), le pBLTS72; ainsi que (ii) dans le chromosome de *B. subtilis* sous forme de copie(s) simple ou multiples, grâce à un plasmide intégratif, le pAC7. Le gène étant dans les 2 cas, sous la dépendance d'un promoteur et d'un peptide signal présent sur les plasmides correspondants. Pour optimiser la production de CPB2FM, ont été testées notamment (i) des souches d'*E. coli* dont les BL21-CodonPlus (DE3)-RIL, capables de compenser la rareté de certains codons (t-RNA) chez *E. coli* par rapport à *C. perfringens* et (ii) des milieux de cultures complétés en certains acides aminés (L-Cys, L-Trp) pour compenser l'auxotrophie des souches *B. subtilis*. Des antiprotéases ont également été utilisées pour limiter la dégradation de CPB2FM en cours des étapes de production et de purification. La toxine CPB2FM produite était présente dans le surnageant de culture de *B. subtilis* et dans la fraction des protéines solubles des *E. coli*. Le meilleur niveau de production a été obtenu avec le surnageant des *B. subtilis* transformés avec le plasmide pBLTS-72-*cpb2*FM. L'évaluation de la production a été réalisée par Western Blot (WB) avec des anticorps polyclonaux anti-CPB2 (Pr Frey). Le nombre de clones obtenus, la croissance des bactéries transformées et les niveaux de production étaient moindres avec *cpb2*FM qu'avec une protéine témoin. Cependant, la purification par plusieurs étapes de chromatographies successives a

permis d'obtenir une protéine suffisamment pure pour produire des anticorps polyclonaux spécifiques de CPB2FM en lapins.

Etude 3 - Vu les faibles niveaux de production obtenus dans la seconde étude, la production de protéines tronquées, N-terminale (couplée à la beta-lactamase Bla-P) et C-terminale (couplée à la Glutathion S-transferase, GST) a été réalisée. Un processus similaire à celui décrit pour la production de CPB2FM a été mis en œuvre, mais avec expression en *E. coli* souches DH5 α , BL21-CodonPlus (DE3)-RIL et SF120, déficientes en certaines protéases bactériennes, qui se sont révélées plus efficaces. La purification par chromatographie a abouti à des protéines pures à plus de 90%, compatibles avec la production d'anticorps polyclonaux spécifiques en lapin dirigés contre ces protéines tronquées. Les niveaux de productions obtenus étaient significativement supérieurs à ceux obtenus pour CPB2FM dans l'étude 2. Les amorces et les anticorps polyclonaux produits au cours des 3 premières études ont été utilisés dans les deux études suivantes. L'objectif des études 4 et 5 était de comparer la prévalence et l'expression des différents allèles du gène *cpb2* dans des populations cas/témoin (bovins morts d'entérototoxicité / bovins sains à l'abattoir). La quatrième étude a été réalisée sur des veaux d'élevages dits conventionnels et la cinquième sur des veaux de boucherie. Enfin, la sixième étude s'est focalisée sur l'analyse des séquences de *cpb2* bovines, y compris la séquence en amont de *cpb2fm*.

Etude 4 - La prévalence du gène *cpb2* a été comparée entre des souches de *C. perfringens* isolées de veaux morts d'entérototoxicité (diagnostic nécropsique et bactériologique : groupe cas, 8 veaux, 41 isolats) et des souches isolées de veaux sains à l'abattoir (groupe témoin, 14 veaux, 87 isolats). Les souches *cpb2* positives ont été testées pour déterminer le type d'allèle présent (soit l'allèle consensus de type « porc », soit l'allèle atypique de type « non porc ») et évaluer leur capacité à exprimer la toxine CPB2. Dans le groupe de bovins morts d'entérototoxicité, 68 % des souches (28/41) étaient *cpb2* positives et toutes renfermaient l'allèle *cpb2* consensus. Dans le groupe témoin, la prévalence du gène *cpb2* était significativement ($p < 0,05$) inférieure (46 %, 40/87) et les deux allèles étaient présents : 67,5 % d'allèle *cpb2* consensus (27/40) et 32,5% d'allèle *cpb2* atypique (13/40). L'expression de la toxine CPB2 était également différente. Dans le groupe des bovins morts d'entérototoxicité, l'allèle *cpb2* consensus exprimait CPB2 dans 64 % des cas (18/28) tandis que dans le groupe témoin, seuls 22 % (6/27) des allèles *cpb2* consensus exprimaient la toxine. Notons que dans le groupe témoin, les allèles *cpb2* atypiques exprimaient CPB2 dans 69 % des cas (9/13). Cette enquête de terrain a donc démontré que, comparée à celle d'un groupe témoin, la prévalence du gène *cpb2* était significativement plus élevée au sein de souches isolées de veaux morts d'entérototoxicité et que toutes les souches *cpb2* positives présentaient un seul type d'allèle (*cpb2* consensus). La capacité d'expression de la toxine CPB2 était également plus élevée dans le groupe cas que dans le groupe témoin. Enfin, la capacité d'expression de CPB2 des souches porteuses de l'allèle atypique est non nulle.

Etude 5 - L'étude réalisée sur des veaux de boucherie n'a pas mené aux mêmes conclusions. Le gène *cpb2* n'a été détecté qu'au sein de souches issues de veaux morts d'un syndrome « enterotoxaemia-like », avec une prévalence de 20% (19/92), inférieure à celle de l'étude précédente. Parmi les souches *cpb2* positives, l'allèle *cpb2* atypique était le plus fréquent (74%, 14/19). Par ailleurs, aucune expression de la toxine CPB2 n'a été mise en évidence, quel que soit l'allèle présent.

Etude 6 - Enfin, la dernière étude a été réalisée afin de comparer les séquences *cpb2* (allèles consensus et atypique) issues de souches d'origine bovine à des séquences déjà publiées. Trois clusters ont pu être identifiés : (i) **cluster 1** : les séquences *cpb2* consensus d'origine bovine et la

séquence *cpb2* du pCPC13 (plasmide de référence) qui sont fortement apparentées (>99%); (ii) **cluster 2** : les séquences *cpb2* consensus d'origine porcine (~ 94% d'identité avec le cluster 1) ; (iii) **cluster 3** : les *cpb2* atypiques quelle que soit l'espèce animale d'origine forment un cluster à part (~75% d'identité avec les 2 autres clusters). Globalement, les gènes *cpb2* possèdent une homologie de séquence d'environ 88%. Cette dernière étude a aussi permis l'analyse de la séquence en amont de *cpb2fm*. Des différences par rapport à la séquence de référence (souche CWC245) ont été mises en évidence, qui peuvent expliquer les difficultés à amplifier la séquence complète en début d'étude. Une séquence promotrice et un peptide signal correspondant à une protéine excrétée dans le milieu extracellulaire ont été mis en évidence. Dans le peptide signal, la délétion d'une adénine (6 au lieu de 7) qui engendre un STOP de traduction précoce est fréquente au sein des souches d'origine bovine. Néanmoins, cette délétion n'empêche pas systématiquement l'expression de la toxine CPB2. Ce maintien de l'expression pourrait être dû à la présence d'un autre ATG au début de l'ORF au sein des gènes *cpb2* d'origine bovine et/ou au rétablissement de l'ORF grâce à un mécanisme de codons glissants.

Conclusion Les données bibliographiques suggèrent depuis très longtemps que la toxine alpha de *C. perfringens* est un acteur moléculaire indispensable dans la physiopathologie de l'entérite nécro-hémorragique foudroyante chez les bovins. La toxine alpha est donc nécessaire, mais pas suffisante puisque sa présence seule ne reproduit ni la nécrose foudroyante, ni le syndrome cardiovasculaire fatal observés dans les cas naturels d'entérite nécro-hémorragique. D'autres facteurs sont donc à l'œuvre et il était logique de considérer d'abord la candidature des autres toxines produites par *C. perfringens*. En commençant cette thèse, nous projetions d'évaluer la candidature de la toxine CPB2. La première partie des travaux a consisté à caractériser les différents allèles présents au locus *cpb2* et à se donner les moyens de détecter la toxine elle-même. Quoique le processus fût parsemé d'obstacles, nous avons finalement réussi à produire et à purifier une toxine CPB2 recombinante. Utilisée comme antigène dans un processus d'hyperimmunisation, elle nous a permis d'obtenir un antisérum polyclonal spécifique. L'étude d'association que nous avons menée ensuite a révélé une situation très différente selon la spéculation envisagée. Chez le veau d'élevage conventionnel, nous montrons une association significative entre le syndrome étudié, la présence du gène *cpb2* et la présence de la toxine CPB2. Inversement, chez le veau de boucherie, les animaux porteurs du gène n'exprimaient pas la toxine, ce qui confirme une étude parue récemment (Valgaeren et al., 2013). Le séquençage des souches a permis de mieux comprendre la filiation des différents allèles de *cpb2* (bovins), la capacité d'expression chez les souches bovines porteuses d'un allèle *cpb2* dit atypique et les difficultés rencontrées en début d'étude. Ensemble, nos résultats suggèrent que la toxine CPB2 pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie de l'entérite nécro-hémorragique chez les bovins, mais dans certaines circonstances seulement, lesquelles semblent réunies chez le veau d'élevage. A défaut de résoudre définitivement la question du cofacteur de la toxine alpha, notre travail souligne le rôle-clé de l'environnement en général, de l'alimentation et du management en particulier, sur la nature et le (dys)fonctionnement de l'écosystème intestinal chez les bovins.

ABSTRACT

Cattle enterotoxaemia is an acute to hyperacute syndrome, which is characterized by the sudden death of the cattle and the presence of hemorrhagic lesions in the small intestine. Under the stimulus of misunderstood triggering factors, the enterotoxaemia is associated with an exponential overgrowth of *Clostridium perfringens* in, often limited, small intestine segments and the production of toxins acting locally or systemically.

Among the numerous potentially implicated toxins in the genesis of these lesions, the beta2 toxin (CPB2) deserves special attention. Discovered in piglets suffering from necrotic enteritis (Gibert et al., 1997), it was thereafter detected in other animal species suffering of various diseases, but also in healthy animals. Two alleles were quickly defined (1) consensus *cpb2*, associated to swines' strains able to produce CPB2 and atypical *cpb2*, detected in strains from other species and a priori unable to express CPB2 (Jost et al., 2005). The strains that could produce CPB2 were widely distributed but the real implication of this toxin in intestinal diseases is not yet clarified. In cattle, the results of a study on intestinal ligated loops in our lab, suggested a synergistic effect of alpha and beta2 toxins to explain the hemorrhagic lesions observed in this assay (Manteca et al., 2000). The present work, begun in 2000, is the continuation of this study.

The global goal was to determine whether the CPB2 toxin was associated, or not, with the cattle enterotoxaemia observed in field conditions. Prior to realizing a case/ control study, we had to produce and purify a CPB2 toxin from cattle strains and we had to have specific tools able to detect the *cpb2* gene and the corresponding toxin. The whole work was organized in 6 studies.

Study one - A strain of *C. perfringens*, coming from a cattle dead of enterotoxaemia and carrying the *cpb2* gene, was chosen to clone the targeted gene. Specific primers were designed to amplify the sequence encoding for the mature protein: CPB2FM, without either its promoter nor its signal peptide.

Study two - This sequence was then inserted (i) in a shuttle plasmid able to express protein *in Escherichia coli* (*E.coli*) and in *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), called pBLTS-72; but also (ii) in the chromosome of *B. subtilis*, as a unique or multiple copy(ies), using an integrative plasmid, the pAC-7. In those two constructions, *cpb2fm* was under the control of a promoter and a signal peptide of the corresponding plasmids. In order to optimize the level of production of CPB2FM, various strains and culture conditions were tested, of which (i) *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL, able to balance the deficit in specific t-RNA codons in *E. coli* compared to *C. perfringens*, but also (ii) culture media enriched in some amino acids (L-Cys, L-Trp) against the auxotrophy of *B. subtilis*. Antiproteases were used too, to limit the degradation of CPB2FM all along the process of production and purification. The CPB2FM toxin was located in the culture supernatant of *B. subtilis* and in the proteins soluble fraction of *E. coli*. The best level of production was reached with *B. subtilis* carrying pBLTS-72-*cpb2fm*. The production was measured by Western Blot (WB) using polyclonal antibodies against CPB2 (provided by Pr Frey). Transformations, cells growth and level of protein production were lower in *cpb2fm* transformed cells than in the same cells carrying a control protein. The purifications needed multiple steps but they have achieved levels and purity compatible with immunization and obtaining specific polyclonal rabbit antibodies against CPB2FM.

Study three - As the level of production was lower than expected, chimeric proteins N-terminal (with beta-lactamase Bla-P) and C-terminal (with Glutathion S-transferase, GST) were constructed. The same process was used than for CPB2FM, and the expression was realized in *E. coli* DH5 α , BL21-CodonPlus (DE3)-RIL and SF120 (proteases deficient strain), the latest being the more efficient ones.

Purification led to a purity >90%, consistent with production of specific polyclonal antibodies against the CPB2-Nt_BlaP and GST-CPB2-Ct. Levels of chimeras production were higher than those of CPB2FM.

The primers and polyclonal antibodies produced during the three first studies were used in the two following studies. The aim of the studies four and five was to compare the prevalence and the expression in vitro of the different *cpb2* alleles in case and control population: cattle dead of enterotoxaemia or healthy cattle, dead at the slaughterhouse. Study four was realized on calves from family farms (conventional breeding) and study five in veal calves. Finally, study six focused on the analysis and comparison of *cpb2* sequences from cattle strains, including the sequence upstream of *cpb2fm*.

Study four - The prevalence of *cpb2* was compared between *C. perfringens* strains from calves dead of enterotoxaemia (necropsic and bacteriologic diagnosis of cases group : 8 calves, 41 strains) and *C. perfringens* strains from healthy calves, sampled at the slaughterhouse (control group, 15 calves, 87 intestinal strains). The *cpb2* positive strains were tested to determine the allelic group (either the consensus “swine” *cpb2*, or the atypical “non swine” *cpb2*) and to assess their ability to express the CPB2 toxin.

In the case group (enterotoxaemia), 68 % of the strains (28/41) were *cpb2* positive and all of them carried the consensus *cpb2*. In the control group, the prevalence of *cpb2* was significantly ($p < 0,05$) lower (46 %, 40/87) and the two alleles were detected : 67,5 % of consensus *cpb2* (27/40) and 32,5% of atypical *cpb2* (13/40). The expression of CPB2 toxin was also different. In the case group 64% of the strains carrying the consensus *cpb2* allele could express CPB2 (18/28), while in the control group, only 22% of the strains carrying the consensus *cpb2* allele can express the toxin (6/27). Interestingly, in control group, 69% (9/13) of the strains carrying the atypical *cpb2* could also express CPB2.

This field study proved that compared to a control group, the prevalence of the *cpb2* gene was significantly higher in strains from calves dead of enterotoxaemia and that in this case group, all the *cpb2* positive strains carried the same allele: consensus *cpb2*. The capacity to express the CPB2 toxin was also higher in the case group than in the control group. And the capacity of strains carrying atypical *cpb2* is non-zero.

Study five – The study realized in the veal calf industry did not lead to the same conclusions. The *cpb2* gene was only detected in calves dead of enterotoxaemia-like syndrome, with a prevalence of only 20% (19/92), lower than in the previous study. Among the *cpb2* positive strains, the atypical *cpb2* allele was the most prevalent (74%, 14/19). More, no CPB2 expression could be detected, regardless the carried allele.

Study six – The last study aimed to compare the *cpb2* sequences (consensus and atypical *cpb2*) from cattle strains between themselves and with other sequences yet published and characterized. Three clusters could be identified (i) **cluster one** : consensus *cpb2* sequences from cattle (or non-swine origin) and *cpb2* sequence of pCPC13 (reference plasmid) were closely related (>99%); (ii) **cluster two** : consensus *cpb2* sequences from swine origin (~ 94% of identity with the cluster 1) ; (iii) **cluster three** : all the atypical *cpb2* sequences whatever the species of origin form a separate cluster (~75% of identity with the two other clusters). Overall, the *cpb2* genes have a sequence homology of about 88%.

This last study had also allowed to analyze the sequence upstream the *cpb2fm*. Sequence differences compared to the reference sequence (from CWC245 strain) were found that could explain the

difficulties encountered to amplify the complete gene sequence in 2000. A signal peptide and promotor sequences reliable with an extracellular excreted protein were found. In the peptide signal sequence, the deletion of an adenine (6 in place of 7) which generates early STOP codon is frequently present in strain from cattle origin. Nevertheless, this deletion is not systematically linked to the incapacity to express the CPB2 toxin. The restoration of the capacity of expression could come from the presence of another ATG, start codon at the beginning of the ORF in this strains and/or the ORF could be restored by the slippery codons mechanism.

Conclusion - For a long time, bibliographic' data suggested that alpha toxin from *C. perfringens* is a molecular key factor in the cattle hyperacute necrohemorrhagic enteritis physiopathology. The alpha toxin is necessary but not sufficient, since this toxin alone is not able to induce neither the hyperacute necrosis, nor the fatal cardiovascular syndrome observed in cases of spontaneous necrohemorrhagic enteritis or enterotoxaemia. Other factors should therefore intervene and logically, the first candidates considered were the other toxins of *C. perfringens*.

At the beginning of this PhD, we aimed to evaluate the role of the CPB2 toxin. The first step of this work consisted of characterizing the different alleles present at the *cpb2* locus and developing the means to detect the toxin itself. Despite the obstacles encountered, we finally succeeded in producing and purifying a recombinant CPB2 toxin. Used as antigen in a hyperimmunization process, this recombinant toxin allowed producing a specific polyclonal antiserum. The association studies we conducted later revealed a very different situation according to the speculation. In the calves from conventional, family farms, we showed a significant association between the studied syndrome, the presence of the *cpb2* gene and the presence of the CPB2 toxin. Conversely, in veal calf industry, the calves carrying the gene *cpb2* did not express the toxin, which confirmed a study published recently (Valgaeren et al., 2013). The sequencing of different *cpb2* cattle genes brought to a better understanding of the phylogeny of the different alleles of *cpb2*, the capacity of expression of the strains carrying an atypical *cpb2* allele and some difficulties encountered in the beginning of the study.

Taken together, our results suggest that the CPB2 toxin may play a role in the pathophysiology of necrohemorrhagic enteritis in cattle, but in certain circumstances only, which appeared to be common in family farmed calves. Failing to definitively resolve the issue of the alpha toxin cofactor, our work highlights the key role of the environment in general, food and management in particular, the nature and (dys)function of the intestinal ecosystem in cattle.

PRÉAMBULE

Le travail qui suit est articulé en 4 grands volets.

Le premier volet est une introduction au monde des clostridies d'intérêt médical et plus à *Clostridium perfringens* en médecine vétérinaire.

Les objectifs du travail sont expliqués dans le second volet.

Le troisième volet correspond à la partie expérimentale et présente les 6 études réalisées dans le cadre de ce travail, sous forme d'articles scientifiques ou de travaux non publiés. Pour des raisons de clarté, ces études ne sont pas présentées de façon chronologique mais regroupées par thème. Les trois premières études abordent la production de la toxine et d'outils pour la détecter (partie 1). Les trois études suivantes traitent de l'épidémiologie du gène *cpb2* et de la toxine CPB2 dans le contexte de l'entérotoxémie bovine en Belgique.

Enfin, le quatrième volet est consacré à la discussion générale et aux perspectives qui s'ouvrent dans ce domaine grâce aux nouvelles technologies disponibles.

INTRODUCTION GÉNÉRALE ET REVUE DE LITTÉRATURE

1. CLOSTRIDIUM : DÉFINITION, SYSTÉMATIQUE ET IMPLICATIONS

1.1. Définition

1.1.1. Historique

La toute première évocation de ce qui pourrait être une clostridie remonte au 18^{ème} siècle (1721) où le Sieur de Tymogne (Edmée de Guyot) évoque des petits vers présents en très grande quantité en cas de gangrène. Il les caractérise comme étant des vers minuscules nécessitant l'usage du microscope pour être visibles. Pasteur sera le premier à les mettre en culture dans la deuxième moitié du 19^e siècle (1863) et il introduira les notions d'organismes aérobies et anaérobies. Les 2 clostridies les plus connues, agents du tétanos et du botulisme, seront respectivement cultivées en 1889 par le japonais Kitasato et en 1897 par le belge van Ermengen. Quant à *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*), il est communément admis que Welch et Nuttall l'ont découverte en 1892, même si Prévot en cite une description légèrement antérieure par Achalme (1891). Elle a eu plusieurs dénominations, d'abord *Bacillus aerogenes capsulatus*, ensuite *Clostridium welchii* en l'honneur de Welch et, enfin, *Clostridium perfringens*.

1.1.2. Description

Le genre *Clostridium* appartient à la famille des Clostridiaceae, ordre des Clostridiales, classe des *Clostridia*, phylum des Firmicutes et comprend 208 espèces (www.bacterio.net/clostridium.html, 2015). Il s'agit de bactéries à Gram positif plus ou moins labile, anaérobies plus ou moins strictes, de forme bacillaire mais à morphologie variable (coccoïdes à filamenteuses), la forme caractéristique restant le bâtonnet épais et régulier. Elles sont catalase et peroxydase négatives. Leur aptitude à former des endospores thermorésistantes garantit leur persistance dans le temps.

1.2. Systématique

Contrairement à de nombreuses bactéries issues d'échange de matériel génétique entre *subphyla* d'un même *phylum*, les bactéries capables de former des endospores, dont les Clostridies, semblent toutes issues d'un *subphylum* commun nommé *Clostridium/Bacillus* à évolution monophylétique (**table 1**). Ce *subphylum* se caractérise également par un taux de guanine + cytosine (G+C) inférieur à 55 mol%. Au-delà de ce point commun, la systématique du genre *Clostridium*, fortement hétérogène, est complexe. Les avancées en génétique moléculaire ont permis une meilleure compréhension de l'évolution de genre *Clostridium* mais en ont également compliqué le classement en espèces. Les espèces de *Clostridium* ont été regroupées en un peu moins de 20 clusters identifiés par des chiffres romains, eux-mêmes subdivisés en sous-cluster identifiés par une lettre. L'exemple des différents toxinotypes de *C. botulinum* souligne la difficulté de concilier (i) l'évolution du classement des souches de *Clostridium* par les techniques génétiques (Keto-Timonen et al., 2006) et (ii) la classification phénotypique ou médicale des souches, d'usage courant chez les agronomes, médecins et vétérinaires (**table 2**, Stackebrandt et Rainey, 1997). Ces classifications sont donc sujettes à des évolutions presque continues et, parfois, profondes.

Table 1. Ancêtres communs au subphylum *Bacillus-Clostridium*

Bactéries capables de former des endospores	Évolution avec perte des capacités de sporulation
<i>Sporomusa sp.</i> <i>Sarcina sp.</i> <i>Heliobacterium sp.</i> <i>Desulfotomaculum sp.</i>	
<i>Clostridium sp</i>	<i>Peptococcus sp.</i> <i>Peptostreptococcus sp.</i> <i>Ruminococcus sp.</i>
<i>Bacillus sp.</i>	<i>Planococcus sp.</i> <i>Caryophanon sp.</i> <i>Kurteria sp.</i> <i>Filibacter sp.</i> <i>Staphylococcus sp.</i>

Table 2. Hétérogénéité des souches de *Clostridium sp*

Cluster	Sous cluster	Exemple de souche(s)
I	a	<i>C. perfringens</i> <i>C. botulinum B, E, F</i>
	e	<i>C. botulinum C, D</i> <i>C. novyi</i>
	g	<i>C. botulinum A,F</i>
	h	<i>C. tetani</i>
II		<i>C. histolyticum</i>
I et II	non classés	<i>C. chauvei</i> <i>C. septicum</i> <i>C. haemolyticum</i>
X	ia	<i>C. difficile</i> <i>C. sordelii</i>
XIV	b	<i>C. piliforme (B. piliforme)</i>
XVII	non classés	<i>C. spiriforme</i>

Classification phénotypique des souches de *Clostridium sp* selon Stackebrandt et Rainey (1997)

L'étude de la phylogénie permet dans certains cas d'améliorer la compréhension des liens entre espèces ou souches. Dans le cas de *C. perfringens*, il n'y a actuellement pas de relation évidente entre l'évolution des housekeeping genes ou gènes de ménage et des gènes des différentes toxines, mais il est néanmoins possible de déterminer une évolution logique pour ces deux types de gènes. Ces nouvelles techniques ont également montré que certains toxinotypes sont probablement issus de l'évolution / transformation relativement récente de toxinotypes plus anciens (voir toxine iota et toxinotype E) et que cette évolution est toujours en cours (Songer, 2010).

1.3. Implications

Les clostridies sont impliquées dans de nombreuses pathologies tant humaines qu'animales mais possèdent également des propriétés intéressantes sur le plan médical et énergétique.

Ces différents points vont être brièvement abordés ci-dessous.

1.3.1. Les neuroclostridioses : tétanos et botulisme

Le Tétanos et Botulisme (Arnon, 1997, table 3) sont deux pathologies qu'il est difficile d'aborder séparément. Les bactéries responsables, *C. tetani* et *C.botulinum*, sont principalement présentes dans l'environnement sous forme sporulée. Sous leur forme végétative, elles produisent de puissantes neurotoxines qui inhibent la transmission de l'influx nerveux chacune à des niveaux différents.

Dans le cas du botulisme, il existe sept toxinotypes antigéniquement distincts présentant une absence de protection croisée. La toxine, souvent ingérée (intoxication) mais parfois produite *in situ* dans l'intestin (toxi-infection) est résorbée par voie sanguine puis se fixe de façon irréversible aux motoneurones périphériques. Elle y empêche le relargage d'acétylcholine en agissant sur un ou plusieurs élément(s) du complexe SNARE (syntaxine, synaptobrevine, SNAP25), selon le toxinotype. Il en résulte une paralysie flasque. Les espèces les plus touchées par le botulisme sont : l'homme, les oiseaux et les bovins. Toutes les espèces ne sont pas sensibles aux mêmes toxinotypes.

Dans le cas du tétanos, l'infection est associée la contamination de plaie par de spores. Si les conditions sont propices (faible tension en oxygène et potentiel redox, nécrose : plaie profonde) les spores germent et la tétanospasme est résorbée par voie sanguine. Elle va, dans un premier temps, se fixer aux jonctions neuromusculaires, puis remonter les axones des nerfs moteurs pour atteindre les interneurons inhibiteurs du système nerveux central (SNC). À ce niveau, elle va empêcher la libération de neuromédiateurs inhibiteurs en agissant sur la synaptobrevine. Le blocage de ces inhibiteurs résulte en une paralysie spastique. Le tétanos touche principalement l'homme, les chevaux, les bovins, puis les carnivores et les porcs.

Table 3 : Toxinotypes des clostridies neurotoxiques et leurs cibles respectives

Toxines de	<i>Clostridium botulinum</i>							<i>Clostridium tetani</i>
	A	B	C	D	E	F	G	tétanospasme
synaptobrevine		X		X		X	X	X
SNAP25	X		X		X			
syntaxine			X					

Dans un cas comme dans l'autre, les premiers symptômes sont souvent des troubles de la préhension alimentaire et évoluent vers une paralysie respiratoire fatale. Le traitement consiste en une sérothérapie, simple contre le tétanos mais complexe pour le botulisme vu le nombre de toxines et la difficulté du diagnostic étiologique précis, une éventuelle antibiothérapie à base de pénicilline (tétanos) et surtout des soins intensifs pour soutenir les grandes fonctions. Les toxines une fois fixées, le restent, et seul le renouvellement de leurs récepteurs spécifiques permet une récupération fonctionnelle, qui se marque après 4 semaines. Des vaccins, vétérinaires et humains, existent contre ces deux bactéries.

1.3.2. Les clostridioses histotoxiques

Cette catégorie de clostridies produit des toxines et/ou enzymes qui endommagent directement les tissus et cellules avec lesquels elles entrent en contact. La pathologie la plus connue est la **gangrène gazeuse**, déjà évoquée 5 siècles avant JC par Hippocrate et bien connue des champs de bataille (Debue-Barazer, 2002). Elle peut être causée par différentes clostridies, seuls ou en association, mais la plus connue est *C. perfringens* de type A, à l'origine de la majorité des cas humains. Chez les animaux c'est *C. septicum* qui prédomine. Ce polymorphisme explique la diversité clinique des cas et complique tant le diagnostique que le traitement. L'infection survient par inoculation (injection, projectiles) ou la contamination d'une plaie par des spores ou des bactéries. Si le terrain se révèle propice (cf tétanos), les bactéries se multiplient et les signes cliniques apparaissent rapidement (<48h) : douleur, gonflement associé à des écoulements nauséabonds puis emphysème gazeux (produit par les bactéries) avec crépitations sous-cutanée. En l'absence de traitement (débridement chirurgical et antibiothérapie), la mort survient rapidement suite à un choc toxémique. Le pronostic est sombre dans tous les cas (Peek et al., 2003). La table 4 reprend les principales myonécroses animales.

Table 4 : Clostridioses histotoxiques et cytotoxiques

<i>Clostridium</i>	Pathologie	Espèces cibles	Lésions, symptômes cardinaux
<i>septicum</i>	œdème malin	humains, ruminants	hémorragies, œdème, nécrose
<i>chauvoei</i>	charbon bactérien, 'blackleg'	Ruminants	myosite nécrosantes oedémateuse
<i>septicum, novyi sordelii</i>	charbon parabactérien	ruminants, porcs	myosite nécrosante
<i>novyi (A)</i>	'false blackleg'	chevaux, humains	emphysémateuse
<i>novyi (B)</i>	gangrène gazeuse	petits ruminants, humains	emphysème, nécrose
<i>novyi (C)</i>	hépatite nécrotique	Ruminants	congestion
	hémoglobininurie bacillaire	ruminants	hémorragie, hémolyse, oedème

Table 4 : Infections à Clostridies histotoxiques ou cytotoxiques avec le nom de la pathologie associée, les principales espèces cibles et les lésions caractéristiques.

Clostridium sordelii est une bactérie associée à des fasciites nécrosantes liés à l'injection de drogue (Kimura et al., 2004), à des gangrènes, mais surtout à des cas gynécologiques (Soper, 2007; Rørbye et al. 2000). Les symptômes apparaissent quelques jours à une semaine après la naissance ou l'avortement : troubles digestifs, hypotension, troubles de la coagulation qui évoluent vers un état de choc septique (Toxic Shock Syndrom) et une forte réaction myéloproliférative (Aronoff et Ballard, 2009; Geny et al., 2007) est corrélée au taux de mortalité qui peut atteindre les 100% (Aldape et al, 2006). Le pouvoir pathogène de cette bactérie est dû à la production d'une toxine létale (LT) qui augmente la perméabilité des barrières cellulaires en modifiant le cytosquelette et les jonctions inter-cellulaires. Cette toxine est une UDP-glucosyltransférase qui atteint les GTPases des familles Rho et Ras.

La maladie du rein pulpeux, due à *C. perfringens* de type D peut également être classée dans les clostridioses neurotoxiques. Elle touche principalement les (jeunes) ovins et, parfois, les caprins. Les signes cliniques sont dus à la toxine epsilon de *C. perfringens*, dont le mode d'action sera détaillé dans le chapitre sur les toxines.

1.3.3. Les clostridioses entérotoxique et « entérotoxémies »

Les pathologies digestives à clostridies sont liées à une dérive de flore s'accompagnant d'une toxémie et certaines bactéries reprises dans le tableau ci-dessous (**table 5**) sont également histotoxiques, le type de pathologie dépendant de la localisation initiale de l'inoculum. Seule *C. difficile*, d'importance croissante en médecine humaine et vétérinaire, sera abordé un peu plus en détail.

Table 5 : Clostridioses digestives et d'origine digestive des animaux de rente.

<i>Clostridium</i>	Pathologie	Organe(s) cible(s)	Espèces cibles
<i>perfringens type A</i>	Entérotoxémie	Intestin	Ruminants
<i>perfringens type B</i>	Entérotoxémie	Intestin	Ruminants nouveau-nés
<i>perfringens type C</i>	Dysenterie	Intestin	Petits ruminants jeunes
	Struck	Intestin	Petits ruminants adultes
<i>perfringens type D</i>	Pulpy kidney disease	Intestin, reins, SNC	Petits ruminants (jeunes)
<i>septicum</i>	Braxy	Caillette	Ruminants
<i>sordelii</i>	Entérotoxémie	Intestin	Ruminants

Table 5 : Clostridies impliquées dans les pathologies d'origine digestive et/ou digestives avec leur nom médical, le ou les organes cible(s) et la ou les espèces cible(s)

La colite pseudomembraneuse à *C. difficile* est principalement une maladie humaine présentant un spectre clinique très étendu : depuis un portage asymptomatique jusqu'à une colite fulminante (Arroyo et al., 2004). Le portage asymptomatique est plus fréquemment décrit chez les nouveaux-nés et les patients hospitalisés sous antibiothérapie. Deux syndromes distincts sont décrits : une diarrhée profuse bénigne et une colite pseudomembraneuse associée à une diarrhée hémorragique sévère. Dans les deux cas, le développement des symptômes est lié à la prise d'antibiotiques macrolides, lincosamides, pénicillines et/ou céphalosporines (Dubberke et al., 2015 ; Schubert et al., 2015). Les symptômes apparaissent quelques jours après le début de la prise d'antibiotique ou après l'arrêt du traitement. Le pouvoir pathogène de *C. difficile* est lié à la production de 2 exotoxines A et B qui agissent toutes deux par réarrangement du cytosquelette de leur cellules cibles et en modifiant la réponse inflammatoire (Keel et Songer, 2006). C'est la détection de ces toxines qui a valeur de diagnostic. Le traitement classique consiste en l'arrêt de l'antibiothérapie. La transplantation de microbiote fécal est également utilisée surtout dans les cas chroniques (Borgia et al., 2015). *C. difficile* persiste souvent après la disparition des symptômes cliniques. On peut également observer des troubles digestifs graves induits par *C. difficile* chez le cheval. Les circonstances d'apparition sont semblables à ce qui a été décrit chez l'homme. Le pronostic est toujours réservé chez le cheval qui déclare systématiquement des symptômes aigus de diarrhée et coliques, avec atteinte multisystémique (Arroyo et al., 2006). Parmi les souches équinnes, il existe des différences de virulence, notamment une sévérité accrue des souches résistantes au métronidazole (Magdesian et al., 2006). Cette bactérie serait aussi une cause d'entérite chez le veau (Hammitt et al., 2008).

1.3.4. Les clostridies dans l'industrie

C. acetobutylicum est aussi appelé “organisme de Weizmann” eu égard à Weizmann qui a découvert les intéressantes propriétés de cet organisme. En effet, cette bactérie est capable de produire, au départ d’amidon, de l’acétone, du butanol et de l’éthanol selon un processus nommé ABE (Acetone-Butanol-Ethanol) ainsi que d’autres composé et ce au départ de différentes matières premières (sucres, lignine, ...). Cela permet de produire du biobutanol de façon économiquement et énergétiquement rentable comparé aux autres modes de production de biocarburants (Ezeji et al., 2003; Friedl et al., 1991). Le BioButanol est utilisable dans les voitures à essence avec les mêmes performances moteur pour moins de rejets de polluants type NOx et globalement pas de rejet net de CO2, si le butanol est produit au départ d’une biomasse (De Guzman, 2009; Ramey et Ramey, 2009).

1.3.5. Les clostridies à usage thérapeutique

L’application médicale la plus connue est l’usage de la toxine botulinique dans un but de myorelaxation contrôlée (toxine A). Elle a de multiples indications thérapeutiques contre des troubles de la motricité, des pathologies auto-immunes et lors de chirurgie. Elle est également utilisée lors d’intervention esthétiques (Jankovic et Hallet, 1994). Les 2 principaux risques sont (i) une diffusion du produit hors de la zone prévue avec parésie ou paralysie des muscles adjacents et (ii) en cas de traitements répétés l’installation d’une résistance progressive, ou à l’inverse d’une sensibilisation au produit avec risque de réaction anaphylactique.

Clostridium et oncologie

Les clostridies natives ou génétiquement modifiées et leur toxine pourraient devenir d’efficaces outils de lutte contre le cancer. Leur caractère anaérobie leur confère la capacité à se développer dans des milieux à faible tension en oxygène, conditions rencontrées au cœur des tumeurs que les agents chimiothérapeutiques conventionnels ont des difficultés à atteindre (vascularisation insuffisante) et où ils perdent souvent en efficacité (Lambin et al., 1998). Certaines techniques utilisées sont présentées dans la **table 6**.

Table 6. Clostridies et oncologie

Agent	<i>C. novyi</i>	<i>C. histolyticum</i>
État de la bactérie	Modifiée : non létale	Native
Fraction utilisée	Spores	Spores
Administration	Voie générale	Voie générale
Effet(s)	Germination spores au cœur de la tumeur et production de toxine non létale	Germination spores au cœur de la tumeur
références	Dang et al. 2001-2004, Agrawal et al., 2004,	Mengesha et al., 2007
Agent	<i>C. perfringens</i>	<i>C. perfringens</i>
État de la bactérie	Modifiée : production agent thérapeutique	Modifiée : production de cytokines, enzymes
Fraction utilisée	Spores	Spores
Administration	Voie générale	Voie générale avec antitumoral inactif
Effet(s)	Germination spores au cœur de la tumeur et production de l'agent thérapeutique <i>in situ</i>	Germination spores au cœur de la tumeur et production de l'enzyme qui va activer l'antitumoral <i>in situ</i>
références	Li et al., 2009	Minton et al., 2001
Agent	Clostridial-Directed Enzyme Prodrug Therapy	Entérotoxine de Clostridium perfringens : CPE
État de la bactérie	Modifiée : production d'enzymes	native couplée à Ac spécifique de la tumeur
Fraction utilisée	Spores	toxine
Administration	Voie générale	injection voie générale en parallèle à des liposomes chargés d'antitumoral
Effet(s)	Germination spores au cœur de la tumeur et production de l'enzyme	homologie entre récepteur de CPE et les protéines Claudine3 et 4 surexprimées par certaines tumeurs sur lesquelles la CPE va agir de façon concentrée
références	Minton et al. 1995 ; Tirandaz et al. 2006	Santin et al. 2005-2007; Kominsky et al., 2004; Hewitt et al., 2006.

Table 6 : Différents exemples de l'utilisation expérimentale des Clostridies dans les thérapies anti-cancéreuses.

2. CLOSTRIDIUM PERFRINGENS : DÉFINITIONS

2.1. Ecologie

Clostridium perfringens est une clostridie immobile et possédant une capsule. C'est une bactérie ubiquitaire qui appartient à la flore tellurique (forme sporulée) et à la flore digestive commensale de nombreux animaux à sang chaud. Au niveau digestif, son nombre et sa localisation diffèrent d'une espèce à l'autre et varient également au cours de la vie de l'animal. Elle s'intègre dans l'équilibre dynamique de la flore, équilibre pouvant être rompu dans certaines circonstances qui sont loin d'être totalement élucidées. Les *C. perfringens* peuvent rapidement passer de quelques centaines ou milliers de germes par ml de contenu intestinal à des comptages supérieurs au million notamment grâce à leur faible temps de génération (13 min à 43°C, Bergey's, 2002). Certains points de ce phénomène d'amplification exponentielle sont encore mal compris : (i) existe-il des inducteurs et/ou des conditions nécessaires pour permettre cette multiplication soudaine (Annett et al., 2002 ; Riddell and Kong, 1992) ; (ii) cette croissance intense concerne-t-elle l'ensemble de la population de *C. perfringens* ou uniquement l'un ou l'autre clone (Manteca et al., 2001 ; Engström et al. 2003) ; (iii) si c'est l'hypothèse d'une amplification clonale qui se vérifie, quels sont les critères qui déterminent le ou les clones sélectionnés ?

2.2. Toxines

Clostridium perfringens possède une grande capacité de toxinogénèse. En effet, plus de 20 toxines différentes peuvent être produites. Elles sont classées, selon leur virulence, en toxines « majeures » et « mineures » et leur production est soumise à différents types de régulation, dont le quorum sensing avec le système VirR/VirS (Ba-Thein et al., 1998) ou Agr-like (Ma et al., 2015 ; Ohtani et al., 2009 ; Vidal et al., 2012). Ainsi, Vidal et associés (2009) ont observé une induction rapide de la toxinogénèse des souches de type C lors de contact avec des entérocytes de type Caco2. Ces observations mettent en évidence des différences de comportement des souches *in vitro* et *in vivo* et, donc, l'influence de l'environnement sur l'évolution de l'équilibre hôte/*C. perfringens*.

2.2.1. Toxines majeures

Quatre toxines majeures (alpha, beta, epsilon, iota) servent de base à la classification des *C. perfringens* en 5 toxinotypes : de A à E (Songer, 1996 ; Petit et al. 1999). Les trois autres toxines considérées comme importantes sont l'entérotoxine, la toxine beta2 et Net B (Daube et al., 1996a; Gibert et al., 1997 ; Keyburn et al. 2008). Cette classification est reprise dans la **table 7**.

Table 7 : Toxinotypes de *C. perfringens*

Toxine	Toxinotype				
	A	B	C	D	E
Alpha	X	X	X	X	X
Beta		X	X		
Epsilon		X		X	
Iota					X
Enterotoxine	(x)				(x)
Beta2	(x)	(x)	(x)	(x)	(x)
Net B	(x)				

Table 7 : classification des souches selon leur capacité à produire les toxines majeures ou leur possession du ou des gène(s) correspondant(s).

2.2.2. Toxines mineures

Les toxines dites mineures sont principalement des enzymes (protéases et sialidases, notamment) qui facilitent l'apport en nutriments et la progression de *C. perfringens* au sein de tissus. Cette bactérie, potentiellement pathogène, est relativement démunie au niveau métabolique et incapable de produire certains éléments essentiels à sa survie (auxotrophie). Cela expliquerait pourquoi la toxinogénèse de *C. perfringens* est à ce point précoce (début de la phase de croissance logarithmique) comparé à la majorité des autres bactéries, et soumise à différents niveaux de régulation. Ses enzymes lui permettraient de trouver rapidement et efficacement les composés nécessaires à sa croissance et de s'adapter à son environnement. Des recherches récentes sur l'entérite nécrotique remettent en cause le caractère mineur de ces protéases : leur action serait primordiale, initiant les lésions au niveau de l'attache basale des entérocytes (Olkowski et al., 2008).

2.2.3. Gènes

Les gènes des toxines majeures de *C. perfringens* sont principalement localisés sur des plasmides, excepté celui de la toxine alpha. Cette relative mobilité facilite l'évolution des souches (Sawires and Songer, 2005-2006) mais complique leur conservation *in vivo* et *in vitro*, ces plasmides pouvant être perdus lors de la conservation et des manipulations *in vitro* (Johansson et al., 2005)

2.2.4. Toxines et entérotoxémies

Les paragraphes qui suivent sont consacrés à la description des toxines majeures de *C. perfringens*. Seront abordés leur(s) gène(s), leur nature protéique (structure et fonction), leur(s) effet(s) toxique(s) et leur éventuelle utilisation dans un but vaccinal. L'accent sera mis sur les toxines associées à l'entérotoxémie bovine et aux souches de type A : alpha, beta2 et entérotoxine. Les trois autres toxines majeures (beta, epsilon, iota), rarement associées aux entérotoxémies bovines, ainsi que la toxine NetB, récemment découverte (Keyburn et al., 2008) seront abordées de façon plus succincte.

2.2.4.1. Toxine alpha – CPA

La toxine alpha est la principale toxine majeure de *C. perfringens* (Titball, 1993; Nagahama et al., 1996; Petit et al., 1999; Sakurai et al., 2004).

Nature de la toxine : génotype et phénotype.

La toxine alpha est codée par un gène chromosomique (*cpa* ou *plc*) et exprimée de façon constitutive par toutes les souches de *C. perfringens* possédant le gène, c'est à dire la grande majorité d'entre elles. Au-delà de ce niveau basal de production, son expression est partiellement contrôlée positivement par des systèmes de régulation comme **VirR/VirS** et **LuxS** (Rood et Lyristis, 1995; Ba-Thein et al., 1996, Ohtani et al., 2002a). D'autres niveaux de régulation, spécifiques des souches de type A, ont été décrits. La production de la toxine alpha a lieu en deux phases : un premier pic a lieu au début de la phase de croissance exponentielle et un second pic à la fin de celle-ci. La régulation finale du niveau de production semble dépendre davantage de la densité cellulaire que de la viabilité des cellules productrices (Phillips-Jones, 2000). Si l'on tient compte de ce schéma de production et de la présence de *C. perfringens* de type A au sein de la flore intestinale normale du bovin, il n'est donc

pas anormal que ces animaux possèdent naturellement des anticorps circulants dirigés contre cette toxine, et ce, même en l'absence de signes cliniques (Manteca et al., 2004).

Nature protéique : structure et mode d'action La toxine alpha de *C. perfringens* est une phospholipase C (PLC) qui présente un haut niveau d'homologie avec les autres enzymes de ce groupe, dont la PLC de *Bacillus cereus*. Elle possède également une forte parenté de séquence et de mode d'action avec les phospholipases endocellulaires des cellules eucaryotes (PLC, PLD, PLA2) dont elle est capable d'induire l'activation via des GTP Binding Protein (Gustafson et al., 1990 a-b; Nagahama et al., 1998 ; Basak et al. 2002).

La toxine alpha est une métallo-enzyme à zinc, calcium dépendante dont la forme mature compte 370 acides aminés (a.a.), organisée en deux domaines N- et C- terminaux. Le domaine N-terminal (a.a. 1-249) est le siège de l'activité enzymatique qui mène à l'hydrolyse des phospholipides. Le domaine C-terminal permet la reconnaissance et la fixation de la toxine aux têtes phospholipidiques en surface des membranes des cellules cibles. La première étape de fixation est médiée par le calcium (Titball, 1989-1993; Nagahama et al., 1998; Jepson et Titball, 2000; Ochi et al., 2003). Ensuite, les interactions hydrophobes entre les chaînes latérales des phospholipides cellulaires et les résidus hydrophobes de la toxine alpha lui permettent de s'insérer au sein de la bicouche phospholipidique (Jepson et Titball, 2000). Si cette toxine ne forme pas véritablement d'oligomères stables à la surface des cellules eucaryotes, la possibilité de complexes transitoires n'est pas exclue (Nagahama et al. 1996). Justin et associés (2002) ont montré qu'alpha pouvait présenter des différences de structures et de cinétique selon les souches productrices. Les cibles principales de la phospholipase de *C. perfringens*-PLC sont la sphingomyéline et la phosphatidylcholine, deux composantes essentielles des membranes cellulaires eucaryotes. Il est intéressant de noter que si la portion enzymatique (N-terminale) possède un effet toxique propre, les deux portions de la toxine sont indispensables pour atteindre une toxicité optimale (100%) (Petit et al., 1999).

Effets toxiques : mécanismes et niveau de toxicité des souches productrices.

Expérimentalement, la toxine alpha est létale lors d'injection intraveineuse et / ou intrapéritonéale chez la souris, induit une nécrose cutanée chez le cobaye et une lyse des érythrocytes humains et de diverses espèces animales (Nagahama et al., 1996; Ochi et al. 1996). La toxine alpha a également d'importants effets sur le système cardiovasculaire (Sakurai et al., 1985). Elle induit ascite et oedèmes en augmentant la perméabilité vasculaire (Titball, 1993, Maegawa et al., 2002). Elle est capable d'inhiber de façon dose dépendante (i) l'activité du myocarde par effet inotrope négatif (Regal and Shideman, 1980a-b ; Stevens and Bryant, 1997) et (ii) la contractilité des muscles squelettiques. À l'inverse, la même toxine alpha induit la contraction des muscles lisses (vasculaires, intestinaux) (Fujii et al., 1986 ; Sakurai et al., 1990; Blayney et al., 1996).

Au niveau sanguin et cellulaire, la toxine alpha induit différents processus responsables de nécrose cellulaire. Via l'activation des phospholipases endocellulaires, elle stimule les mécanismes de l'inflammation (Titball, 1993). La toxine alpha a également des effets complexes sur les neutrophiles (PMN) permettant à *C. perfringens* d'y survivre après phagocytose (O'Brien et Melville, 2004). Sous son influence, les PMN s'accumulent massivement dans les vaisseaux sanguins de faible diamètre situés à proximité du site d'infection (margination) sans pouvoir l'atteindre car la toxine inhibe la diapédèse (Awad et al., 2001). La toxine induit également chez ces PMN un burst oxydatif prématuré, associé à la libération massive d'enzymes et d'agents oxydants qui endommagent les vaisseaux

sanguins et les tissus avoisinants sans atteindre les bactéries cibles (Styrt et al., 1989). Au niveau circulatoire, la toxine alpha entraîne de façon dose dépendante l'adhérence des PMN aux molécules de fibrine, fibrinogène et collagène de type I et l'agrégation des plaquettes en l'absence de lésion vasculaire (Ochi et al., 2002). On observe dès lors des complexes circulants de taille croissante englobant plaquettes, fibrine et globules blancs. Ces complexes peuvent obstruer les petits vaisseaux sanguins, créant des infarcti. En parallèle, les cellules endothéliales produisent une réponse pro-inflammatoire sous l'influence de la toxine alpha avec comme conséquences (i) la production et la libération de facteur d'activation des plaquettes (PAF) dans la circulation sanguine et (ii) l'expression de P-selectine, une molécule augmentant l'adhérence des neutrophiles à l'endothélium vasculaire avec pour conséquence la margination exacerbée citée précédemment (Stevens et al., 1988; Bunting et al. 1997, Bryant et al., 2000).

En conclusion, la toxine alpha altère l'activité des neutrophiles et leur capacité de migration jusqu'aux tissus infectés. Elle promeut également les accidents thrombo-emboliques et donc les conditions anaérobies favorables à la croissance de *C. perfringens* (Flores-Diaz and Alape-Giron, 2003). Ces effets sur le système vasculaire entraînant une ischémie tissulaire sont observés dans la gangrène gazeuse. En 1994, Ninomiya et associés montrent que la toxine alpha est impliquée dans les phénomènes de coagulation intravasculaire disséminée (**CIVD**) et l'état de choc dans les infections à *C. perfringens* de type A. En 1997, Bunting et associés suggèrent que les mêmes effets pourraient être également présents localement dans l'intestin lors d'entérotoxémie.

Niveau de toxicité. La quantité de toxine efficace est influencée par d'un côté son niveau de production et de l'autre, par les facteurs d'inactivation ou de destruction (anticorps, protéases, ...). Et ses conséquences dépendent également de la sensibilité de la cellule ou molécule cible. Cet équilibre s'applique à toutes les toxines.

La toxine alpha agit d'une manière dose-dépendante avec un seuil critique au-delà duquel se manifestent les effets toxiques (Ninomiya et al. 1994; Fernandez-Miyakawa et Uzal, 2005; Jost et al., 2006).

Concernant le niveau de production, en plus des systèmes VirR/VirS et Lux communs à toutes les souches de *C. perfringens* (Ohtani et al., 2002a-b), les souches de type A possèdent un système d'up-régulation d'expression spécifique via le gène *plcR* (Rood et Lyristis, 1995). Rood (1998) a également décrit des queues poly-A chez ces souches, responsables d'un autre mécanisme d'up-régulation, température dépendant. Le niveau d'expression de la toxine alpha est donc particulièrement variable et dépendant de la présence d'un ou plusieurs système(s) de régulation, présent ou non selon les souches (Katayama et al., 1993; Bullifent et al., 1996). Cet état de chose fait que le niveau d'expression peut varier d'un facteur 40 via des régulations du mRNA traduit) (Tsutsui et al., 1995). Cela pourrait expliquer pourquoi les *C. perfringens* de type-A peuvent à la fois être partie intégrante d'une flore intestinale normale et devenir pathogènes dans certaines circonstances liées au nombre de bactéries et au niveau d'expression des toxines.

Au niveau destruction ou inactivation, la toxine alpha est très sensible aux protéases digestives telles que la trypsine et la chymotrypsine (Niilo, 1986). Mais dans certaines circonstances, les protéases sont moins efficaces : soit leur production est faible (animaux très jeunes, régime pauvre en protéines prolongé), soit elles sont détruites ou inhibées par des inhibiteurs de protéases comme on en trouve dans le soja cru ou les patates douces (Lawrence and Cooke, 1980 ; Niilo, 1986). Si l'une de

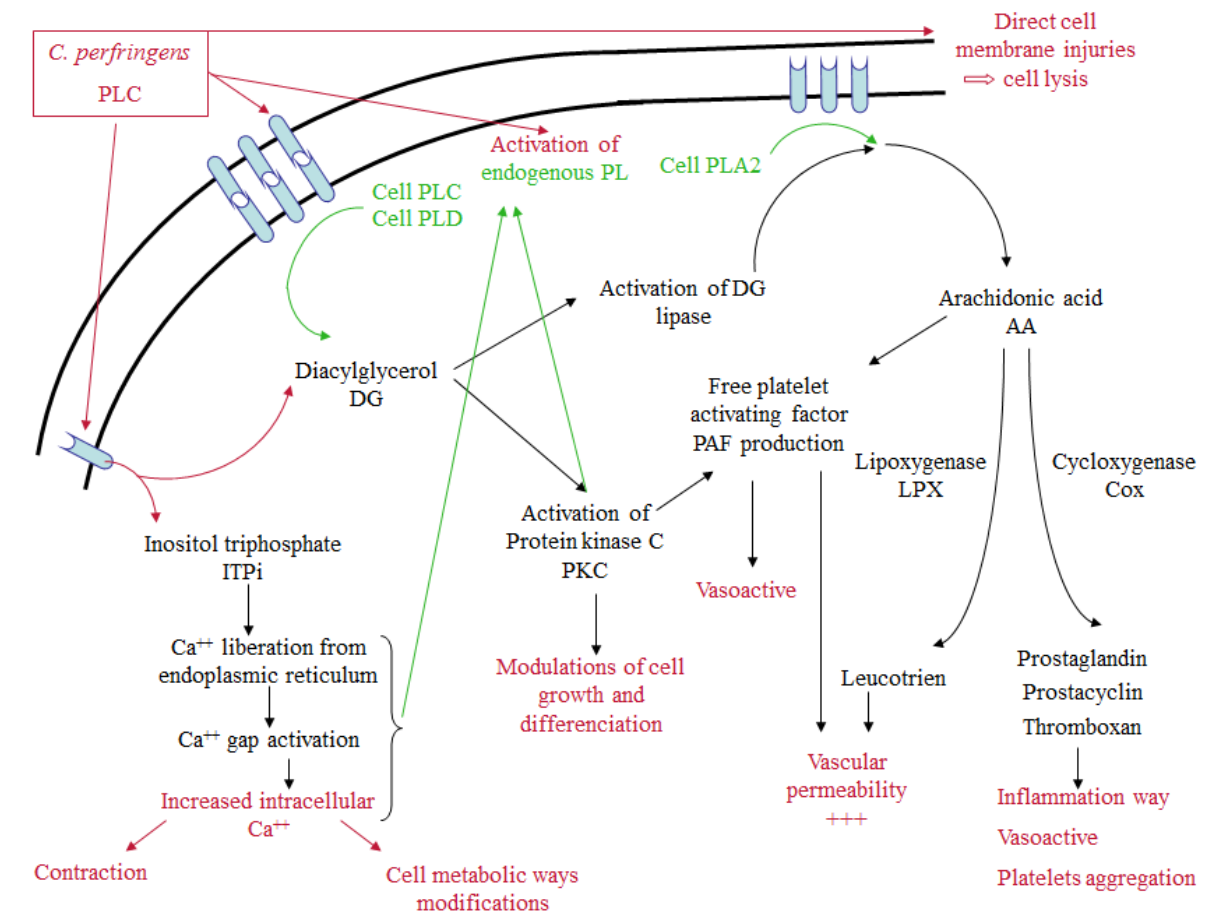
ces situations est associée à un changement brusque vers un régime riche en protéines, le niveau de protéases peut devenir insuffisant pour contrôler les toxines présentes dans l'intestin. Ce type de scénario peut être transposé aux autres toxines sensibles aux protéases comme les toxines beta et beta2.

Sur la sensibilité des cellules cibles, Flores-Diaz et associés (1998 et 2005) ont démontré que certaines lignées cellulaires sont significativement plus sensibles à la toxine alpha que d'autres (10^5 fois pour la lignée DonQ). Cette sensibilité accrue est liée à une déficience cellulaire en UDP-glucose et/ou en gangliosides complexes. Ces deux types de molécules sont liées car l'UDP-glucose (i) fait partie du processus d'élaboration des gangliosides composants essentiels des membranes cellulaires et (ii) prend également part à la production de phosphatidylcholine, cible de la toxine alpha. La quantité de gangliosides membranaires et leur teneur en acide sialique sont donc proportionnelles au niveau de résistance des cellules envers la toxine alpha. Dans les cellules déficientes en UDP-glucose, les dégâts infligés aux membranes par la toxine alpha dépassent les capacités de réparation de la cellule. Parmi les causes de déficiences en UDP-glucose chez la cellule on trouve le manque d'oxygène et / ou de glucose rencontré en cas de diabète ou physiologiquement dans les myocytes. Dans le même ordre d'idée, une synergie a été observée *in vitro* et *in vivo* entre la toxine alpha et les « Grandes Sialidases » de *C. perfringens*, synergie partiellement expliquée par la contribution de l'acide sialique dans la résistance de cellules vis à vis d'alpha (Flores-Diaz et al., 2005). Et dans une étude belge, toutes les souches de *C. perfringens* de type A testées par hybridation DNA-DNA possédaient des gènes codants pour des sialidases (Daube et al., 1996).

Toxine alpha et entérotoxémie. Dans les cas d'entérotoxémie en Europe, on retrouve presque exclusivement du *C. perfringens* de type A (*cpb2+/-, cpe-*) (Daube et al., 1996; Manteca et al., 2001; Dennison et al., 2005; Ceci et al., 2006) et ces souches de type A sont capables de produire des quantités de toxine alpha plus élevées que les autres souches (Fernandez-Miyakawa and Uzal, 2005, Fernandez-Miyakawa et al. 2007). Mais malgré ses différents effets toxiques identifiés, l'implication de la toxine alpha dans les entérotoxémies reste controversée. En effet, aucun modèle expérimental n'a actuellement pu reproduire l'entérotoxémie. Chez des porcelets gnotobiotiques, l'infection *per os* avec du *C. perfringens* de type A induit une entérococolite hémorragique (Niilo et al., 1963), mais la reproduction des lésions intestinales après administration de toxine alpha purifiée paraît impossible (Songer, 1996). L'injection intraveineuse de cette toxine à des veaux sains entraîne une diarrhée transitoire associée à une hyperhémie de la muqueuse digestive (Songer, 1996) et Lozano et associés (1970) ont réussi à reproduire une diarrhée sévère chez des veaux privés de colostrum. De plus, alors que les travaux de Fukata et associés (1998) mettaient en évidence l'implication de la toxine alpha dans les cas d'entérite nécrotique chez la volaille (Fukata et al., 1988), des travaux récents avec des souches alpha négatives contredisent cette hypothèse (Keyburn et al., 2006 ; Thompson et al., 2006). Pour ces différentes raisons, l'hypothèse actuelle privilégie une implication de la toxine alpha dans les processus pathologiques d'entérotoxémie en synergie avec une ou plusieurs autres toxines.

Vaccins. En dépit de son rôle controversé dans l'entérotoxémie, certains vaccins renseignent la présence de la valence « alpha ». La vaccination entraîne une réponse sérologique positivement corrélée à la quantité d'antigène injecté (Manteca et al, 2004), mais le seuil sérologique pour obtenir une protection clinique a été fixé empiriquement car aucune expérience de protection clinique n'a été réalisée *in vivo*. De plus, chez des bovins sains, un niveau basal d'anticorps circulants anti- alpha peut être détecté car la toxine, produite en petite quantité par la flore intestinale normale, peut être

résorbée et induire une réponse immunitaire. Certaines souches (comme la A121A/91) produisent des formes de toxine alpha immunogènes mais non toxiques. Ces souches pourraient être une alternative aux souches vaccinales actuelles (Schoepe et al., 2001 et 2006). Mais la toxine alpha n'est probablement pas le seul facteur de virulence à considérer dans l'approche vaccinale contre les souches de type A. En effet, l'équipe de Thompson et associés (2006) a en effet réussi à obtenir une immunité protectrice chez des volailles en travaillant avec des souches de *C. perfringens* alpha négatives.



2.2.4.2. Toxine Beta2 – CPB2

La Beta2 (CPB2) est une des dernières toxines de *C. perfringens* à avoir été découverte et caractérisée (Gibert et al., 1997). En dépit de son nom, elle n'a pas de parenté de séquence avec la toxine beta mais seulement des similitudes d'activité biologique.

Nature de la toxine : génotype et phénotype

Le gène codant pour la beta2, *cpb2*, est localisé sur un mégaplasmide (de 54 à 100 kb) et est exprimé sous le contrôle positif de **virR/virS** (Ohtani et al., 2003). A hauteur du promoteur, le gène *cpb2* présente une séquence consensus différente des séquences consensus classiquement présentes dans les promoteurs des facteurs de virulence connus chez *C. perfringens* (Ohtani et al., 2004). C'est également le cas pour le gène codant pour une adhésine au collagène de *C. perfringens*: *cna*. Ces deux gènes, *cpb2* et *cna*, sont sous le contrôle d'expression de *virR / virS*, mais de manière opposée.

On observe un processus d'up-régulation pour *cpb2* et de down-regulation pour *cna*. La toxine beta2 semble sensible aux protéases comme la toxine alpha (Smedley et al., 2004) ou *a minima* instable si on considère la diminution rapide de sa toxicité (Gibert et al., 1997). Elle est principalement produite à la fin de la phase de croissance logarithmique (Smedley et al., 2004).

Différents gènes ou allèles de *cpb2* ont été mis en évidence et présentent des divergences de séquences. Divers modes de classification sont possibles. Dans un premier temps, les gènes *cpb2* ont été divisés en deux grandes classes : d'un côté les gènes *cpb2* de souches porcines présentant une forte corrélation génotype / phénotype et de l'autre les gènes *cpb2* de souches non porcines avec une faible corrélation génotype / phénotype (Bueschel et al., 2003). Jost et associés (2005) ont aussi défini 2 classes alléliques similaires : les gènes *cpb2* « consensus » présents chez le porc et bien exprimés et les gènes *cpb2* « atypiques » présents chez les autres espèces animales et caractérisés par une absence d'expression. Une autre classification a été adoptée par Fisher et associés (2005) dans le contexte des diarrhées humaines associées à *C. perfringens* : les diarrhées sporadiques (DS) et celles associées aux antibiotiques (DAA). Ils mettent en évidence deux variants de *cpb2*, *cpb2h1* et *cpb2h2*, tous deux associés au gène de l'entérotoxine, *cpe*. *Cpb2h1* est localisé sur le même plasmide que le gène *cpe* qui code pour l'entérotoxine avec une séquence d'insertion (IS) IS1151 présente en aval de *cpe*. *Cpb2h2* est localisé sur un plasmide distinct de celui sur lequel est situé le gène *cpe* en aval duquel on retrouve une IS1470-like. Le variant *cpb2h2* est plus proche des séquences (atypiques) d'origine animale que *cpb2h1*. Concernant les protéines correspondantes, CPB2H1 est 10 fois plus cytotoxique que CPB2H2 pour les cellules Caco2. Enfin, une dernière classification a été décrite par Johansson et associés en 2006. Pour les souches d'origine animale, elle est liée à l'origine géographique des souches. Cette classification n'est pas directement transposable aux souches humaines. L'hypothèse de l'auteur concernant cette différence est la plus grande mobilité des humains se déplaçant beaucoup plus aisément et fréquemment que les animaux d'une région à l'autre du globe.

Un aspect intéressant relatif à la toxine beta2 est l'inconstance de la relation entre présence du gène *cpb2* et production de la toxine beta2 (CPB2). Chez des porcelets présentant une entérite, la corrélation entre la présence du gène *cpb2* et son expression est supérieure à 90%, alors que *cpb2* semble absent chez les porcs sains. Chez le bovin, moins de 50% des souches testées sont capables d'exprimer la toxine selon Bueschel et associés (2003). Récemment, d'autres études (Fisher et al., 2005; Waters et al., 2005) ont montré que certaines souches *cpb2+*, précédemment classées comme non productrices, possèdent les informations génétiques nécessaires et la capacité de produire la toxine mais que les quantités de mRNA sont trop faibles pour correspondre à une production de quantités de protéines détectables par les techniques classiques de protéomique, comme le Western Blot. Une autre étude a montré que l'expression de la toxine beta2 peut être induite par certains aminosides (gentamicine, streptomycine) via un glissement de la fenêtre de lecture au niveau du ribosome ou ribosomal frameshift (mécanisme des codons « glissants » ou slippery codons) (Vilei et al., 2005). Ces deux études ont été réalisées sur des souches d'origine équine. A l'instar de la toxine alpha, différents niveaux d'expression de CPB2 sont observés et ce, dans les différentes espèces animales (Harrison et al., 2005).

Effets toxiques

La toxine beta2 est classée dans les toxines majeures car elle est létale en intraveineuse chez la souris (DL_{50} : 3 µg) et présente des propriétés cytotoxiques envers certaines lignées cellulaires : I407, CHO

(Gibert et al., 1997) et CaCo2 (Smedley et al., 2004). Les cellules infectées s'arrondissent et présentent des bourgeonnements membranaires puis finalement se détachent de leur support. Aucune action sur le cytosquelette ou sur une voie métabolique particulière n'a pu être mise en évidence jusqu'à présent. Actuellement, le mode d'action supposé de cette toxine est la formation de pores membranaires.

Si l'implication de la toxine beta2 dans les pathologies entériques à *C. perfringens* n'a pas encore été démontrée, elle est néanmoins fortement suspectée chez le porc (Klaasen et al., 1999 ; Bueschel et al. 2003) et le cheval (Herholz et al., 1999). Chez le porc, une relation étroite entre porcelets, entérite, présence du gène *cpb2* et production de la toxine beta2 est observée. Chez le cheval, la toxine a été détectée par immunohistochimie au niveau des lésions caractéristiques de typhlocolite et est absente des portions saines de l'intestin (Bacciarini et al., 2003). Chez le bovin, comme pour la toxine alpha, l'implication directe de la toxine beta2 dans l'entérotoxémie n'est pas scientifiquement prouvée. Une synergie entre la beta2 et une autre toxine est l'hypothèse la plus probable. Manteca et associés (2002) ont observé lors d'une reproduction *in vivo* d'infection à *C. perfringens* sur anses ligaturées de veau que les anses inoculées avec des souches *cpb2+* et hautes productrices de toxine alpha présentaient les scores lésionnels les plus élevés. Dans une étude antérieure, ils avaient également montré que les bovins entérotoxémiques présentaient un nombre plus élevé de souches *cpb2+/cpa+* (par animal) que les bovins sains, même si la prévalence de *cpb2* entre les deux populations n'était pas significativement différente (Manteca et al. 2001). Une des études de ce travail aborde directement la répartition de ces souches chez le bovin sain ou entérotoxémique. Dans le cadre de l'entérotoxémie bovine, pour les toxines alpha et beta2, la présence ou l'absence de lésions semble plus liée à un problème quantitatif (nombre de bactéries et / ou niveau de production de toxine) que qualitatif (présence ou absence de bactéries toxigènes).

Depuis peu, une nouvelle synergie est suspectée en médecine humaine entre la toxine beta2 et l'entérotoxine (Fisher et al., 2005). L'association fréquente des gènes *cpb2* et *cpe* sur le même plasmide (Fisher et al., 2005) ou sur des plasmides différents (Harrison et al., 2005) a été prouvée en cas de diarrhées à *C. perfringens* de type sporadique ou associées aux antibiotiques (voir ci-dessus les variants *cpb2h1* et *cpb2h2*). En médecine vétérinaire, l'association entre *cpb2* et *cpe* a aussi été mise en évidence par Bueschel et associé (2003) dans des souches *C. perfringens* de type EE (type E portant le gène *cpe*), ces souches étant considérées comme une cause commune de mort subite chez les veaux aux Etats-Unis. Malheureusement, aucune de ces souches de type EE n'exprimait la toxine beta2 *in vitro*. Néanmoins, cette étude suggère la possibilité d'une liaison génétique entre *cpb2* et *cpe* dans des souches d'origine animale, à l'instar de certaines souches humaines.

Vaccins

A l'heure actuelle, aucun vaccin anti-clostridien ne renseigne de valence « beta2 ».

2.2.4.3. Entérotoxine – CPE

L'entérotoxine, surtout étudiée en médecine humaine, est à l'origine d'intoxications alimentaires caractérisées par une diarrhée aqueuse accompagnée de fortes douleurs abdominales. Il s'agit d'une pathologie auto-limitante, avec des symptômes aigus et de courte durée (moins de 24h) qui ne porte pas à conséquence, excepté chez les personnes âgées, les jeunes enfants ou les patients immunodéprimés.

Nature de la toxine : génotype et phénotype

Le gène codant pour l'entérotoxine, *cpe*, se situe soit sur le chromosome (intoxication alimentaire) soit sur un plasmide conjugatif (diarrhée) (Brynstad et al., 2001; Miyamoto et al., 2004). Le gène *cpe* est principalement retrouvé chez des souches de *C. perfringens* de type A d'origine humaine et, parfois, chez des souches de type E d'origine bovine. On considère qu'environ 5% des souches de *C. perfringens* d'origine animale sont porteuses du gène *cpe* (Songer et al., 1993). En Belgique, les souches bovines testées, principalement de type A, sont *cpe* négatives (Daube et al., 1994). Cependant, au Nigéria, plus de 50% des souches de type A isolées de bovins diarrhéiques possèdent le gène *cpe*, alors que ce gène est absent des souches isolées de bovins sains (Efuntoye et Adesotoye, 2003). Comme mentionné précédemment, Bueschel et associés (2003) ainsi que Fischer et associés (2005) ont observé une corrélation élevée entre les gènes *cpb2* et *cpe* au sein de souches de type E isolées de veaux diarrhéiques et une association *cpe* – *cpb2* chez des souches de type A isolées de cas de diarrhées humaines, respectivement.

Le gène *cpe* code pour une protéine mature de 319 acides aminés (35 kDa, pI 4.3) qui ne présente pas d'homologie significative avec d'autres protéines, excepté avec une protéine non toxique produite par *C. botulinum*, mais ce lien reste incertain.

Contrairement aux autres exotoxines de *C. perfringens*, l'entérotoxine est uniquement produite pendant la phase de sporulation de la bactérie. Le phosphate inorganique semble être le signal environnemental décisif qui induit la sporulation et la production d'entérotoxine (Philippe et al., 2006). L'entérotoxine est thermosensible : elle est irréversiblement inactivée à 60°C et détruite à partir de 75°C. Elle est, par contre, résistante aux protéases et semble même jouir d'une augmentation d'activité sous l'action de certaines d'entre elles, comme la trypsine et la chymotrypsine (Kokai-Kun et McLane, 1997).

Effets toxiques

L'entérotoxine est classée dans les toxines majeures. Elle semble capable d'agir de 3 façons distinctes mais synergiques en induisant (i) une hyperkaliémie et, donc, une insuffisance cardiaque, (ii) un choc endotoxinique avec décompensation cardiorespiratoire et (iii) une interférence avec la transmission neuromusculaire.

Chez l'homme, les lésions intestinales induites par l'entérotoxine sont principalement localisées à hauteur de l'iléum. Les changements peuvent être morphologiques avec raccourcissement et épaissement des villosités, nécrose des entérocytes et / ou électrophysiologiques avec réduction de la résistance transépithéliale et de l'absorption nette d'eau (Fernandez Miyakawa et al., 2005). L'entérotoxine (35 kDa) avec son récepteur et co-récepteur forment un volumineux complexe hydrophobe capable de créer des pores dans les membranes cellulaires. Un premier complexe de 155kDa se forme et cette structure, s'insérant dans la membrane cellulaire, permet le transit de petites molécules de l'intérieur de la cellule vers la lumière intestinale, créant un déséquilibre osmotique. Ces changements permettent à l'entérotoxine d'interagir avec les jonctions serrées intercellulaires au niveau de l'occludine. L'interaction entre l'entérotoxine et l'occludine mène à la formation d'un complexe de 200 kDa et à l'internalisation de l'occludine (Kokai-Kun et McLane, 1997). La barrière sélective de l'épithélium est alors perturbée, la perméabilité intestinale augmente et l'homéostasie intestinale est rompue. Le signe clinique associé est une diarrhée aqueuse aiguë (Skjelkvale and Uemura, 1977). Au niveau cellulaire, les entérocytes présentent des modifications qui

vont d'une légère modification morphologique à l'apoptose (faible dose) ou la nécrose (forte dose), selon le niveau d'exposition à l'entérotoxine (Chakrabarti et al., 2003; McClane et Chakrabarti, 2004).

Vaccins :

Aucun vaccin anti-clostridien ne renseigne actuellement de valence « entérotoxine ».

2.2.4.4. Toxine Beta - CPB

Nature de la toxine : génotype et phénotype

Le gène codant pour la toxine beta, *cpb*, est localisé sur un grand plasmide peu caractérisé (Rood, 1998), et que l'on retrouve chez des souches de type B (ϵ, β, α) et de type C (β, α) de *C. perfringens*. Le gène *cpb* code pour une protéine d'environ 35 kDa, partiellement sensible à la chaleur sous sa forme monomérique et particulièrement sensible à l'activité des protéases digestives comme la trypsine (Sakurai and Fuji, 1987).

Si la toxine beta2 a été ainsi nommée en raison de ses effets biologiques communs avec la toxine beta, ces deux toxines n'ont aucun lien phylogénétique. La toxine beta est, par contre, proche de la toxine alpha de *Staphylococcus aureus* tant au niveau séquence que mode d'action.

Effets toxiques

La DL50 de la toxine beta est inférieure à 100 $\mu\text{g/ml}$, mais sa demi-vie *in vivo* est très courte à cause de sa grande sensibilité aux protéases (Sakurai and Fuji, 1987). Cette caractéristique explique pourquoi cette toxine est principalement impliquée dans des pathologies du très jeune âge (peu, voire pas de protéases digestives) ou en présence de faible niveau de protéases (régime pauvre en protéines : Pigbel). L'extrême labilité de la toxine beta restreint et localise également ses effets toxiques. Sa production a lieu au début de la phase de croissance logarithmique et son niveau chute avec la production des protéases clostridiennes et non clostridiennes. Chez les nouveau-nés, la toxine beta est particulièrement connue pour son implication dans l'entérite nécrotique du porcelet (Waters et al., 2003) ou la dysenterie de l'agneau (Greco et al., 2005) et, peut-être, dans certains cas d'entérotoxémie du veau au pis (Griner and Bracken, 1953) associés à une nécrose de la muqueuse et des parois intestinales.

Au niveau moléculaire, cette toxine est une « pore-forming » ou « porine cholestérol dépendante » composée d'un heptamère résistant à la chaleur (228 kDa). Celui-ci se localise principalement au niveau des îlots lipidiques de la membrane, plus spécifiquement au niveau des microzones membranaires résistantes aux détergents (DRM's en anglais pour « detergent resistant membrane microarrays ») (Shatursky et al., 2000; Shepard et al., 2000; Tweten et al., 2001). Le pore formé par la toxine permet un efflux de K^+ ainsi qu'un influx de Na^+ et de Ca^{++} au niveau des cellules touchées (Nagahama et al., 2003). La toxine beta, comme l'alpha de *Staphylococcus aureus* et de *C. perfringens*, est également capable d'induire un relargage d'acide arachidonique, donc une activation des processus inflammatoires, (Fink et al, 1989; Menestrina et al., 2001, Steinthorsdottir et al., 2000) et ce via l'activation des phospholipases endocellulaires (Fink et al., 1989). Ces deux activités, déséquilibre ionique et activation des phospholipases, sont dose-dépendantes et semblent liées.

Vaccins: L'utilisation de vaccins comprenant le toxoïde beta, antigène majeur (Fisher et al., 2006) chez les porcelets non sevrés permet une réduction de 30% des pertes lorsque ces vaccins sont

utilisés en urgence (Springer and Selbitz, 1999). Globalement la vaccination donne des résultats satisfaisants chez les porcelets (Hogh, 1976) et en médecine humaine dans les épidémies de Pigbel (Bai et al., 2006).

2.2.4.5. Toxine Epsilon

La toxine epsilon de *C. perfringens* est la toxine clostridienne la plus puissante après les neurotoxines botuliniques et tétanique. Elle est produite par les souches de type B (entérotoxémie et dysenterie) et de type D (maladie du rein pulpeux) de *C. perfringens*. Ces pathologies affectent principalement les ovins (agneaux), mais peuvent également toucher les caprins et les bovins (Uzal et al., 2002 ; Mete et al., 2013 ; Jones et al. 2015), exceptionnellement les humains.

Nature de la toxine : génotype et phénotype

Le gène codant pour la toxine, *etx*, est localisé sur un plasmide de haut poids moléculaire et ne présente pas d'homologie de séquence avec des séquences codant pour d'autres toxines ou protéines enregistrées dans les bases de données (Bentancor et al., 1999). Néanmoins la structure de la toxine est proche de l'aérolysine d'*Aeromonas hydrophila* (Cole et al., 2004).

La toxine epsilon est produite sous forme de protoxine inactive (331 a.a., pl 8,02) capable de se fixer à la cellule cible, mais devant subir l'action d'une protéase pour devenir toxique (Nagahama et al., 1998). Cette activation correspond à la perte de 13-14 a.a. au niveau N-terminal et de 22 a.a. au niveau C-terminal (Miyata et al., 2001). Différents isoformes (d'environ 31,2 kDa) peuvent ainsi être obtenus et possèdent des degrés d'activité variables.

Effets toxiques

La toxine epsilon est extrêmement puissante (CL_{50} : 2 µg/ml *in vitro*, DL_{50} : 0,78 ng en souris) et, ce même, si un état de tolérance peut être sélectionné lors de faibles doses à répétition (Beal et al., 2003).

La toxine epsilon augmente la perméabilité vasculaire et affecte directement l'intégrité des endothéliums vasculaires : il en résulte des œdèmes protéiniques (Uzal et al., 2004). *In vivo*, les fonctions de la barrière endothéliale sont rapidement et irréversiblement compromises, de façon dose- et temps-dépendante (Adamson et al. 2005). Lésions sont souvent distribuées de façon bilatérale et symétrique dans les organes touchés et les signes cliniques non latéralisés (Finnie et al., 1999). À l'autopsie, on observe principalement de l'œdème cérébral et pulmonaire. Chez la souris, la toxine epsilon s'accumule principalement au niveau du rein (glomérules, capillaires et tube collecteurs). Mais cet organe a également un effet protecteur car chez la souris, la néphrectomie augmente la sensibilité à la toxine (Tamai et al., 2003). Récemment, des anticorps naturels anti-epsilon (absence de vaccination et transfert d'immunité colostrale) ont été mis en évidence chez des chevreaux dès l'âge de 6 semaines en l'absence de tout signe clinique. Mais chez ces animaux, le titre en anticorps augmentait de façon drastique en cas d'entérotoxémie (Veschi et al., 2008).

Au niveau moléculaire, la fixation de la toxine epsilon requiert un récepteur spécifique, probablement une glycoprotéine (Shortt et al., 2000). Ces récepteurs sont vraisemblablement présents au niveau de l'endothélium (Nagahama and Sakurai, 1992) et pourraient être particulièrement représentés dans les organes cibles comme le cerveau et les reins (Finnie et al., 1999; Finnie, 2003; Tamai et al., 2003). Comme la toxine beta, l'epsilon est une poreformine

heptamérique qui s'organise en tonneaux beta dans les zones membranaires résistantes aux détergents (DRM's). Ces pores induisent une fuite rapide du K⁺ et une entrée rapide des Na⁺ et Cl⁻, ainsi qu'une entrée lente du Ca⁺⁺ (Petit et al., 2001) associée à une réduction de la résistance transépithéliale (Petit et al., 2003). Chez le mouton et la chèvre, lors d'essais sur anses ligaturées, Fernandez-Miyakawa and Uzal (2003) ont pu reproduire les transports d'eau et d'ions au niveau du petit et du gros intestin. La toxine epsilon induit également des modifications du cytosquelette (marginalisation de l'actine, épaissement des microtubules) et des membranes cellulaires (bourgeoisements) (Donelli et al., 2003). Les lésions observées au niveau cellulaire aboutissent à de la nécrose. La présence de gangliosides et leur teneur en acide sialique semblent diminuer les capacités de fixation et d'heptamérisation de la toxine, donc sa toxicité, comme c'est déjà le cas pour la toxine alpha (Miyata et al., 2002; Shimamoto et al., 2005).

Vaccination La vaccination contre la toxine epsilon confère un haut degré de protection (Stephen and Pietrowski, 1986) et est largement utilisée en petits ruminants (Oyston et al., 1998; Uzal and Kelly, 1998).

2.2.4.6. Toxine Iota

La toxine Iota est produite exclusivement par les souches de type E.

Nature de la toxine : génotype et phénotype

Contrairement aux autres toxines majeures de *C. perfringens*, il s'agit d'une toxine binaire composée d'un élément enzymatique (Ia) et d'un élément de liaison (Ib) sans lien covalent. Les deux portions de la toxine sont indispensables à la toxicité, mais la présence d'anticorps contre l'une des deux portions est suffisante pour neutraliser toute activité *in vivo*. La toxine Iota appartient à la classe des toxines ADP-ribosylantes et présente une très forte homologie avec la toxine de *C. spiriforme* (Sa – Sb). Cette homologie est telle qu'il est possible d'intervertir les sous-unités de ces deux toxines en préservant l'activité toxique : Ia + Ib = Ia + Sb = Sa + Ib = Sa + Sb. Il existe des homologies avec d'autres toxines du même groupe, mais nettement moindres que celle décrite ci-dessus (Sakurai et al., 2003, Tsuge et al., 2003).

Les gènes codant pour cette toxine, *iap/ibp*, sont également localisés sur un grand plasmide. Les deux sous-unités de la toxine sont codées par deux gènes de même orientation, séparés par 40 nucléotides non codants (Stiles et al., 2002). Selon certains auteurs, l'origine du plasmide porteur de *iap/ibp* serait un plasmide porteur de *cpe* issus d'une souche de type A dans lequel un élément génétique mobile portant *iap/ibp* se serait inséré à hauteur d'un locus *tcp* pour *Transfer Clostridial Plasmid*. Cet événement aurait transformé des souches de type A en type E, lesquelles ont ensuite évolué indépendamment. Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi certaines souches de type E possèdent un gène *cpe* silencieux (voir § beta2) (Songer and Miskimmins, 2004; Li et al., 2007).

Effets toxiques

Cette toxine est dermonécrotique chez le cobaye et létale en intrapéritonéal chez la souris (Sakurai et al., 1995; Tsuge et al., 2003), mais a une toxicité (*in vitro*) relativement faible comparée aux autres toxines majeures.

Pour obtenir l'activité toxique, Ia et Ib, exprimées sous forme de pro-toxines, doivent être clivées par des protéases. Les protéases responsables du processus de maturation de Ia-Ib sont produites par *C.*

perfringens sous le contrôle du système VirR / VirS (Gibert et al., 2000). La sous-unité Ib (protoxine de 100 kDa – 836 a.a) doit subir la protéolyse de ses 171 a.a. N-terminaux pour devenir pleinement active (~80 kDa – 665 a.a.) (Stiles et al., 2002). Avant cette activation, la protoxine est capable de se lier à la membrane cellulaire mais est incapable d'oligomériser ou de fixer Ia. L'oligomérisation de Ib-activée en un heptamère de ~530 kD est température-dépendante et facilitée par une protéine présente à la surface des cellules et considérée comme son récepteur (Blocker et al., 2001; Stiles et al., 2002). Les heptamères de Ib forment des pores qui entraînent une diminution lente de la résistance transépithéliale, mais n'agissent pas sur le cytosquelette comme epsilon (Richard et al., 2002). Ce sont des pores hydrophiles qui ont une plus grande perméabilité au K⁺ qu'au Cl⁻ (Knapp et al. 2002).

Comme pour les toxines beta ou epsilon, Ib-activé se fixe à son récepteur cellulaire dans les régions DRM's (Hale et al., 2004 ; Nagahama et al., 2004). Les complexes Ib-activée / récepteur migrent et se regroupent pour oligomériser. Ces oligomères, qui induisent l'endocytose, interagissent avec Ia et les 3 éléments sont internalisés de concert. La toxine Ib-Ia se trouve dans un endosome d'où Ia est exportée dans le cytosol de la cellule eucaryote par un mécanisme pH-dépendant (acidification de l'endosome). Ia induit l'ADP-ribosylation de certains types d'actine et entraîne la dislocation du cytosquelette en inhibant la polymérisation de l'actine. Cette perturbation du cytosquelette induit à son tour une modification de la perméabilité des épithéliums (Aktories and Wegner, 1992; Nagahama et al., 2000).

Concernant l'implication de la toxine iota dans l'entérotoxémie du bovin, Bueschel et associés (2003) de même que Songer et Miskimmins (2004) ont montré que les souches de type EE (type E possédant le gène *cpe*) sont considérées comme fréquemment responsables de mort subites chez les veaux.

Vaccins: La vaccination contre la sous-unité Ib procure une bonne protection contre la toxine iota sauvage et également contre la toxine de *C. spiriforme* sans risque de toxicité (Sirard et al., 1997). Il n'y a pas de vaccin contre le type E enregistré pour le veau, mais bien pour les petits ruminants chez lesquels il est recommandé (Songer and Miskimmins, 2004).

2.2.4.7. Toxine NetB

NetB pour « **Necrotic enteritis toxin B** » est la dernière toxine de *C. perfringens* à avoir été découverte et caractérisée au début du XXI^e siècle (Keyburn et al., 2008). Elle a été mise en évidence chez des volailles atteintes d'entérite nécrotique (EN) à *C. perfringens*.

Nature de la toxine : génotype et phénotype

Le gène codant pour cette toxine, *netB*, est situé sur un grand plasmide conjugatif (Lepp et al., 2010). On le retrouve chez des souches de type A régulièrement porteuses également du gène *cpb2* et il a une identité de 38% avec *cpb* le gène de la toxine beta de *C. perfringens* et 31% d'identité avec le gène de la toxine alpha de *Staphylococcus aureus* (Keyburn et al., 2008). Les études réalisées jusqu'à présent montrent une très forte conservation de la séquence, que la souche soit issue ou non d'un animal atteint d'entérite nécrotique (Abildgaard et al., 2010 ; Keyburn et al., 2010). Si le gène a été mis en évidence chez des souches de volailles atteintes d'EN (EN+), il est également présent chez des souches d'animaux sains et / ou d'élevage sans problème d'EN (EN-) (Abildgaard et al.,

2010 ; Keyburn et al., 2010 ; Johansson et al., 2010 ; Martin et Smyth, 2009 ; Smyth et Martin, 2010). Certaines études montrent une prévalence de NetB plus élevée chez les souches EN+ qu'EN- (Keyburn et al., 2008 et 2010 ; Johansson et al., 2010), mais d'autres études montrent le contraire (Abildgaard et al., 2010)

La production de NetB semble sous l'influence positive (up-regulation de la transcription) du système virR / virS qui agit déjà de la sorte sur les gènes des toxines alpha et beta2 (Cheung et al., 2010). La corrélation entre la présence du gène et son expression est variable d'une souche à l'autre et selon les études. Il semblerait que les souches issues d'épisodes cliniques d'EN soient plus à même d'exprimer la toxine à des niveaux détectables que celles issues d'animaux sains (Abildgaard et al., 2010, Keyburn et al., 2010).

Effets toxiques

La toxine NetB est cytotoxique pour les hépatocytes LHM (Long Horn Male) chez lesquels elle induit des modifications du cytosquelette avec arrondissement de la cellule, souvent associées à l'apoptose (rounding), et de la lyse. Elle semble, comme la toxine beta, appartenir à la famille des porines (Johansson et al., 2010). Son implication dans l'EN a été testée par construction de mutants *netB* KO (inactivation du gène *NetB*) qui perdent leur virulence. La virulence est restaurée par complémentation avec le gène sauvage (Keyburn et al., 2008). Néanmoins, certaines équipes de recherche ont montré qu'il était possible de reproduire l'EN *in vivo* avec des souches de *C. perfringens* A *netB+* mais également *netB-* (Smyth et Martin, 2010 ; Cooper et Songer, 2010), alors que d'autres n'arrivent à induire la pathologie qu'au départ de souches *netB+* (Keyburn et al., 2010). La virulence des souches en fonction de leur origine « clinique » (animaux EN+ ou EN-) est également sujette à controverse. Il semble que les souches issues d'épisodes cliniques soient plus à même d'induire de l'EN en conditions expérimentales (Cooper et al., 2010) mais surtout que d'une souche à l'autre le score lésionnel soit variable (Johansson et al., 2010), ce qui probablement lié au niveau de production de NetB comme l'ont observé les équipes d'Abildgaard et de Keyburn en 2010.

Vaccins : A l'heure actuelle, aucun vaccin anti-clostridien ne renseigne de valence NetB.

Table 8 : Tableau récapitulatif des toxines majeures de *C. perfringens*

Toxine	Alpha	beta2	entérorotoxine	beta	epsilon	iota	NetB
Gène	<i>cpa</i> ou <i>plc</i>	<i>cpb2</i>	<i>cpe</i>	<i>cpb</i>	<i>etx</i>	<i>iap-ibp</i>	<i>netB</i>
Localisation gène	Chromosome	Plasmide	Chromosome ou plasmide	Plasmide	Plasmide	Plasmide	Plasmide
Expression	Forme mature	Forme mature	Forme mature	Forme mature	Protoxine	Protoxines	
Activation	/	/	/	/	Protéases	Protéases	/
Forme active	Phosphalipase	Porine ?	Équilibre ions et atteinte tight junctions	Porine	Porine	Pore Ib + ADP-ribosylation Ia	Porine ?
Structure IV°	Complexe temporaire ?	???	Binome récepteur toxine	Heptamère	Heptamère	Heptamère	???
Récepteur		???	oui	DRM's	DRM's	DRM's	???
Inactivation	Protéases	Protéases	Chaleur 75°C	Protéases			
Régulation	Agr-like (VirR/VirS), LuxS, plcR, polyA, contact cellulaire (Caco2)	Agr-like* (VirR/VirS), pH, aminosides, contact cellulaire (Caco2)	Agr-like (SpoA),	Agr-like* (VirR/VirS), contact cellulaire (Caco2)	Agr-like*		VirR/VirS

Table 8 : Toxines majeures de *C. perfringens* avec leur localisation génétique, leur état activé ou non lors de l'excrétion, leurs propriétés connues, leur mode de régulation connu (juin 2015). *avis contradictoire selon les publications

3. PATHOLOGIES ASSOCIÉES À *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* ET SES DIFFÉRENTS TOXINOTYPES.

3.1. Pathologies humaines et animales.

Les humains souffrent principalement de pathologies causées par le toxinotype A : gangrène gazeuse (type A non enterotoxinogène), diarrhée sporadique ou associée aux antibiotiques (type A +/- enterotoxinogène), intoxication alimentaire, (type A entérotoxigène et type D) (Vogel, 1995; Rood et al., 1997; Meer and Songer, 1997; Sparks et al., 2001 ; Carney et al., 2002; Vaishnavi et al. 2005).

Les animaux sont en général atteints d'entérites diverses, accompagnées ou non de diarrhée voire de dysenterie ou d'entérotoxémies dont le symptôme cardinal est la mort subite (Songer 1996, 2010). Ces pathologies sont causées par des souches des 5 toxinotypes (Rood et al., 1997; Duchesnes et al., 2003 ; Coetzer and Tustin, 2005; Greene, 2006; Radostits et al., 2007). Mais ils peuvent également être victime de gangrène gazeuse.

La pathologie peut donc être le fait d'une dérive de flore, d'une inoculation traumatique de bactéries (spores), voire de l'ingestion de toxines préformées.

3.2. Toxinotypes et implications vétérinaires

La grande majorité des pathologies présentées ci-dessous sont caractérisées par une évolution aiguë, un pronostic sombre à désespéré liés à une production de toxines au niveau intestinal mais ayant des répercussions systémiques parfois importantes.

3.2.1. Toxinotype A (toxine alpha +/- entérotoxine, CPB2, NetB)

Les souches de type A sont principalement associées à des problèmes de diarrhée, dysenterie et entérotoxémie chez diverses espèces animales (ruminants, porcs, chevaux, volaille) (Daube et al. 1996; Songer, 1996; Glock and DeGroot, 1998; Herholz et al., 1999; Manteca et al, 2001; Bacciarini et al., 2003, Bueschel et al., 2003; Songer and Uzal, 2005). Les plus connues, outre l'entérotoxémie qui sera développée dans le chapitre suivant, sont l'entérite nécrotique de la volaille, l'entérite néonatale du porcelet et la typhlocolite équine.

3.2.2. Toxinotype B (toxines alpha, beta et epsilon +/- CPB2)

Le toxinotype B est l'agent causal de la dysenterie de l'agneau. Il semble que les toxines beta et epsilon soient les facteurs de virulence majeurs de cette pathologie présentant un taux de mortalité proche de 100% (Fernandez-Miyakawa et al., 2007).

3.2.3. Toxinotype C (toxines alpha et beta +/- CPB2)

Les souches de type C sont essentiellement associées à des pathologies néonatales eu égard à la sensibilité de la toxine beta aux protéases, faiblement produites dans le très jeune âge. Elles sont responsables d'entérites nécrotiques et hémorragiques chez les porcelets, agneaux, veaux et poulains nouveau-nés. Des pathologies à *C. perfringens* de type C peuvent être observées chez des animaux plus âgés lorsque le niveau de protéases digestives est significativement diminué ou qu'elles sont inhibées.

3.2.4. Toxinotype D (toxines alpha et epsilon +/- CPB2)

Les souches de **type D** sont responsables de la “maladie du rein pulpeux” (pulpy kidney disease), une entérotoxémie qui frappe principalement les moutons (agneaux) et dont la pathogénie est directement liée aux effets de la toxine epsilon. La maladie du rein pulpeux se caractérise par une absence de lésions intestinales et la présence d’oedèmes résultant d’une atteinte vasculaire ciblant principalement les reins et le système nerveux central (Griner and Bracken, 1953; Niilo, 1986; Popoff 1989). Ces souches peuvent également causer des entérites à caractère nécro-hémorragique notamment chez le chevreau (Greco et al., 2015).

3.2.5. Toxinotype E (toxines alpha et iota +/- entérotoxine, CPB2)

Le rôle et l’importance réelle des souches de *C. perfringens* **type E** et de la toxine iota restent incertains. Néanmoins, elles semblent impliquées dans les entérotoxémies du mouton et de la chèvre au Moyen Orient et du veau en Amérique du Nord ou en Afrique (Billington et al., 1998; Bueschel et al., 2003; Efuntoye et Adesotoye, 2003 ; Sipos et al., 2003; Songer and Miskimmins, 2004; Greco et al., 2005). Des souches de type EE (type E entérotoxine positive) sont également associées à des entérites hémorragiques du veau (Bueschel et al., 2003).

**4. L'ENTÉROTOXÉMIE BOVINE: DESCRIPTION, ÉPIDÉMIOLOGIE, DIAGNOSTIC ET PROPHYLAXIE.-
CATTLE ENTEROTOXAEMIA AND CLOSTRIDIUM PERFRINGENS: DESCRIPTION, DIAGNOSIS AND
PROPHYLAXIS .**

M. Lebrun, J.G. Mainil, A. Linden

Veterinary Record. 2010, 67 : 13-22.

Department of Infectious and Parasitic Diseases—Bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Liège, Liège 4000, Belgium

L'article de revue qui suit décrit de façon détaillée les aspects pratiques de la pathologie au centre de ce travail. Il aborde les points auxquels les vétérinaires praticiens sont confrontés et sur lesquels ils peuvent agir avant et après mortalité avec suspicion d'entérotoxémie.

Papers

Cattle enterotoxaemia and *Clostridium perfringens*: description, diagnosis and prophylaxis

M. Lebrun, J. G. Mainil, A. Linden

Cattle enterotoxaemia is one of numerous pathologies caused by *Clostridium perfringens*. These anaerobic Gram-positive bacteria are naturally present in the intestinal flora of mammals, but their uncontrolled multiplication under certain conditions results in the overproduction of toxins in the intestinal tract. Major clinical signs are induced by the systemic spread of these toxins in the blood and tissues. Enterotoxaemia may be acute or peracute, and sudden death is often reported in rapidly growing, apparently healthy cattle. Enterotoxaemia can be prevented only with better understanding of its risk factors and pathogenesis. This paper provides an up-to-date overview of knowledge concerning the aetiology of the syndrome, its epidemiological context, pathogenesis, clinical signs and lesions, the diagnostic procedures and prophylactic tools, with specific attention to field aspects that are directly relevant to practitioners and clinical researchers.

THE word 'enterotoxaemia' denotes a toxæmia of intestinal origin that occurs when toxins produced in the intestines are absorbed into the bloodstream. Enterotoxaemia can be caused by various microorganisms, but the term is most frequently used in relation to the absorption of toxins produced by species of the genus *Clostridium* (Manteca and Daube 1994, Daube and others 1996a, Popoff 1998).

The genus *Clostridium* comprises more than 100 species, several of which are pathogenic, producing exotoxins that act locally or systemically on the host's cells and tissues. Although several species of *Clostridium* can cause enterotoxaemia in different hosts, the syndrome has come to be associated with the species *Clostridium perfringens* in ruminants (Popoff 1998).

Sheep enterotoxaemia caused by *C perfringens* is well documented. Different strains of *C perfringens* are responsible for several clinical syndromes, including lamb dysentery, pulpy kidney and struck (enterotoxaemia in adult sheep that causes sudden death) (Buxton and others 1978, Kadra and others 1999, Gkiourtzidis and others 2001, Soler-Jover and others 2004, Uzal and others 2004). Prevention is straightforward, through vaccination of ewes during pregnancy and of the lambs (Clarkson and others 1985, Green and others 1987, Odendaal and others 1988, 1989, de la Rosa and others 1997, Uzal and Kelly 1998, Uzal and others 1999, Roskopf-Streicher and others 2004). The situation is less clear in cattle.

This article reviews aspects of the aetiology, epidemiology and pathogenesis of cattle enterotoxaemia, with special reference to beef cattle. Its intention is to improve the accuracy of field and routine laboratory diagnosis, and to improve prophylaxis through management practices and vaccination.

C perfringens Description

C perfringens is a Gram-positive, anaerobic, oxygen-tolerant, rod-shaped bacterium, successively named *Bacillus aerogenes capsulatus* (Welch and Nuttall 1892, Lucey and Hutchins 2004), *Bacterium welchii* and *Clostridium welchii* in honour of William Henry Welch, who first described it in 1892. The species name *perfringens* ('breaking through' in Latin), proposed by Veillon and Zuber (1898) (*Bacillus perfringens*), replaced *welchii* in the fifth edition of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Bergey and others 1939). *C perfringens* is probably the best-known and most widespread anaerobic pathogen throughout the world. It is a normal component of the intestinal flora of healthy warm-blooded animals and human beings (Popoff 1989, Rood and Cole 1991, Songer 1996).

Like all bacterial species, *C perfringens* can be subdivided into strains according to the results of different typing methods. Although subdivision by serotyping was proposed in the past, division into strains according to the combinations of toxins produced (or toxinotypes) is still the most widespread and routinely useful method today. Genotyping is generally used only in PCR analysis of toxin genotype (Daube and others 1994, Meer and Songer 1997, Kanakaraj and others 1998, Baums and others 2004).

C perfringens can produce up to 30 potential toxins, and strains are traditionally classified into five categories (A, B, C, D and E) according to the combination of the four major toxins (α , β , ι and ϵ) they produce (Hatheway 1990, Songer 1996, Petit and others 1999) (Table 1). These five types can be further subdivided according to the production of two additional toxins: the enterotoxin (encoded by the *cpe* gene) and the β_2 toxin (encoded by the *cbp2* gene) and numerous so-called minor toxins (Niilo 1987, Daube and others 1996a, b, Ghazi and others 1997, Gibert and others 1997, O'Brien and Melville 2004) (Table 1).

Veterinary Record (2010) 167, 13-22 doi: 10.1136/vr.b4859

M. Lebrun, DVM, MSc,
Association de Santé et
d'Identification Animale, Allée des
Artisans 2, 5590 Ciney, Belgium
J. G. Mainil, DVM, MSc, PhD,
A. Linden, DVM, MSc, PhD,
Bacteriology Section, Department
of Infectious Diseases, Faculty of
Veterinary Medicine, University of Liège,
B43A Boulevard de Colonster 20, 4000
Liège, Belgium

E-mail for correspondence:
maude.lebrun@arsia.be

Provenance: not commissioned;
externally peer reviewed

July 3, 2010 | **Veterinary Record**

Papers

Associated pathologies

Type A strains cause most pathologies associated with *C. perfringens* in human beings: gas gangrene (type A, non-enterotoxigenic), sporadic or antibiotic-associated diarrhoea (type A, \pm enterotoxigenic, \pm *cpb2*) and food poisoning (type A or D, enterotoxigenic) (Vogel 1995, Meer and Songer 1997, Sparks and others 2001, Carney and others 2002, Fisher and others 2005, Vaishnavi and others 2005). Necrotising enteritis (type C) is also seen in human beings (Kreft and others 2000).

In animals, the five toxinotypes cause numerous forms of enteritis and enterotoxaemia (Popoff 1989, Songer 1996, Greene and Jang 2003, Marks and Kather 2003, Coetzer and Tustin 2005, Radostits and others 2007a) (Table 2).

Type A strains are associated with diarrhoea, dysentery and enterotoxaemia in ruminants, pigs, horses and poultry (Manteca and Daube 1994, Songer 1996, Daube and others 1996b, Glock and DeGroot 1998, Herholz and others 1999, Manteca and others 2001, Bacciarini and others 2003, Bueschel and others 2003, Songer and Uzal 2005, Radostits and others 2007b). The role of the α toxin in enteritis and enterotoxaemia awaits full experimental confirmation: the α toxin has not yet been shown to be present in the bloodstream of mammals in non-experimental infections, experimental trials to reproduce enterotoxaemia in mammals using the α toxin have failed, and although clinical signs of necrotic enteritis can be reproduced in poultry (Fukata and others 1983), more recent work with mutant strains has questioned the supposed role of the α toxin (Keyburn and others 2006) and implicated the more recently discovered NetB toxin in this pathology (Keyburn and others 2008).

Type B and C strains cause most cases of dysentery and enterotoxaemia with necrotic or haemorrhagic enteritis, and type D strains cause the pulpy kidney enterotoxaemic syndrome in sheep, and perhaps in calves in which no necrotic or haemorrhagic intestinal lesions are present (Griner and Bracken 1953, Niilo 1986, Leary and Titball 1997, Popoff 1998, Radostits and others 2007c, d). The major β and ϵ toxins have been shown to have a role in these syndromes, and prevention by vaccination with toxoids is effective, at least in small ruminants (Uzal and Kelly 1998, Springer and Selbitz 1999, Uzal and others 2002, Rosskopf-Streicher and others 2004, Fernandez-Miyakawa and others 2007).

The role and importance of *C. perfringens* type E (ι toxin) is still unclear, but type E strains appear to cause enteritis in sheep and goats in the Middle East and in calves in North America (Billington and others 1998, Bueschel and others 2003, Sipos and others 2003, Songer and Miskimmins 2004, Greco and others 2005, Radostits and others 2007c).

Specific toxins

The enterotoxin (*cpe* gene) is responsible for enteritis, diarrhoea and food poisoning in human beings (Schalch and others 1997, 1999, Lin and Labbe 2003, Miyamoto and others 2004, 2006, Fisher and others 2005) and could also be involved in cases of diarrhoea in animals (Tschürdewahn and others 1991, Kokai-Kum and McClane 1997, Bueschel and others 1998, 2003, Netherwood and others 1998).

The β 2 toxin (*cpb2* gene) described in the late 1990s (Gibert and others 1997) has been associated with enteritis in piglets (Klaasen and others 1999, Bueschel and others 2003), typhlocolitis in horses (Herholz and others 1999, Bacciarini and others 2003) and diarrhoea in dogs (Thiede and others 2001). However, its role remains to be determined in human beings and in some animal species in which β 2-positive strains have been isolated. The role of the β 2 toxin will be further discussed in this paper in the specific context of cattle enterotoxaemia (see 'Strain typing' section).

The last *C. perfringens* toxin discovered is NetB. It has been identified as a definitive virulence factor of the poultry necrotic enteritis syndrome (Keyburn and others 2008). This toxin is found in type A strains from poultry with or without necrotic enteritis and was also detected in one strain from a cow with liver abscesses (Martin and Smyth 2009).

Cattle enterotoxaemia

Cattle enterotoxaemia is an acute or peracute syndrome with a case fatality rate close to 100 per cent, associated with an uncontrolled multiplication of *C. perfringens* in the small intestine with an overproduction

of toxins (Manteca 2004). These toxins act both locally and systemically and may cause death within a few minutes to a few hours (Barker and others 1993, Manteca and others 2001). Recent cattle enterotoxaemia literature is summarised in Table 3.

TABLE 1: *Clostridium perfringens* conventional toxinotypes

Toxin	Type A	Type B	Type C	Type D	Type E
α	X	X	X	X	X
β		X	X		
ϵ		X		X	
ι					X
Enterotoxin	(x)				(x)
β 2	(x)	(x)	(x)	(x)	(x)
X Classic					
(x) Potential					

History

The first case of cattle enterotoxaemia was reported in Australia in young calves grazing on lush spring grass (Rose and Edgar 1936). Several cases were reported in the following years, mainly in suckling calves of beef cattle breeds (Griner and Bracken 1953, Niilo and others 1974, Manteca and Daube 1994, Manteca and others 2000). Unlike in sheep, enterotoxaemia in cattle has remained a poorly defined syndrome. Today, clostridial enterotoxaemia in cattle is characterised by sudden death, most often with lesions of haemorrhagic and segmental enteritis at postmortem examination and high colony counts of *C. perfringens* in the small intestine (Daube and others 1996a, Songer 1996, Manteca and others 2001). Field cases of enterotoxaemia remain difficult to confirm, and the differential diagnosis of sudden death needs to be considered.

Moreover, the role and identity of the strains was uncertain until recent developments in molecular biology techniques (Manteca and Daube 1994, Songer 1996, Manteca and others 2001, Sawires and Songer 2005, 2006).

Most of the description of cattle enterotoxaemia hereafter is based on specific studies carried out on beef cattle breeds in Belgium (Daube and others 1996a, Manteca and others 2000, 2001, Manteca 2004), complemented with published data from other beef cattle breeds in other countries (Griner and Bracken 1953, Fleming 1985, Efuntoy and Adetosoye 2003). At the end of the 20th century a pathology closely related to enterotoxaemia was described in North America: the haemorrhagic bowel syndrome (HBS) or jejunal haemorrhage syndrome (JHS) (Dennison and others 2002, 2005, Abutarbush and others 2004, Abutarbush and Radostits 2005, Ceci and others 2006). This syndrome, affecting mainly high-producing dairy cattle, is so closely related that it will be discussed commonly with 'beef cattle' enterotoxaemia in this paper. Both syndromes (enterotoxaemia and HBS) share some common features: intensive rearing conditions, sudden onset, haemorrhagic enteritis (jejunitis), high *C. perfringens* counts, identical *C. perfringens* toxinotypes (mainly A) and stressful breeding conditions. The differences between enterotoxaemia and HBS may be linked to a differential evolution of *C. perfringens* strains on both sides of Atlantic, as suggested by Johansson and others (2006). However, some cases have been described in Europe (Miyamoto and others 2006).

Epidemiology

Target population

Cattle enterotoxaemia affects mainly suckling and veal calves in good to excellent body condition up to four months of age living in farms with high-quality management (Fleming 1985, Manteca and Daube 1994, Manteca and others 2000). Although beef cattle breeds (Belgian blue, Blonde d'Aquitaine, Charolais, Hereford) are more frequently affected, the rearing and breeding conditions have a greater effect than breed on whether an animal is at risk from enterotoxaemia. Therefore, cattle enterotoxaemia is tightly linked to intensive rearing conditions, both in beef and in veal production (Griner and Bracken 1953, Songer 1996, Popoff 1998, Manteca and others 2000). In Belgian blue cattle in Belgium, losses due to enterotoxaemia cause up to 10,000 deaths (4 to 5 per cent of the total annual registered mortalities) of suckling calves per year (Manteca and others 2000). These intensive breeding conditions seem to be present in the context of HBS too (Abutarbush and Radostits 2005, Berghaus and others 2005), with high-producing dairy cows most commonly affected (Dennison and others 2002, Berghaus and others 2005).

TABLE 2: Relationship between *Clostridium perfringens* toxinotypes and pathologies

Toxinotype	Animal species affected	Syndrome
A (α)	Cattle, lambs Fowl, piglets	Enterotoxaemia Necrotic enteritis
B (α, β, ϵ)	Neonatal calves, foals Adult sheep	Haemorrhagic enteritis Haemorrhagic enterotoxaemia
C (α, β)	Newborn lambs Neonatal pigs, lambs, calves, goats, foals	Dysentery Necrotic or haemorrhagic enterotoxaemia
D (α, ϵ)	Adult sheep Lambs (as pulpy kidney disease), calves Adult cattle Fowl	Acute enterotoxaemia (struck) Enterotoxaemia Enterotoxaemia Necrotic enteritis

Triggering factors

Cattle enterotoxaemia is a non-contagious sporadic disease, even if several fatal cases may be observed in a same herd (Shirley 1958, Sudaric and Nadazdin 1983, Katitch 1987, Popoff 1998, Schotte and others 2004). The disease is often associated with stressful conditions observed 24 to 36 hours before sudden death (Manteca and Daube 1994, Manteca and others 2000). Stress may be caused by an abrupt change in diet (for example, introducing high carbohydrate and protein substrates such as heavy grain, or grazing on rich pasture without a transition phase) or by a water supply defect. Stressful environmental conditions such as animals being regrouped or transported, hierarchical troubles or rough handling during dehorning or dipping should

also be considered. Medical treatment (antibiotherapy, antiparasitic prophylaxis) and some physiological states such as calving, lactation peak and oestrus in the dam are also considered as triggering factors of enterotoxaemia.

In a recent study on the risk factors associated with HBS in dairy cattle, the conclusion was that management practices implemented to achieve high milk production may increase the risk of HBS development. The increased consumption of a high-energy diet is the most plausible common pathway for all of the risk factors (Berghaus and others 2005).

Clinical data**Clinical signs**

Cattle enterotoxaemia is an acute or peracute syndrome classically described by the farmer or the veterinarian as 'sudden death' or 'found dead'. Very few animals show premonitory clinical signs such as abdominal pain or nervous disorders. In Europe, there is no associated diarrhoea and only rarely tympanism (Fleming 1985, Manteca and Daube 1994). This is in contrast with the observations made in the USA in high-producing dairy cows or beef cattle suffering from HBS (Clarkson and others 1985, Dennison and others 2002, 2005, Abutarbush and others 2004, Abutarbush and Radostis 2005, Ceci and others 2006, Muskens and others 2007). If the animal does not die suddenly, some agonic signs may be observed (respiratory distress, lateral recumbency and convulsions before coma).

Postmortem lesions

Rapid putrefaction of the abdomen with gas production and a putrid smell is characteristic of clostridial infection. The most typical local

TABLE 3: Publications on cattle enterotoxaemia since 1980 (previous references were listed in Manteca and others 1994) showing the pathology, toxinotype, type of animal and country reported

Year	Authors	Pathology	Toxinotype	$\beta 2^*$	Animals	Country
1985	Fleming	Enterotoxaemia	A, B, C, D		Calves	USA
	Sakurai	Necrotic enteritis	A		Dairy cows	Japan
1987	Sato and others	Necrotic enteritis	C		Beef cattle	Japan
	Katitch	Enteritis	A, C		Cattle	France
1989	Nillo	Enterotoxaemia	C		Calves	Canada
	Worrell and others	Enterotoxaemia	A		Buffaloes	Indonesia
1989	Popoff	Enterotoxaemia	B, C, D, E		Calves and adult cattle	France
1990	Hatheway	Enterotoxaemia	A, E		Calves and adult cattle	USA
1993	Barker and others	Enteric infection	C, D		Feedlot cattle	USA
1994	Manteca and others	Enterotoxaemia	A		Cattle	Belgium
1996	Daube and others	Enterotoxaemia	A		Beef cattle	Belgium
1998	Songer	Enteritis, enterotoxaemia	A, B, C, D, E		Calves and adult cattle	USA
	Billington and others	Enteritis	E		Calves	USA
1999	Glock and Degroot	Sudden death	A, C, D		Feedlot cattle	USA
	Petit and others	Enteritis, enterotoxaemia	A, B, C, D, E	Yes	Calves	France
2000	Garmory and others	Diarrhoea	A, E	Yes	Calves	USA
	Manteca and others	Enterotoxaemia	A	Yes	Cattle	Belgium
2001	Manteca and others	Enterotoxaemia	A	Yes	Calves	Belgium
	Dennison and others	Haemorrhagic bowel syndrome	A	Yes	Dairy cattle	USA
2002	Manteca and others	Enterotoxaemia	A	Yes	Calves	Belgium
	Bueschel and others	Sudden death, enterotoxaemia, enteritis	A, C, EE	Yes	Calves and adult cattle	USA
2003	Efuntoye and Adetosoye	Diarrhoea	A, C, D		Cattle	Nigeria
	Manteca	Enterotoxaemia	A	Yes	Cattle	Belgium
2004	Philippeau and others	Enterotoxaemia	Not specified		Cattle	France
	Sipos and others	Enteritis, enterotoxaemia	A, E		Domestic and exotic ruminants	Austria
2004	Abutarbush and others	Jejunal haemorrhage syndrome	A		Beef cows	Canada
	Manteca and others	Enterotoxaemia	A	Yes	Cattle	Belgium
2004	Schotte and others	Enterotoxaemia	A		Calves and adult cattle	Germany
	Songer†	Enteritis, enterotoxaemia	A, B, C, D, E		Calves and adult cattle	USA
2005	Songer and Miskimins	Enteritis	E		Calves	USA
	Abutarbush and Radostis	Jejunal haemorrhage syndrome	A		Dairy and beef cattle	Canada
2005	Dennison and others	Haemorrhagic bowel syndrome	A	Yes	Dairy cattle	USA
	Jost and others	Enteric diseases	A, C, E	Yes	Cattle	USA
2006	Johansson and others	Enteritis	A	Yes	Roe deer	Sweden
	Rooney and others	Haemorrhagic enteritis	Not specified		Cattle	USA
2007	Sawires and Songer	Enteritis, sudden death	A, C, E		Cattle	USA
	Ceci and others	Haemorrhagic bowel syndrome	A	Yes	Dairy cattle	Italy
2007	Lebrun and others	Enterotoxaemia	A	Yes	Cattle	Belgium
	Muskens and others	Jejunal haemorrhage syndrome	A suspected		Dairy cows	Netherlands

* Some $\beta 2$ -positive strains were detected in these studies

† Personal communication

EE Type E and enterotoxin positive

Papers

Lesion is acute necrohaemorrhagic jejunoileitis, with a thickened haemorrhagic and necrotic intestinal wall and abundant liquid haemorrhagic contents (Manteca and others 2001). The affected intestinal loops may extend from only 10 cm to the entire length of the small intestine. In some cases, the lesions can involve more than one intestinal segment, with successive uninjured and injured loops providing a picture of segmentary enteritis (Worrall and others 1987). However, in a few peracute cases, the intestinal wall is only congested. There is also gas accumulation and a reactive secondary satellite adenitis of the mesenteric lymph nodes (Manteca and Daube 1994, Glock and DeGroot 1998). Similar lesions were described in the past in North American Hereford calves from high-quality dairy cows (Griner and Bracken 1953). The post-mortem lesions of HBS cases (type A) differ to some extent, since blood clots sticking to the intestinal wall and sometimes fibrinous peritonitis are described (Dennison and others 2002, Abutarbush and Radosits 2005).

Microscopic lesions

Under the microscope, the intestinal lesions (haemorrhages, cell necrosis) extend from the tip of the villi to the base of the crypts. There is progressive erosion of the villi reaching the conjunctive axis and causing haemorrhages. White blood cell infiltration is present with massive margination of neutrophils and accumulation of lymphocytes in small blood vessels in the underlying mucosa (Arbuckle 1972, Sakurai 1985, Worrall and others 1987, Manteca and others 2001, 2002). In ortho- and parasymphathetic nodes of the muscular and mucosal layers of the gut, hydropic degeneration is observed (Manteca and others 2000, Manteca 2004).

Internal organs can present lesions typical of toxæmia. The liver parenchyma can present centrilobular vacuolar degeneration or necrosis and the serous membranes may show petechiae. The kidneys may be congested with parenchymatous degeneration of convoluted tubules and sometimes haemorrhagic areas lining the cortex and medulla (Worrall and others 1987).

The local and systemic microscopic lesions of bovine enterotoxæmia are reminiscent of cases of necrotic enteritis in poultry caused by type A of *C. perfringens* (Vissinon and others 1996). In cattle, clusters of bacteria similar in appearance to *C. perfringens* can be observed sticking to the intestinal cells. These bacteria remain localised in the necrotic areas (Manteca and others 2001) and do not cross the lamina propria or spread deeply through the intestinal wall.

Bacteriological findings

Clostridial population

In the past, bacteriological data were scarce, since diagnosis was usually limited to the growth of the bacteria in the intestinal contents on blood agar plates in anaerobic conditions followed by identification and typing of one or two colonies of the predominant colony type, most often *C. perfringens* (Manteca and Daube 1994). More recently, quantitative bacteriological analysis of the intestinal contents of typical enterotoxæmia cases, and comparison with other cases of 'sudden death' for which the diagnosis of enterotoxæmia could be excluded, confirmed the fact that bovine enterotoxæmia is characterised by a drift of the commensal flora of the small intestine and by uncontrolled overgrowth of *C. perfringens* at the location of the necrohaemorrhagic lesions (Popoff 1998, Manteca and others 2001). *C. perfringens* is normally present at a level of 10^2 to 10^6 cfu/ml of intestinal contents but can reach counts higher than 10^8 to 10^9 cfu/ml of intestinal contents in cases of enterotoxæmia (Manteca and others 2001, Philippeau and others 2003).

In cattle, it is questionable whether the overgrowth involves the whole *C. perfringens* population or is limited to one toxinotype (Manteca and others 2001, Manteca 2004) or even to one clone as described in poultry (Engström and others 2003, Nauerby and others 2003, Gholamiandekhordi and others 2006, Rooney and others 2006). Avian strains isolated from clinical outbreaks of necrotic enteritis (mainly *netB*-positive) present an interesting property. They are able to inhibit the growth of other *C. perfringens* strains more efficiently than strains isolated from healthy chickens (Timbermont and others 2009). This intraspecies interstrain growth inhibition could be an advantage in the competition for the supply of essential amino acids, allowing exponential multiplication of those strains.

Strain typing

In Europe, type A non-enterotoxigenic *C. perfringens* is mainly isolated from enterotoxæmic cattle (Daube and others 1994, 1996b, Garmory and others 2000, Manteca and others 2001, Johansson and others 2006). HBS, encountered in feedlot and dairy cattle in the USA, is also associated with type A non-enterotoxigenic *C. perfringens* strains (Dennison and others 2002, 2005, Abutarbush and Radosits 2005, Ceci and others 2006).

The situation could nevertheless be different in some cases. Glock and Degroot (1998) identified types C and D as responsible for enterotoxæmia in feedlot cattle in the USA. Moreover, the presence of the *cpe* gene (with or without *cpe* expression) in type A strains or other types complicates the interpretation of the results. Bueschel and others (2003) demonstrated that 51 out of 91 bovine strains were of type A *cpe*-negative, 37 were of type EE (type E, *cpe*-positive) and the other five were of type C *cpe*-negative. But the *cpe*-positive strains seemed to be unable to produce the corresponding toxin (in vitro). Silent *cpe* gene carriage in type A *C. perfringens* was also described in healthy and diarrhoeic human beings (Fisher and others 2005, Heikinheimo and others 2006). In a Nigerian study, six of the 11 type A cattle strains were *cpe*-positive and able to produce enterotoxin (Efuntoy and Adetosoye 2003). However, the origin of the strains was not clearly described in those studies; the information was limited to 'calves with enteritis or abomasitis' or 'diarrhoeic cattle'.

If type A represents the main toxinotype isolated in cattle (Yoo and others 1997), strains of this toxinotype present a high degree of genetic diversity (Ginter and others 1996, Manteca and others 2002, Waters and others 2003). Johansson and others (2006) observed that epidemiologically related isolates were of the same pulsed-field gel electrophoresis type, which could partially explain some differences linked to geography and breeding usage (Johansson and others 2006). In the same way, the association between a similar clinical condition and the toxinotype was also described by Rooney and others (2006). The most recent study on *C. perfringens* clonal relationships was performed by multilocus sequence typing and allowed regrouping of strains in clusters (Jost and others 2006). Type A strains represent the majority of one cluster and are found in another of the three major clusters. This technique helps to identify host-species relationships with respect to these *C. perfringens* isolates.

There is thus strong evidence that type A strains are the main strains involved in cattle enterotoxæmia. But, within type A, it is likely that toxins other than α toxin contribute to the pathophysiological process. In this context, some studies related to the β_2 toxin provide new insights on the subject.

The β_2 toxin

The β_2 toxin is the fifth major toxin of *C. perfringens*. The major toxins are lethal for mice after intravenous administration. The β_2 toxin-producing strains (type C) were originally isolated from necrotic enteritis in young piglets (Gibert and others 1997). The β_2 toxin has comparable biological activities to the first described β toxin (lethality to mice, haemorrhagic necrosis of intestinal wall in the guinea pig ligated loop model and cytotoxic properties) but the two toxins differ in molecular size and lack a significant amino acid identity (Gibert and others 1997).

Different variants of the β_2 toxin have been described in animals and in human beings, with some being more toxic than others (Fisher and others 2005) and some encoding genes or alleles that are expressed more than others due to differences in the gene sequence promoting or impairing expression (Jost and others 2005). The variant present in the porcine strains associated with haemorrhagic diarrhoea (type C) seems to be toxic and highly expressed (Waters and others 2003). This good correlation between the presence of the gene and toxin expression has also been observed in horses with typhlocolitis (type A) (Bacciarini and others 2003). The situation is less clear in cattle. Bueschel and others (2003) reported that less than 50 per cent of *C. perfringens* bovine strains (from enteritis and enterotoxæmia) produced the β_2 toxin. In a study performed on ligated intestinal loops, Manteca and others (2002) suggested that α and β_2 toxins act in a synergistic way to induce intestinal lesions in calves. Lebrun and others (2007) demonstrated the exclusive pres-

Papers

intestine and in the internal tissues, taking part in the postmortem putrefaction process, but most importantly biasing the quantitative bacterial analysis. Ideally, intestinal samples should be taken less than three hours after death. After this delay, in euthanased healthy animals, clostridial (*C. perfringens*) counts reach levels similar to those in enterotoxaemia cases (Philippeau and others 2003).

Unfortunately, since calves are most frequently 'found dead', the time of death is rarely determined and the delay between death and sampling is most often unknown. Therefore, in practice, postmortem examination must be performed on-site (or on-farm) as quickly as possible and the ligated intestinal loop should be kept at 4°C in appropriate anaerobic transport conditions (in an anaerobic jar) to reduce the multiplication of *C. perfringens* for the next 24 hours (Songer and Miskimmins 2004, J. Songer, personal communication). If any sample must be kept for more than 24 hours before bacterial analysis, it should be frozen at -20°C, keeping in mind that freezing is lethal for a proportion of the bacteria present, including *C. perfringens*.

Routine bacterial analysis

Examination of a Gram-stained direct smear of the intestinal content can help in detecting a large number of Gram-positive bacilli, but quantitative anaerobic growth on blood agar is the gold standard to confirm the field suspicion of enterotoxaemia due to *C. perfringens* (Popoff 1998, Manteca and others 2001, Philippeau and others 2003). To generate anaerobic conditions, a jar with an oxygen-consuming system is enough, since *C. perfringens* is oxygen-tolerant (Bergey and others 1939). After overnight growth, the typical fried egg-shaped colonies of *C. perfringens* are surrounded by a double β-haemolysis zone (Bergey and others 1939, Manteca and others 2001). If necessary, a 2 per cent agar plate with phenylethanol limits the overgrowth of other bacteria (Songer and Miskimmins 2004). Some specific selective media allow the rapid growth and specific detection of *C. perfringens* by means of chromogenic and/or fluorogenic substrates (Gubash and Ingham 1997, Adcock and Saint 2001).

As already mentioned, the number of *C. perfringens* present in the region of the lesions is the most important bacterial criterion. This is one further reason to carry out bacterial analysis only as a support to the field suspicion. The first authors to advise systematic *C. perfringens* enumeration were Sato and others (1985) and Sakurai (1985). The cut-off number of cfu, however, remains debatable and varies according to the authors (Popoff 1998, Manteca and others 2001, Philippeau and others 2003). In cattle, counts higher than 10⁶ to 10⁷ cfu/ml of intestinal contents are considered as a hallmark of *C. perfringens* overgrowth and confirmatory of a field suspicion.

Toxin typing

Toxin typing can be performed by phenotypic or genotypic assays. Phenotypic assays such as the mouse seroneutralisation assay after intraperitoneal or intravenous injection of four- to six-hour culture supernatants (gold standard) or ELISAs aim to detect the production of the toxins (Hatheway 1990). Genotypic assays such as DNA colony hybridisation with gene probes and PCRs aim to detect the toxin-encoding genes (Daube and others 1996b, Kadra and others 1999, Johansson and others 2005).

However, toxin typing of the isolates of *C. perfringens* is rarely applied routinely. The laboratories must be appropriately equipped to perform some tests and several colonies (up to 10) have to be typed to give an appropriate result. Moreover, in the case of cattle enterotoxaemia, the typing should include the β₂ toxin, which can be routinely detected only by genetic methods. Genotyping results are sometimes difficult to interpret because of the existence of different gene variants and different levels of expression of the same variant.

Nevertheless, when applied, *C. perfringens* toxin typing is performed mostly by PCR in specialised laboratories because PCR can detect any combination of toxin-encoding genes present in the isolates in a one-step procedure and can also be applied to clinical cases involving *C. perfringens* in other diseases and/or animal species. Some PCR methods do not require the complicated, time-consuming and costly bacterial culture and DNA extraction phases but can be applied on (almost) raw samples, such as faeces or urine (Persson and Olsen 2005, van den Berg and others 2006, Zhang and others 2006). Unfortunately, there

also exist limits and biases such as the detection of silent or underexpressed genes or the loss of the gene of interest during *in vitro* growth (Rood and Cole 1991). Indeed, the genes coding for different toxins are (*cph*, etc., *iap-ibp*, *cpb2*) or can be (*cpe*) located on mobile elements (plasmids or transposons) that can be lost. It is especially advisable to limit the number of handlings and subcultures in an aerobic atmosphere to reduce this risk (Johansson and others 2005), and the use of an anaerobic cabinet is therefore highly recommended.

Direct or *in vivo* toxin detection

Different tests based on toxin detection with specific antibodies can also be directly applied to biological samples, such as intestinal contents, faeces or serum. Commercial kits are available. They are rapid and easy to use in the diagnostic laboratory, for example, ELISA (Bio-X) (Ginter and others 1994) or slide latex agglutination kits (Gentaur, Oxoid) (McClane and Snyder 1987, Fach and Popoff 1997, Kadra and others 1999), or primarily by the practitioner on-site during the post-mortem examination such as immunosticks (Bio-X). These tests are available for α, β and ε toxins, but not yet for the ι and β₂ toxins.

When these tests are applied in the laboratory, delay and conditioning of the samples are also crucial factors, because toxins are rapidly degraded in the gut by proteases (Popoff 1998). In any case, a positive result (presence of the toxin) is meaningful, taking into account the general context and the other criteria, while a negative result is not interpretable.

Prophylaxis

Since cattle enterotoxaemia is a peracute syndrome with a case fatality rate close to 100 per cent, there is no treatment. Prevention measures are important and should be applied when some risk factors are present or when some animals die of enterotoxaemia and other animals are exposed to the same stressors.

Management

Good practice in animal management is crucial. The aim is to promote slow food transitions and diets rich enough in fibre to allow equilibrium of the intestinal flora. Careful attention should be given to avoid stressful situations related to feeding or the environment, such as a sudden change in diet or animal regrouping (Popoff 1998, Manteca and others 2000). These suggestions are based on field observations and should be adapted to each individual situation according to the case history and farm management.

Medical Vaccination

There are several commercial vaccines against clostridial enterotoxaemia in ruminants. All marketed vaccines in Europe contain at least one of *C. perfringens* toxinotypes and most contain the β and ε toxoids. Several also contain the α toxoid and raw culture supernatants of *C. perfringens*. In addition, several other clostridial species toxoids and/or bacteria are usually present in the vaccines: *Clostridium chauvoei*, *Clostridium novyi*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium septicum* and *Clostridium tetani*. A few vaccines also include other bacteria such as *Mannheimia haemolytica* or enterotoxigenic *Escherichia coli*.

Effectiveness of vaccination is better in small ruminants and pigs (Kelneric and others 1996, Songer 1996) than in cattle. Indeed, there are examples of breakdown in the field when clostridial vaccines are used in cattle (Glock and Degroot 1998). A first difficulty is the absence of an experimental model of the enterotoxaemia syndrome (Manteca and others 2001). Moreover, no current vaccines contain β₂ or enterotoxin toxoids and α toxoid is present in only some vaccines. For α toxin, divergent opinions exist concerning its implication in clostridial enteritis/enterotoxaemia and its subsequent importance in vaccine composition. In healthy cattle, α toxin is present and there is a basic level of antibodies to α in serum, meaning that a part of produced toxin may be absorbed in the blood and processed by the immune system. The serological threshold to obtain clinical protection is empirically fixed because any experimental protection has not been determined *in vivo*. But after vaccination, it was demonstrated that seroconversion was positively correlated with the quantity of antigen present in the vaccine (Manteca and others 2004). In that study, the highest titres were

ence of a specific allelic variant, *cpb2*, and the highest expression of the corresponding toxin variant among isolates from enterotoxaemic calves compared with healthy animals.

These results strengthen the possible role of the $\beta 2$ toxin in cattle enterotoxaemia, but further studies related to different variants are needed (van Asten and others 2010).

Pathogenesis

Bacteriology

Threshold of toxicity and possible toxin association

For many years the striking characteristics of cattle enterotoxaemia were the dramatic and sudden change in the intestinal flora at the location of the lesions of necrohaemorrhagic enteritis, characterised by the uncontrolled multiplication and overgrowth of *C. perfringens*, with local overproduction of toxins (Barker and others 1993, Songer 1996, Popoff 1998). The following hypothesis can be formulated to explain the pathogenesis of cattle enterotoxaemia: a local overgrowth of some *C. perfringens* clones associated with overproduction of highly expressed α toxin and a potent and highly expressed $\beta 2$ toxin variant or another α -synergistic toxin and the absorption of, at least, the α toxin into the bloodstream (Barker and others 1993, Popoff 1998, Manteca and others 2001).

If the absorption of the α toxin is the most likely explanation of the sudden death of calves suffering from enterotoxaemia, although this remains to be proved, the hypothesis of a synergy between the α toxin and a $\beta 2$ toxin variant was proposed to explain the lesions of necrohaemorrhagic jejunoileitis observed in cattle enterotoxaemia with toxinotype A strains. Moreover, the level of production of the α toxin may also play a role. Indeed, in a ligated intestinal loop assay in one calf, Manteca and others (2002) reproduced typical lesions of necrohaemorrhagic enteritis with one $\beta 2$ toxin-positive strain, and not with any of the $\beta 2$ toxin-negative strains. However, this $\beta 2$ toxin-positive strain also had a higher level of production of the α toxin. The next experimental steps should therefore be: to demonstrate the actual production of the $\beta 2$ toxin variant in vivo in the calf intestine; to compare the level of production of the α toxin between strains isolated from cases of enterotoxaemia and other calves, and between strains negative or positive for the different $\beta 2$ toxin variants; to test different mutants and complement strains (those genetically modified) for the level of expression and production of the α and $\beta 2$ toxins in the ligated intestinal loop assay; and to test the competition and inhibition between different strains of the same species of bacteria.

Some specific conditions

When *C. perfringens* grows in high numbers, the bacteria seem to be able to attach or, at least, get close to the enterocytes. This protects the bacteria from certain immune system components (Arbuckle 1972, Niilo 1986, Popoff 1998). This situation creates a microspace where toxins are concentrated and partially protected against destruction, and also enhances the imbalance between production and elimination of toxins (by transit, proteases and antibodies) (Popoff 1998, Manteca and others 2001, Efuntoyee and Adetosoye 2003).

Moreover, the toxinogenic clostridia would be better adapted to obtain nutrients essential for their proliferation than non-toxinogenic strains (Jost and others 2006, Schotte and others 2004). Indeed, *C. perfringens* strains possess few metabolic enzymes and are unable to produce some essential amino acids, which they must find in their environment. Enzymes and/or toxins therefore allow a more efficient and earlier food supply because they are associated with eukaryotic cells and extracellular matrix lesions that release nutrients not normally available to bacteria, and consequently multiplication is more effective. This metabolic situation may partially explain why toxinogenesis occurs very early in *C. perfringens* growth phases (early in the logarithmic phase). This effect should be emphasised if an intraspecies interstrain growth inhibition was demonstrated between cattle strains, as has been shown in poultry strains (Timbermont and others 2009).

Paralytic ileus

Causes and predisposing factors

The causes of the flora drift are still not completely elucidated, although a poststress modification in the intestinal environment is

strongly suspected (Worrall and others 1987, Huis in 't Veld 1991, Manteca and others 2000). This stress would lead to intestinal stasis (paralytic ileus) or, at least, to a decrease of the intestinal transit (Manteca and others 2001).

According to epidemiological studies (Braun and others 1993, Manteca and others 2000, 2001, Berghaus and others 2005), problems in feeding are the main origin of the stress-induced paralytic ileus and small intestinal flora drift. As in other species (sheep, poultry and pigs) drastic feeding modifications, overfeeding, or a protein- and easily fermentable starch-rich diet with few raw fibres (cellulose, hemicellulose and lignin), favour enterotoxaemia as well as other digestive problems (Niilo 1986, Riddell and Kong 1992, Annett and others 2002). These situations occur mainly in beef and veal production, in which the aim is to reach maximal average daily weight gain, but can also occur in high-producing dairy cattle near the lactation peak (Glock and DeGroot 1998, Dennison and others 2002, Abutarbush and Radostits 2005). A maximal risk level is also observed in suckling calves grazing on lush grass (Manteca and Daube 1994).

Some reports of human (Zoppi and others 1993) and pig (Okewole and others 1991) diseases showed that constipation may also lead to significant *C. perfringens* overgrowth of the intestinal flora.

The degenerative lesions in the ortho- and parasympathetic nodes of muscular and mucosal layers of the gut may also be correlated with the existence of such a paralytic ileus (Manteca and others 2000, Manteca 2004).

Other causes favouring paralytic ileus are other infections, parasitism, injuries and/or hepatic insufficiency, which increase the absorption of the toxins (Philippeau and others 2003).

Consequences

The paralytic ileus cancels the beneficial flush effect of intestinal transit and therefore favours the multiplication and overgrowth of *C. perfringens* in the small intestine, with consequent toxin(s) production in the location of the paralysed intestinal segments (Fleming 1985). The paralytic ileus would therefore explain the localised, sometimes segmentary, aspect of the intestinal lesions and the localised clostridial overgrowth.

The effects of the toxins themselves must be added, since some increase intestinal permeability, enhancing their own absorption and the absorption of other toxins.

Cause of death

Toxaemia with consequent multi-organ failure is the most probable cause of the sudden death. The vital parenchymas (for instance, in the lungs, liver or kidneys) present lesions of toxaemia (Radostits and others 2007b, c, d).

Diagnosis

Field criteria

Diagnosis of cattle enterotoxaemia requires an integrated approach. Sudden death without any premonitory signs and the presence of acute haemorrhagic jejunoileitis with haemorrhagic intestinal contents at postmortem examination are highly specific, although not exclusively of cattle enterotoxaemia in Europe. Information on breeding conditions and triggering factors previously described must be taken into account, with particular attention to any stress observed 12 to 36 hours before death.

Laboratory results

In the attempt to confirm the suspicion of enterotoxaemia in cases of sudden death, laboratory analysis is a necessity to make the distinction from other causes of sudden death (for example, septicemia or the animal being struck by lightning). It must be emphasised that the results of the laboratory analysis come to support the field suspicion, based on the above reviewed criteria, and never the opposite.

Sampling

The ideal sample obtained at postmortem examination for bacterial analysis is a ligated intestinal loop in the location of the necrohaemorrhagic lesions. Meaningful samples for bacterial isolation come from freshly dead animals. *C. perfringens* is a member of the normal microbiota and can rapidly invade and multiply in high numbers in the

July 3, 2010 | **Veterinary Record**

Papers

intestine and in the internal tissues, taking part in the postmortem putrefaction process, but most importantly biasing the quantitative bacterial analysis. Ideally, intestinal samples should be taken less than three hours after death. After this delay, in euthanased healthy animals, clostridial (*C. perfringens*) counts reach levels similar to those in enterotoxaemia cases (Philippeau and others 2003).

Unfortunately, since calves are most frequently 'found dead', the time of death is rarely determined and the delay between death and sampling is most often unknown. Therefore, in practice, postmortem examination must be performed on-site (or on-farm) as quickly as possible and the ligated intestinal loop should be kept at 4°C in appropriate anaerobic transport conditions (in an anaerobic jar) to reduce the multiplication of *C. perfringens* for the next 24 hours (Songer and Miskimmins 2004, J. Songer, personal communication). If any sample must be kept for more than 24 hours before bacterial analysis, it should be frozen at -20°C, keeping in mind that freezing is lethal for a proportion of the bacteria present, including *C. perfringens*.

Routine bacterial analysis

Examination of a Gram-stained direct smear of the intestinal content can help in detecting a large number of Gram-positive bacilli, but quantitative anaerobic growth on blood agar is the gold standard to confirm the field suspicion of enterotoxaemia due to *C. perfringens* (Popoff 1998, Manteca and others 2001, Philippeau and others 2003). To generate anaerobic conditions, a jar with an oxygen-consuming system is enough, since *C. perfringens* is oxygen-tolerant (Bergey and others 1939). After overnight growth, the typical fried egg-shaped colonies of *C. perfringens* are surrounded by a double β -haemolysis zone (Bergey and others 1939, Manteca and others 2001). If necessary, a 2 per cent agar plate with phenylethanol limits the overgrowth of other bacteria (Songer and Miskimmins 2004). Some specific selective media allow the rapid growth and specific detection of *C. perfringens* by means of chromogenic and/or fluorogenic substrates (Gubash and Ingham 1997, Adcock and Saint 2001).

As already mentioned, the number of *C. perfringens* present in the region of the lesions is the most important bacterial criterion. This is one further reason to carry out bacterial analysis only as a support to the field suspicion. The first authors to advise systematic *C. perfringens* enumeration were Sato and others (1985) and Sakurai (1985). The cut-off number of cfu, however, remains debatable and varies according to the authors (Popoff 1998, Manteca and others 2001, Philippeau and others 2003). In cattle, counts higher than 10^6 to 10^7 cfu/ml of intestinal contents are considered as a hallmark of *C. perfringens* overgrowth and confirmatory of a field suspicion.

Toxin typing

Toxin typing can be performed by phenotypic or genotypic assays. Phenotypic assays such as the mouse seroneutralisation assay after intraperitoneal or intravenous injection of four- to six-hour culture supernatants (gold standard) or ELISAs aim to detect the production of the toxins (Hatheway 1990). Genotypic assays such as DNA colony hybridisation with gene probes and PCRs aim to detect the toxin-encoding genes (Daube and others 1996b, Kadra and others 1999, Johansson and others 2005).

However, toxin typing of the isolates of *C. perfringens* is rarely applied routinely. The laboratories must be appropriately equipped to perform some tests and several colonies (up to 10) have to be typed to give an appropriate result. Moreover, in the case of cattle enterotoxaemia, the typing should include the β_2 toxin, which can be routinely detected only by genetic methods. Genotyping results are sometimes difficult to interpret because of the existence of different gene variants and different levels of expression of the same variant.

Nevertheless, when applied, *C. perfringens* toxin typing is performed mostly by PCR in specialised laboratories because PCR can detect any combination of toxin-encoding genes present in the isolates in a one-step procedure and can also be applied to clinical cases involving *C. perfringens* in other diseases and/or animal species. Some PCR methods do not require the complicated, time-consuming and costly bacterial culture and DNA extraction phases but can be applied on (almost) raw samples, such as faeces or urine (Persson and Olsen 2005, van den Berg and others 2006, Zhang and others 2006). Unfortunately, there

also exist limits and biases such as the detection of silent or underexpressed genes or the loss of the gene of interest during in vitro growth (Rood and Cole 1991). Indeed, the genes coding for different toxins are (*cph*, etc., *iap-ibp*, *cph2*) or can be (*cpe*) located on mobile elements (plasmids or transposons) that can be lost. It is especially advisable to limit the number of handlings and subcultures in an aerobic atmosphere to reduce this risk (Johansson and others 2005), and the use of an anaerobic cabinet is therefore highly recommended.

Direct or in vivo toxin detection

Different tests based on toxin detection with specific antibodies can also be directly applied to biological samples, such as intestinal contents, faeces or serum. Commercial kits are available. They are rapid and easy to use in the diagnostic laboratory, for example, ELISA (Bio-X) (Ginter and others 1994) or slide latex agglutination kits (Gentaur, Oxoid) (McClane and Snyder 1987, Fach and Popoff 1997, Kadra and others 1999), or primarily by the practitioner on-site during the post-mortem examination such as immunosticks (Bio-X). These tests are available for α , β and ϵ toxins, but not yet for the ι and β_2 toxins.

When these tests are applied in the laboratory, delay and conditioning of the samples are also crucial factors, because toxins are rapidly degraded in the gut by proteases (Popoff 1998). In any case, a positive result (presence of the toxin) is meaningful, taking into account the general context and the other criteria, while a negative result is not interpretable.

Prophylaxis

Since cattle enterotoxaemia is a peracute syndrome with a case fatality rate close to 100 per cent, there is no treatment. Prevention measures are important and should be applied when some risk factors are present or when some animals die of enterotoxaemia and other animals are exposed to the same stressors.

Management

Good practice in animal management is crucial. The aim is to promote slow food transitions and diets rich enough in fibre to allow equilibrium of the intestinal flora. Careful attention should be given to avoid stressful situations related to feeding or the environment, such as a sudden change in diet or animal regrouping (Popoff 1998, Manteca and others 2000). These suggestions are based on field observations and should be adapted to each individual situation according to the case history and farm management.

Medical Vaccination

There are several commercial vaccines against clostridial enterotoxaemia in ruminants. All marketed vaccines in Europe contain at least one of *C. perfringens* toxinotypes and most contain the β and ϵ toxoids. Several also contain the α toxoid and raw culture supernatants of *C. perfringens*. In addition, several other clostridial species toxoids and/or bacteria are usually present in the vaccines: *Clostridium chauvoei*, *Clostridium novyi*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium septicum* and *Clostridium tetani*. A few vaccines also include other bacteria such as *Mannheimia haemolytica* or enterotoxigenic *Escherichia coli*.

Effectiveness of vaccination is better in small ruminants and pigs (Kelneric and others 1996, Songer 1996) than in cattle. Indeed, there are examples of breakdown in the field when clostridial vaccines are used in cattle (Glock and Degroot 1998). A first difficulty is the absence of an experimental model of the enterotoxaemia syndrome (Manteca and others 2001). Moreover, no current vaccines contain β_2 or enterotoxin toxoids and α toxoid is present in only some vaccines. For α toxin, divergent opinions exist concerning its implication in clostridial enteritis/enterotoxaemia and its subsequent importance in vaccine composition. In healthy cattle, α toxin is present and there is a basic level of antibodies to α in serum, meaning that a part of produced toxin may be absorbed in the blood and processed by the immune system. The serological threshold to obtain clinical protection is empirically fixed because any experimental protection has not been determined in vivo. But after vaccination, it was demonstrated that seroconversion was positively correlated with the quantity of antigen present in the vaccine (Manteca and others 2004). In that study, the highest titres were

obtained in two- to four-month-old calves using a first injection at one month of age followed by a booster one month later. Further boosters were necessary twice a year. If the risk of infection is considered high at birth, the cows may be vaccinated at seven and eight months of gestation. In this case, calves from vaccinated dams should not be vaccinated before the fourth month of life because passive immunity interferes with active immunisation. For vaccines without α toxoid, a booster is recommended every year. Finally, it must be emphasised that the sporadic course of the disease in small-scale farms (one to two cases per year) limits the economic interest of vaccination against enterotoxaemia compared with vaccination against epidemic pathologies.

Improvements in the vaccines currently available are needed. At the present time, antidostridial vaccines are raw culture supernatants. Cultures are inactivated and bacterial bodies are removed, but they contain a lot of uncharacterised and unstandardised elements such as minor toxins and metabolic waste. These elements may disturb the immune response to toxoids of interest and induce a local inflammatory response and allergic reactions (Stokka and others 1994, Uzal and others 1999). The production of vaccines from virulent strains also requires stringent safety conditions, costly detoxification and control steps. It may be possible to create targeted vaccine(s) composed of non-toxic peptides. That seems feasible, as all *C. perfringens* toxins genes have been cloned and expressed as recombinant proteins (α : Bennett and others 1999, Schoepe and others 2006; β : Steinhorsdottir and others 1995; α - β : Bai and others 2006; β - β : Xu and others 2005; ϵ : Goswami and others 1996, Oyston and others 1998; ι : Sirard and others 1997; enterotoxin: Belyi and Varfolomeeva 2003; β 2, Gibert and others 1997, Lebrun and others 2007). Another way would be to select strains producing naturally protective immunogenic but non-toxic variants of the toxins of interest, such as the 1121A/19 strain of *C. perfringens*, which produces a non-toxic variant of α toxin that induces a protective response against different toxic variants of α (Schoepe and others 2001).

Antibiotics

In some rare cases of an enzootic-like form of the syndrome, it is sometimes recommended to administer antibiotics and/or immune serum prophylactically to protect all the animals living in the same conditions as the first victims, considering they were all exposed to the same initiating stress (Fleming 1985, Daube and others 1992, 1996a, Popoff 1998). Antibiotics like penicillin G can prevent the multiplication of *C. perfringens* and the production of new toxin(s) but have no effect on the toxins already produced. *C. perfringens* normally has little resistance to antibiotics, but can acquire multiple resistances in the case of frequent antibiotic use on the farm. Some mechanisms of resistance transmission are well studied, such as the tetracycline resistance model (Daube and others 1992, Lyras and Rood 1996, 1997, Dubreuil and others 2003, Dubreuil and Neut 2004, Johansson and others 2004, Lucey and Hutchins 2004, Menozzi and others 2004).

Serotherapy

Immune serum contains antibodies that can neutralise the circulating toxins, but treatment has no effect on toxins already fixed on their target cells. Moreover, neither antimicrobial agents nor hyperimmune serum has much therapeutic value, because death occurs too quickly to allow effective therapeutic intervention. The lack of identification of the toxins involved in cattle enterotoxaemia, the cost of immune serum and the existence of a risk of anaphylaxis, since the sera are produced in horses, render this approach very uncommon.

Probiotics

In the context of an enzootic-like form with a common initiating stress, the administration of probiotics, in a preventive way, could help the gut flora to overcome the stress. Some of these probiotic organisms are also used as growth promoters in the context of intensive breeding such as in feedlots (Klaassen and others 1999, Reid and Friendship 2002, Beauchemin and others 2003, Ewaschuk and others 2004, Barbosa and others 2005, Timmerman and others 2005, Jouany 2006, Stein and others 2006, Kim and others 2007, Yasuda and others 2007).

Conclusions

Cattle enterotoxaemia affects predominantly young beef cattle, in an intensive breeding context such as the feedlot or veal industry, or high-producing dairy cattle in the case of HBS. For the veterinary clinician, the first diagnostic hypothesis is based on the case history (sudden death, stress) and the lesional aspect at postmortem examination (haemorrhagic jejunoileitis). These suspicions would be ideally confirmed by both bacterial anaerobic culture and *C. perfringens* counting if samples can be processed in good conditions and rapidly. After bacterial identification, the toxin type(s) associated preferentially with cattle enterotoxaemia has to be determined. In cattle enterotoxaemia and HBS, type A is the dominant toxinotype.

There are difficulties in making an exhaustive review of cattle enterotoxaemia. In some studies the exact origin of *C. perfringens* strains is not indicated but only associated with 'intestinal troubles, enteritis, diarrhoea' or just 'sudden death'; the citation 'suspected of clostridial disease' is also a generic term commonly used. The criteria to determine whether or not it is enterotoxaemia are not always clearly defined, for example when using methods such as *C. perfringens* counting. Two other elements can be confusing. First, with evolution in the techniques used, some strains originally classified into one toxinotype by the mouse seroneutralisation assay have been reviewed and reclassified into another toxinotype. As a consequence, some older studies are difficult to interpret. Secondly, the classification of the toxins into 'major' and 'minor' toxins is somewhat debatable. Indeed, some minor toxins have been proved to play a more important role than initially expected, like θ toxin or perfringolysin in the pathogenesis of gas gangrene. New classification of the strains of *C. perfringens* should also be a future major research domain.

In the field, clostridial enterotoxaemia has both cost and animal welfare implications for cattle breeders, who may lose calves of high value to the disease. While further studies are expected to provide better understanding of the pathogenicity of *C. perfringens*, as well as progress in vaccination strategies, good breeding management and feeding practices remain the best means of preventing enterotoxaemia in cattle.

References

- ABUTARBUSH, S. M. & RADOSTITS, O. M. (2005) Jejunal hemorrhage syndrome in dairy and beef cattle: 11 cases (2001 to 2003). *Canadian Veterinary Journal* **46**, 711-715.
- ABUTARBUSH, S. M., CARMALT, J. L., WILSON, D. G., O'CONNOR, B. F., CLARK, E. G. & NAYLOR, J. M. (2004) Jejunal hemorrhage syndrome in 2 Canadian beef cows. *Canadian Veterinary Journal* **45**, 48-50.
- ADCOCK, P. W. & SAINT, C. F. (2001) Rapid confirmation of *Clostridium perfringens* by using chromogenic and fluorogenic substrates. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 4382-4384.
- ANNETT, C. B., VISTE, J. R., CHIRINO-TREJO, M., CLASSEN, H. L., MIDDLETON, D. M. & SIMKO, E. (2002) Necrotic enteritis: effect of barley, wheat and corn diets on proliferation of *Clostridium perfringens* type A. *Avian Pathology* **31**, 598-601.
- ARBUCKLE, J. B. R. (1972) The attachment of *Clostridium welchii* (*C. perfringens*) type C to intestinal villi of pigs. *Journal of Pathology* **106**, 65-72.
- BACCIARINI, L. N., BOERLIN, P., STRÄUB, R., FREY, J. & GRÖNE, A. (2003) Immunohistochemical localization of *Clostridium perfringens* β 2-toxin in the gastrointestinal tract of horses. *Veterinary Pathology* **40**, 376-381.
- BAI, J. N., ZHANG, Y. & ZHAO, B. H. (2006) Cloning of alpha-beta fusion gene from *Clostridium perfringens* and its expression. *World Journal of Gastroenterology* **12**, 1229-1234.
- BARBOSA, T. M., SERRA, C. R., LA RAGIONE, R. M., WOODWARD, M. J. & HENRIQUES, A. O. (2005) Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 968-978.
- BARKER, I. K., VAN DREUMEL, A. A. & PALMER, N. (1993) The alimentary system, disease associated with enteric clostridial infection. In *Pathology of Domestic Animals*, Vol. 2, 5th edn. Eds K. V. F. Jobb, P. C. Kennedy, N. Palmer. Academic Press, pp. 213-221.
- BAUMS, C. G., SCHOTTE, U., AMTSBERG, G. & GOETHE, R. (2004) Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Veterinary Microbiology* **100**, 11-16.
- BEAUCHEMIN, K. A., YANG, W. Z., MORGAVI, D. E., GHORBANI, G. R., KAUTZ, W. & LEEDLE, J. A. (2003) Effects of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. *Journal of Animal Sciences* **81**, 1628-1640.
- BELYI, I. F. & VARFOLOMEIEVA, N. A. (2003) Construction of a fusion protein carrying antigenic determinants of enteric clostridial toxins. *FEMS Microbiology Letters* **225**, 325-329.
- BENNETT, A. M., LESCOTT, T., PHILLIPOTS, R. J., MACKETT, M. & TITBALL, R. W. (1999) Recombinant vaccinia viruses protect against *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *Viral Immunology* **12**, 97-105.
- BERGEY, D. H., BREED, R. S., MURRAY, E. D. G. & HITCHENS, A. P. (1939)

July 3, 2010 | **Veterinary Record**

Papers

- The genus *Clostridium*. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th edn. Williams and Wilkins. pp 551-572
- BERGHAUS, R. D., MCCLUSKEY, B. J. & CALLAN, R. J. (2005) Risk factors associated with hemorrhagic bowel syndrome in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **226**, 1700-1706
- BILLINGTON, S. J., WIECKOWSKI, E. U., SARKER, M. R., BUESCHEL, D., SONGER, J. G. & MCCLANE, B. A. (1998) *Clostridium perfringens* type B animal enteritis isolates with highly conserved, silent enterotoxin gene sequences. *Infection and Immunity* **66**, 4531-4536
- BRAUN, U., STEINER, A. & GOTZ, M. (1993) Clinical signs, diagnosis and treatment of duodenal ileus in cattle. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* **135**, 345-355
- BUESCHEL, D. M., JOST, B. H., BILLINGTON, S. J., TRINH, H. T. & SONGER, J. G. (2003) Prevalence of *cpb2*, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. *Veterinary Microbiology* **94**, 121-129
- BUESCHEL, D., WALKER, R., WOODS, L., KOKAI-KUN, J., MCCLANE, B. & SONGER, J. G. (1998) Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A necrotic enteritis in a foal. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **213**, 1305-1307
- BUXTON, D., LINKLATER, K. A. & DYSON, D. A. (1978) Pulpy kidney disease and its diagnosis by histological examination. *Veterinary Record* **102**, 241
- CARNEY, T., PERRY, J. D., FORD, M., MAJUMDAR, S. & GOULD, F. K. (2002) Evidence for antibiotic induced *Clostridium perfringens* diarrhea. *Journal of Clinical Pathology* **55**, 240
- CECI, L., PARADIES, P., SASANELLI, M., DE CAPRARIIS, D., GUARDA, E., CARUCCHIO, M. T. & CARELLI, G. (2006) Haemorrhagic bowel syndrome in dairy cattle: possible role of *Clostridium perfringens* type A in the disease complex. *Journal of Veterinary Medicine, A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine* **53**, 518-523
- CLARKSON, M. J., BAULL, W. B. & KERRY, J. B. (1985) Vaccination of cows with clostridial antigens and passive transfer of clostridial antibodies from bovine colostrum to lambs. *Veterinary Record* **116**, 467-469
- COETZER, J. A. W. & TUSTIN, R. C. (2005) *Infectious Diseases of Livestock*. 2nd edn. Oxford University Press
- DAUBE, G., CHINA, B., SIMON, P., HAVLA, K. & MAINIL, J. (1994) Typing of *Clostridium perfringens* by in vitro amplification of toxin genes. *Journal of Applied Bacteriology* **77**, 650-655
- DAUBE, G., GINTER, A., MANTECA, C., LIMBOURG, B., COPPE, P., MAINIL, J. & KAECKENBEECK, A. (1996a) L'entérotoxémie bovine: rôle de *Clostridium perfringens*. Ministère des Classes Moyennes et de l'Agriculture. Administration Recherche et Développement
- DAUBE, G., MAINIL, J., LIMBOURG, B. & KAECKENBEECK, A. (1992) Etude de l'antibiostase de *Clostridium perfringens* par l'emploi de sonde génétique. *Annales de Médecine Vétérinaire* **136**, 53-56
- DAUBE, G., SIMON, P., LIMBOURG, B., MANTECA, C., MAINIL, J. & KAECKENBEECK, A. (1996b) Hybridization of 2659 *Clostridium perfringens* isolates with gene probes for seven toxins (α , β , ϵ , ι , θ , μ and enterotoxin) and for sialidase. *American Journal of Veterinary Research* **57**, 496-501
- DE LA ROSA, C., HOGUE, D. E. & THONNEY, M. L. (1997) Vaccination schedules to raise antibody concentrations against epsilon-toxin of *Clostridium perfringens* in ewes and their triplet lambs. *Journal of Animal Science* **75**, 2228-2234
- DENNISON, A. C., VAN METRE, D. C., MORLEY, P. S., CALLAN, R. J., PLAMPIN, E. C. & ELLIS, R. P. (2005) Comparison of the odds of isolation, genotypes, and in vivo production of major toxins by *Clostridium perfringens* obtained from the gastrointestinal tract of dairy cows with hemorrhagic bowel syndrome or left-displaced abomasum. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **227**, 132-138
- DENNISON, A. C., VAN METRE, D. C., CALLAN, R. J., DINGSMORE, P., MASON, G. L. & ELLIS, R. P. (2002) Hemorrhagic bowel syndrome in dairy cattle: 22 cases (1997-2000). *Journal of the American Veterinary Medical Association* **221**, 686-689
- DUBREUIL, L., CADYET, L. & NEUT, C. (2003) Antianaerobic activity of etrapenem compared to seven other agents. Proceedings of the 43th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, September 14 to 17, 2003. Abstract E2010
- DUBREUIL, L. & NEUT, C. (2004) Clostridia: antibiotic susceptibility, present and near future. Proceedings of Meeting 3 of the European Concerted Action OLK2-CT2001-01267: Diagnosis, Epidemiology and Antibiotic Resistance of the Genus *Clostridium*. Parma, October 17 to 18, 2004. pp 49-55
- EFUNTOYE, M. O. & ADETOSOYE, A. I. (2003) Clostridial diarrhoea in food animals in Ibadan, Nigeria. *Israel Journal of Veterinary Medicine* **58**. www.isrvma.org/article/58_1_5.htm. Accessed April 24, 2006
- ENGSTROM, B. E., FERMER, C., LINDBERG, A., SAARINEN, E., BAVERUD, A. & GUNNARSSON, A. (2003) Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. *Veterinary Microbiology* **94**, 225-235
- EWASCHUK, J. B., NAYLOR, J. M., CHIRINO-TREJO, M. & ZELLO, G. A. (2004) *Lactobacillus rhamnosus* strain GG is a potential probiotic for calves. *Canadian Journal of Veterinary Research* **68**, 249-253
- FACH, P. & POPOFF, M. R. (1997) Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in food and fecal samples with a duplex PCR and the slide latex agglutination test. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 4232-4236
- FERNANDEZ-MIYAKAWA, M. E., HSHER, D. J., POON, R., SAYEED, S., ADAMS, V., ROOD, J. I., MCCLANE, B. A. & UZAL, F. A. (2007) Both epsilon-toxin and beta2-toxin are important for the lethal properties of *Clostridium perfringens* type B isolates in the mouse intravenous injection model. *Infection and Immunity* **75**, 1443-1452
- FISHER, J. D., MIYAMOTO, K., HARRISON, B., AKIMOTO, S., SARKER, M. R. & MCCLANE, B. A. (2005) Association of beta2 toxin production with *Clostridium perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates carrying a plasmid enterotoxin gene. *Molecular Microbiology* **56**, 747-762
- FLEMING, S. (1985) Enterotoxaemia in neonatal calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* **1**, 509-514
- RUKATA, T., HADATE, Y., BABA, E., UEMURA, T. & ARAKAWA, A. (1988) Influence of *Clostridium perfringens* and its toxin in germ-free chickens. *Research in Veterinary Science* **44**, 68-70
- GARMORY, H. S., CHANTER, N., FRENCH, N. P., BUESCHEL, D., SONGER, J. G. & TITBALL, R. W. (2000) Occurrence of *Clostridium perfringens* beta2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. *Epidemiology and Infection* **124**, 61-67
- GHAZI, E., YOUNAN, M., ARDEHALI, M. & MULLER, W. (1997) Differentiation of proteinase (minor toxin lambda) in *Clostridium perfringens* strains from sheep and goats in Iran. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* **104**, 443-445
- GHOLAMIANDEKHORDI, A. R., DUCATILLE, R., HEYNDRIKX, M., HAESBROUCK, F. & VANIMMERSEEL, F. (2006) Molecular and phenotypical characterization of *Clostridium perfringens* isolates from poultry flocks with different disease status. *Veterinary Microbiology* **113**, 143-152
- GIBERT, M., JOLIVET-RENAUD, C. & POPOFF, M. R. (1997) Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene* **203**, 650-673
- GINTER, A., RENIER, K., COLLARD, A., LIMBOURG, B., DAUBE, G., SIMON, P., MANTECA, C. & COPPE, P. (1994) Caractérisation et typage de souches de *Clostridium perfringens* par la méthode ELISA. In *Biotechnologie du Diagnostic et de la Prévention des Maladies Animales*. Eds P. El Hassane Diop, A. Kaekenbeek. John Libbey Eurotext. pp 31-48
- GINTER, A., WILLIAMSON, E. D., DESSY, F., COPPE, P., BULLIFENT, H., HOWELLS, A. & TITBALL, R. W. (1996) Molecular variation between the α -toxins from the type strain (NCTC 8237) and clinical isolates of *Clostridium perfringens* associated with diseases in man and animals. *Microbiology* **142**, 191-198
- GKOURTIDIS, K., FREY, J., BOURTZI-HATZOPPOULOU, E., ILIADIS, N. & SARRIS, K. (2001) PCR detection and prevalence of alpha-, beta-, epsilon-, iota- and enterotoxin genes in *Clostridium perfringens* isolated from lambs with clostridial dysentery. *Veterinary Microbiology* **82**, 39-43
- GLOCK, R. D. & DEGROOT, B. D. (1998) Sudden death of feedlot cattle. *Journal of Animal Science* **76**, 315-319
- GOSWAMI, P. P., RUPA, P., PRIHAR, N. S. & GARG, L. C. (1996) Molecular cloning of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin gene and its high level expression in *E. coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **226**, 755-740
- GRECO, G., MADIO, A., BUONAVOGLIA, D., TOTARO, M., CORRENTE, M., MARTELLA, V. & BUONAVOGLIA, C. (2005) *Clostridium perfringens* toxin-types in lambs and kids affected with gastroenteric pathologies in Italy. *Veterinary Journal* **170**, 346-350
- GREEN, D. S., GREEN, M. J., HILLYER, M. H. & MORGAN, K. L. (1987) Injection site reactions and antibody responses in sheep and goats after the use of multivalent clostridial vaccines. *Veterinary Record* **120**, 435-439
- GREENE, C. E. & JANG, S. S. (2003) Anaerobic infections. In *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Revised Reprint. 3rd edn. Ed C. E. Greene. Saunders Elsevier. pp 381-388
- GRINER, L. A. & BRACKEN, F. K. (1953) *Clostridium perfringens* (type C) in acute hemorrhagic enteritis of calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **122**, 99-102
- GUBASH, S. M. & INGHAM, L. (1997) Comparison of a new, bismuth-iron-sulfite-cycloserine agar for isolation of *Clostridium perfringens* with the tryptose-sulfite-cycloserine and blood agars. *Zentralblatt für Bakteriologie* **285**, 397-402
- HATHEWAY, C. L. (1990) Toxicogenic clostridia. *Clinical Microbiology Reviews* **3**, 66-98
- HEIKINHEIMO, A., LINDSTROM, M., GRANUM, P. E. & KORKEALA, H. (2006) Humans as reservoir for enterotoxin gene-carrying *Clostridium perfringens* type A. *Emerging Infectious Diseases* **12**, 1724-1729
- HERHÖLZ, C., MISEREZ, R., NICOLET, J., FREY, J., POPOFF, M., GIBERT, M., GERBER, H. & STRAUB, R. (1999) Prevalence of β 2-toxicogenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 358-361
- HUIS IN 'T VELD, J. H. (1991) Gastrointestinal flora and health in man and animal. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* **116**, 232-239 (In Dutch)
- JOHANSSON, A., ASPAN, A., BAGGE, E., BAVERUD, V., ENGSTROM, B. E. & JOHANSSON, K. E. (2006) Genetic diversity of *Clostridium perfringens* type A isolates from animals, food poisoning outbreaks and sludge. *BMC Microbiology* **6**, 47
- JOHANSSON, A., ENGSTROM, B. E., FREY, J., JOHANSSON, K. E. & BAVERUD, V. (2005) Survival of *Clostridium perfringens* during simulated transport and stability of some plasmid-borne toxin genes under aerobic conditions. *Acta Veterinaria Scandinavica* **46**, 241-247
- JOHANSSON, A., GREKO, C., ENGSTROM, B. & KARLSSON, M. (2004) Antimicrobial susceptibility in Swedish, Norwegian and Danish *Clostridium perfringens* isolated from poultry and distribution of tetracycline resistance genes. Proceedings of Meeting 3 of the European Concerted Action OLK2-CT2001-01267: Diagnosis, Epidemiology and Antibiotic Resistance of the Genus *Clostridium*. Parma, October 17 to 18, 2004. p 75
- JOST, B. H., BILLINGTON, S. J., TRINH, H. T., BUESCHEL, D. M. & SONGER, J. G. (2005) Atypical *cpb2* genes, encoding beta2-toxin in *Clostridium perfringens* isolates of nonporcine origin. *Infection and Immunity* **73**, 652-656
- JOST, B. H., TRINH, H. T. & SONGER, J. G. (2006) Clonal relationships among *Clostridium perfringens* of porcine origin as determined by multilocus sequence typing. *Veterinary Microbiology* **116**, 158-165
- JOUANY, J. P. (2006) Optimizing rumen functions in the close-up transition period and early lactation to drive dry matter intake and energy balance in cows. *Animal Reproduction Science* **96**, 250-264
- KADRA, B., GUILLOU, J. P., POPOFF, M. & BOURLIOUX, P. (1999) Typing of sheep clinical isolates and identification of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains by classical methods and by polymerase chain reaction (PCR). *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **24**, 259-266
- KANAKARAJ, R., HARRIS, D. L., SONGER, J. G. & BOSWORTH, B. (1998) Multiplex PCR assay for detection of *Clostridium perfringens* in feces and intestinal contents of pigs and in swine feed. *Veterinary Microbiology* **63**, 29-38

- KATTICH, R. V. (1987) Observation on the epidemiology, pathogenesis and prophylaxis of enteritis due to *Clostridium perfringens* types A and C. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* **60**, 95-101
- KELNERIG, Z., NAGLIC, T. & UDOVICIC, I. (1996) Prevention of necrotic enteritis in piglets by vaccination of pregnant gilts with a *Clostridium perfringens* type C and D bacterin-toxoid. *Veterinarni Medicina* **41**, 335-338
- KEYBURN, A. L., BOYCE, J. D., VAZ, P., BANNAM, T. L., FORD, M. E., PARKER, D., DI RUBBO, A., ROOD, J. I. & MOORE, R. J. (2008) NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathogens* **4**, e26
- KEYBURN, A. L., SHEEDY, S. A., FORD, M. E., WILLIAMSON, M. M., AWAD, M. M., ROOD, J. I. & MOORE, R. J. (2006) Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. *Infection and Immunity* **74**, 6496-6500
- KIM, P. I., JUNG, M. Y., CHANG, Y. H., KIM, S., KIM, S. J. & PARK, Y. H. (2007) Probiotic properties of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains isolated from porcine gastrointestinal tract. *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**, 1108-1111
- KLAASSEN, H. L., MOLKENBOER, M. J., BAKKER, J., MISEREZ, R., HANJ, H., FREY, J., POPOFF, M. R. & VAN DEN BOSCH, J. F. (1999) Detection of the $\beta 2$ toxin gene of *Clostridium perfringens* in diarrhoeic piglets in the Netherlands and Switzerland. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **24**, 325-332
- KOKAI-KUN, J. F. & MCCLANE, B. A. (1997) The *Clostridium perfringens* enterotoxin. In *The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis*. Eds J. I. Rood, B. A. McClane, J. G. Songer, R. W. Tittball. Academic Press, pp 325-357
- KREFT, B., DALHOFF, K. & SACK, K. (2000) Necrotizing enterocolitis: a historical and current review. *Medizinische Klinik (Munich)* **95**, 435-441 (In German)
- LEARY, S. E. C. & TITBALL, R. W. (1997) The *Clostridium perfringens* β -toxin. In *The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis*. Eds J. I. Rood, B. A. McClane, J. G. Songer, R. W. Tittball. Academic Press, pp 243-250
- LEBRUN, M., HLEBE, P., DESMECHT, D., GALLENI, M., MAINIL, J. G. & LINDEN, A. (2007) The expression of *Clostridium perfringens* consensus beta2 toxin is associated with bovine enterotoxaemia syndrome. *Veterinary Microbiology* **120**, 151-157
- LIN, Y. T. & LABBE, R. (2003) Enterotoxigenicity and genetic relatedness of *Clostridium perfringens* isolates from retail foods in the United States. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 1642-1646
- LUCEY, B. P. & HUTCHINS, G. M. (2004) William H. Welch, MD, and the discovery of *Bacillus welchii*. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* **128**, 1193-1195
- LYRAS, D. & ROOD, J. I. (1996) Genetic organization and distribution of tetracycline resistance determinants in *Clostridium perfringens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**, 2500-2504
- LYRAS, D. & ROOD, J. I. (1997) Transposable genetic elements and antibiotic resistance determinants from *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile*. In *The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis*. Eds J. I. Rood, B. A. McClane, J. G. Songer, R. W. Tittball. Academic Press, pp 73-92
- MANTECA, C. (2004) Etude étiologique de l'entérotoxémie bovine. *Annales de Médecine Vétérinaire* **148** (Suppl.), 16-20
- MANTECA VILLANUEVA, C. (2003) Etude étiologique de l'entérotoxémie bovine. PhD thesis. Infectious Diseases Department, University of Liège, Belgium
- MANTECA, C. & DAUBE, G. (1994) Etude de l'entérotoxémie bovine en Belgique I - Introduction et contexte bibliographique. *Annales de Médecine Vétérinaire* **138**, 155-164
- MANTECA, C., DAUBE, G., JAUNIAUX, T., LIMBOURG, B., KACKENBEECK, A. & MAINIL, J. G. (2000) Etude de l'entérotoxémie bovine en Belgique II - Épidémiologie descriptive. *Annales de Médecine Vétérinaire* **145**, 75-82
- MANTECA, C., DAUBE, G., JAUNIAUX, T., LINDEN, A., FIRSON, V., DETILLEUX, J., GINTER, A., COPPE, P., KACKENBEECK, A. & MAINIL, J. G. (2002) A role for the *Clostridium perfringens* $\beta 2$ toxin in bovine enterotoxaemia? *Veterinary Microbiology* **86**, 191-202
- MANTECA, C., DAUBE, G., FIRSON, V., LIMBOURG, B., KACKENBEECK, A. & MAINIL, J. G. (2001) Bacterial intestinal flora associated with enterotoxaemia in Belgian Blue calves. *Veterinary Microbiology* **81**, 21-32
- MANTECA, C., GINTER, A., LIMBOURG, B., COPPE, P., MAINIL, J. & DAUBE, G. (2004) Etude de l'entérotoxémie bovine. III. Comparaison de différents protocoles d'immunisation contre la toxine α de *Clostridium perfringens*. *Annales de Médecine Vétérinaire* **148**, 147-152
- MARKS, S. L. & KATHER, E. J. (2003) *Clostridium perfringens*- and *Clostridium difficile*-associated diarrhea. In *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3rd edn. Revised Reprint. Ed C. E. Greene. Saunders Elsevier, pp 363-369
- MARTIN, T. G. & SMYTH, J. A. (2009) Prevalence of netB among some clinical isolates of *Clostridium perfringens* from animals in the United States. *Veterinary Microbiology* **136**, 202-205
- MCCLANE, B. A. & SNYDER, I. T. (1987) Development and preliminary evaluation of a slide latex agglutination assay for detection of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Journal of Immunological Methods* **100**, 131-136
- MEER, R. R. & SONGER, J. G. (1997) Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *American Journal of Veterinary Research* **58**, 702-705
- MENOZZI, M. G., ROSSI, S., SOMENZI, P., BERTONCINI, L., ZERBINI, I., CHEZZI, C. & DETTORI, G. (2004) Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Clostridium* in Parma. Proceedings of Meeting 3 of the European Concerted Action OIK2-CT2001-01267: Diagnosis, Epidemiology and Antibiotic Resistance of the Genus *Clostridium*. Parma, October 17 to 18, 2004. pp 86-87
- MIYAMOTO, K., FISHER, D. J., II, J., SAYEED, S., AKIMOTO, S. & MCCLANE, B. A. (2006) Complete sequencing and diversity analysis of the enterotoxin-encoding plasmids in *Clostridium perfringens* type A non-food-borne human gastrointestinal disease isolates. *Journal of Bacteriology* **188**, 1585-1598
- MIYAMOTO, K., WEN, Q. & MCCLANE, B. A. (2004) Multiplex PCR genotyping assay that distinguishes between isolates of *Clostridium perfringens* type A carrying a chromosomal enterotoxin gene (cpe) locus, a plasmid cpe locus with an IS1470-like sequence, or a plasmid cpe locus with an IS1151 sequence. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 1552-1558
- MUSKENS, J., VELDHORST, G. J., SNOEP, J. J. & VOS, J. (2007) High mortality in a herd with signs of jejunal hemorrhage syndrome. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* **132**, 116-119 (In Dutch)
- NAURBY, B., PEDERSEN, K. & MADSEN, M. (2003) Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among *Clostridium perfringens* isolates from chickens. *Veterinary Microbiology* **94**, 257-266
- NETHERWOOD, T., BINNS, M., TOWNSEND, H., WOOD, J. L., MUMFORD, J. A. & CHANTER, N. (1998) The *Clostridium perfringens* enterotoxin from equine isolates; its characterization, sequence and role in foal diarrhea. *Epidemiology and Infection* **120**, 193-200
- NILO, L. (1986) Experimental production of hemorrhagic enterotoxaemia by *Clostridium perfringens* type C in maturing lambs. *Canadian Journal of Veterinary Research* **50**, 32-35
- NILO, L. (1987) Toxic characteristics of *Clostridium perfringens* type C in enterotoxaemia of domestic animals. *Canadian Journal of Veterinary Research* **51**, 224-228
- NILO, L., HARRIS, W. N. & JONES, G. A. (1974) *Clostridium perfringens* type C in hemorrhagic enterotoxaemia of neonatal calves in Alberta. *Canadian Veterinary Journal* **15**, 224-226
- O'BRIEN, D. K. & MELVILLE, S. B. (2004) Effects of *Clostridium perfringens* alpha-toxin (PLC) and pertingolysin O (PFO) on cytotoxicity to macrophages, on escape from the phagosomes of macrophages, and on persistence of *C. perfringens* in host tissues. *Infection and Immunity* **72**, 5204-5215
- ODENDAAL, M. W., VISSER, J. J., BERGH, N. & BOTHA, W. J. (1989) The effect of passive immunization on active immunity against *Clostridium perfringens* type D in lambs. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* **56**, 251-255
- ODENDAAL, M. W., VISSER, J. J., BOTHA, W. J. & PRINSLOO, H. (1988) The passive protection of lambs against *Clostridium perfringens* type D with semi-purified hyperimmune serum. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* **55**, 47-50
- OKFOWOLE, P. A., ITODO, A. E., OYETUNDE, I. L., CHIMA, J. C., IROKANULO, E. A. & OGHOJI, R. A. (1991) *Clostridium perfringens* type A enterotoxaemia in pigs: a report of five cases. *British Veterinary Journal* **147**, 484-485
- OYSTON, P. C., PAYNE, D. W., HAVARD, H. L., WILLIAMSON, E. D. & TITBALL, R. W. (1998) Production of a non-toxic site-directed mutant of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin which induces protective immunity in mice. *Microbiology* **144**, 333-341
- PERSSON, S. & OLSEN, K. E. (2005) Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. *Journal of Medical Microbiology* **54**, 1043-1047
- PETTI, L., GIBERT, M. & POPOFF, M. R. (1999) *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends in Microbiology* **7**, 104-110
- PHILIPPEAU, C., GONÇALVES, S. & JULLIAND, V. (2003) Morts subites des bovins - Diagnostic bactériologiques des entérotoxémies. *Le Point Vétérinaire* **237**, 12-13
- POPOFF, M. R. (1989) Les entérotoxémies. *Revue de Médecine Vétérinaire* **140**, 479-491
- POPOFF, M. R. (1998) Interactions between bacterial toxins and intestinal cells. *Toxicon* **36**, 665-685
- RADOSTITS, O. M., GAY, C. C., HINCHCLIFFE, K. W. & CONSTABLE, P. D. (2007a) Enteric diseases associated with *Clostridium perfringens*. In *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats*. 10th edn. Saunders, pp 836
- RADOSTITS, O. M., GAY, C. C., HINCHCLIFFE, K. W. & CONSTABLE, P. D. (2007b) Enterotoxaemia associated with *Clostridium perfringens* type A. In *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats*. 10th edn. Saunders, pp 836-838
- RADOSTITS, O. M., GAY, C. C., HINCHCLIFFE, K. W. & CONSTABLE, P. D. (2007c) Enterotoxaemia associated with *Clostridium perfringens* type B, C and E. In *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats*. 10th edn. Saunders, pp 838-840
- RADOSTITS, O. M., GAY, C. C., HINCHCLIFFE, K. W. & CONSTABLE, P. D. (2007d) Enterotoxaemia associated with *Clostridium perfringens* type D. In *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats*. 10th edn. Saunders, pp 841-844
- REID, G. & FRIENDSHIP, R. (2002) Alternatives to antibiotic use: probiotics for the gut. *Animal Biotechnologies* **13**, 97-112
- RIDDELL, C. & KONG, X. M. (1992) The influence of diet on necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Diseases* **36**, 499-503
- ROOD, J. I. & COLE, S. T. (1991) Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiological Reviews* **55**, 621-648
- ROONEY, A. E., SWEZEY, J. L., FRIEDMAN, R., HECHT, D. W. & MADDOX, C. W. (2006) Analysis of core housekeeping and virulence genes reveals cryptic lineages of *Clostridium perfringens* that are associated with distinct disease presentations. *Genetics* **172**, 2081-2092
- ROSE, A. L. & EDGAR, G. (1996) Enterotoxaemic jaundice of sheep and cattle. *Australian Veterinary Journal* **12**, 212-220
- ROSSKOPF-STREICHER, U., VOLKERS, P., NOESKE, K. & WERNER, E. (2004) Quality assurance of *C. perfringens* epsilon toxinoid vaccines - ELISA versus mouse neutralization test. *ALTEX* **21** (Suppl 3), 65-69
- SAKURAI, K. (1985) Necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens* type A in dairy cows with a discussion of the aetiology. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association* **38**, 587-590
- SATŌ, Y., MOCHIZUKI, A., HIRASAWA, H., OHTA, T., MOROZUNO, K., TOJO, H., TAKADA, T., HAYAKAWA, G. & FURUHATA, T. (1985) A case of necrotic enteritis in beef cattle harboring caused by *Clostridium perfringens* type A. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association* **38**, 122-125
- SAWIRES, Y. S. & SONGER, J. G. (2005) Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for strain typing of *Clostridium perfringens*. *Anaerobe* **11**, 262-272
- SAWIRES, Y. S. & SONGER, J. G. (2006) *Clostridium perfringens*: insight into virulence

Papers

- evolution and population structure. *Anaerobe* **12**, 23-43
- SCHALCH, B., BJORKROTH, J., EISGRUBER, H., KORKEALA, H. & STOLLE, A. (1997) Ribotyping for strain characterization of *Clostridium perfringens* isolates from food poisoning cases and outbreaks. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 3992-3994
- SCHALCH, B., SPERNER, B., EISGRUBER, H. & STOLLE, A. (1999) Molecular methods for the analysis of *Clostridium perfringens* relevant to food hygiene. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **24**, 281-286
- SCHOEPE, H., NEUBAUER, A., SCHLAPP, T., WIELER, L. H. & BALIER, G. (2006) Immunization with an alpha-toxin variant 121A/91-R212H protects mice against *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *Anaerobe* **12**, 44-48
- SCHOEPE, H., FACHE, C., NEUBAUER, A., FOTSCHKA, H., SCHLAPP, T., WIELER, L. H. & BALIER, G. (2001) Naturally occurring *Clostridium perfringens* nontoxic alpha-toxin variant as a potential vaccine candidate against alpha-toxin-associated diseases. *Infection and Immunity* **69**, 7194-7196
- SCHOTTE, U., TRUYEN, U. & NEUBAUER, H. (2004) Significance of β 2-toxinogenic *Clostridium perfringens* infection in animals and their predisposing factors - a review. *Journal of Veterinary Medicine* **51**, 423-426
- SHIRLEY, G. N. (1958) Clostridial enteritis in cattle. *Veterinary Record* **70**, 478-480
- SIPOS, W., FISCHER, L., SCHINDLER, M. & SCHMOLL, F. (2003) Genotyping of *Clostridium perfringens* isolated from domestic and exotic ruminants and swine. *Journal of Veterinary Medicine, B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* **50**, 360-362
- SIRARD, J. C., WEBER, M., DUFLOT, E., POPOFF, M. R. & MOCK, M. (1997) A recombinant *Bacillus anthracis* strain producing the *Clostridium perfringens* Ib component induces protection against iota toxin. *Infection and Immunity* **65**, 2029-2033
- SOLERJOVER, A., BLASI, J., GÓMEZ DE ARANDA, I., NAVARRO, E., GIBERT, M., POPOFF, M. R. & MARTÍN-SATUE, M. (2004) Effect of epsilon toxin-GFP on MDCK cells and renal tubules in vivo. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **52**, 931-942
- SONGER, J. G. (1996) Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clinical Microbiology Reviews* **9**, 216-234
- SONGER, J. G. & MISKIMMINS, D. W. (2004) *Clostridium perfringens* type E enteritis in calves: two cases and a brief review of the literature. *Anaerobe* **10**, 239-242
- SONGER, J. G. & UZAL, F. A. (2005) Clostridial enteric infections in pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **17**, 528-536
- SPARKS, S. G., CARMAN, R. J., SARKER, M. R. & MCCLANE, B. A. (2001) Genotyping of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with antibiotic-associated diarrhea and food poisoning in North America. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 883-888
- SPRINGER, S. & SELBITZ, H. J. (1999) The control of necrotic enteritis in sucking piglets by means of a *Clostridium perfringens* toxoid vaccine. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **24**, 333-336
- STEIN, D. R., ALLEN, D. T., PERRY, E. B., BRUNER, J. C., GATES, K. W., REHBERGER, T. G., MERTZ, K., JONES, D. & SEIGER, L. J. (2006) Effects of feeding propionibacteria to dairy cows on milk yield, milk components, and reproduction. *Journal of Dairy Science* **89**, 111-125
- STEINTHORSDDOTTIR, V., FRÍDRÍKSDÓTTIR, V., GUNNARSSON, E. & ANDRESSON, Ö. S. (1995) Expression and purification of *Clostridium perfringens* beta-toxin glutathione S-transferase fusion protein. *FEMS Microbiology Letters* **130**, 273-278
- STOKKA, G. L., EDWARDS, A. J., SPIRE, M. F., BRANDT, R. T., Jr, & SMITH, J. E. (1994) Inflammatory response to clostridial vaccines in feedlot cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **204**, 415-419
- SUDARIC, F. & NADAZDIN, M. (1983) Endemic clostridial infection on cattle farm. *Veterinarski Glasnik* **37**, 383-391
- THIEDE, S., GOETHE, R. & AMTSBERG, G. (2001) Prevalence of beta2 toxin gene of *Clostridium perfringens* type A from diarrhoeic dogs. *Veterinary Record* **149**, 273-274
- TIMBERMONT, L., LANCKRIET, A., PASMANS, E., HAESBROUCK, E., DUCATELLE, R. & VAN IMMERSSEEL, F. (2009) Intra-species growth-inhibition by *Clostridium perfringens* is a possible virulence trait in necrotic enteritis in broilers. *Veterinary Microbiology* **137**, 388-391
- TIMMERMAN, H. M., MULDER, L., EVERTS, H., VAN ESPEN, D. C., VAN DER WAL, E., KLAASSEN, G., ROUWERS, S. M., HARTEMINK, R., ROMBOUITS, F. M. & BEYENEN, A. C. (2005) Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics. *Journal of Dairy Science* **88**, 2154-2165
- TSCHIRDEWAHN, B., NOTERMANS, S., WERNARS, K. & UNTERMANN, F. (1991) The presence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains in faeces of various animals. *International Journal of Food Microbiology* **14**, 175-178
- UZAL, F. A. & KELLY, W. R. (1998) Protection of goats against experimental enterotoxaemia by vaccination with *Clostridium perfringens* type D epsilon toxoid. *Veterinary Record* **142**, 722-725
- UZAL, F. A., KELLY, W. R., MORRIS, W. E. & ASSIS, R. A. (2002) Effects of intravenous injection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in calves. *Journal of Comparative Pathology* **126**, 71-75
- UZAL, F. A., KELLY, W. R., MORRIS, W. E., BERMUDEZ, J. & BAISON, M. (2004) The pathology of peracute experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxaemia in sheep. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **16**, 403-411
- UZAL, F. A., WONG, J. P., KELLY, W. R. & PRIEST, J. (1999) Antibody response in goats vaccinated with liposome-adsorbed *Clostridium perfringens* type D epsilon toxoid. *Veterinary Research Communications* **23**, 143-150
- VAISHNAVI, G., KAUR, S. & SINGH, K. (2005) *Clostridium perfringens* type A and antibiotic associated diarrhea. *Indian Journal of Medical Research* **122**, 52-56
- VAN ASTEN, A. J., NIKOLAOU, G. N. & GRÖNE, A. (2010) The occurrence of cpb2-toxinogenic *Clostridium perfringens* and the possible role of the beta2-toxin in enteric disease of domestic animals, wild animals and humans. *Veterinary Journal* **183**, 135-140
- VAN DEN BERG, R. J., KUIJPER, E. J., VAN COPPENRAET, L. E. & CLAAS, E. C. (2006) Rapid diagnosis of toxinogenic *Clostridium difficile* in faecal samples with internally controlled real-time PCR. *Clinical Microbiology and Infection* **12**, 184-186
- VEILLON, A. & ZUBER, A. (1898) Recherches sur quelques microbes strictement anaérobies et leur rôle en pathologie. *Archives de Médecine Expérimentale et d'Anatomie Pathologique* **10**, 517-545
- VISSIENNON, T., MENGER, S. & LANGHOF, I. (1996) Hepatic and renal ultrastructural lesions in experimental *Clostridium perfringens* type A enterotoxaemia in chickens. *Avian Diseases* **40**, 720-724
- VOGEL, L. C. (1995) Antibiotic-induced diarrhea. *Orthopaedic Nursing* **14**, 38-41
- WATERS, M., SAVOIE, A., GARMORY, H. S., BUESCHEL, D., POPOFF, M., SONGER, J. G., TITBALL, R. W., MCCLANE, B. & SARKER, M. R. (2003) Genotyping and phenotyping of beta2-toxinogenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with gastrointestinal diseases in piglets. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 3584-3591
- WELCH, W. H. & NUTTALL, G. H. F. (1892) A gas producing bacillus (*Bacillus aerogenes capsulatus*, Nov Spec) capable of rapid development in the blood vessels after death. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* **3**, 81-91
- WORRALL, E. E., NATALIA, L., RONOHARDJO, P., PARTOUTOMO, S. & TARMUDJI, V. (1987) Enterotoxaemia in water buffaloes caused by *Clostridium perfringens* type A. *Veterinary Record* **121**, 278-279
- XU, C. B., ZENG, J., XU, C. L. & WANG, Y. J. (2005) Fusion of beta1-toxin gene and beta2-toxin gene from *Clostridium perfringens* type C. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **45**, 205-208 (In Chinese)
- YASUDA, K., HASHIKAWA, S., SAKAMOTO, H., TOMITA, Y., SHIBATA, S. & FUKATA, T. (2007) A new synbiotic consisting of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* and dextran improves milk production in Holstein dairy cows. *Journal of Veterinary Medical Science* **69**, 205-208
- YOO, H. S., LEE, S. U., PARK, K. Y. & PARK, Y. H. (1997) Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 228-232
- ZHANG, B. W., LI, M., MA, L. C. & WEI, F. W. (2006) A widely applicable protocol for DNA isolation from fecal samples. *Biochemical Genetics* **44**, 503-512
- ZOPPI, G., CINQUETTI, M., LUCIANO, A., BENINI, A., MUNER, A. & BERTAZZONI MINELLI, E. (1998) The intestinal ecosystem in chronic functional constipation. *Acta Paediatrica* **87**, 836-841

OBJECTIFS

OBJECTIFS

L'entérotoxémie bovine est un syndrome aigu à suraigu caractérisé par une mort subite et des lésions nécrohémorragiques au niveau de l'intestin grêle. Sous l'influence de facteurs déclenchants encore mal connus, l'entérotoxémie est caractérisée par une multiplication exponentielle de *Clostridium perfringens* dans des portions souvent limitées de l'intestin grêle et une production de toxines à actions locales et systémiques.

Parmi les nombreuses toxines potentiellement impliquées dans la genèse des lésions, la toxine beta2 (CPB2) mérite une attention particulière. Elle a été découverte chez des porcelets atteints d'entérite nécrotique (Gibert et al., 1997). Par la suite, de nombreuses études ont permis de la mettre en évidence chez d'autres espèces animales dans des circonstances pathologiques diverses ainsi que chez des animaux sains. Les souches qui produisent la CPB2 sont largement distribuées, mais l'implication de cette toxine dans les pathologies intestinales n'est pas encore élucidée. Chez les bovins, les résultats d'une étude réalisée dans notre laboratoire sur anses intestinales ligaturées ont suggéré une action synergique entre la toxine alpha et la toxine CPB2 pour expliquer les lésions hémorragiques observées dans le modèle (Manteca et al., 2002). C'est dans le prolongement de cette étude que le présent travail a débuté en 2000.

L'objectif général était de déterminer si la toxine CPB2 est bien associée à des cas d'entérotoxémie bovine rencontrés sur le terrain. Afin de réaliser ces enquêtes cas/témoins de terrain, il a fallu au préalable produire une toxine CPB2 d'origine bovine, la purifier et se doter d'outils de détection spécifiques du gène *cpb2* et de la toxine.

Les objectifs spécifiques étaient donc les suivants :

- (1) Cloner le gène *cpb2* codant pour la toxine CPB2 au départ d'une souche de *C. perfringens* isolée d'un bovin mort d'entérotoxémie ;
- (2) Produire et purifier la toxine CPB2 correspondante ;
- (3) Produire des anticorps polyclonaux dirigés contre cette toxine comme outils de détection ;
- (4) Comparer la prévalence et l'expression de différents allèles du gène *cpb2* au sein de souches de *C. perfringens* isolées soit de veaux morts d'entérotoxémie, soit de veaux sains. Dans ce but, 2 enquêtes terrain ont été réalisées, la première sur des veaux provenant d'élevages conventionnels et la seconde sur des veaux de boucherie.
- (5) Comparer les séquences du gène *cpb2* provenant de souches d'origine bovine avec celles déjà publiées.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les 3 premières études présentées dans ce travail ont pour objectifs la production de la toxine CPB2 d'origine bovine en Bacillus subtilis et Escherichia coli sous sa forme mature ou sous forme de protéines chimères, sa purification et la production d'anticorps spécifiques.

Les 3 études suivantes ont un caractère plus épidémiologique. Deux études portent sur la prévalence et le type de gène cpb2 détecté chez des bovins sains ou morts d'entérotoxémie ainsi que sur la capacité de souches cpb2 positives à exprimer la toxine CPB2. L'une a été réalisée sur des veaux issus d'élevage conventionnel, l'autre sur des veaux d'engraissement. La dernière étude se penche sur la phylogénie de séquences cpb2 issues de souches isolées de bovins sains ou morts d'entérotoxémie et les compare aux séquences cpb2 déjà publiées.

ÉTUDES 1-2-3 : PRODUCTION DE LA TOXINE BETA2 D'ORIGINE BOVINE ET D'ANTICORPS POLYCLONAUX SPÉCIFIQUES.

Depuis la découverte de la toxine beta2 de *C. perfringens* (CPB2), son implication dans diverses pathologies digestives a fréquemment été évoquée, mais les premiers travaux ont majoritairement été réalisés chez le porc. Afin d'étudier le rôle de cette toxine dans l'entérotoxémie bovine, il était indispensable de produire une CPB2 d'origine bovine, de la purifier et de se doter d'outils de détection spécifiques du gène et de la protéine.

Au cours de la première étude, une souche de *C. perfringens*, isolée d'un bovin mort d'entérotoxémie, et porteuse du gène *cpb2* a été choisie pour cloner le gène d'intérêt. Des amorces spécifiques ont été dessinées afin d'amplifier la séquence codant pour la forme mature de la protéine, *cpb2fm*, sans son peptide signal. La séquence en amont de *cpb2fm* n'ayant pu être amplifiée avec les amorces construites sur base de la séquence porcine de *cpb2*.

Sur base de cette séquence, la deuxième étude a permis de produire la protéine correspondante (CPB2FM) afin de pouvoir la purifier et l'étudier tant au niveau structure que fonction. La séquence *cpb2fm* a été clonée dans un plasmide d'amplification, puis dans différents plasmides d'expression, en *Escherichia coli* (*E. coli*) et / ou en *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*). Le choix de ne pas produire la protéine en *Clostridium* a été fait pour des raisons d'ordre technique, notamment la possibilité de travailler en aérobiose. *E. coli* a été choisie pour la connaissance que l'on en a et la diversité des souches disponibles. Et *B. subtilis* a l'avantage d'avoir une utilisation du code génétique proche de *Clostridium*. De nombreuses combinaisons souche-plasmide-milieu ont été réalisées afin de stimuler la production de la CPB2FM tout en limitant sa dégradation par les protéases. Le gène *cpb2fm* a également été inséré dans le chromosome de *B. subtilis*. Au départ de la construction la plus efficace, la purification de la CPB2FM a nécessité 3 étapes de chromatographie pour atteindre une pureté supérieure à 90%. Cette protéine purifiée a été détectée en Western blot par les anticorps anti-beta2 d'origine porcine et a permis de produire des anticorps polyclonaux spécifiques en lapins. Ces anticorps anti CPB2FM étaient capables de reconnaître la protéine produite par des souches de *C. perfringens* d'origine bovine et porcine. Par contre, les niveaux de CPB2FM obtenus étaient insuffisants pour envisager une production à une échelle industrielle.

C'est la raison pour laquelle des protéines tronquées ont été produites au cours de la troisième étude afin d'améliorer et simplifier les étapes de production et de purification. La CPB2FM a été scindée en un fragment N-terminal et un fragment C-terminal sur base de la prédiction de la structure secondaire de la protéine. Les deux séquences correspondantes ont été amplifiées, puis clonées, grâce des amorces dessinées lors de cette étude, pour être ensuite couplées à la séquence codant pour leur protéine porteuse : la bêta-lactamase BlaP pour le fragment N-terminal et la glutathion S-transférase (GST) pour le fragment C-terminal. Ces 2 constructions ont été exprimées en *E. coli*, puis purifiées en une ou deux étapes. Pour les 2 protéines tronquées, une pureté supérieure à 90%, compatible avec la production d'anticorps polyclonaux, a été atteinte. Les anticorps produits contre les protéines tronquées étaient capables de détecter la CPB2FM en Western Blot. Et les anticorps anti-CPB2FM détectaient les deux protéines chimères en Western blot.

Les amorces et les anticorps polyclonaux spécifiques produits au cours de ces 3 premières étapes ont permis d'étudier l'implication du gène *cpb2* et de la toxine CPB2 dans le contexte de l'entérotoxémie bovine.

1. TYPAGE ET SÉLECTION DES SOUCHES DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* ISSUES DE BOVINS MORTS D'ENTÉROTOXÉMIE EN VUE DU CLONAGE DU GÈNE *CPB2*

*Pour travailler sur *cpb2* –CPB2, l'étape initiale consistait à sélectionner parmi les souches de *C. perfringens* conservées au laboratoire de bactériologie une souche, issue d'un veau mort d'entérotaxémie et porteuse du gène d'intérêt : *cpb2*. Les différentes étapes de cette sélection sont décrites dans le chapitre qui suit.*

1.1. Introduction

Depuis la découverte de la toxine beta2 de *C. perfringens* (CPB2), son implication dans diverses pathologies digestives, dont l'entérotoxémie bovine, a fréquemment été évoquée, ainsi que son action synergique avec la toxine alpha (Manteca *et al.*, 2002). La CPB2 est, en effet, associée à des troubles digestifs divers, souvent à caractère hémorragique et violent (Garmory, 2000). Au début de cette étude, peu de choses étaient connues sur cette toxine, que ce soit sa structure, son mode d'action ou son implication réelle dans les pathologies citées plus haut. On savait cependant que le gène codant se situe sur un mégaplasmide (Gibert *et al.*, 1997 ; Shimizu *et al.*, 2001) et que la toxine possède des effets cytotoxique *in vitro* et létal *in vivo* chez la souris (Gibert *et al.*, 1997).

Dans ce contexte, les 3 premières études ont été mises en oeuvre pour produire la toxine CPB2 de façon maîtrisée, (i) si possible sous sa forme native afin d'éprouver sa toxicité et son implication dans l'entérotoxémie et (ii) en quantité suffisante pour pouvoir envisager une production à des fins de diagnostic et /ou d'immunisation.

Au préalable, il était indispensable de sélectionner des souches de *C. perfringens* d'intérêt. La première étude a été réalisée en ce sens. Le toxinotype d'une collection de souches de terrain issues de cas d'entérotoxémie bovine (Manteca *et al.*, 2001) a été déterminé. Les PCR (Herholz *et al.*, 1999) ont permis d'établir qu'il s'agissait bien de souches de *C. perfringens* de toxinotype A, possédant ou non le gène *cpb2*. Ce typage a été réalisé sur un échantillonnage représentatif d'isolats belges obtenus entre 2000 et 2002 et d'isolats plus anciens (Daube *et al.*, 1994). Sur ces derniers, la recherche des gènes codant pour les toxines majeures (alpha, beta1, beta2, epsilon, iota et l'entérotoxine) avait déjà été réalisée par hybridation génétique (Daube *et al.*, 1996 ; Manteca *et al.*, 2002). Le second objectif de l'étude 1 était de sélectionner, parmi les souches *cpb2* positives, une souche pour en cloner le gène *cpb2*, si possible dans son entièreté (promoteur, séquence signal et séquence codant pour la forme mature de la protéine).

1.2. Matériel et méthode du typage des souches de *C. perfringens*

1.2.1. Bovins

Toutes les souches de *C. perfringens* ont été isolées de bovins morts d'entérotoxémie. Le tableau clinique, les lésions d'entérite hémorragique segmentaire et le comptage élevé ($> 10^7$ CFU de *C. perfringens* / ml de contenu intestinal) ont permis de confirmer la cause de la mort (Manteca *et al.* 1994-2001). Les bovins analysés entre 2000 et 2002 sont considérés comme *cpb2* positifs si plus $\geq 50\%$ des souches analysées sont porteuses du gène *cpb2* (Herholz *et al.*, 1999).

1.2.2. Souches

Quarante-cinq souches de *C. perfringens* (collection 1990) typées par hybridation (Daube *et al.*, 1996) conservées à -70°C en Brain Heart Infusion (BHI) (OXOID, United Kingdom) + 20% de glycérol ainsi que 102 souches (collection 2000) conservées à -70°C en bouillon Schaedler (OXOID, United Kingdom) + 20% de glycérol ont été remises en culture en bouillon Schaedler puis sur boîte Columbia Agar avec 5% de sang de mouton (OXOID, United Kingdom).

Les cultures ont été réalisées en cabinet anaérobie (N₂ 80%, CO₂ 10%, H₂ 10%) à 37°C pendant 12 à 18h. L'absence de contamination a été vérifiée par coloration de Gram à chaque étape de culture.

1.2.3. Détermination du toxinotype

Les souches présentant les caractéristiques morphologiques macroscopiques (colonies hémolytiques en « œuf sur le plat ») et microscopiques (bâtonnets Gram+ épais et réguliers) ont été toxinotypées par PCR multiplexe (Daube et al., 1994 ; Herholz et al., 1999, Gkiourtzidis et al., 2001) afin de détecter la présence des gènes codant pour les toxines alpha, beta1, beta2 (CPB2), epsilon, iota et pour l'entérotoxine. L'ADN total des souches a été obtenu au départ des colonies mises en suspension dans un tampon de lyse (Tris HCl 0,1M, tween 0.05%, protéinase K 0,024 mg/ml, pH 8.5) durant 1 h à 60°C. L'inactivation de la réaction de lyse est réalisée en portant à ébullition pendant 5 min. La fraction contenant l'ADN (surnageant) est récupérée par centrifugation (15000 rpm, 10 min, 4°C).

Les DNA polymérases, *Taq*, *Pfu* et *Pfx* ainsi que les amorces et les oligonucléotides proviennent de chez Roche (Suisse) et Amersham Biosciences (Suède) et Eurogentec (Belgique). Les PCR ont été réalisées sur un thermocycleur Mastercycler (Eppendorf, United Kingdom). Les amplicons sont détectés par électrophorèse en gel d'agarose et révélés au bromure d'éthidium.

1.2.4. Amplification du gène de la CPB2

Les amorces publiées par Gibert et associés (1997) [P385, P393] et Herholz et associés (1999) [P319, P320] ont été testées selon les conditions d'amplifications décrites par les auteurs (**Figure 1**).

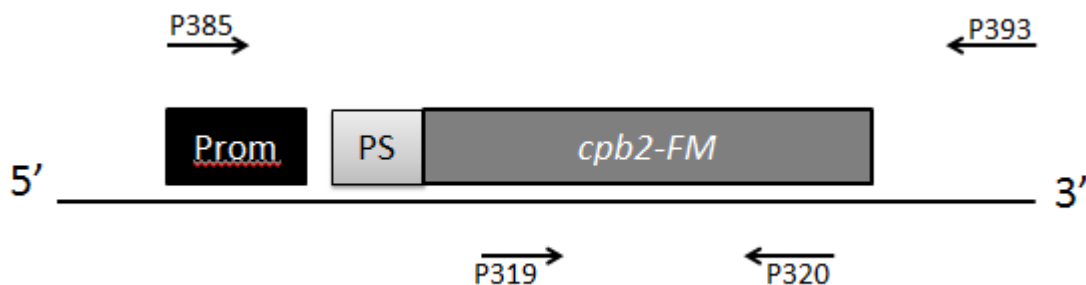


Figure 1 : Positions des amorces P385, P393 (Gibert et al., 1997) et P319, P320 (Herholz et al., 1999), utilisées pour essayer d'amplifier le gène *cpb2* d'une souche d'origine bovine. Prom : promoteur ; PS : peptide signal ; *cpb2-FM* : séquence codant pour la forme mature de la protéine.

Ces amorces ont également été testées en combinaison (P319+P393 et P385+P320) et selon différentes conditions d'amplification présentées dans les **tables 1 et 2**.

Les nouvelles amorces destinées à amplifier la séquence codant pour la forme mature de la protéine CPB2 ont été générées avec l'aide du programme Vector NTI (Invitrogen, United Kingdom) sur base de la première séquence de *cpb2* publiée (Gibert et al., 1997).

Table 1 : Amorces pour *cpb2* et tailles des amplicons

Amorces [combinaisons]	Séquences
p319	5'- GAAAGGTAATGGAGAATTATCTTAATG-3'
p320	5'- GCAGAATCAGGATTTTGACCATATACC-3'
p393	5'-CCAGTAAAAATTGACCTTAAAAAA-3'
p385	5'-GGATATCTTAAATTTAGCACAG-3'
[P319-P320]	573 pb
[P385-P320]	900 pb
[P319-P393]	1000 pb
[P385-P393]	1350 pb

Table 1 : Amorces utilisées pour l'amplification du gène *cpb2* et tailles des amplicons théoriquement obtenus avec les combinaisons de ces différentes amorces.

Table 2 : Conditions d'amplification testées pour amplifier *cpb2* avec les différentes combinaisons d'amorces P385, P393 (Gibert et al., 1997) et P319, P320 (Herholz et al., 1999).

Tm	25 cycles	30 cycles	35 cycles
50°C	Taq-Pfu	Taq-Pfu	Taq-Pfu
55°C	Taq-Pfu	Taq-Pfu; Pfu	Taq-Pfu; Pfx
60°C		Pfx	Pfx

Table 2 : Combinaisons d'amorces : [P319-P320], [P385-P320], [P319-P393], [P385-P393]. Enzymes utilisées : Taq, Pfu, Pfx. Tm testées : 50°C, 55°C, 60°C. Nombre de cycles : 25, 30, 35.

1.3. Résultats

1.3.1. Typage des souches

Des difficultés ont été rencontrées pour relancer les cultures de certaines souches aussi bien celles provenant de la collection 2000 que celles de la collection 1990.

Pour les souches plus anciennes (collection 1990), on observe des discordances concernant la présence du gène *cpb2* entre les résultats obtenus précédemment par hybridation (Manteca et al., 2002) et ceux obtenus par PCR selon les conditions décrites par Herholz et associés (1999). En effet, sur 45 souches testées, 2 souches *cpb2* négatives par hybridation se sont révélées positives en PCR et *a contrario*, 17 souches positives par hybridation étaient négatives en PCR. Ces divergences sont présentées dans la **table 3**.

Table 3 - Collection 1990 : comparaison de la détection de *cpb2* par hybridation et PCR (Herholz et al., 1999)

cas (bovin)	souche	Hybridation	PCR (Herholz)
46433	C11	+	-
46433	C12	+	-
46433	C13	+	-
46433	C14	+	-
46433	C15	+	-
46433	C16	+	-
46433	C17	+	-
46433	C18	+	-
46433	C19	+	-
46433	C20	-	+
46433	C21	-	+
46433	C22	-	-
46658	C3	+	+
46658	C5	+	-
46804	C10	+	+
46804	C9	+	+
46929	C6	+	+
46929	C9	+	+
46959	C5	+	-
46959	C6	+	-
46959	C8	-	-
46960	C7	+	+
46960	C8	+	+
46972	C10	+	+
46972	C11	+	-
46977	C9	+	+
47001	C12	+	+
47001	C5	+	+
47001	C6	+	+
47002	C12	+	+
47004	C6	+	+
47009	3	+	-
47009	4	+	+
47009	8	+	+
47009	12DH	+	+
47009	5DH	+	+
47009	6DH	+	+
47009	ODH	+	+
47009	OHD	+	+
47024	C4	-	-
47048	C18	+	-
92E	146	+	+
93E	814	+	-
ATCC	3626	+	-
G14CO	1	+	+

Table 3 : Résultats sur les souches anciennes des hybridations génétiques (Manteca) et des PCR (selon Herholz et al., 1999). Les souches sont classées selon l'animal-cas d'origine et le numéro de souche associé à ce cas.

La majorité des souches récentes typées s'avèrent être des souches de type A non-entérotoxigènes (94/103).

Globalement, 55 % des souches récentes et anciennes possèdent le gène *cpb2*, les résultats détaillés sont présentés dans la **table 4**.

Table 4 : Résultats de la détection du gène *cpb2* par PCR (Herholz et al., 1999) sur les souches de *C. perfringens* isolées de bovins entérotoxémiques (collections 2000 et 1990)

Cas (bovins)	<i>cpb2</i>		Nb de souches testées
	PCR (+)	PCR (-)	
Collection 2000	55	47	102
56223		4	4
56225	1	2	3
56362	3	2	5
56365	3		3
56502		5	5
56523	2	1	3
56527	4	1	5
56548	5	1	6
56567	3	1	4
56575	4		4
56614	3	3	6
56622	5	1	6
56673	5		5
56711	4	1	5
56712		5	5
56726	4		4
56756	3	2	5
56766	2	2	4
56792		5	5
56846		5	5
56849		5	5
56885	4	1	5
Collection 1990	25	20	45
47009	7	1	8
47001	3		3
46433	2	10	12
46804	2		2
46929	2		2
46960	2		2
46658	1	1	2
46972	1	1	2
46977	1		1
47002	1		1
47004	1		1
92E	1		1
G14CO	1		1
46959		3	3

47024		1	1
47048		1	1
93E		1	1
94E		1	1
TOTAL	80	67	147

Quinze des 22 bovins morts d'entérotoxémie entre 2000 et 2002 et dont les souches ont été analysées, se révèlent *cpb2* positifs selon les critères déterminés ci-dessus. Cet exercice n'a pas été réalisé pour les souches de l'ancienne collection car le nombre de souches par animal était insuffisant.

1.3.2. Choix des souches pour le clonage du gène

Trois souches issues de bovins morts d'entérotoxémie ont été choisies pour amplifier le gène codant pour CPB2 sur base de l'intensité et de la pureté du signal PCR. Les résultats d'amplification (Herholz et al., 1999) de ces 3 souches (46433-C21 ; 46658-C3 et 47001-C12) sont présentés sur la **figure 2**.

Figure 2 : ADN génomique et mégaplasmidique des souches sélectionnées

ADN génomique et mégaplasmidique

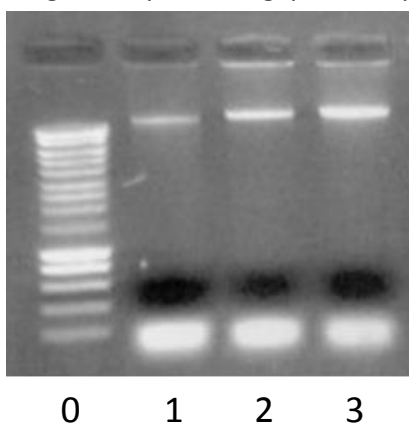


Figure 2 : ADN génomique et mégaplasmidique après purification de souches de bovins entérotoxémiques. 0 : Smart Ladder (200 pb, Eurogentec, Liège) ; 1 à 3 : Souches de *Clostridium perfringens* 46433-C21 (1), 46658-C3 (2) et 47001-C12 (3). Gel d'agarose 1 % coloré au bromure d'éthidium.

1.3.3. Amplification du gène qui code pour la protéine CPB2

L'amplification de la séquence bovine codant pour la protéine CPB2, son promoteur et son peptide signal [amorces P385 – P393], selon les conditions préconisées par Gibert et associés (1997) et les conditions décrites dans la **table 2**, n'a donné aucun résultat sur ces 3 souches sélectionnées.

L'utilisation des combinaisons d'amorces dans différentes conditions (**tables 1 et 2**) a montré que les réactions incluant l'amorce P385 n'aboutissent à aucune amplification contrairement aux autres (**Figure 3**). Il semble donc que le problème se situe en amont de la séquence codante pour la forme mature de la protéine (cf **Figure 1**).

Figure 3 : Essais d'amplification par différentes combinaison de paires d'amorces et conditions PCR

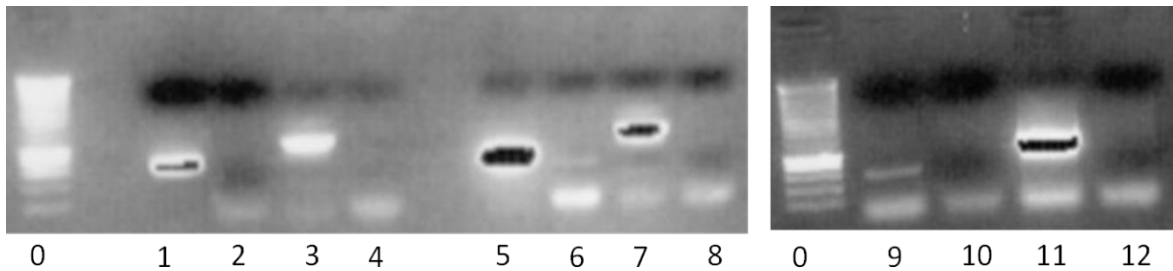


Figure 3 : PCR *cpb2*– Essais avec différentes paires d'amorces et différentes conditions de PCR sur l'ADN de la souche 47001-C12. 0 : Smart Ladder (200 pb, Eurogenec, Liège). Conditions de PCR : mélange Taq + Pfu, Tm 50°C, 25 cycles (1 à 4) ; mélange Taq + Pfu, Tm 55°C, 30 cycles (5 à 8) ; Pfx, Tm 55°C, 30 cycles (9 à 12). Gel d'agarose 1 % coloré au bromure d'éthidium. Les combinaisons de amorces : P319 + P320 (1, 4, 8 ; positives) ; P385 + P 320 (2, 5, 9 ; négatives) ; P319 + P393 (3, 6, 10 ; positives) ; P385 + P393 (4, 7, 11 ; négatives).

Néanmoins, les meilleurs résultats d'amplification avec les différentes combinaisons d'amorces ont été obtenus avec la souche 47001-C12, ayant été choisie pour les étapes ultérieures d'amplification.

Suite à ces observations, des amorces spécifiques s'hybridant en amont et en aval de la séquence nucléotidique codant uniquement pour la forme mature de la protéine (CPB2FM) ont été générées sur base de la première séquence publiée (Gibert *et al.*, 1997) avec l'aide du programme Vector NTI (Invitrogen, United Kingdom) : SacI-*cpb2*FM ou β -tox4 (5'-GAGCTCAGGCCAAAGAAATCGACGCTTATAGAAAGGT AATGG-3') et EcoRI-*cpb2*FM ou β -tox5 (5'-GAATTCCTATGCACAATACCCTTCACC-3'). Les sites de restrictions ont été incorporés aux amorces afin de permettre le clonage dans un vecteur d'expression, la séquence clonée se trouvant alors sous dépendance du peptide signal et du promoteur du vecteur d'expression.

D'autres amorces encadrant le promoteur et le peptide signal ont également été dessinées (β -tox1, β -tox2, β -tox3) dans le cadre de ce travail sur base de la séquence publiée par Gibert et associés (1997) mais aucune amplification du gène *cpb2* n'a pu être obtenue. Les amorces nouvellement créées sont reprises dans la **table 5** et leur position par rapport au gène *cpb2* dans la **figure 4**.

Table 5 : Amorces dessinées lors de cette étude pour amplifier le gène *cpb2* d'origine bovine sur base de la séquence publiée par Gibert et associés (1997).

Amorces	Séquences	Tm
β -tox1	5'-TTTTTTAAGCTCAATTTTACTGGTAA-3'	61 °C
β -tox2	5'-GGATATCTTAAATTTAGCACAGAAGAATG-3'	62 °C
β -tox3	5'-GGGATATCTTAAATTTAGCACAG-3'	57,4 °C
β -tox4	5'- <u>GAGCTC</u> AGGCCAAAGAAATCGACGCTTATAGAAAGGTAATGG-3'	55 °C
β -tox5	5'- <u>GAATTC</u> CTATGCACAATACCCTTCACC-3'	54 °C

Table 5 : Nouvelles amorces pour l'amplification du gène *cpb2* d'origine bovine. Les amorces β -tox4 et β -tox5 possèdent un site de restriction : SacI pour β -tox4 (GAGCTC) et EcoRI pour β -tox5 (GAATTC). Les différentes Tm sont indiquées dans la colonne de droite.

Figure 4 : Amorces dessinées pour amplifier le gène codant pour la forme mature de la protéine CPB2

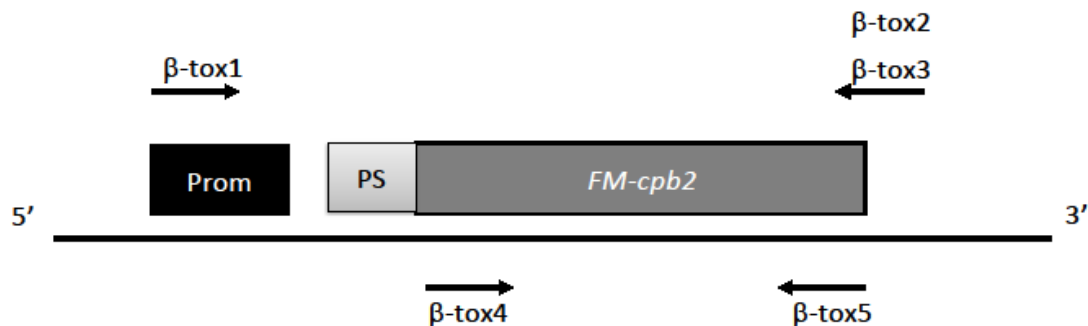


Figure 4 : Position des nouvelles amorces β -tox 1 β -tox 2, β -tox 3, β -tox 4 et β -tox 5 par rapport au gène *cpb2* sur base de la séquence publiée par Gibert et associés (1997). Prom : promoteur ; PS : peptide signal ; *cpb2-FM* : séquence codant pour la forme mature de la protéine.

1.4. Discussion

1.4.1. Souches issues de bovins morts d'entérotoxémie

Les tests PCR réalisés sur les souches de terrain récentes confirment la prédominance du toxinotype A en cas d'entérotoxémie à *C. perfringens* chez le bovin.

Lorsqu'un animal possède des souches de *C. perfringens cpb2* positives, celles-ci représentent souvent la majorité des souches testées.

Des souches de *C. perfringens* issues de bovins entérotoxémiques ou morts à l'abattoir continueront d'être isolées et typées afin d'évaluer de façon plus précise la dispersion de ce gène au sein de la flore intestinale des bovins en fonction du tableau clinique associé.

Les difficultés rencontrées pour relancer la culture de certaines souches pose la question de la bonne conservation de l'ADN bactérien et de l'intérêt de travailler sur des souches qui ont subi le moins de stress possible surtout lorsque le gène-cible est situé sur un plasmide ou tout autre élément potentiellement mobile. Ce risque est illustré par la proportion non négligeable de souches positives à l'hybridation génétique avec une sonde *cpb2* qui se sont révélées négatives par PCR.

Ce point doit néanmoins être nuancé en fonction des différences de sensibilité, spécificité et robustesse des 2 techniques. En effet, les sondes sont moins sensibles à de légères modifications de séquences que les amorces PCR. Donc les souches « hybridation positive / PCR négative » peuvent soit avoir perdu le plasmide porteur du gène *cpb2* en cours de conservation ou manipulation, soit posséder un gène *cpb2* reconnu par la sonde mais pas par les amorces, suite à de légères divergences de séquences.

1.4.2. Clonage du gène *cpb2*

Dans ce travail, les étapes d'isolement du gène de la CPB2 se sont finalement concentrées sur la séquence codante de la forme mature de la protéine vu l'impossibilité d'amplifier la séquence en

amont de cette dernière (promoteur et peptide signal). En effet, en utilisant l'amorce en amont du gène *cpb2* publiée par Gibert et collaborateurs (1997) ou en dessinant de nouvelles amorces sur base de la séquence complète publiée par la même équipe, les essais d'amplification de la totalité du gène *cpb2* au départ de la souche bovine 47001-C12 se sont révélés infructueux. Ces résultats suggèrent qu'il existe une certaine variabilité nucléotidique du gène *cpb2* entre souches de *C. perfringens*, notamment au niveau du promoteur. Ce genre d'observation a déjà été faite pour la toxine alpha de *C. perfringens* (CPA) (Ginter *et al.*, 1996). Gibert et collaborateurs (1997) avaient également remarqué qu'il existait une grande hétérogénéité au sein des plasmides portant *cpb1* et *cpb2*, les gènes des toxines CPB1 et CPB2 respectivement. Ces variations peuvent être liées à l'espèce d'origine, ou simplement aux différences éventuelles entre souches provenant d'une même espèce animale. Il serait intéressant, comme cela a été fait pour la toxine alpha, de pouvoir analyser les mutations existant entre les toxines provenant de nombreuses souches afin de voir si ces mutations peuvent avoir un effet sur la structure, l'activité ou l'immunogénicité de la protéine.

1.5. Conclusion et perspectives

En conclusion, cette première étude a permis de déterminer (i) le toxinotype des souches nouvellement collectées et (ii) les souches porteuses du gène *cpb2* afin de sélectionner une souche de *C. perfringens* bovine en vue du clonage de ce gène.

Les étapes suivantes consisteront (i) à transférer le gène *cpb2* dans d'autres bactéries reconnues pour leur facilité de manipulation et leur capacité de production de protéines exogènes à savoir *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) et *Escherichia coli* (*E. coli*) et (ii) à optimiser le niveau de production de CPB2 chez celles-ci. En effet, le caractère anaérobie de *Clostridium* et le risque de perte d'éléments génétiques (plasmides) en cas de stress aérobie (Frey, 2002 communication orale) rendent sa manipulation complexe et peu répétable (Roberts *et al.*, 1988, Zdanovsky et Zdanovskaia, 2000). De plus, le niveau d'expression de la toxine CPB2 par *C. perfringens* est apparemment faible (Gibert *et al.*, 1997).

2. PURIFICATION OF THE RECOMBINANT BETA2 TOXIN (CPB2) FROM AN ENTEROTOXAEMIC BOVINE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS STRAIN AND PRODUCTION OF A SPECIFIC IMMUNE SERUM.

M. Lebrun ^{a,*}, P. Filée ^b, M. Galleni ^b, J.G. Mainil ^a, A. Linden ^a, B. Taminiau ^a

Protein Expression and Purification. 2007, **55** : 119–131. doi:10.1016/j.pep.2007.04.021

^a Department of Infectious and Parasitic Diseases—Bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège 4000, Belgium

^b Lab of Biological Macromolecules, Centre of Protein Engineering (Centre d'Ingénierie des Protéines, C.I.P.), Faculty of Sciences, University of Liège, Liège 4000, Belgium.

Dans cet article sont développées les différentes techniques mises en oeuvre pour produire de la CPB2FM au départ de la séquence codant pour la forme mature de la protéine (cpb2FM en plasmide d'expression ou intégrée au chromosome bactérien) ainsi que les étapes de purification de CPB2FM et l'obtention d'anticorps polyclonaux spécifiques en lapins

Purification of the recombinant beta2 toxin (CPB2) from an enterotoxaemic bovine *Clostridium perfringens* strain and production of a specific immune serum

M. Lebrun^{a,*}, P. Filée^b, M. Galleni^b, J.G. Mainil^a, A. Linden^a, B. Taminiau^a

^a Department of Infectious and Parasitic Diseases—Bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège 4000, Belgium

^b Lab of Biological Macromolecules, Centre of Protein Engineering (Centre d'Ingénierie des Protéines, C.I.P.), Faculty of Sciences, University of Liège, Liège 4000, Belgium

Received 1 February 2007, and in revised form 20 April 2007
Available online 6 May 2007

Abstract

Overgrowth of *Clostridium perfringens* clones with production of one or more of its toxin(s) results in diverse digestive and systemic pathologies in human and animals, such as cattle enterotoxaemia. The so-called beta2 toxin (CPB2) is the most recently described major toxin produced by *C. perfringens*. In this study, the *cpb2* ORF (*cpb2FM*) from a cattle *C. perfringens*-associated enterotoxaemia was cloned and sequenced. The *cpb2FM* and its deduced nucleotide sequence clearly corresponded to the *cpb2* allele considered as “consensus” and not to “atypical” allele, despite its “non-porcine” origin. Expression assays of the recombinant toxin CPB2FM were performed in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* with the expression vector pBLTS72, and by genomic integration by double recombination in *B. subtilis*. Highest level of production was obtained with the expression vector in *B. subtilis* 168 strain. The recombinant CPB2FM protein was purified and a specific rabbit polyclonal antiserum was produced. Polyclonal antibodies could detect CPB2 production in supernatants of *C. perfringens* from enterotoxaemic cattle.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *Clostridium perfringens*; Beta2-toxin; Cloning; Expression; *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*

Clostridium perfringens (*C. perfringens*) is an anaerobic Gram positive sporulating bacterial species frequently involved in enteric diseases, enteritis and enterotoxaemia, both in humans and animals. The origin of these diseases is typically a localised overgrowth of a *C. perfringens* sub-population [1] in the small intestine, with massive local production and, in some cases, resorption of at least one major *C. perfringens* toxin (alpha, beta, epsilon, iota and/or the enterotoxin) [2,3].

In cattle for instance, *C. perfringens* is the causative agent of an acute enterotoxaemia that leads to sudden death of 1- to 4-month-old beef calves, with excellent meat conformation and no pathological history. Though type E strains producing the alpha and iota major toxins have

been isolated in the USA [4], the most frequent *C. perfringens* toxinotype associated with enterotoxaemia in cattle is type A, producing only the alpha major toxin [1,5–7]. However, typical bovine enterotoxaemia can not be reproduced by a challenge with type A strains alone [3]. Different other *C. perfringens* toxins have been suspected to have a synergistic action with the alpha toxin, more especially:

- Enterotoxin (CPE) responsible for food-poisoning in humans;
- Beta2 toxin (CPB2), described in 1997 from a porcine *C. perfringens* isolate [8].

Though CPB2 is functionally related to the beta toxin, its amino-acid (a.a.)¹ sequence is unique amongst bacterial

* Corresponding author. Fax: +32 4 366 41 22.

E-mail address: maude.lebrun@ulg.ac.be (M. Lebrun).

¹ Abbreviations used: a.a., amino acid; TCA, trichloroacetic acid.

toxins. CPB2 is a 235 a.a. protein with a 30 a.a. long signal peptide, an estimated molecular weight of 28 kDa and an isoelectric point between 5.2 and 5.4. CPB2 is secreted in the culture supernatant and can be cleaved into two peptides (15 and 13 kDa) by trypsin. CPB2 is also considered a major toxin according to its lethality in mice after intra-venous injection and its cytotoxic activity for CHO, I407 [8] and Caco2 cell lines [9]. The CPB2-encoding gene (*cpb2*) is located on a mega-plasmid [1,10,11] and its expression is up-regulated by the VirR/VirS system [12]. CPB2 expression can also be induced by some antibiotics such as gentamicin [13].

Today, the *cpb2* gene has been detected in *C. perfringens* strains isolated from humans and from numerous animal species, mainly pigs and horses, but also cattle, goats, sheep, dogs and even more exotic mammals and birds [14–25]. Pig is considered as the reference animal species for the CPB2 toxin, not only because it was first described and characterised from a porcine *C. perfringens* isolate [8], but also because there exist strong epidemiological evidence that CPB2 is involved in the pathogenesis of necrotic enteritis in piglets: the majority (90%) of *C. perfringens* isolates from piglets with necrotic enteritis are *cpb2*-positive in contrast to isolates from healthy piglets (10% only) and the correlation between the genotype (presence of the *cpb2* gene) and the phenotype (production of the CPB2 toxin) is up to 90% [11].

In other animal species and in humans, the data are more confusing. First, different *cpb2* gene variants have been described [23,25,26]. The *cpb2* gene variant highly homologous to the original porcine *cpb2* gene [8] has been named the consensus gene (*cpb2^{cons}*) and the several other *cpb2* gene variants, tentatively the atypical genes (*cpb2^{atyp}*) [26]. Then part of *cpb2^{atyp}* genes identified cannot lead to the expression of a mature CPB2 due to the presence of a premature stop codon or frame shift mutations [26]. Finally, CPB2 toxin coming from a non porcine origin tend to be expressed at a lower rate than their porcine counterparts [26,42].

In cattle the first results did not strongly support a role for the CPB2 toxin in enterotoxaemia. A first study showed a marginally significant difference between case (enterotoxaemic) and control groups for the *cpb2* gene presence; though a higher lesional score in a ligated intestinal loop assay was obtained with one *cpb2*-positive compared to three *cpb2*-negative isolates [20]. Moreover, the correlation between the presence of a *cpb2* gene and the production of a CPB2 toxin varies between 50% for type A strains and 0% for type E strains [4]. But more recently, Lebrun and collaborators [27] showed not only that all 28 *cpb2*+ isolates from 8 calves with enterotoxaemia harbour the *cpb2^{cons}* gene, in contrast to two thirds of the 40 *cpb2*- isolates from healthy calves, but also that the expression rate of the *cpb2^{cons}* gene was much higher in isolates from enterotoxaemic calves (64% vs 22%). Bovine enterotoxaemia may therefore be the consequence of a local overgrowth of some *C. perfringens* sub-populations including clones producing the CPB2^{cons} toxin in higher amounts.

More investigation is certainly needed to better understand the role of CPB2 in bovine enterotoxaemia, including studies on the regulation of the expression *in vitro* and *in vivo* of the *cpb2^{cons}* and *cpb2^{atyp}* genes and on the possible synergy of action with the alpha toxin. The purpose of this work was to clone the *cpb2^{cons}* gene from a *C. perfringens* isolate from a case of calf enterotoxaemia in *Escherichia coli* and in *Bacillus subtilis*, to purify the CPB2^{cons} toxin and to obtain a specific polyclonal immune serum in rabbits, which was subsequently used as a detection tool of the production of CPB2 toxins [27].

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

Sixteen field strains of *C. perfringens* were collected in 2003 from 3 enterotoxaemic calves with a history of sudden death, characteristic necro-haemorrhagic lesions of the small intestine at necropsy and *C. perfringens* counts higher than 10⁶ CFU ml⁻¹ of intestinal content [1]. The positive *C. perfringens* control strains for the different major toxin genes were the reference strain CWC 245, a *C. perfringens* type C (*cpa*, *cpb*, *cpb2*) isolated from a piglet with necrotic enteritis [28], and reference strains for other toxinotypes CN 3888 (type A: *cpa*), NCTC 8239 (type A+enterotoxin: *cpa*, *cpe*), ATCC 3626 (type B: *cpa*, *cpb*, *etx*), CN 3978 (type D: *cpa*, *etx*), NCIB 10748 (type E: *cpa*, *iap-ibp*). Clostridia were grown on Perfringens Agar plus OPSP (OXOID, United Kingdom) plates supplemented with 5% of bovine blood and grown in brain heart infusion broth (BHI, OXOID) in anaerobic conditions (80% N₂; 10% H₂; 10% CO₂) [1].

Experimental strains

All the strains are referred in Table 1.

Escherichia coli: *E. coli* DH5 α (Invitrogen, USA) was used as recipient strain for recombinant plasmids. *E. coli* DH5 α , *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL were used as hosts for the overexpression of the CPB2 mature form (CPB2FM). Those bacteria were grown in Luria-Bertani (LB, [29]) and Terrific Broth (TB, Difco, USA) as rich liquid or solid (1.5% agar) media. Recombinant strains were selected with 100 μ g ml⁻¹ ampicillin (Amp^r 100) or with tetracycline (5 μ g ml⁻¹) and chloramphenicol (30 μ g ml⁻¹) when *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL was grown to preserve its "rare codon t-RNA" genes.

Bacillus subtilis: *B. subtilis* 168 (ATCC 23857), *B. subtilis* 168 IS10, *B. subtilis* 168 IS10 AmyE were used as hosts for CPB2FM overexpression. Recombinant strains were selected with 10 μ g ml⁻¹ kanamycin (Kan^r 10). Culture media (LB, TB) were complemented with L-cystein (50 μ g ml⁻¹) and L-tryptophan (50 μ g ml⁻¹) when *B. subtilis* 168 IS10 and 168 IS10 AmyE were used (L-Cys 50, L-Trp 50) to set off auxotrophy.

Table 1
Bacterial strains used in this study

Strains	Genotype	Source or references
<i>E. coli</i> DH5 α	$F^- \phi 80 \text{ } \Delta \text{lacZ} \Delta \text{M15 } \Delta (\text{lacZYA-argF}) \text{U169 } \text{deoR } \text{recA1 } \text{endA1 } \text{hsdR17} (r_k, m_k^+)$ <i>phoA supE44</i> λ^- <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Life Technologies, Tastrup, Germany
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	$F^- \text{ompT } \text{hsdS}_B (r_b, m_b)$ <i>gal dcm (DE3)</i>	Novagen, Madison, USA
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus (DE3)-RIL	$F^- \text{ompT } \text{hsdS}_B (r_b, m_b)$ <i>gal dcm (DE3)</i> extra copies of <i>E. coli</i> , <i>argU</i> , <i>ileY</i> , and <i>leuW tRNA genes</i>	Stratagene, Seattle, USA
<i>B. subtilis</i> 168 IS10	<i>Trp- spo-GRAS</i>	Bacillus Genomic Stock Center, Ohio State University, Columbus
<i>B. subtilis</i> 168 (ATCC n $^\circ$ 23857)	<i>Ind- Tyr+</i>	Bacillus Genomic Stock Center, Ohio State University, Columbus
<i>B. subtilis</i> 168 IS10 <i>AmyE</i>	<i>Trp-Cys- spo-GRAS Amy Spc</i>	University of Liège, Protein Engineering Centre, Belgium

Plasmid vectors (Table 2)

The plasmids used in this study are referred in the Table 2.

Expression vector

The pBLTS-72 vector is designed to be replicative in *E. coli* and *B. subtilis* (C.I.P.) (Fig. 1). A designed promoter allows the expression of recombinant proteins in both hosts.

Integrative vector

The integrative vector pAC7 is replicative in *E. coli* but not in *B. subtilis* (C.I.P.) (Fig. 2). It contains a classical multiple cloning site within a truncated amylase gene (*AmyE*). A recombinant gene cloned in this vector can be maintained in *Bacillus* only if a recombination event occurs between the truncated *AmyE* and the chromosomal copy of the gene.

- A single recombination event will lead to the integration of the recombinant vector, bearing a functional copy of *AmyE* gene. The strain will keep the ability to metabolize starch (amylase test).
- With a double recombination event, the recombinant gene will disrupt the chromosomal *AmyE* gene. The recombinant strain will thus lose the ability to metabolize starch (Fig. 3).

Table 2
Vectors used in this study

Vector	Specificity	Source or references
pGEM-T Easy	Cloning plasmid in <i>E. coli</i> Amp r (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	Promega
pGEM-T-Easy cpb2FM	Insertion of the nucleotide sequence coding for the mature form of beta2-toxin	This study
pBLTS72	<i>Bacillus/E. coli</i> shuttle vector, expression vector <i>Bacillus</i> : Kan r (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) <i>E. coli</i> : Amp r (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	C.I.P.,* P. Filée, 2001
pBLTS72-cpb2FM	PBLTS72 with insertion of the nucleotide sequence coding for the mature form of beta2-toxin	This study
pAC7	<i>Bacillus</i> genomic integration vector <i>Bacillus</i> Kan r (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) <i>E. coli</i> : Amp r (75 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	C.I.P.*
pAC7-cpb2FM	pAC7 with insertion of the nucleotide sequence coding for the mature form of beta2-toxin	This study

* C.I.P., Centre d'Ingénierie des Protéines Protein Engineering Centre.

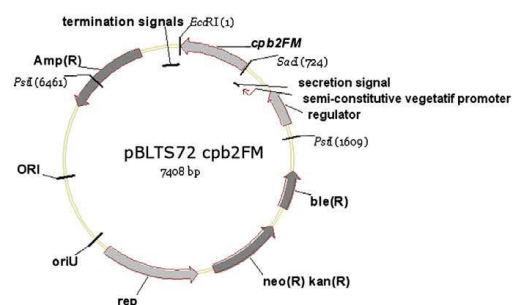


Fig. 1. pBLTS72-cpb2FM vector. Map of the pBLTS72-cpb2FM. Amp(R), Ble(R), neo(R), kan(R), ampicillin, bleomycin, neomycin and kanamycin resistance cassettes. Ori and oriU, respectively, replication origin in *E. coli* and *B. subtilis*. Rep, *Staphylococcus aureus* putative replication gene.

This gives an easy strategy to distinguish “single” from “double” recombinant based upon the amylase activity in transformed *Bacillus*. Genomic integration offers better genetic stability and allow to work without the need of antibiotics for vector maintenance.

DNA techniques

General protocols

DNA extractions of *C. perfringens* were performed as described by Herholz et al. [14]. Routine DNA manipula-

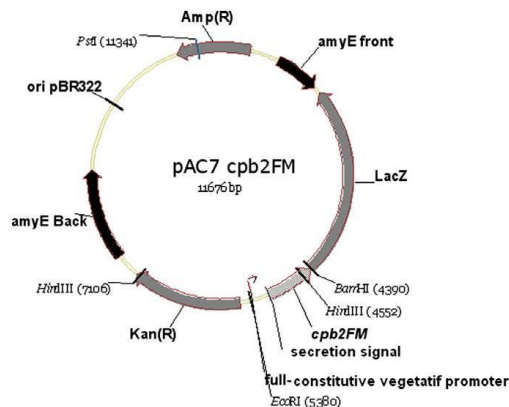


Fig. 2. pAC7-cpb2FM vector. Map of the pAC7-cpb2FM. Amp(R), kan(R), respectively, ampicillin and kanamycin resistance cassettes. Ori pBR322, replication origin from the pBR322 vector. LacZ, β -galactosidase reporter cassette.

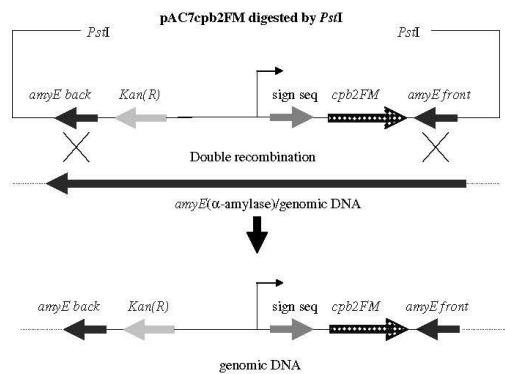


Fig. 3. Insertion mechanism of *cpb2FM* sequence by double crossing-over from pAC7 vector into *B. subtilis* 168 chromosome.

tions were carried out as described by Sambrook et al. [29]. *B. subtilis* was transformed according to the method of Msadek et al. [30]. Restriction endonucleases, sequencing enzymes, *Taq* or *Pfu* DNA polymerases were purchased from Amersham Biosciences (Sweden), Roche (Switzerland), Stratagene® (USA) and Gibco BRL (USA). Oligonucleotides and primers for DNA sequencing were obtained from Amersham Biosciences (Sweden). DNA sequencing was performed by dideoxychain termination method (ALF Express DNA sequencer of Amersham Biosciences, Sweden) with an additional internal primer (GGAAAGAACAAGTTGAGAATGAAGG).

Polymerase chain reaction (PCR) assays

A couple of primers was generated according to the first *cpb2* sequence published [8] to amplify a 708 bp encoding

for the mature form of the toxin (*cpb2FM*). The upper primer is *SacI*-*cpb2FM* (5'-GAGCTCAGGCCAAAGAAA TCGACGCTTATAGAAAGGTAATGG-3') and the lower primer is *EcoRI*-*cpb2FM* (5'-GAATTCCTATGC ACAATACCCTTCACC-3'). The PCR assays were performed using DNA thermal cycler Mastercycler (Eppendorf®) in 50 μ l containing: 5.0 μ l DNA template, 45.0 μ l *Taq*-PCR mix (10 mM Tris-HCl, pH 8.3; 1.5 mM MgCl₂; 50 mM KCl) containing 200 μ M of each deoxynucleotide, 0.25 mM of each primer, and finally 1 U *Taq* DNA polymerase. The thermocycling (94 °C, 1 min; 55 °C, 1 min; 72 °C, 1 min, repeated 35 times) was preceded by an incubation of 5 min at 95 °C and followed by an extension of 7 min at 72 °C. Primers and PCR conditions for the other major toxin-encoding genes (*cpa*, *cpb*, *etx*, *iap*, *cpe*) to assess the toxin type of the 16 field strains have been described previously [5]. Amplicons were detected by agarose gel electrophoresis (1.25%).

Cloning of the *cpb2* gene

Different cloning strategies in *E. coli* and in *B. subtilis* were compared to choose the best suitable host for the highest level of CPB2FM production.

Multicopy plasmid. At first, the *cpb2* ORF lacking the signal sequence (*cpb2FM*) was amplified from a field strain of *C. perfringens* (47001-c12) with *SacI*-*cpb2FM* and *EcoRI*-*cpb2FM* primers. The PCR product was then cloned into the pGEM-T Easy vector (pGEM-T Easy-*cpb2FM*). After sequencing, the sequence of the amplified fragment was compared with the *cpb2* gene reference sequence [8]. The pGEM-T Easy-*cpb2FM* vector was amplified in *E. coli* DH5 α , purified and digested with *SacI* and *EcoRI* endonucleases. The *cpb2FM* sequence was recovered after agarose gel electrophoresis, purified and ligated into the pBLTS72 plasmid linearised with *SacI* and *EcoRI* endonucleases, to give the pBLTS72-*cpb2FM* recombinant plasmid. This vector was subsequently introduced by transformation into *E. coli* and *B. subtilis* for the production assays.

Genomic integration. To clone the *cpb2FM* fragment into the pAC7 integrative plasmid, the pBLTS72-*cpb2FM* recombinant plasmid was digested by *AttII*, purified and treated by KLENOW system (Large Fragment Polymerase). A second restriction with *BamHI* gave a fragment containing the promoter and the signal sequence of the pBLTS72 plasmid and the *cpb2FM* sequence. This fragment was transferred into the pAC7 plasmid, previously digested with *SmaI* and *BamHI* and dephosphorylated. The pAC7-*cpb2FM* recombinant plasmid was introduced by transformation in *E. coli* DH5 α . Colonies were checked by PCR for the presence of *cpb2FM* and the recombinant plasmid was purified.

Bacillus subtilis 168 IS10 (*amyE*) was subsequently transformed either with pAC7-*cpb2FM* or with pAC7, as a control vector. The colonies obtained were tested for

the presence of *cpb2FM* by PCR and for double recombination integration with the amylase assay. The clones having lost the amylase activity, thus supporting a double recombination were grown in TB broth for the production assays.

Proteins techniques

SDS-PAGE and Western blotting

For SDS-PAGE, proteins were solubilised in loading buffer (0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 2.5% SDS, 10% β -ME, 20% glycerol, 0.02% Bromophenol blue) and boiled during 5 min. Electrophoresis in 15% acrylamide gel was performed according to supplier recommendations, with Pre-stained Precision Plus All Blue[®] or SeeBlue[®] Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen, USA) as molecular weight protein standards (Bio-Rad, USA). Proteins were visualized with Coomassie brilliant blue staining.

Gel analysis were realised with ImageJ software from National Health Institute (USA) to evaluate the relative importance of CPB2FM with regard to the other proteins (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

For Western blotting, proteins were transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. Immunoblots were analysed using, as primary antibodies, rabbit polyclonal immune sera against an equine CPB2 toxin (kindly provided by Prof. J. Frey) or against the bovine CPB2FM toxin (produced during this study). Secondary antibodies were a goat polyclonal anti-rabbit serum coupled to alkaline phosphatase (Bio-Rad, USA). Revelation was achieved with nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate reagents (NBT/BCIP, Bio-Rad, USA) or Western Blue[®] Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase (Promega, USA).

The equine CPB2 toxin immune serum provided was the reference serum.

Expression of CPB2FM toxin

Different growth conditions were tested to improve protein expression, such as different liquid media and different growth temperature (18 and 37 °C).

Bacillus subtilis. Expression assays were performed in *B. subtilis* 168 and *B. subtilis* 168 IS10, transformed with the pBLTS72-cpb2FM recombinant plasmid or in *B. subtilis* 168 IS10 *AmyE*-cpb2FM (with the pAC7-cpb2FM double recombination). After overnight culture in TB or LB (Kan^r 10), supernatant was collected by centrifugation at 6000g for 30 min at 4 °C.

Escherichia coli. The expression was also studied after cloning in *E. coli* DH5 α , *E. coli* BL21 (DE3) and *E. coli* BL21-CodonPlus[™](DE3)-RIL transformed with the pBLTS72-cpb2FM recombinant plasmid. After overnight culture in TB or LB (Amp^r 100) (L-Cys 50, L-Trp 50), periplasmic fraction was extracted by a cold osmotic shock as previously described [31,32]. The total soluble cell proteins

were recovered by repeated short sets of sonication on ice, followed by 13000g, 10 min centrifugation at 4 °C. The supernatant was then collected.

Proteins. Protease inhibitors such as Pefabloc[®] (Roche, Switzerland) and EDTA were used to prevent protein degradation. Proteins were precipitated with cold trichloroacetic acid (TCA), washed with frozen isopropanol and reconstituted either in loading buffer [31] or in phosphate buffer (H₂PO₄ 50 mM, NaCl 120 mM). Total protein estimation was obtained with 2-bicinchoninic acid assay (BCA Proteinassay, Pierce[®], USA).

Purification of the CPB2FM protein

The initial culture was a 15 l culture, and the supernatant was first concentrated on PELICON[®], thus reducing the volume to 6.5 l. The rest of the purification process is resumed in Table 3.

The culture supernatant of the *B. subtilis* 168 strain harbouring the pBLTS72-cpb2FM recombinant plasmid was subjected to a 3 step chromatographic protocol. The presence of the CPB2FM protein was checked at each step, by SDS-PAGE 15%.

The first step was a S-Sepharose fast flow resin in sodium acetate buffer (50 mM, pH 4.5) with a supernatant/buffer in 1/15 rapport (v/v). A batch fixation was made overnight at 4 °C with soft agitation followed by mass elution with 1 M NaCl in sodium acetate buffer (50 mM, pH 4.5). Proteins were then dialysed in Tris buffer (10 mM, pH 7.2) and concentrated on ultrafiltration cell (Millipore). The second step was realised on a Q-Sepharose column (mono Q) in Tris buffer (10 mM, pH 7.2). The CPB2FM protein was eluted with a linear gradient ranging from 0 to 1 M NaCl in the same buffer. Finally, fractions of interest were mixed to an equal volume of phosphate buffer (100 mM), (NH₄)₂SO₄ (3 M), pH 7.2 (to obtain a final protein solution in phosphate buffer (50 mM), (NH₄)₂SO₄ (1.5 M), pH 7.2) loaded on an isopropyl column (hydrophobic) and eluted with a linear gradient ranging from 1.5 to 0 M of (NH₄)₂SO₄. All resins and columns came from Amersham Biosciences. The final product was verified on SDS-PAGE (15%) and by Western blotting.

Production of a polyclonal immune serum

Purified CPB2FM protein (>85%) was used to immunise two New Zealand white rabbits in the "Centre d'Economie Rurale et d'Hormonologie" (Marloie, Belgium). Each rabbit subcutaneously received 150 μ l of a protein solution (containing 250 μ g ml⁻¹ of protein) at days 0, 14, 28 and 56. Serum samples were collected at days 0, 38, and 66 and rabbits were bled at day 80. Sera were compared by Western blotting against the purified CPB2FM toxin. The equine CPB2 toxin immune serum provided by Pr Frey was the reference serum.

Table 3
Purification process

Step	Sample	Resin/column	Buffer A (sample, resin)	Buffer B (elution)	Method	CPB2FM content
Concentration	Raw <i>B. subtilis</i> 168 pBLTS72-cpb2FM supernatant	Pelicon (Millipore [®]) Cut off 10 kDa				5% of total protein (TP) Protein content: 340 µg.ml ⁻¹
Purification1	Concentrated supernatant TB, Kan ^r 10 6500 ml	S-Sepharose fast flow 400 ml	Sodium acetate 20 mM, pH 4.5 50 l	Sodium acetate 20 mM, NaCl 1 M, pH 4.5 2 l	Batch fixation, in buffer A, overnight, 4 °C, soft melting Direct elution with buffer B	37.5% of TP
Dialysis 1	1500 ml of protein elution solution		Tris 10 mM, pH 7.2, 25 l		Overnight, 4 °C	
Purification 2	Dialysis product concentrated and filtrated on 1.6, 0.7, 0.45 µm C.O. filters: 500 ml Purified in 2 [*] 250 ml (a – b) according the same process	Q-Sepharose: Source 15Q 20 ml HR 26/101	Tris 10 mM, pH 7.2	Tris 10 mM, NaCl 1 M, pH 7.2	Flow 4 ml min ⁻¹ , fraction 4 ml 0 30% buffer B on 300 ml 30 100% buffer B on 60 ml	60% of TP 1 mg ml ⁻¹ Pool a: 20 ml Pool b: 36 ml
Purification 3	Fractions of interest from purification step 2 + phosphate 100 mM, (NH ₄) ₂ SO ₄ 3 M, 20 ml, pH 7 = proteins in phosphate 50 mM, (NH ₄) ₂ SO ₄ 1.5 M, 40 ml, pH 7	Isopropyl 20 ml	Phosphate 50 mM, (NH ₄) ₂ SO ₄ 1.5 M, pH 7	Phosphate 50 mM	Flow 2 ml min ⁻¹ , fraction 4 ml 0 100% buffer B on 80 ml	
Dialysis 2	a Pool 1 = 3 fractions = 12 ml Pool 2 = 1 fraction = 4 ml b Pool 1 = 3 fractions = 12 ml Pool 2 = 3 fractions = 12 ml		Phosphate 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4 2 [*] 2 h, 4 °C 2 [*] 2 l			Pool 1 > 80% of TP Pool 2 > 90% of TP Pool 1a 1.6 mg ml ⁻¹ Pool 2a 0.2 mg ml ⁻¹ Pool 1b 0.6 mg ml ⁻¹ Pool 2b 0.3 mg ml ⁻¹

* SDS PAGE analysis with ImageJ of the National Health Institute (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) and BCA protein quantification.

Sequence analysis

The sequence alignment and comparison of *cpb2FM* with reference sequences (GenBank) were realised with CLUSTALW (Vector NTI software, Invitrogen) [33]. Predictive secondary structure analysis was made with HELICAL WHEEL program and a hydrophobicity outline was established with “GOR secondary structure prediction method”, version IV [34].

Results and discussion

cpb2FM cloning and sequencing

Using the PCR conditions described above the *cpb2FM* sequence was successfully amplified from the genomic DNA of a type A *C. perfringens* strain (47001-c12) originating from an enterotoxaemic cattle (sudden death, no diarrhoea). The amplified fragment (ORF) was cloned and sequenced three times. The resulting sequence is referred on GenBank at Accession No. DQ525205. According to the PCR developed by Jost and associate, the *cpb2* gene of *C. perfringens* strain (47001-c12) was classified as “consensus” and not as “atypic” despite its bovine origin.

The nucleotide identity level with other published *cpb2* sequences varied between 76.4% and 99% according to the origin of the strain. The *cpb2FM* displays 94% of nucleotide identity with the reference consensus *cpb2* sequence of the CWC245 strain [8]. Unlike to what was preferentially observed in cattle [26], the ORF of the strain 47001-c12 belongs to the “consensus” type. Such as proposed recently, *cpb2* seems to be divided in (minimum) two allelic subpopulations. These different *cpb2* were called “consensus” (pig animals) and “atypic” (non pig animals) by Jost et al. [26], *cpbh1* and *cpbh2* by Fisher et al. [23] in human with intestinal troubles and classified as group I and II by Johansson et al. [25] according to their European or North American geographical origin. Of course the *cpb2* genes of the other isolates from enterotoxaemic cattle should be sequenced to get a more accurate view of the allelic population(s) linked to cattle enterotoxaemia in Belgium.

The CPB2FM a.a.-derived sequence (enterotoxaemic cattle was aligned with five other CPB2 a.a.-derived published sequences) (Fig. 4). Those sequences came from:

- (i) the reference strain CWC245 (AAC27465), a type C strain from a pig with necrotic enteritis [8]
- (ii) type A non-pig strain (AAU14851) and a type A bovine strain (AAU14859) both classified as “atypical” [26]
- (iii) two type A strains of human sporadic diarrhoea (AWW66355, CPB2H1) and of antibiotic-associated diarrhoea (AWW66356, CPB2H2) [23]

The alignment analysis confirms the presence of 2 subpopulations of CPB2 toxins: (i) a “consensus”, including

CPB2FM (this study), the reference consensus porcine CBP2 [8] and the human CPB2H2 [23] ($\geq 91\%$ identity, $\geq 97\%$ similarity), and (ii) an “atypical” including the atypical non-porcine and bovine CBP2 [26] and the human CPB2H1 [23] ($\geq 96\%$ identity, $\geq 100\%$ similarity). The two groups share 60–65% a.a.-identity and 75–80% a.a.-similarity (See table in supplemental material).

Clearly the CPB2FM toxin from strain 47001-c12 is related to the consensus sequence despite its “non-porcine type A” origin as defined by Jost et al. [26]. It presents the highest homology level with the CPB2H2 of *C. perfringens* type A from a human antibiotic-associated diarrhoea; a strain where the *cpb2* and *cpe* genes are present on two distinct plasmids [23]. Since the *cpb2FM* sequence belongs to the “consensus” group, the predicted amino acids sequence may be sufficiently conserved to present a correct folding compared to the consensus toxin [8], and therefore share similar toxic properties. On the contrary, the folding and the translation of the “atypical” CPB2 toxin appears to be strongly compromised [26], and consequently, the biological relevance of the atypical toxin can be questioned.

But the classification of the *cpb2* gene(s) and their derived proteins is not a trivial exercise, which should take into account not only the animal species [4,26] or human origin [23,35], but also the geographical context of the strain [25] and the possible association to other virulence factors such as *cpe* gene [23,35].

The hydrophobic profile analysis of CPB2FM toxin structure shows a mainly hydrophobic C-terminal end and underlines the presence of two α amphiphilic helices in the N-terminal end. The first helix is composed of 3 heptads repeats (window 21) and the second helix of 2 heptads repeats (window 14) (according to COILS version 2.1). These heptads repeats patterns are characteristics of the α helical coiled coil folding motif, which is one of the principal subunit oligomerisation motives found in proteins. Crystallography of the different variants would also help to better understanding of CPB2 toxin mode of action.

Production and purification of CBP2-FM

The pBLTS72-*cpb2FM* recombinant plasmid was used in different strains of *B. subtilis* and *E. coli* to compare their relative ability to produce the CPB2. The two producing bacteria tested possessed high potential for recombinant protein production. The strain with the highest level of production was chosen for the CBP2-FM purification process and for rabbit immunisation.

With the pBLTS72-*cpb2FM* recombinant plasmid, the numbers of transformed cells (*E. coli* and *B. subtilis*) were always lower than the numbers obtained with the same plasmid carrying a control recombinant protein-encoding gene when cultured in the same conditions. A growth curve comparison actually shows a significant delay for pBLTS72-*cpb2FM* containing clones compared to the clones carrying the same vector with a recombinant control protein-encoding gene (data not shown).

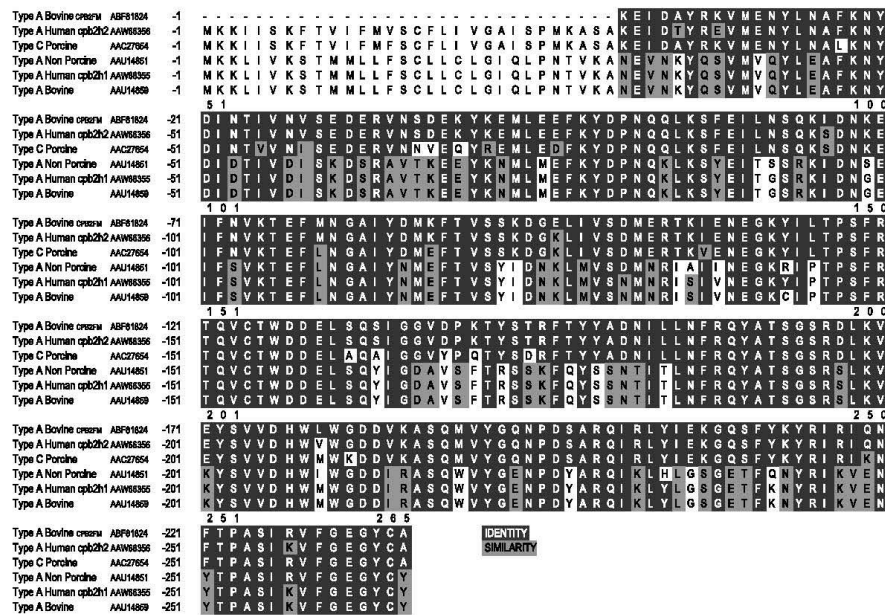


Fig. 4. CPB2 amino acid sequences alignment underlying the different allelic sequences. Global alignment of 6 CPB2 proteins (CLUSTALW[®]). CPB2FM (ABF81824): From enterotoxaemic cattle (this study). AAW66356: *C. perfringens* type A from a human case of sporadic diarrhoea [23]. AAC27654: the reference CPB2 from *C. perfringens* type C of piglet with necrotic enteritis [8]. AAU14851: *C. perfringens* type A strain from non porcine animal with suspected clostridial intestinal disease [26]. AAW66355: *C. perfringens* type A strain from a human antibiotic-associated diarrhoea case [23]. AAU14859 *C. perfringens* type A strain from a cattle with suspected clostridial intestinal disease [26].

Escherichia coli

Escherichia coli tends to concentrate recombinant proteins in the periplasmic space, compared to protein secreted in supernatant by *Bacillus*, with corresponding advantage of a small volume of highly concentrated protein solution easier to handle.

Though the first assays in *E. coli* DH5 α carrying the pBLTS72-cpb2FM recombinant plasmid gave a positive response in Western blotting with polyclonal antibodies against CPB2 of equine origin, no overexpression was detected on SDS–PAGE with Coomassie blue staining: only a faint band corresponding to CPB2 was present.

The *E. coli* BL21-CodonPlus[™](DE3)-RIL was then chosen for its implementation in 3 t-RNA corresponding to rare codons in *E. coli*, but abundant ones in Gram positive bacteria such as *C. perfringens*. When the *E. coli* BL21-CodonPlus[™](DE3)-RIL carrying the pBLTS72-cpb2FM recombinant plasmid was grown in LB broth, the main pool of CPB2FM was detected by SDS–PAGE and western blotting in the periplasmic fraction. But when the conditions were optimized to upgrade the CPB2FM expression, most of the toxin was found in the supernatant instead of the periplasmic space, which contained only a few proteins. It is presumably the results of leakage in the bacterial outer membrane. This observation could give us a hint of the possible CPB2FM deleterious effect on a bacterial phos-

pholipidic membrane and by extension on the membrane of eukaryotic cells, such as suspected in a previous study [8]. Thus despite promising early production assays, *E. coli* apparent inability to support scaling up of CPB2FM expression lessens its interest. Actually, if the protein escapes from the periplasmic space, the advantages of small volumes handling and high protein concentration are not present anymore.

Bacillus subtilis

Bacillus is phylogenetically closer to *Clostridium* than *E. coli* for both the codon usage and DNA base composition. *Clostridium* and *Bacillus* are a group of Gram positive endospore-forming bacteria with a low G+C content (21–40%) [36] compared to *E. coli* (50%). Others arguments strengthening the choice of *Bacillus* are its ability for clostridial protein excretion (without help or tagging) and the close relationship of some *Bacillus* and *Clostridium* toxins as the phospholipase C [37–39].

No overexpression was detected on SDS–PAGE (Coomassie blue staining), during the first assays of production in *B. subtilis* 168 IS10, only a faint band could be suspected to be CPB2FM. But they gave a positive response in Western Blotting with polyclonal antibodies against the CPB2 toxin from equine origin. The comparison of the CPB2FM production by *B. subtilis* 168 IS10 strains containing the

plasmid or the integrated copy of *cpb2* shows that, for the same protein purification process, the expression from the plasmidic genes gives higher rate of production (Fig. 5.1 and 5.2).

The genomic integration by double recombination was still attractive because it provides a stable presence of *cpb2FM* gene in *B. subtilis* without the need of antibiotics to keep a plasmid copy. These characteristics being interesting mainly in industrial process.

Level of production

When CPB2FM productions by all the strains (2 *E. coli* and 3 *B. subtilis* strains) are compared on SDS-PAGE (Coomassie blue staining) and western blotting, the *B. subtilis* 168 (wild type) transformed with pBLTS72-*cpb2FM* appeared to be the most efficient mean to produce consequent amount of CPB2FM protein, present in the culture supernatant (Fig. 5.3). The level of production obtained in *B. subtilis* 168 with the multicopy plasmid was clearly better than those obtained *in vitro* with wild *Clostridium* (47001c12) (Fig. 6). The relative lack of CPB2FM overproduction may be explained by the potential toxicity of the protein, which could damage the membrane of producing cells during expression phase, or could activate a self-limit-

ing pattern in these cells to avoid any toxic effect. Concerning production engineering, compared to previous recombinant proteins production obtained with the same expression vector in *Bacillus* [32], the optimum production level was not reached. Other *Bacillus* strains should be tested such as *B. subtilis* WB800 which is deleted for eight extracellular proteases to limit the degradation of the protein of interest [39,40] or *B. brevis* 47 characterised by its capacity to overproduce recombinant proteins [38].

Purification of CPB2FM and rabbit immunisation

Purification of CPB2FM from *B. subtilis* 168—pBLTS72-*cpb2FM* supernatant by a three-steps purification protocol allowed to obtain purity up to 80 and 90% (SDS-PAGE with Coomassie blue staining, total protein dosage by BCA, ratio between CPB2FM and total protein) and is therefore compatible with the immunisation process (Fig. 7). We obtained up to 30 mg of pure CPB2FM at a concentration of 1.6 mg ml^{-1} in phosphate buffer (H_2PO_4 , 50 mM, NaCl 120 mM, pH 7.4). The multiple steps of the purification process presents a high risk of activity loss [8] compared to a single step purification process such as possible with His-tagged protein [4,16,41]. But the purified

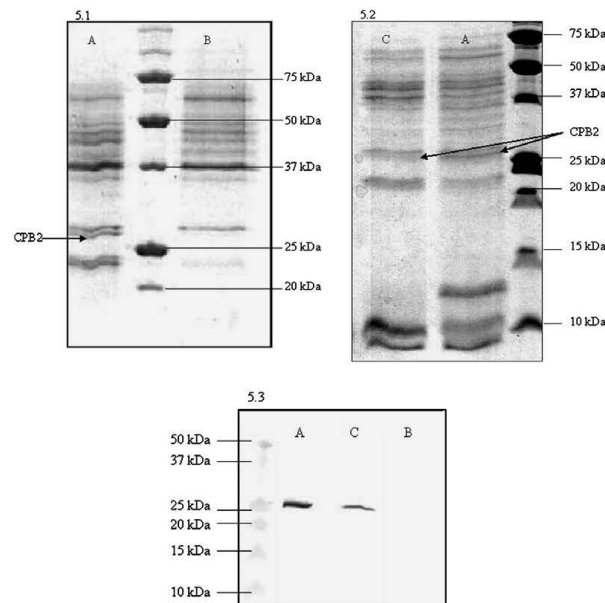


Fig. 5. Comparative CPB2FM production in *B. subtilis* with pBLTS72 plasmid or by genomic integration. 5.1 and 5.2, SDS PAGE with Precision Plus Protein Unstained Standards (Bio-Rad®) on 10 μl of 10-fold concentrated supernatant of *B. subtilis* 168 transformed with pBLTS72-*cpb2FM* (A), *B. subtilis* 168 transformed with pBLTS72 (B) or *B. subtilis* 168 IS10 with genomic *cpb2FM* (C). 5.3: Western Blotting with Pre-stained Precision Plus All Blue Standards on 10 μl of 10-fold concentrated supernatant of *B. subtilis* 168 transformed with pBLTS72-*cpb2FM* (A), *B. subtilis* 168 transformed with pBLTS72 (B) or *B. subtilis* 168 IS10 with genomic *cpb2FM* (C). Primary serum (1/1000): polyclonal rabbit anti-beta2 antibodies, secondary serum (1/1500): polyclonal goat anti-rabbit antibodies, coupled to alkaline phosphatase. Revelation with nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate reagents (NBT/BCIP, Bio-Rad).

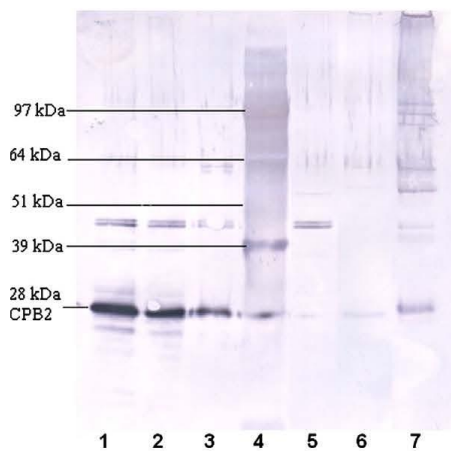


Fig. 6. Comparative CPB2 production in *B. subtilis* 168 pBLTS72-cpb2FM and in *C. perfringens*. Western blotting with SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen). Primary serum (1/1500); polyclonal rabbit anti-CPB2FM antibodies. Secondary serum (1/1500): polyclonal goat anti-rabbit antibodies coupled to alkaline phosphatase. Revelation with Western Blue® Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase (Promega). 1 2 3, respectively, 10, 5 and 2 μ l of raw supernatant of *B. subtilis* 168 transformed with pBLTS72-cpb2FM; 4, molecular weight standards; 5, 10 μ l of raw supernatant of *B. subtilis* 168; 6, 10 μ l of raw supernatant of *C. perfringens* (C3.2.5) from enterotoxaemic cattle; 7, 10 μ l of ~10-fold concentrated supernatant of *C. perfringens* (C3.2.5) from enterotoxaemic cattle.

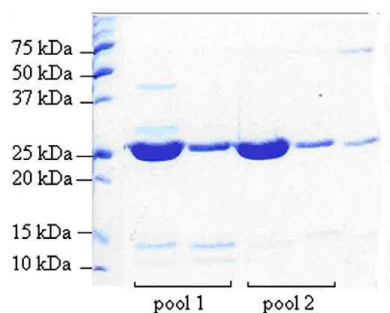


Fig. 7. Purified CPB2FM. SDS PAGE with Precision Plus Protein Unstained Standards (Bio-Rad®) on 10 μ l of different fractions of the third step of purification on isopropyl column. CPB2FM pool 1, >80% of purity; pool 2, >90% of purity.

B. subtilis 168 CPB2FM displays an apparent improved physical stability. Indeed, the CPB2FM purified protein resists to successive freezing-thawing cycles as shown by the absence of protein degradation on SDS-PAGE. Bacciarini and associates [41] also shown a relatively resistance of the toxin with an IFI (indirect immunofluorescence) positive reaction against CPB2 in intestinal tissue of a horse which they never succeeded to isolate a *cpb2*+ *C. perfringens* strain from.

The four different immune sera obtained by rabbit immunisation (d 0, 38, 66, 80) were compared to the equine CPB2 immune serum by Western blotting on TCA-concentrated supernatants of *C. perfringens* CWC245, *B. subtilis* 168 and *B. subtilis* 168—pBLTS72-cpb2FM. A positive specific band was observed with the dilutions from 1/500 to 1/1500 with few non-specific reactions, except for the pre-immune sample (d 0). We compared then the two immune sera (equine and bovine CPB2 toxin) against the purified recombinant CPB2FM: they obtained equivalent response. We also tested the “equine” and “bovine” sera against supernatant of some *C. perfringens* strains from cattle (Fig. 8). Moreover, the polyclonal antibodies obtained in this study could detect the “consensus” as well as the “atypical” CPB2 [27], what was not true for the antibodies produced against consensus CPB2 toxin (porcine origin) by Jost et al. [26]. The immune serum against the equine CPB2 toxin (Frey) can detect the consensus toxin and slightly the atypic toxin (Fig. 9).

Genotype and phenotype of 16 strains isolated from enterotoxaemic cattle... validation of new tools

According to the multiplex PCR results [5], all 16 strains isolated from 3 enterotoxaemic cattle were classified as non-enterotoxigenic type A strains. Nine of these (56%) were also positive by PCR for the presence of the *cpb2* gene (*cpb2FM*, 708 bp). The supernatants of those 16 field strains were also tested for the production of CPB2 by Western blotting with the polyclonal immune serum produced in rabbits. Seven of the 16 strains (43.75%) expressed a protein band recognized by the anti-CPB2 immune serum. All of them were *cpb2* positive by PCR. Thus 7 of the nine *cpb2* PCR positive strains (78%) actually produced the CPB2 in the culture supernatants (Table 4, Figs. 8 and 10).

As this study is mainly intended as a prospective study on a recombinant protein, no control group was included here but it had been done in another study [27].

In previous study on enterotoxaemic calves, if *cpb2* was more frequently found in pathologic than in control cattle population (31% of strains, 62% of calves vs. 29% of strains, 59% of calves, respectively), the prevalence of *cpb2* was lower that expected when the toxin was discovered [1]. These genotypic results were clearly under the *cpb2* prevalence observed in pigs, where the presence of the gene is strongly associated to toxin production (>90% correlation) and to intestinal troubles (necrotic enteritis in piglets, [11]). In diseased cattle, besides the relatively low prevalence of the gene, an apparent low prevalence of CPB2 expressing strains (<50%) was observed and expression seems bound to the toxinotype (type A 50% vs. type EE 0%) [4].

Though the proportion of the *cpb2* PCR positive strains expressing the protein is quite high (7/9, 78%) compared to other studies in non-pig animal species [4,26] the size of the sample is small. Another study including different control

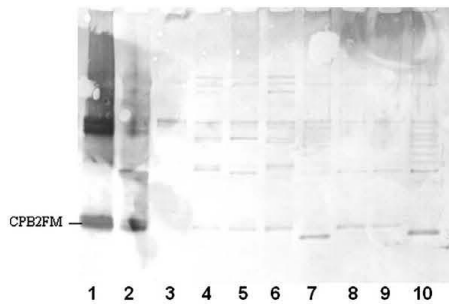


Fig. 8. Verification of CPB2FM antiserum on purified CPB2FM protein and on wild *C. perfringens* strains supernatants. Western blotting with SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen). Primary serum (1/1500); polyclonal rabbit anti-CPB2FM antibodies (this study). Secondary serum (1/1500); polyclonal goat anti-rabbit antibodies coupled to alkaline phosphatase (Promega). Revelation with Western Blue® Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase (Promega). 1, 5 µl of purified CPB2FM; 2, molecular weight standards; 3 6, 10 µl of ~10-fold concentrated supernatant of *C. perfringens* from enterotoxaemic cattle (C3.2.1, C3.2.2, C3.2.3, C3.2.4); 7 10, 10 µl of ~10-fold concentrated supernatant of *C. perfringens* from healthy cattle (T7.1, T7.2, T7.3, T7.4).

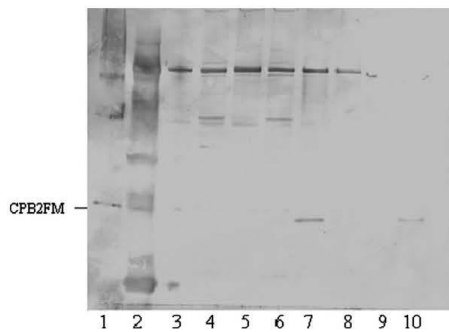


Fig. 9. Verification of equine CPB2 antiserum on purified CPB2FM protein and on wild *C. perfringens* strains supernatants. Western blotting with SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen). Primary serum (1/1500); polyclonal rabbit anti-CPB2 (equine) antibodies provided by Pr Frey (b). Secondary serum (1/1500); polyclonal goat anti-rabbit antibodies coupled to alkaline phosphatase (Promega). Revelation with Western Blue® Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase (Promega). 1, 5 µl of purified CPB2FM; 2, molecular weight standards; 3 6, 10 µl of ~10-fold concentrated supernatant of *C. perfringens* from enterotoxaemic cattle (C3.2.1, C3.2.2, C3.2.3, C3.2.4); 7 10, 10 µl of ~10-fold concentrated supernatant of *C. perfringens* from healthy cattle (T7.1, T7.2, T7.3, T7.4).

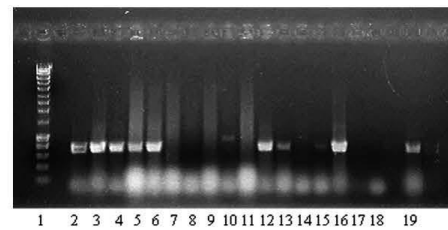


Fig. 10. PCR cpb2FM on *C. perfringens* strains from enterotoxaemic cattle. 1, Smart Ladder (Eurogentec); 2 17, sixteen strains from 3 cattle were tested for presence or absence of cpb2FM sequence; 18, negative control (CN 3888); 19, positive control (CWC245).

and case animal populations and *cpb2* gene variants has been performed and published since [27]. In this context the *cpb2FM* PCR (this study) shows a better reliability to expression of CPB2 than the PCR proposed by Herholz et al. [14] (*cpb2-H*). So, 90% of strains *cpb2FM* PCR positive are positive for CPB2 Western blotting in the enterotoxaemic group vs. 72% of strains *cpb2-H* PCR positive and, in the control group 87.5% of strains *cpb2FM* PCR positive are positive for CPB2 Western blotting, vs. 41% of strains *cpb2-H* PCR positive (unpublished data).

The different hypotheses proposed to explain the difference between gene and toxin prevalence are mainly genetic: presence of silent gene [4], of cryptic gene (Frey, 2002: oral communication) or more generally mutations that prevents the correct expression of the gene product. This led to a classification of *cpb2* gene in “pig” and “non pig” types [26].

But recent publications on isolates from horses have also shown that the expression of CPB2:

- (i) Could be induced by some external stimuli such as antibiotics (gentamicin) [13] what was yet suspected by Herholz et al. [14].
- (ii) Is linked to the level of CPB2 toxin mRNA in the cell. Some strains primarily considered as “non-producing” appear to be able to produce a typical CPB2. But their mRNA levels are so low that they correspond to protein amount undetectable by classical methods such as Western blotting. The hypothesis proposed to explain this observation is a low transcriptional level and/or the instability of the mRNA [42].

Table 4

Beta2 genotype (PCR cpb2FM) and phenotype (Western blot, cattle immune serum) of *C. perfringens* field strains from enterotoxaemic cattle

Cattle	1					2					3					Σ	
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4		5
<i>cpb2FM</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	9
CPB2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	7

Sixteen strains from 3 cattle were tested by PCR for the presence of *cpb2FM* and by Western blot with cattle immune serum for expression of CPB2 in their supernatant.

Those recent findings open new prospects concerning the implication of the CPB2 in clostridial intestinal pathologies in “non-pig” species. The direct detection of CPB2 with specific antibodies could allow overcoming the question of the ability of the *cpb2*+ strains to express or not the CPB2 toxin. This type of direct diagnostic method is conceivable on sample fresh enough to avoid CPB2 degradation by intestinal proteases/enzymes what could lead to an underestimation of CPB2 expression level.

The stability of the genetic information should also be looked after. Indeed, *cpb2* gene is located on a plasmid which could be lost in the course of aerobic sub-culturing or in stressing conditions [4,8,15,26,43].

Conclusions and prospects

The CPB2FM toxin produced in this study and its specific polyclonal antibodies provide us a good tool to investigate implication of the CPB2 toxin in cattle *C. perfringens*-associated enterotoxaemia and to study the mode of action of the CPB2 toxin in the intestinal tract. Even if CPB2 is suspected to form pore in the cell membranes [8], its precise pattern of action remains unknown and, more basically, the prime cause of enterotoxaemia are still unclear. It will be interesting in the future to study and compare the ratio of *cpb2*+/*cpb2*- strains in normal and enterotoxaemic intestinal flora [44,45] to follow the respective evolution of these 2 populations during enterotoxaemia and to determine if in certain *in vivo* conditions, the growth of *cpb2*+ strains is promoted comparatively to *cpb2*- strains. Finally, further studies should try to clearly define the criterion to discern the two allelic populations, taking into account nucleotide and amino-acid sequences but also the ability of CPB2 to be expressed.

Acknowledgments

We thank Pr Joachim Frey for providing anti-CPB2 polyclonal antibodies. Great thanks also to members and persons in charge of the C.I.P. (Centre d'Ingenierie des Proteines) who shared their experience in proteomic and molecular biology, and to all the members of the service of bacteriology of the veterinary medicine faculty of the University of Liege.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.pep.2007.04.021.

References

- [1] C. Manteca, G. Daube, V. Pirson, B. Limbourg, A. Kaekenbeek, J.G. Mainil, Bacterial intestinal flora associated with enterotoxaemia in Belgian Blue calves, *Vet. Microbiol.* 81 (2001) 21–32.
- [2] M.R. Popoff, Les Enterotoxémies, *Rev. Méd. Vét.* 140 (1989) 479–491.
- [3] J.G. Songer, Clostridial enteric diseases of domestic animals, *Clin. Microbiol. Rev.* 9 (1996) 216–234.
- [4] D.M. Bueschel, B.H. Jost, S.J. Billington, H.T. Trinh, J.G. Songer, Prevalence of *cpb2*, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype, *Vet. Microbiol.* 94 (2003) 121–129.
- [5] G. Daube, B. China, P. Simon, K. Hvala, J.G. Mainil, Typing of *Clostridium perfringens* by in vitro amplification of toxin genes, *J. Appl. Bacteriol.* 77 (1994) 650–655.
- [6] R.R. Meer, J.G. Songer, Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*, *Am. J. Vet. Res.* 58 (1997) 702–705.
- [7] L. Petit, M. Gibert, M. R. Popoff, *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype, *Trends Microbiol.* 7 (1999) 104–110.
- [8] M. Gibert, C. Jolivet-Renaud, M.R. Popoff, Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*, *Gene* 203 (1997) 65–73.
- [9] J.G. Smedley, D.J. Fisher, S. Sayeed, G. Chakrabarti, B.A. McClane, The enteric toxins of *Clostridium perfringens*, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 152 (2004) 183–204.
- [10] T. Shimizu, S. Ohshima, K. Ohtani, T. Shimizu, H. Hayashi, Genomic map of *Clostridium perfringens* strain 13, *Microbiol. Immunol.* 45 (2001) 179–189.
- [11] M. Waters, A. Savoie, H.S. Garmory, D. Bueschel, M. Popoff, J.G. Songer, R.W. Titball, B. McClane, M.R. Sarker, Genotyping and phenotyping of beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with gastrointestinal diseases in piglets, *J. Clin. Microbiol.* 41 (2003) 3584–3591.
- [12] K. Ohtani, H.I. Kawsar, K. Okumura, H. Hayashi, T. Shimizu, The VirR/VirS regulatory cascade affects transcription of plasmid-encoded putative virulence gene in *Clostridium perfringens* strain 13, *FEMS Microbiol. Lett.* 222 (2003) 137–141.
- [13] E.M. Vilei, Y. Schlatter, V. Perreten, R. Straub, M.R. Popoff, M. Gibert, A. Grone, J. Frey, Antibiotic-induced expression of a cryptic *cpb2* gene in equine beta2-toxigenic *Clostridium perfringens*, *Mol. Microbiol.* 57 (2005) 1570–1581.
- [14] C. Herholz, R. Miserez, J. Nicolet, J. Frey, M. Popoff, M. Gibert, H. Gerber, R. Straub, Prevalence of beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders, *J. Clin. Microbiol.* 37 (1999) 358–361.
- [15] H.S. Garmory, N. Chanter, N.P. French, D. Bueschel, J.G. Songer, R.W. Titball, Occurrence of *Clostridium perfringens* beta2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays, *Epidemiol. Infect.* 124 (2000) 61–67.
- [16] L.N. Bacciarini, O. Pagan, J. Frey, A. Grone, *Clostridium perfringens* beta2-toxin in an African elephant (*Loxodonta africana*) with ulcerative enteritis, *Vet. Rec.* 149 (2001) 618–620.
- [17] K. Gkiourtzidis, J. Frey, E. Bourti-Hatzopoulou, N. Iliadis, K. Sarris, PCR detection and prevalence of alpha-, beta-, beta2-, epsilon-, tau- and enterotoxin genes in *Clostridium perfringens* isolated from lambs with clostridial dysentery, *Vet. Microbiol.* 82 (2001) 39–43.
- [18] S. Thiede, R. Goethe, G. Amsberg, Prevalence of beta2 toxin gene of *Clostridium perfringens* type A from diarrhoeic dogs, *Vet. Rec.* 149 (2001) 273–274.
- [19] A. Aschfalk, P. Valentin-Weigand, W. Muller, R. Goethe, Toxin types of *Clostridium perfringens* isolated from free-ranging, semi-domesticated reindeer in Norway, *Vet. Rec.* 151 (2002) 210–213.
- [20] C. Manteca, G. Daube, T. Jauniaux, A. Linden, V. Pirson, J. Detilleux, A. Ginter, P. Coppe, A. Kaekenbeek, J.G. Mainil, A role for the *Clostridium perfringens* beta2 toxin in bovine enterotoxaemia? *Vet. Microbiol.* 86 (2002) 191–202.
- [21] T. Dray, *Clostridium perfringens* type A and beta2 toxin associated with enterotoxaemia in a 5-week-old goat, *Can. Vet. J.* 45 (2004) 251–253.
- [22] P. Boujon, M. Henzi, J.H. Penseyres, L. Belloy, Enterotoxaemia involving beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* in a white stork (*Ciconia ciconia*), *Vet. Rec.* 156 (2005) 746–747.
- [23] J.D. Fisher, K. Miyamoto, B. Harrison, S. Akimoto, M.R. Serker, B.A. McClane, Association of beta2 toxin production with *Clostrid-*

- ium perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates carrying a plasmid enterotoxin gene, *Mol. Microbiol.* 56 (2005) 747–762.
- [24] G. Greco, A. Madio, V. Martella, M. Campolo, M. Corrente, D. Buonavoglia, C. Buonavoglia, Enterotoxaemia associated with beta2 toxin-producing *Clostridium perfringens* type A in two Asiatic black bears (*Selenarctos thibetanus*), *J. Vet. Diagn. Invest.* 17 (2005) 186–189.
- [25] A. Johansson, A. Aspan, E. Bagge, V. Baverud, B.E. Engstrom, K.E. Johansson, Genetic diversity of *Clostridium perfringens* type A isolates from animals, food poisoning outbreaks and sludge, *BMC Microbiol.* 6 (2006) 47.
- [26] B.H. Jost, S.J. Billington, H.T. Trinh, D.M. Bueschel, J.G. Songer, Atypical *cpb2* genes, encoding beta2-toxin in *Clostridium perfringens* isolates of nonporcine origin, *Infect. Immun.* 73 (2005) 652–656.
- [27] M. Lebrun, P. Filée, D. Desmecht, M. Galleni, J.G. Mainil, A. Linden, The expression of *Clostridium perfringens* consensus beta2 toxin is associated with bovine enterotoxaemia syndrome, *Vet. Microbiol.* 120 (2006) 151–157.
- [28] P. Hogh, Necrotizing infectious enteritis in piglets, caused by *Clostridium perfringens* type C. I. Biochemical and toxigenic properties of the *Clostridium*, *Acta Vet. Scand.* 8 (1967) 26–38.
- [29] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, second ed., in: N. Ford, C. Nolan, M. Ferguson (Eds.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, vol. 3, Cold Spring Harbor, 1989.
- [30] T. Msadek, V. Dartois, F. Kunst, M.L. Herbaud, F. Denizot, G. Rapoport, ClpP of *Bacillus subtilis* is required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation, *Mol. Microbiol.* 27 (1998) 899–914.
- [31] F.M. Asubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Intersciences, New York, 1991.
- [32] P. Filée, Thesis “Etude du répresseur BlaI de *Bacillus licheniformis* 749/I impliqué dans la régulation de la beta-lactamase BlaP. University of Liège, 2001, p139.
- [33] J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 4673–4680.
- [34] V. Di Francesco, J. Garnier, P.J. Munson, Improving protein secondary structure prediction with aligned homologous sequences, *Protein Sci.* 5 (1996) 106–113.
- [35] B. Harrison, D. Raju, H.S. Garmory, M.M. Brett, R.W. Titball, M.R. Sarker, Molecular character of *Clostridium perfringens* isolates from humans with sporadic diarrhea: evidence for transcriptional regulation of the beta2-toxin-encoding gene, *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 8362–8370.
- [36] D. Leslie, N. Fairweather, D. Pickard, G. Dougan, M. Kehoe, Phospholipase C and haemolytic activities of *Clostridium perfringens* alpha-toxin cloned in *Escherichia coli*: sequence and homology with a *Bacillus cereus* phospholipase C, *Mol. Microbiol.* 3 (1989) 383–392.
- [37] V. Witte, N. Wolf, T. Diefenthal, G. Reipen, H. Dargatz, Heterologous expression of the clostripain gene from *Clostridium histolyticum* in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*: maturation of the clostripain precursor is coupled with self-activation, *Microbiology* 140 (1994) 1175–1182.
- [38] M. Nagahama, K. Michiue, J. Sakurai, Production and purification of *Clostridium perfringens* alpha-toxin using a protein-hyperproducing strain, *Bacillus brevis* 47, *FEMS Microbiol. Lett.* 145 (1996) 239–243.
- [39] K. Murashima, C.L. Chen, A. Kosugi, Y. Tamaru, R.H. Doi, S.L. Wong, Heterologous production of *Clostridium cellulovorans* engB, using protease-deficient *Bacillus subtilis*, and preparation of active recombinant cellulosomes, *J. Bacteriol.* 184 (2002) 76–81.
- [40] H.Y. Cho, H. Yukawa, M. Inui, R.H. Doi, S.L. Wong, Production of minicellulosomes from *Clostridium cellulovorans* in *Bacillus subtilis* WB800, *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004) 5704–5707.
- [41] L.N. Bacciarini, P. Boerlin, R. Straub, J. Frey, A. Gröne, Immunohistochemical localization of *Clostridium perfringens* beta2-toxin in the gastrointestinal tract of horses, *Vet. Pathol.* 40 (2003) 376–381.
- [42] M. Waters, D. Raju, H.S. Garmory, M.R. Popoff, M.R. Sarker, Regulated expression of the beta2-toxin gene (*cpb2*) in *Clostridium perfringens* type A isolates from horses with gastrointestinal diseases, *J. Clin. Microbiol.* 43 (2005) 4002–4009.
- [43] H.L.B.M. Klaasen, M.J.C.H. Molkenboer, J. Bakker, R. Miserez, H. Häni, J. Frey, M.R. Popoff, J.F. van den Bosch, Detection of the beta2 toxin gene of *Clostridium perfringens* in diarrhoeic piglets in The Netherlands and Switzerland, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 24 (1999) 325–332.
- [44] B. Nauerby, K. Pedersen, M. Madsen, Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among *Clostridium perfringens* isolates from chickens, *Vet. Microbiol.* 94 (2003) 257–266.
- [45] U. Schotte, U. Truyen, H. Neubauer, Significance of beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* infection in animals and their predisposing factors – a review, *J. Vet. Med.* 51 (2004) 423–426.

3. CONSTRUCTION DE DEUX PROTÉINES TRONQUÉES SUR BASE DES FRAGMENTS N- ET C-TERMINAUX DE CPB2FM.

Au vu des quantités de CPB2-FM obtenues, il a été décidé, en cours de thèse, de produire deux fragments de CPB2-FM sous forme de protéines tronquées ou protéines chimères. Ces constructions ont été réalisées dans le but d'augmenter les niveaux de production et les protéines tronquées obtenues après purification ont servi à la production d'anticorps polyclonaux spécifiques de leur protéine tronquée et de CPB2-FM.

3.1. Introduction

Un des objectifs initiaux de ce travail était d'obtenir une construction capable de s'adapter aux exigences de production d'une protéine à l'échelle industrielle, que ce soit un outil diagnostique ou un antigène à vocation vaccinale.

Au cours des essais de production de la forme mature de la protéine CPB2 d'origine bovine (CPB2 FM), en *E. coli* comme en *B. subtilis*, deux problèmes sont apparus. Premièrement, la quantité de protéine obtenue est faible comparée aux capacités connues d'expression des combinaisons plasmides-bactéries testées (Filée, 2001). Deuxièmement, le mode d'action de CPB2 étant inconnu, il est impossible de vérifier si les étapes de purification successives ne dénaturent pas la protéine avec pour conséquence de diminuer voir annihiler sa toxicité (Gibert et al, 1997 ; Fisher et al., 2006).

Cette toxicité est (i) à la fois une hypothèse à démontrer afin de prouver ou non l'implication de CPB2 dans l'entérototoxicité bovine et (ii) un possible frein technique à la surproduction de cette protéine. En effet, si la CPB2FM s'avère réellement toxique, les cellules productrices pourraient (i) être lésées voire détruites, ce qui limiterait *de facto* la production de CPB2FM et (ii) en restreindre la production par réaction d'autodéfense.

Afin de contourner cette difficulté et d'obtenir un outil de détection efficace et robuste, la production de protéines tronquées formées par la fusion d'un fragment (N- et C- terminaux) de la CPB2 FM et d'une protéine porteuse a été envisagé.

3.2. Matériel et méthodes

3.2.1. Souches bactériennes

Les souches utilisées dans cette étude sont reprises dans la **table 1**.

Escherichia coli : *E. coli* DH5 α (Invitrogen, USA) a servi à amplifier les plasmides porteurs des gènes de protéines tronquées. *E. coli* DH5 α , *E. coli* SF120 ont été utilisées pour exprimer la protéines tronquées N-terminale (CPB2Nt_BlaP) ; *E. coli* SF120 et *E. coli* BL21 CodonPlusTM(DE3)RIL pour exprimer la protéine tronquée C-terminale (GST_CP2Ct). Ces souches ont été cultivées en bouillon : Luria-Bertani (LB), Terrific (TB, Difco, USA) et 2XYT (Difco, USA). Pour la protéine tronquée N-terminale, les souches recombinantes ont été sélectionnées avec de l'ampicilline à 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ et spectinomycine à 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (SF120) ou spectinomycine à 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (DH5 α). Pour la protéine tronquée C-terminale, les souches recombinantes ont été sélectionnées avec de l'ampicilline à 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (SF120) ou ampicilline à 30 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, chloramphenicol avec adjonction de leucine, isoleucine et arginine à 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ pour les *E.coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL afin de conserver le t-RNA des codons rares.

3.2.2. Clonage des gènes d'intérêt

Les souches bactériennes, les amorces et les plasmides sont respectivement repris dans les **tables 1, 2 et 3**. Les manipulations de l'ADN de routine ont été réalisées selon les recommandations de Sambrook et associés (1989).

Table 1 : Souches

Noms	Génotypes	Résistance antibiotique	Fournisseurs
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus™(DE3)-RIL	<i>F ompT hsdS_B (r_b⁻ m_b⁻) gal dcm (DE3). Extra copies of E. coli, argU, ileY, and leuW tRNA genes</i>	Cam ^r	Stratagene, ,USA
<i>E. coli</i> BL21	<i>E. coli</i> B F- <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) gal [malB ⁺] _{K-12} (λ ^S)	Cam ^r	Stratagene, ,USA
<i>E. coli</i> DH5α [™]	<i>F φ80 dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻,m_k⁺) phoA supE44 λ thi-1 gyrA96 relA1</i>	Cam ^r	Life Technologies, Allemagne
<i>E. coli</i> SF120	<i>deficient in chromosomal genes ptr, ompT and degP encoding proteases Protease III, OmpT, and DegP, respectively ptr32::ΩCat^r degP41(ΔPstI-Kan^r) ΔompT</i>	Kan ^r	United States Patent US5264365 (ATCC 55099)

Table 1 : Souches utilisées pour le clonage, l'amplification et la production des protéines tronquées.

Table 2 : Amorces utilisées

Amorces	Séquences	Sites
cpb2_BlaP	5'- TTAGAAGATTTTAAATAGACCCTAACAGTAATAATCAAACGAATGCCTCG - 3'	
BlaP_cpb2	5' – GAGGCATTCGTTTGATTACTGTTAGGGTCATATTTAAAATCTTCTAA-3'	
BetaTox-4	5'- <u>GAGCTCAGGCCAAAGAAATCGACGCTTATAGAAAGGTAATGG</u> -3'	<u>SacI</u>
GST_cpb2	5' – GGGATCCCCCTAACCAACAACACTGAAA – 3'	
BetaTox-5	5'- <u>GAATTC</u> CTATGCACAATACCCTTCACC-3'	<u>EcoRI</u>

Table 2 : listes des amorces utilisées pour le clonage des séquences codant pour les protéines tronquées. Certaines de ces amorces contiennent des sites de restriction (soulignés) qui sont mentionnés dans la colonne « sites » : BetaTox-4 (βTox-4) site *SacI* ; BetaTox-5 (βTox-5) site *EcoRI*.

Table 3 : Plasmides

Plasmides	Hôtes et Particularités	Source et référence
<i>pGem-T Easy</i>	<i>E.Coli Amp^r (100 µg/ml)</i>	<i>Promega, Madison , USA</i>
<i>pBLTS</i>	<i>E. coli Amp^r (100µg/ml)</i> <i>B. subtilis Kan^r (10µg/ml)</i>	<i>P. Filée, CIP</i>
<i>pSPC</i>	<i>E. coli Amp^r (50 µg/ml), Spc^r (100µg/ml)</i>	<i>P. Filée, CIP</i>
<i>pGEX(5x-1): GST Gene fusion</i>	<i>E. coli Amp^r (100 µg/ml)</i>	<i>Amersham Biosciences, USA</i>

Table 3 : Plasmides utilisés pour le clonage, l'amplification et la production des protéines tronquées.

3.2.2.1. Séquence codant pour la forme mature de la CPB2 : *cpb2FM*.

La séquence C-terminale a été obtenue au départ de l'ADN génomique d'une souche de *C. perfringens* de bovin entérotoxémique (47001-C12), obtenu selon la technique décrite par Herholz et associés (1999).

La construction pBLTS72_cpb2FM (Lebrun et al., 2007), dans laquelle le gène *cpb2FM* (origine : 47001-C12) est sous contrôle des promoteurs, séquence signal et terminaison du plasmide navette (*E. coli*, *Bacillus*), a servi de base à l'amplification de la séquence N-terminales.

3.2.2.2. Choix des séquences N- et C-terminales du *cpb2FM* et des protéines porteuses.

Les fragments N- et C-terminaux de la CPB2FM (*cpb2Nt* et *cpb2Ct*) ont été choisis sur base des résultats du séquençage et des hypothèses de structures secondaire et tertiaire (Programme LOGIC PILE UP de GCG dont option helicalwheel). Les protéines porteuses ont été choisies pour la maîtrise de leur production et purification et leur facilité de détection-dosage (Filée 2001) : la beta lactamase (BlaP) pour le fragment CPB2Nt et la Glutathion-S transférase (GST ou P2) pour le fragment CPB2Ct.

3.2.2.3. Réaction de Polymérisation en Chaîne : PCR

Les PCR ont été réalisées sur un thermocycleur Mastercycler (Eppendorf) dans un volume de 50 µl contenant : 5 µl d'ADN modèle, 450 µl de Taq-PCR mix (Tris HCl 10 mM, pH 8.3 ; MgCl₂ 1.5 mM, KCl 50 mM) contenant 200µM de chaque déoxy nucléotide, 0.25 mM de chaque amorce et 1.5 U de Taq/Pfu polymérases (v/v) (Amersham Biosciences, USA). Les conditions spécifiques d'amplification relatives à chaque protéine tronquées sont décrites dans le paragraphe suivant, elles sont précédées d'une incubation de 5 min à 95°C et suivie d'une phase d'extension de 7 min à 72°C. Les produits de PCR ont été purifiés par GFX (Amersham Biosciences, UK) entre chaque étape. Les amplicons ont été visualisés par coloration au bromure d'éthidium après électrophorèse en gel d'agarose à 1.5%

3.2.2.4. Obtention du fragment N-terminal : *cpb2Nt-BlaP*

La séquence *cpb2Nt_BlaP* a été obtenue en 3 étapes.

Une première PCR a permis d'amplifier la séquence de la protéine porteuse (BlaP) au départ du plasmide pSPC-BlaP (CIP) avec amorces Beta2_BlaP (up) et BlaP_EcoR1 (down) : 35 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 60°C (T_m), 30 sec à 72°C.

La seconde étape a consisté à amplifier le fragment N-terminal de *cpb2FM* au départ du pBLTS72_cpb2Fm avec les amorces *SacI_beta2* (up) et Beta2_BlaP (down) : 35 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 55°C (T_m), 90 sec à 72°C (Figure 1).

Une dernière étape a été nécessaire pour obtenir le fragment *cpb2Nt_BlaP* au départ des deux produits PCR des étapes 30 sec à 72°C.

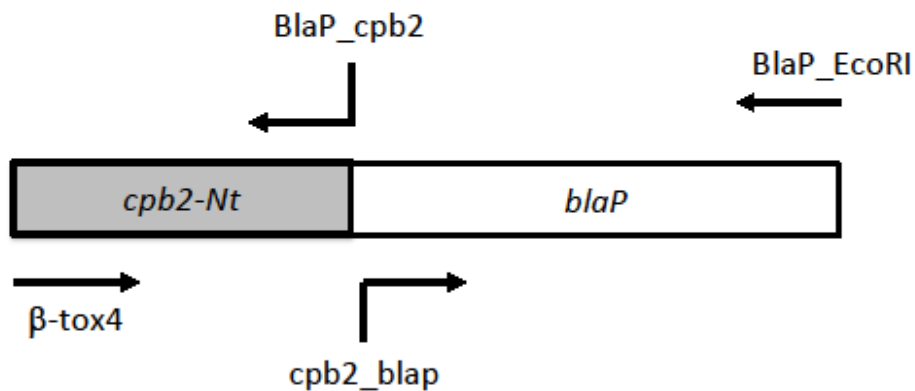


Figure 1 : positions des amorces pour l'obtention de la protéine tronquée N terminale. *BlaP* est le gène codant pour une beta lactamase et *cpb2 Nt* est la séquence codant pour le fragment N terminal de CPB2

3.2.2.5. Obtention du fragment C-terminal *GST_cpb2Ct*

L'ADN génomique de la souche 47001-c12 a subi une PCR avec les amorces *GST_BlaP* (up) et *Btox5* (down) : 35 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 60°C (T_m), 30 sec à 72°C (**Figure 2**).

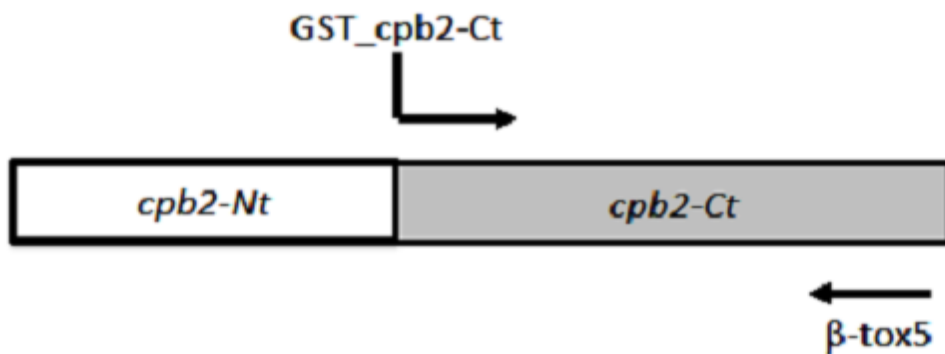


Figure 2 : positions des amorces pour l'obtention de la protéine tronquée C-terminale. *Cpb2 Ct* est la séquence codant pour le fragment C terminal de CPB2, *GST* : Glutathion S transférase.

3.2.2.6. Clonage en plasmide pGEM

Avant d'être clonés dans le pGEM (T4 DNA ligase), les produits de PCR purifiés, *cpb2Nt_BlaP* et *GST_cpb2Ct*, ont subi un ajout d'une base alanine (dATP 200 μ M, 15 min à 72°C, 10 min à 97°C, Taq polymérase). Les plasmides obtenus après ligation des fragments d'intérêt dans le pGEM ont été amplifiés en *E. coli* DH5 α par culture overnight à 37°C (LB, Amp^r100) puis purifiés par Nucléobond AX100 (Macherey-Nagel, Düren).

3.2.3. Obtention des vecteurs d'expression et expression des protéines tronquées.

3.2.3.1. Protéine tronquée N-terminale : CPB2Nt_BlaP

Le fragment *cpb2Nt_BlaP* et le plasmide pSPC ont été digérés séquentiellement par *SacI* et *EcoRI* (Promega) avant la ligation (T4 DNA ligase).

La production de protéine tronquée CPB2Nt_BlaP a ensuite été étudiée dans différentes conditions reprises dans la **table 4**. La production a été réalisée en *E. coli SF120* et *DH5 α* transformées avec le pSPC_cpb2Nt_BlaP. Après une nuit de culture à 37°C en TB Amp50, Spc100 ou 2XYT Amp50, Spc75, la fraction périplasmique a été récupérée par choc osmotique par le froid (Sambrook et al., 1989).

3.2.3.2. Protéine tronquée C-terminale : GST_CPB2Ct.

Le pGEM-GST_cpb2Ct et le plasmide d'expression pGEX(5x-1) ont été linéarisés par digestion avec *BamHI* et *EcoRI* en tampon multicore (Promega). Le fragment GST_cpb2Ct purifié et le pGEX(5x-1) ont ensuite été ligués (T4 DNA ligase) pour obtenir le pGEX(5x-1)-GST_cpb2Ct. Ce plasmide a ensuite été amplifié en *E. coli DH5a* et purifié par Nucleobond AX 100.

La production de la protéine tronquée GST_CPB2Ct, inductible à l'IPTG (isopropylthiogalactosidase, 3h), a ensuite été étudiée dans différentes conditions reprises dans la **table 5**. La production a été réalisée en *E. coli SF120* et *BL21-CodonPlus™(DE3)-RIL*. Après une nuit de culture en TB Amp000 ou 2XYT Amp100, Clp30 et Ile-Leu,Arg 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, les bactéries ont été récupérées par centrifugation (15 min, 5000rpm, 4°C). La fraction cellulaire soluble a été obtenue par des cycles courts et répétés de sonication sur glace du culot bactérien remis en suspension dans du PBS, puis récupérée par centrifugation, 10 min à 18000 rpm à 4°C.

3.2.3.3. Protéines

Pour éviter la dégradation des protéines tronquées, des inhibiteurs de protéases : EDTA, Pefabloc (Roche, Suisse) ou de pont disulfure : β -mercaptoéthanol, ont été utilisés lors des étapes d'obtention des fractions d'intérêt et de purification. L'estimation de la concentration en protéines des différentes étapes d'expression et purification a été réalisée grâce au test BCA (2-Bicinchoninic Assay, Pierce, USA).

3.2.4. Purification des protéines tronquées.

Les résines et colonnes proviennent de chez Amersham Biosciences (USA) et les fractions sont vérifiées par SDS-PAGE (15%) entre chaque étape de purification.

3.2.4.1. Protéine tronquée N-terminale : CPB2Nt-BlaP (table 4)

La fraction périplasmique des *E. coli SF120* transformées par le plasmide d'intérêt a été diluée en tampon phosphate 50mM et sulfate ammonique 1.5M à pH 7. La purification a été réalisée sur colonne hydrophobe isopropyle en 2 étapes successives. D'abord un gradient de sulfate ammonique de 1.5 à 0 M à pH 7, suivie d'une purification par 3 paliers de NaCl (7.5, 15 et 100%) à pH 7.4. Les fractions d'intérêt ont une pureté en CPB2Nt_BlaP supérieure à 90% et serviront à l'obtention d'anticorps polyclonaux.

La fraction périplasmique des *E. coli* DH5 α transformées par le plasmide d'intérêt a été diluée en tampon acétate 10mM à pH 4.5 et passée sur colonne S sépharose Fastflow. La première étape d'élution a été réalisée par un gradient de NaCl de 0 à 1M à pH 4.5. Les fractions d'intérêt ont été poolées et dialysées 3 h en tampon Tris 10mM à pH 7.2 et la colonne régénérée. La seconde purification a été réalisée sur la même colonne, également par un gradient de NaCl de 0 à 1M mais en tampon Tris 10mM à pH 7.2. Les fractions d'intérêt ont une pureté supérieure à 80% et serviront à vérifier les anticorps produits contre la forme mature de CPB2 et la protéine tronquée N-terminale.

3.2.4.2. Protéine tronquée C-terminale : GST_CPB2Ct (table 5)

La fraction cellulaire soluble des *E. coli* BL21-CodonPlus™(DE3)-RIL transformées par le plasmide d'intérêt a été diluée en tampon Tris 100mM. La purification a consisté en 2 cycles successifs de (i) fixation sur résine glutathion sépharose 4B de 1h à température ambiante puis (ii) élution avec une solution de glutathion 20 mM en tampon Tris 100 mM, NaCl 120mM à pH 8 additionnée d'EDTA 5 mM et Péfabloc 1 mM (antiprotéases).

La fraction cellulaire soluble des *E. coli* SF120 transformées par le plasmide d'intérêt a été diluée en tampon Tris 100mM. La purification a consisté en 2 cycles successifs de (i) fixation sur résine glutathion sépharose 4B une nuit à 4°C puis (ii) élution avec une solution de glutathion 30 mM en tampon Tris 100 mM, NaCl 120mM à pH 8 additionnée de Péfabloc 1 mM (antiprotéases). Les fractions d'intérêt ont une pureté en GST-CPB2Ct supérieure à 90%, compatible avec la production d'anticorps.

3.2.5. Production d'immunsérums polyclonaux

Les fractions contenant les protéines tronquées (CPB2Nt-BlaP et GST-CPB2Ct), pures à > 90% ont été utilisées pour immuniser des lapins New Zealand au Centre d'Economie Rurale et d'Endocrinologie (Belgique). Chaque lapin reçoit en sous-cutané 150 μ l d'une solution de protéines à 250 μ g.ml⁻¹ minimum aux jours 0, 14, 28 et 56. Un échantillon de sérum est prélevé aux jours 0, 38 et 66 et les lapins sont saignés au jour 80.

Table 4 : Production de CPB2Nt_BlaP

<i>E. coli</i>	Milieux de culture	Obtention fraction périplasmique par choc osmotique par le froid	Matrices de purification	Elution étape 1	Elution étape 2	Résultats
<i>SF120</i> (protéases déficientes)	TB, Amp50, Spc100	Tampon phosphate 50 mM, (NH ₄) ₂ . SO ₄ 1.5M, pH7	Isopropyle (hydrophobe)	Gradient de (NH ₄) ₂ . SO ₄ de 1.5M à 0M (Salting Out)	Paliers de NaCl 7.5 , 15 et 100 % Tampon Tris 10 mM, pH 7.4	Pureté > 90% Fractions positives utilisées pour l'immunisation
<i>DH5α</i>	2XYT, Amp50, Spc75	Tampon acétate de Na (CH ₃ COONa), 10 mM, pH 4.5	S Sépharose FF	Gradient de NaCl de 0 à 1M en tampon acétate de Na, pH4.5. Dialyse des fractions positives en Tris 10mM, pH 7.2	Gradient de NaCl de 0 à 1 M tampon Tris 10 mM, pH 7.2.	Pureté > 80% Fractions positives utilisées pour vérifier la spécificité par rapport aux Ac (CPB2FM)

Table 4 : étapes de production (expression) et purification de la protéine tronquée N terminale, CPB2Nt_BlaP. TB : terrific broth, 2XYT :double yeast-tryptones, Amp : ampicilline, SPC : spectinomycine, (NH₄)₂. SO₄ : sulfate d'ammonium, Ac : anticorps polyclonaux

Table 5 : Production de GST_CP2Ct

E. coli	Milieux de culture	Obtention fraction cellulaire soluble	Matrice de purification	Elution étape 1	Résultats
<i>E. coli</i> BL21- <i>CodonPlus™(DE3)-RIL</i>	2XYT Amp100, Clp30 Ile, Leu, Arg 50 µg/ml	Sonication en PBS sur glace + β-mercaptoéthanol 5 mM ou Péfabloc 1mM	Glutathion sépharose 4B, 1h , T° ambiante	Glutathion 20 mM en tampon tris 100 mM, Na Cl 120 mM, EDTA 5mM et Péfabloc 1 mM, pH 8	Après 2 cycles de fixation-élution successifs, purification partielle. Fractions positives utilisées pour vérifier la spécificité par rapport aux Ac (CP2FM)
<i>SF120 (protéases déficientes)</i>	TB Amp100	Sonication en PBS sur glace, EDTA 5 mM, péfabloc 1 mM + centrifugation 18000 rpm, 10 min, 4°C	Glutathion sépharose 4B, OVN, 4°C	Glutathion 30 mM en tampon Tris 100 mM, NaCl 120 mM, pefabloc 1 mM, pH 8	Pureté > 90%. Utilisation des fractions positives pour immunisation lapin. 3 bandes dominantes : GST, GST_CP2Ct, Bande lourde inconnue

Table 5 : étapes de production (expression) et purification de la protéine tronquée C terminale, GST_CP2Ct. TB : terrific broth, 2XYT : double yeast-tryptones, Amp : ampicilline, Clp : chloramphenicol, Ile : isoleucine, Leu : leucine, Arg : arginine; (NH₄)₂. SO₄ : sulfate d'ammonium, Ac : anticorps polyclonaux.

3.2.6. Vérification des protéines tronquées et des immunosérums produits contre ceux-ci par Western Blot.

3.2.6.1. Western Blot.

Les anticorps dirigés contre totalité ou partie de la CPB2FM sont utilisés à la dilution 1/500. Les anticorps secondaire anti-lapin sont utilisés à la dilution 1/1500. La révélation de la réaction est réalisée avec les réactifs NBT BCIP (Nitro Blue Tetrazolium chloride / 5, bromo- 4, chloro- 3, indol phosphate).

3.2.6.2. Vérification des immunosérums.

Les sérums obtenus contres ces 2 protéines ont été utilisés en Western Blot sur du surnageant de *Bacillus subtilis* transformé par le pBLTS72-cpb2FM et comparés aux anticorps polyclonaux obtenus contre CPB2FM (Lebrun et al., 2007).

3.2.6.3. Vérification des protéines produites dans cette étude.

La reconnaissance des protéines tronquées GST-CPB2Ct et CPB2Nt-BlaP par les anticorps dirigés contre la forme mature de la toxine (CPB2FM) (Lebrun et al., 2007) a été vérifiée sur la fraction périplasmique obtenue par choc osmotique par le froid de culture de *E. coli* SF120 transformées (i) par pGEX(5x-1)-GST_cpb2Ct (2 XYT, Amp100) ou (ii) par pGEM-cpb2Nt_BlaP (2 XYT, Amp50, Spc100). Une protéine de haut poids moléculaire a été co-purifiée avec la GST_CPB2Ct

3.3. Résultats et discussion

3.3.1. Production des protéines tronquées

Les protéines fusion exprimées en *E. coli* S120 (protéases déficiente) se retrouvent principalement dans la fraction périplasmique et sont toutes deux visibles en SDS-PAGE. Cette souche semble particulièrement bien adaptée à la production des 2 protéines tronquées de cette étude.

3.3.1.1. Protéine tronquée N-terminale : CPB2Nt_BlaP

Les fractions d'intérêt obtenues en *E. coli* DH5 α ont une pureté supérieure à 80% et serviront à vérifier les anticorps produits contre la forme mature de CPB2 et la protéine tronquée N-terminale.

Les fractions d'intérêt obtenues en *E. coli* SF120 ont une pureté en CPB2Nt-BlaP supérieure à 90% et ont été utilisées pour l'obtention d'anticorps polyclonaux (**Figure 3**).

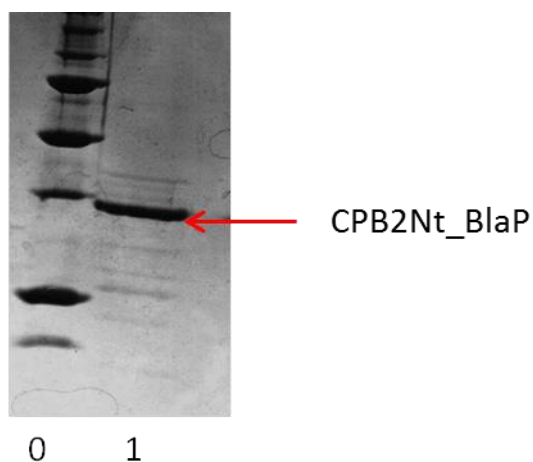


Figure 3 : CPB2Nt_BlaP purifiée: 0 : Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-rad®), 1 : Fraction périplasmique *E. coli* S120 pSPC-BlaP-CPB2Nt, purifiée (Q et S sépharose FF) ; SDS-PAGE 15%.

3.3.1.2. Protéine tronquée C-terminale : GST_CPB2Ct

Les fractions d'intérêt obtenues en *E. coli* SF120 ont une pureté en GST_CPB2Ct supérieure à 90% et ont été utilisées pour l'obtention d'anticorps polyclonaux. Sur SDS-PAGE on peut observer 3 bandes protéiques dominantes correspondant à la GST, la GST_CPB2Ct et une protéine de haut poids moléculaire inconnue. Le séquençage N-terminal de cette protéine a permis de déterminer qu'elle est apparentée à la famille des GroEL, protéines qui servent de chaperones à d'autres (**Figure 4**). La co-production et co-purification d'une protéine de la famille des GroEL avec la GST_CPB2Ct est un aspect qui mériterait d'être approfondi. On sait en effet que ces protéines ont pour but d'améliorer l'efficacité du repliement de certaines protéines amphiphiles et que la bonne conformation d'une protéine est souvent indissociable d'une activité optimale (Weissman, 2001).

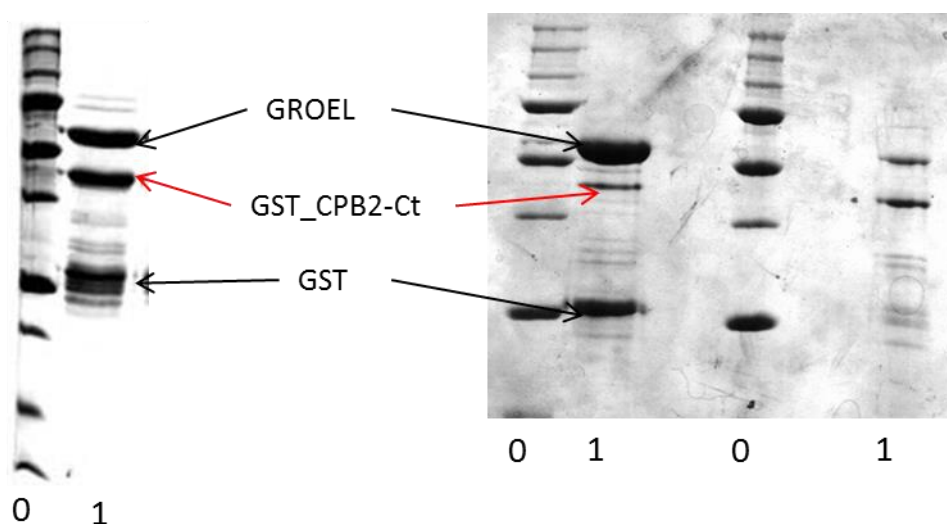


Figure 4 : GST_CPB2-Ct purifiée et co-purification d'une GROEL : 0 : Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-rad®).1 : Fractions périplasmiques d'*E. coli* S120 transformée avec le pGEX(5x-1)-CPB2 Ct, purifiées (glutathion sépharose 4B) ; SDS-PAGE 15%.

3.3.2. Western Blotting

3.3.2.1. Détection de la forme mature par les anticorps produits contre les protéines tronquées N et C-terminales

Les anticorps obtenus par immunisation contre CPB2Nt_BlaP et GST_CPB2Ct sont capables de détecter la CPB2FM produite en *B. subtilis*, sans présenter de réaction croisée avec d'autres protéines de *B. subtilis*.

3.3.2.2. Détection des protéines tronquées N et C-terminales

Leur parenté avec la CPB2FM est confirmée par Western Blot. En effet, les anticorps contre CPB2FM sont capables de les détecter de façon spécifique. La réaction est plus intense vis à vis de CPB2Ct (**Figure 5**).

Les protéines fusion supportent donc les étapes de purification. Et ni la présence de la protéine porteuse, ni la taille des fragments de CPB2 ne semblent être un obstacle à leur reconnaissance par les anticorps polyclonaux produits précédemment contre la forme mature de la toxine.

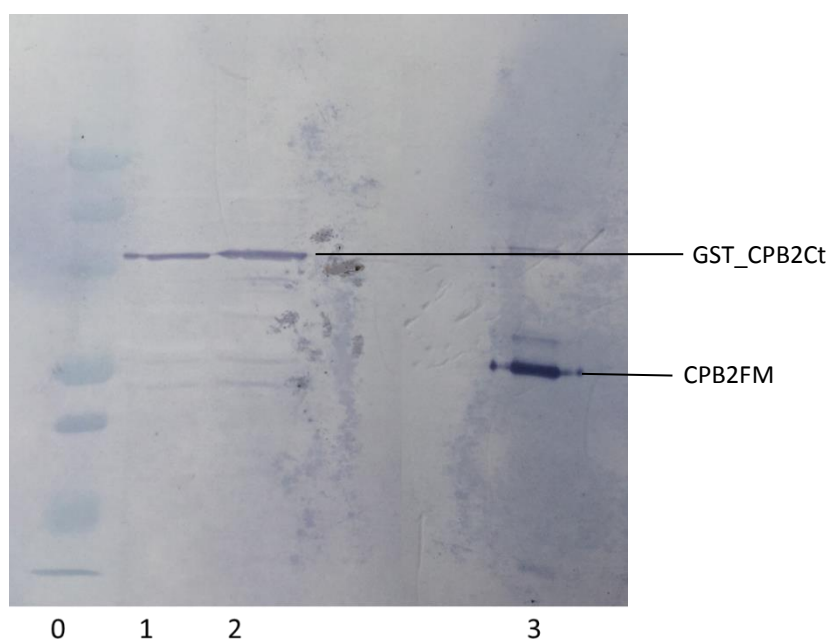


Figure 5 : Détection par Western Blot de GST_CPB2-Ct avec les Ac polyclonaux contre CPB2FM (1/500). GST-CPB2_Ct issue d'une extraction par choc osmotique de la fraction périplasmique de *E. coli* SF120 transformée par le pGEX_{5x-1}_cpb2-Ct : (1)20µl ; (2) : 40 µl. CPB2FM (3) 10 µl. Ac CPB2FM à 1/500 ; Ac secondaires à 1/1500. Echelle: Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-rad®)

Le faible taux de détection de CPB2Nt_BlaP par les anticorps polyclonaux anti-CPB2FM semble sans relation directe avec son immunogénicité, si on se réfère à la capacité des anticorps anti-CPB2Nt_BlaP à détecter tant CPB2Nt_BlaP que CPB2FM. La taille du peptide N-terminal, inférieure au C-terminal, joue par contre peut-être en sa défaveur (**figures 6 et 7**).

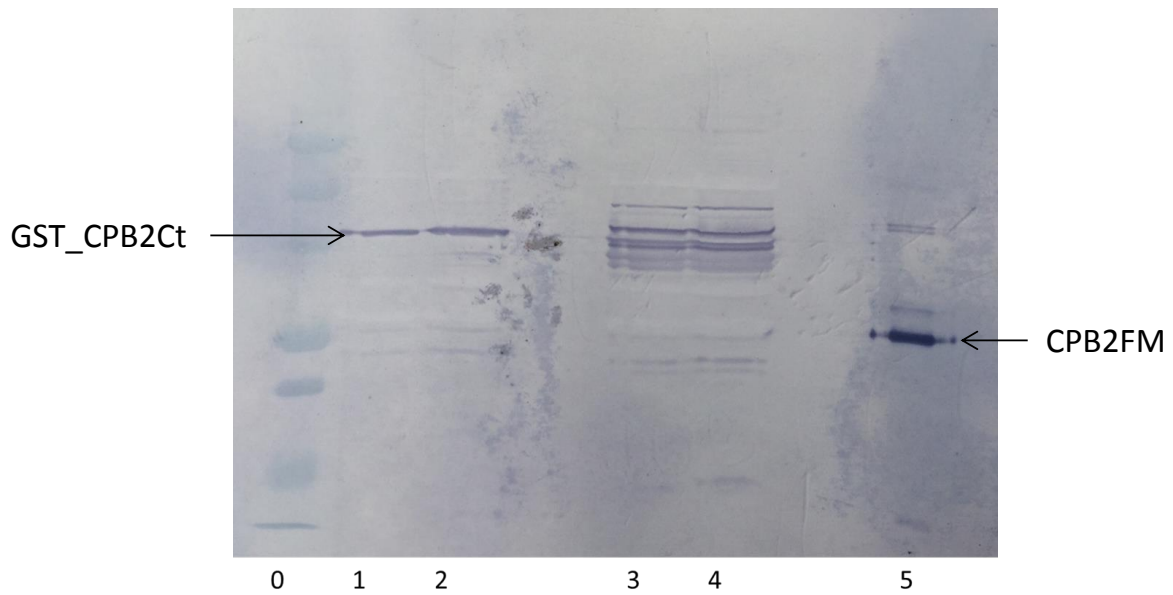


Figure 6 : Détection par Western Blot de GST-CPB2-Ct avec les Ac polyclonaux contre CPB2FM (1/500). Extraction par choc osmotique de la fraction périplasmique de *E. coli* SF120 transformée par le pGEX_{5x-1}-cpb2-Ct : GST-CPB2-Ct (1 :20μl ; 2 : 40 μl) ou par le pSPC72_cpb2Nt_BlaP : CPB2Nt_BlaP (3 : 20μl ; 4 : 40μl). CPB2FM (5) 10 μl. Ac CPB2FM à 1/500 ; Ac secondaires à 1/1500. Echelle: Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-rad®)

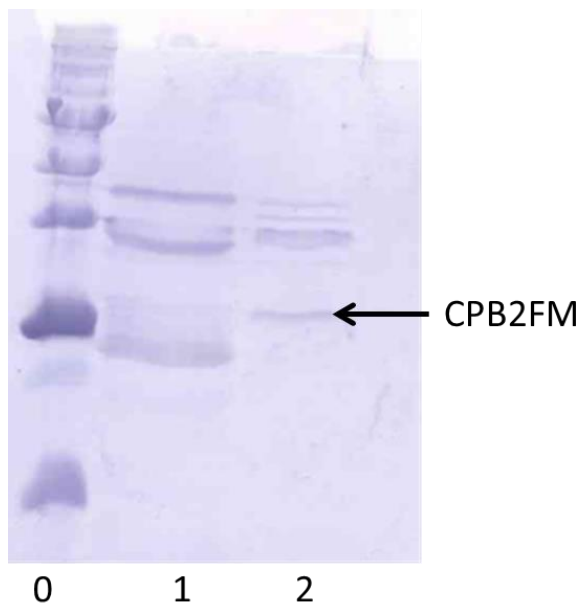


Figure 7 : Western Blot avec les anticorps produits contre CPB2-Nt_BlaP. Antigènes 1 : surnageant *B. subtilis* IS10 transformé par pBLTS72_CTD (témoin) surnageant concentré 10x ; 2 : surnageant *B. subtilis* IS10 transformé par pBLTS72_cpb2FM surnageant non concentré. Anticorps primaires (lapin) anti-CPB2Nt_BlaP : 1/500. Anticorps secondaires (souris) anti-lapin : 1/1500. Echelle (0): Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-rad®)

3.4. Conclusions

Si un des objectifs de départ était de savoir produire CPB2 à un niveau industriel, la faible efficacité de production atteinte pour CPB2FM nous a fait envisager la production de protéines tronquées. À volumes de culture comparables, les quantités de protéines obtenues pour les protéines fusions N- et C- terminales sont nettement supérieures à celle de CPB2FM. En effet, pour obtenir une protéine purifiée à des concentrations comparables, il aura fallu plus de 50L pour CPB2FM contre 1 à 5L pour les protéines tronquées. Leur apparente stabilité lors de la purification est également un avantage et peut-être une des raisons des meilleurs rendements obtenus après purification. Les protéines ainsi obtenues ont pu être utilisées à des fins d'immunisation. Néanmoins, l'impact de la protéine porteuse sur l'antigénicité de ces constructions n'a pas été déterminé. Elle pourrait avoir un impact négatif, surtout concernant la protéine N-terminale dans laquelle la protéine porteuse a un poids moléculaire supérieur à la protéine d'intérêt.

ÉTUDES 4-5-6 : ÉTUDE ÉPIDÉMIOLOGIQUE DE LA TOXINE BETA2 CHEZ LES BOVINS DANS LE CONTEXTE DE L'ENTÉROTOXÉMIE.

Les 3 premières études se sont focalisées sur la production de la toxine CPB2 d'origine bovine et la création d'outils permettant sa détection. La seconde partie du travail s'est attachée à l'étude épidémiologique de *cpb2*/CPB2 en s'appuyant sur ces outils.

L'objectif des deux premières études était de comparer les prévalences du gène *cpb2* et de la toxine CPB2 dans des populations cas/témoin (bovins cas morts d'entérototoxicité / bovins témoins sains à l'abattoir). La première étude de terrain a été réalisée sur des veaux d'élevages dits conventionnels la deuxième sur des veaux de boucherie. La troisième étude s'est focalisée sur l'analyse des séquences de *cpb2* bovines, y compris la séquence en amont de *cpb2fm*.

La première étude sur les veaux d'élevage a montré une prévalence significativement plus élevée du gène *cpb2* chez les veaux cas (68%, 28/41) que chez les veaux témoins (46%, 40/87). Les souches positives ont été testées pour déterminer le type d'allèle présent (consensus « porc » versus atypique « non porc ») et leur capacité à exprimer la CPB2. Chez les premiers (cas), le gène *cpb2* était systématiquement de type consensus et CPB2 était exprimée dans 64% des cas (18/28). Chez les seconds, les deux allèles étaient présents : 67,5% des *cpb2* étaient de type consensus (27/40) dont 22% étaient exprimés (6/27), alors que 32,5% des *cpb2* étaient de type atypique (13/40) dont 69% étaient exprimés (9/13). En conclusion, chez les souches de bovins morts d'entérototoxicité la présence de *cpb2* (consensus) et la capacité d'expression est significativement plus élevée. Et certaines souches porteuses de l'allèle atypique de *cpb2* sont capables d'exprimer CPB2.

Dans la seconde étude, menée sur des veaux de boucherie, le gène *cpb2* n'a été détecté que chez des veaux morts d'un syndrome « enterotoxaemia-like », avec une prévalence de 20% (19/92), inférieure à celle de la première étude. Au sein des animaux et des souches *cpb2* positives, l'allèle atypique était le plus fréquent (74%, 14/19). Aucune expression n'a été mise en évidence, quel que soit l'allèle de *cpb2* présent, ce qui contraste avec les résultats de la première étude. Dans ce contexte, aucune relation n'a pu être mise en évidence entre la présence du gène *cpb2* consensus, la toxine CPB2 et les symptômes « enterotoxaemia-like ».

L'objectif de la troisième étude était le séquençage de plusieurs gènes *cpb2*, consensus et atypique, d'origine bovine. La comparaison des séquences des *cpb2* bovins aux séquences déjà publiées, a permis de définir trois clusters : (i) cluster 1 : les *cpb2* consensus bovins et le *cpb2* du pCPC13 (plasmide de référence) auquel elles sont fortement apparentées (>99%); (ii) cluster 2 : les *cpb2* consensus d'origine porcine (~94% d'identité avec le cluster 1) ; (iii) cluster 3 : les *cpb2* atypiques quelle que soit leur espèce d'origine (~75% d'identité avec les 2 autres clusters). Cette troisième étude a aussi permis l'analyse de la séquence en amont de *cpb2fm*. Elle a mis en évidence une séquence promotrice correspondant à une protéine excrétée dans le milieu extracellulaire. Dans le peptide signal, la délétion d'une adénine (6 au lieu de 7) qui engendre un stop précoce est fréquente chez les souches bovines. Néanmoins, elle n'empêche pas systématiquement l'expression de CPB2. Ce maintien de l'expression pourrait être dû à la présence d'un autre ATG au début de l'ORF chez *cpb2* d'origine bovine et/ou au rétablissement de l'ORF grâce au mécanisme de codons glissants.

En conclusion : (i) les souches de *C. perfringens* isolées de veaux morts d'entérototoxicité sont significativement plus fréquemment porteuses du gène *cpb2* et du variant consensus de ce gène que celles présentes chez les veaux sains ; (ii) l'expression de l'allèle *cpb2* consensus est significativement

plus fréquente chez les souches isolées de veaux morts d'entérotoxémie que chez celles isolées de veaux sains et l'allèle *cbp2* atypique présent chez ces dernières peut également être exprimé ; (iii) les résultats chez les veaux de boucherie sont différents et posent la question des rôles de *C. perfringens* et du gène *cbp2* dans le syndrome « enterotoxaemia-like » observé dans ces élevages ; (iv) les gènes *cbp2* bovins sont répartis dans deux groupes, l'un constitué des *cbp2* consensus bovins et du gène *cbp2* du pCP13 , l'autre des *cbp2* atypiques de toutes espèces ; (v) les différences d'expression in vitro ne peuvent être expliquées à ce stade par l'analyse des séquences promotrices et des ORF.

4. THE EXPRESSION OF *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* CONSENSUS BETA2 TOXIN IS ASSOCIATED WITH BOVINE ENTEROTOXAEMIA SYNDROME.

M. Lebrun ^a, P. Filée ^b, B. Mousset ^a, D. Desmecht ^c, M. Galleni ^b, J.G. Mainil ^a, A. Linden ^a
Veterinary Microbiology. 2007, **120** :151-157.

^a Department of Infectious and Parasitic Diseases (Bacteriology), Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège 4000, Belgium

^b Department of Chemistry, Centre of Protein Engineering (Centre d'Ingénierie des Protéines), Faculty of Sciences, University of Liège, Liège 4000, Belgium

^c Department of Morphology and Pathology (Pathology), Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège 4000, Belgium

Après 3 études concernant la production de CPB2 d'origine bovine et la création d'outils permettant sa détection, ici commence la partie de ce travail qui concerne l'étude épidémiologique de cpb2/CPB2 s'appuyant sur ces outils. Cette première étude épidémiologique porte sur une population de bovins issus d'élevages dits conventionnels, c'est-à-dire qu'il ne s'agit pas de veaux blancs ou d'engraissement. L'objectif est de déterminer les prévalences de la toxine et de son gène dans une population cas (bovins morts d'entérotoxémie) et une population témoin (bovins sains abattus).



The expression of *Clostridium perfringens* consensus beta2 toxin is associated with bovine enterotoxaemia syndrome

M. Lebrun^{a,*}, P. Filée^b, B. Mousset^a, D. Desmecht^c, M. Galleni^b,
J.G. Mainil^a, A. Linden^{a,**}

^a Department of Infectious and Parasitic Diseases (Bacteriology), Faculty of Veterinary Medicine,
University of Liège, Liège 4000, Belgium

^b Department of Chemistry, Centre of Protein Engineering (Centre d'Ingénierie des Protéines), Faculty of Sciences,
University of Liège, Liège 4000, Belgium

^c Department of Morphology and Pathology (Pathology), Faculty of Veterinary Medicine,
University of Liège, Liège 4000, Belgium

Received 11 May 2006; received in revised form 12 October 2006; accepted 17 October 2006

Abstract

Clostridium perfringens has been implicated in a broad array of enteric infections including the fatal haemorrhagic enteritis/enterotoxaemia syndrome in cattle. The beta2 toxin (CPB2), encoded by *cpb2*, is suspected to be implicated in this syndrome. However, among *C. perfringens* isolates from cattle suspected of clostridial disease, an atypical allele was recently found to predominate at the *cpb2* locus and atypical corresponding CPB2 proteins were shown to be poorly expressed, thus arguing against a biologically significant role of the beta2 toxin in clostridial diseases in cattle. This study compared genotype and phenotype of the beta2 toxin between *C. perfringens* isolates from a group of healthy calves ($n = 14$, 87 isolates) and from a group of enterotoxaemic calves ($n = 8$, 41 isolates). PCR results revealed the exclusive presence of the typical “consensus” *cpb2* in the enterotoxaemic group. Western blot analysis demonstrated that the typical variant of CPB2 was often expressed in isolates from enterotoxaemic calves (43.9%) and infrequently in isolates from healthy cattle (6.9%). These data suggest that the typical variant of the CPB2 toxin may play a role in the pathogenesis of cattle enterotoxaemia.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Clostridium perfringens*; Bovine enterotoxaemia; Beta2-toxin; Atypic allele; Expression

* Corresponding author at: Veterinary Bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Colonster Boulevard, 20, B43, 4000 Liège-Sart Tilman, Belgium. Tel.: +32 4 366 4051; fax: +32 4 366 4122.

** Corresponding author at: Veterinary Bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Colonster Boulevard, 20, B43, 4000 Liège-Sart Tilman, Belgium.

E-mail addresses: maude.lebrun@ulg.ac.be (M. Lebrun), a.linden@ulg.ac.be (A. Linden).

1. Introduction

The Gram-positive, spore-forming, anaerobe *Clostridium perfringens* is an important human and veterinary pathogen. This bacterium can produce at least 15 different toxins, helping to explain its ability to cause a broad array of enteric and histotoxic infections (Songer, 1996; Rood, 1998; Petit et al., 1999; Smedley et al., 2004).

C. perfringens isolates are classified into one of five types (A–E) on the basis of differential production of the four toxins alpha, beta, epsilon and iota, and according to specific animal hosts. Besides these “typing” toxins, other toxins may also be involved in the pathogenesis of specific diseases in specific hosts, including the beta2 toxin (CPB2) which is postulated to play a role in *C. perfringens* neonatal enteritis in pigs (Gibert et al., 1997), typhlocolitis in horses (Herholz et al., 1999; Bacciarini et al., 2003) and dogs (Thiede et al., 2001), cattle enterotoxaemia (Manteca et al., 2002) and gastrointestinal disease in man (Fisher et al., 2005).

The pathogenic role of CPB2 was first suspected on the basis of *in vitro* studies (Gibert et al., 1997; Smedley et al., 2004; Fisher et al., 2005). The ligated intestinal loop model in anaesthetized calves (Manteca et al., 2002) also suggested that CPB2 could cause jejuno-ileal lesions. In field studies, a strong correlation was demonstrated by the high prevalence of *cpb2* in isolates from piglets with enteritis and the absence of *cpb2* from isolates from healthy piglets (Klaasen et al., 1999; Garmory et al., 2000; Bueschel et al., 2003; Waters et al., 2003). Moreover, since allelic variants of *cpb2* have been identified (Gibert et al., 1997), isolates from diseased piglets were shown to harbour the same “consensus” variant (*cpb2*^{con}) and to express the corresponding CPB2 variant (CPB2^{con}) (Bueschel et al., 2003; Jost et al., 2005). Such a clear-cut allelic disequilibrium strengthens the evidence for the role of this CPB2 variant (CPB2^{con}) in the pathogenesis of neonatal pig enteritis/diarrhoea.

Among *C. perfringens* isolates from non-porcine species however, including isolates from cattle suspected of clostridial disease, another variant of *cpb2* was found to predominate (Jost et al., 2005), which encodes for an atypical CPB2 toxin (CPB2^{aty}). The latter only displays 62.3% identity and 80.4% similarity to that encoded by the typical *cpb2*^{con} allele

and, strikingly, is not expressed (Jost et al., 2005). Furthermore, in the subset of non-porcine *C. perfringens* isolates possessing the *cpb2*^{con} allele, about half express a truncated CPB2^{con} due to an adenosine insertion leading to a premature stop codon (Jost et al., 2005; Fisher et al., 2005). These observations led to the recent suggestion that, unlike in piglets, CPB2 does not play a role in the pathogenesis of clostridial enteric diseases in cattle.

The aim of this study was to compare the prevalence of *cpb2* alleles and corresponding CPB2 variants production by *C. perfringens* isolates from healthy calves and from diseased calves which died from a fatal haemorrhagic enteritis/enterotoxaemia syndrome.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Eight Belgian blue calves were selected with the following criteria: (i) a history of peracute death (without any previous signs of disease), (ii) segmental haemorrhagic jejunitis/ileitis at necropsy and (iii) $>10^6$ colony forming units (CFU) of *C. perfringens* per millilitre (ml) of haemorrhagic intestinal fluid. The control (healthy) animals consisted of 14 Belgian Blue cattle which (i) had successfully completed a clinical preslaughter examination by a veterinarian, (ii) displayed no macroscopic lesions of the digestive tract and (iii) of which jejunal *C. perfringens* counts were less than 10^3 CFUs per ml of jejunal fluid.

2.2. Growth conditions for bacterial isolation and amplification

All *C. perfringens* field isolates used in this study were obtained from samples of jejuno-ileal fluid taken in the Faculty of Veterinary Medicine's necropsy room (enterotoxaemic group, $n = 8$, 41 isolates) and in a local slaughterhouse (control group, $n = 14$, 87 isolates). The *cpb2* positive control was the porcine *C. perfringens* reference strain CWC 245 (Gibert et al., 1997). Aliquots of jejunal fluid were plated onto Perfringens Agar plus OPSP (Oxoid®), supplemented with 5% bovine blood and grown at 37 °C in an H₂/CO₂/N₂ atmosphere (10/10/80). Jejuno-ileal fluids from enterotoxaemic animals had been first diluted to

10⁶. Once low density individual colonies were obtained, 4–7 isolates were picked up from each animal, typed by PCR and stored frozen (in BHI, glycerol 10%, –20 °C). *Escherichia coli* (*E. coli*) strain DH5 α (Invitrogen®) and *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) strain 168 (ATCC no. 23857) were used for cloning and recombinant CPB2 production, respectively. They were grown at 37 °C in Luria-Bertani (LB) and Terrific broth (TB) or on LB/TB agar plates. For growth of recombinant *E. coli* or *B. subtilis*, either ampicillin (100 μ g ml⁻¹, Sigma®) or kanamycin (10 μ g ml⁻¹, Sigma®), respectively were added to the appropriate media.

2.3. DNA and protein engineering techniques

Genomic DNA from *C. perfringens* was isolated by the method of Herholz et al. (1999). *E. coli* and *B. subtilis* plasmid DNA extraction, transformation, DNA restriction, ligation, agarose gel electrophoresis, and transfer to nylon membranes were performed essentially as previously described (Maniatis et al., 1982). Automated nucleotide sequencing was performed by the core DNA sequencing platform of the University of Liège. Production of recombinant CPB2^{con} was performed using standard procedures. Briefly, the *cpb2*^{con} coding sequence, lacking the coding region for the signal sequence, was amplified as a 708-bp product from a *C. perfringens* field (enterotoxaemic) bovine isolate by PCR with an upper primer containing a *SacI* site (*SacI*-CDS = 5'-GAGCTCAGGCCAAAGAAATCGA CGCTTATAGAAAGGTAATGG-3') and a lower primer containing an *EcoRI* site (*EcoRI*-CDS = 5'-GAATTCCTATGCACAATACCCTTC ACC-3') (according to the sequence published by Gibert et al., 1997). The PCR product was digested with *SacI*-*EcoRI* and cloned into pGEM-TEasy (Promega®), generating pGEM-TEasy-BETA2. A series of DNA sequencing of the insert portion of pGEM-TEasyBETA2 gave a *cpb2*^{con} sequence whose translation yielded an expected CPB2^{con} (GenBank identification number: DQ525205) very close to that previously published (Gibert et al., 1997). The pGEM-T Easy-BETA2 was purified and digested with *SacI* and *EcoRI* endonucleases (Amersham Biosciences®). The DNA fragment corresponding to CPB2^{con} was separated by agarose gel electrophoresis, purified and ligated in the

expression vector: pBLTS72 (C.I.P. plasmid), preliminarily also digested with *SacI* and *EcoRI* endonucleases, to give pBLTS72-CPB2^{con}. Recombinant CPB2^{con} was purified from *B. subtilis* concentrated supernates to >85% homogeneity using successively S-sepharose resin, then Q-sepharose resin and finally isopropyl column (Amersham Biosciences®). After ultimate confirmation was obtained by NH₂-terminal aminoacid sequencing, the final product was used for immunisation of rabbits.

2.4. PCR detection of toxinotypic patterns

Typing of *C. perfringens* isolates gathered for the study was made on the basis of a multiplex PCR aimed at detecting the *cpa*, *cpb*, *cpe*, *ibp* and *etx* genes according to Garmory et al. (2000). The PCR products were identified by UV transillumination, following electrophoresis through a 1.5% agarose gel containing 1.5 μ g/ml ethidium bromide. The 128 isolates screened were all of type A (41 principals and 87 controls), the isolate CWC-245 taken as a reference excepted (type C). Both *cpb2*^{con} and *cpb2*^{aty} alleles were then detected by a second PCR protocol (triplex) using a mix of *cpb2* allele-specific forward primers (5'-CAATTGGGGGAGTTTATCCACAA-3' for *cpb2*^{con} and 5'-ATTATGTTTAGGAATAC AGTTA-3' for *cpb2*^{aty}) with a common reverse primer (5'-CA ATACCCTTCACC AAATACTC-3'), according to Jost et al. (2005). The PCR was performed by using *Taq* DNA polymerase (Roche®) and the supplied reaction buffer and the following scenario: (i) a 5-min hot start at 95 °C, (ii) 35 cycles, with 1 cycle consisting of 1 min at 94 °C, 1 min at 55 °C, and 1 min at 72 °C followed by (iii) a final extension step at 72 °C for 7 min. Production of 304-bp (CWC-245 isolate) or 741-bp (local bovine isolate ML-2) amplicons was confirmed to be specific of the *cpb2*^{con} and *cpb2*^{aty} alleles, respectively.

2.5. Western blot analyses of CPB2 production

The 128 type-A *C. perfringens* isolates were grown in anaerobic brain heart infusion broth (Oxoid) supplemented with 0.5% yeast extract and 0.05% cysteine at 37 °C for 12 h. The culture supernatant fluid (CSF) was harvested by centrifugation and passed through a 0.22 μ m-pore-size filter (Millipore®). The

CSF was then concentrated 40-fold by ultrafiltration through a 10,000-molecular weight cut-off filter (Amicon) (Millipore®), and CPB2 was detected by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting with our rabbit primary polyclonal antiserum (1/1000) followed by an appropriate goat secondary antiserum coupled to alkaline phosphatase (1/1500) (Promega®). Revelation was performed with nitroblue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate reagents (Promega®). Positive control lanes loaded either with purified CPB2^{con} or with the CSF from control *cpb2*^{con} + (CWC-245) and *cpb2*^{aty} + (ML-2) strains were always included.

2.6. Statistical analysis

Prevalences of gene (*cpb2*), allele (*cpb2*^{con} or *cpb2*^{aty}) and CPB2^{con}/CPB2^{aty} production were computed within each group (enterotoxaemic and control). Chi-square and Fisher exact Test analyses were used to test the hypothesis that these prevalences were homogeneously distributed among both groups. For the hypothesis test, differences were assumed as significant at $p < 0.05$ (confidence interval of 95%).

3. Results

All the genotyping/phenotyping data are presented in Table 1. The frequencies of *cpb2*-positive isolates were different between the set of isolates from

enterotoxaemic group (68%, 28/41) and that from control group (46%, 40/87) with $p = 0.018$ (Chi-square) and $p = 0.014$ (Fisher test).

The PCR protocol aimed at differentiating between known alleles at the veterinary *cpb2* locus consistently gave clear results. Among *cpb2*⁺ isolates from enterotoxaemic group, 100% (28/28) were harbouring the *cpb2*^{con} allele, whereas only 67.5% (27/40) harboured this allele among *cpb2*⁺ isolates from control group. Thus, as a whole, 68.3% (28/41) of the isolates from enterotoxaemic group possessed the *cpb2*^{con} allele against 31% (27/87) of the set drawn from control group. There was also a difference ($p < 0.001$, Chi-square, and $p < 0.001$, Fisher test).

The protein engineering protocol yielded a recombinant CPB2^{con}. The rabbit polyclonal antiserum mounted against this recombinant protein allowed specific detection of a single band at ~28 kDa on Western blots of CSFs, whether they originated from a CPB2^{con} - or CPB2^{aty} - producing isolate (*cpb2* + *con* and *cpb2* + *aty*) (Figs. 1 and 2). NH2-terminal aminoacid sequencing of excised bands indeed retrieved the expected toxin.

With respect to CPB2^{con} expression, 64.3% (18/28) and 22.2% (6/27) of *cpb2*^{con}-positive isolates were also positive on Western blots among isolates from the enterotoxaemic and control groups, respectively (Table 1). Thus, as a whole, 43.9% (18/41) of the isolates from the enterotoxaemic group duly expressed CPB2^{con}, against 6.9% (6/87) among that from controls ($p < 0.001$, Chi-square, and $p < 0.001$, Fischer test).

Table 1
Genotypic and expression data from the 128 toxinotype-A *Clostridium perfringens* isolates

	Enterotoxaemic group (isolates selected for analysis ^a = 41)				Control group (isolates selected for analysis ^a = 87)			
	<i>cpb2</i> ^{-b}		<i>cpb2</i> ^{+b}		<i>cpb2</i> ^{-b}		<i>cpb2</i> ^{+b}	
	13 (32%)	28 (68%)	47 (54%)	40 (46%)				
	Enterotoxaemic group (isolates selected for analysis ^a =41)				Control group (isolates selected for analysis ^a =87)			
	304 bp	741 bp	304 bp	741 bp	304 bp	741 bp	304 bp	741 bp
PCR-positive clones for said amplicon ^c	0 (0%)	0 (0%)	28 (100%)	8 (0%)	8 (0%)	8 (0%)	27 (67.5%)	13 (32.5%)
WB-positive clones for CPB2	0 (0%)	0 (0%)	18 (64.3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (22.2%)	9 (69.2%)
CPB2 ^{con} producing clones	18(43.9%)				6(6.9%)			

^a The selected isolates displayed the same toxinotypic pattern: α^+ , $\beta 1^-$, ϵ^- , ι^- and enterotoxin⁻, as determined by PCR.

^b *cpb2* genotypes.

^c The 304- and 741-bp amplicons are specific for *cpb2*^{con} and *cpb2*^{aty} alleles, respectively according to Jost et al. (2005).

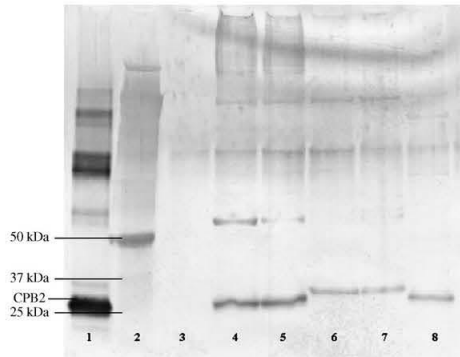


Fig. 1. Western blot with supernatant of *Clostridium perfringens* from healthy cattle (slaughterhouse, control group). Rabbit primary polyclonal antiserum (1/1000), goat secondary antiserum coupled to alkaline phosphatase (1/1500). Lane 1: purified recombinant CPB2^{con} (2 μl), lane 2: molecular weight ladder All blue precision plus protein prestained standard (BioRad®), lanes 3–10: 10 μl TCA concentrated supernatant of *C. perfringens* from healthy cattle (T). Lane 3, T1.4; lane 4, T6.3 (*cpb2*^{at}); lane 5, T6.4 (*cpb2*^{at}); lane 6, T7.2 (*cpb2*^{con}), lane 7, T7.3 (*cpb2*^{con}), lane 8, T8.1 (*cpb2*^{at}). Positive spots from T7.2 (*cpb2*^{con}) and T7.3 (*cpb2*^{con}) strains seem to be slightly lighter than those from *cpb2*^{at} strains.

Finally, among the isolates that were PCR-positive for *cpb2*^{at}, which were concentrated in the set of isolates picked up from controls, 69.2% (9/13) duly expressed CPB2^{at}.



Fig. 2. Western blot with supernatant of *C. perfringens* from enterotoxaemic cattle (necropsy, enterotoxaemic group). Rabbit primary polyclonal antiserum (1/1000), goat secondary antiserum coupled to alkaline phosphatase (1/1500). Lane 1: purified recombinant CPB2^{con} (2 μl), lane 2: molecular weight ladder All blue precision plus protein prestained standard (BioRad®), lane 3–10: 10 μl TCA concentrated supernatant of *C. perfringens* from enterotoxaemic cattle (C). Lane 3, C3.2.1; lane 4, C3.2.2; lane 5, C3.2.3; lane 6, C3.2.4; lane 7, C3.5.1; lane 8, C3.5.2; lane 9, C3.5.3; lane 10, C3.5.4.

4. Discussion

This study clearly demonstrated the strong correlation between the prevalence of a specific variant of CPB2 expression by *C. perfringens* isolates from cattle with peracute segmental haemorrhagic enteritis/enterotoxaemia syndrome, and the relative absence of such expression among isolates representative of the intestinal *C. perfringens* flora of healthy cattle. To our knowledge, this is the first report suggesting an association between the CPB2^{con} variant and spontaneously occurring enterotoxaemia in cattle. Together with the demonstration by Manteca et al. (2002), in the intestinal ligated loop assay, that *cpb2*-positive isolates of *C. perfringens* produce more pronounced intestinal lesions than an isolate lacking *cpb2*, the results gathered here suggest that CPB2^{con} is either a marker of virulence or a true cofactor in the pathogenesis of the disease, and therefore, a potential candidate for use in future vaccinations. In contrast, the absence of the second allele, *cpb2*^{at}, among these isolates suggests that the corresponding variant CPB2^{at} does not play a role. If CPB2^{con} acts as a cofactor instead of a simple marker of virulence, then it is postulated that the cytopathic activity associated with CPB2^{at} expression is probably weaker (or perhaps not even pathogenic at all) than that reported for CPB2^{con} (Fisher et al., 2005).

The allelic frequencies among *cpb2*-positive isolates from the normal calves in our study were approximately two-thirds (consensus) and one-third (atypical), which suggests that both alleles are widespread in cattle isolates. This result contrasts dramatically from data published recently in which the scarcity of the *cpb2*^{con} variant in non-porcine species was emphasized (Jost et al., 2005). Perhaps, geographic differences between the type of *cpb2* alleles in non-porcine *C. perfringens* could explain the different results, as suggested by Jost et al. (2005).

The present study showed also that among the *cpb2*^{con}-positive isolates, the genotype/phenotype correlation was significantly higher among isolates from enterotoxaemic calves than in normal cattle (64% expression versus 22%). As the absence of CPB2 expression in non-porcine isolates has been assigned to a frameshift mutation causing a very premature stop codon (Jost et al., 2005; Fisher et al., 2005) or to an extremely low level of undetectable expression (Waters et al., 2005), the difference might result from

the intestinal expansion of only the consensus variant in diseased animals. Alternatively, differences in promoters may explain the difference. However, if the intestinal environment resulted in the selection of high-producing full-length CPB2^{con} promoter-ORF combinations, it suggests that the CPB2^{con} itself confers an advantage in certain circumstances.

Successful expression of CPB2^{aty} was detected in 69% of *cpb2*^{aty}-positive isolates, all originating from control animals, whereas this allele did not result in this expression in a previous study (Jost et al., 2005). Once more, differences in culture conditions may have reduced or increased the expression of CPB2^{aty}, promoters could be different or isolates may have been equipped or not in VirR/VirS-mediated regulation (Ohtani et al., 2003). However, the *cpb2*^{aty} allele should definitely not be considered as systematically turned off in cattle.

If the intestinal density of CPB2^{con}-producing isolates (*cpb2* + *con*) is different between healthy and enterotoxaemic cattle, then an important question arises: what are the factors causing the apparent selection of CPB2^{con}-producing clones (*cpb2* + *con*)? In other words, what kind of selective advantage is afforded to the bacteria by possessing the plasmid encoding CPB2^{con}? Answering this question would enable the development of strategies to prevent this serious disease.

In summary, this study offers several new contributions to our understanding of *C. perfringens*-associated peracute haemorrhagic enteritis/enterotoxaemia syndrome in cattle, enabling additional studies to be conducted on the role of CPB2 *in vivo* and on the environmental conditions leading to the explosion of a CPB2^{con}-producing population (*cpb2* + *con*). By demonstrating the exclusive presence of a specific allelic variant among isolates from diseased animals, and by showing the highest prevalence of isolates effectively producing the corresponding toxin variant in diseased compared to healthy animals, this study strengthens the possible role of a CPB2 specific variant in the pathogenesis of enterotoxaemia in cattle.

Acknowledgements

We thank Dr. J. Watts (Veterinary School, Liege, Belgium) for scientific advice. We are also grateful

to the scientific teams of the Department of Infectious Diseases and of Centre of Protein Engineering (University of Liege) for advice and technical assistance. In the same way, thank to the members of the Department of Morphology and Pathology (Veterinary School, Liege) and of the slaughterhouse of Droixhe (Liege, Belgium) for cattle sampling.

References

- Bacciarini, L.N., Boerlin, P., Straub, R., Frey, J., Gröne, A., 2003. Immunohistochemical localization of *Clostridium perfringens* β 2-Toxin in the gastrointestinal tract of horses. *Vet. Pathol.* 40, 376–381.
- Bueschel, D.M., Jost, B.H., Billington, S.J., Trinh, H.T., Songer, J.G., 2003. Prevalence of *cpb2*, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. *Vet. Microbiol.* 94, 121–129.
- Fisher, J.D., Miyamoto, K., Harrison, B., Akimoto, S., Serker, M.R., McClane, B.A., 2005. Association of beta2 toxin production with *Clostridium perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates carrying a plasmid enterotoxin gene. *Mol. Microbiol.* 56 (3), 747–762.
- Garmory, H.S., Chanter, N., French, N.P., Bueschel, D., Songer, J.G., Titball, R.W., 2000. Occurrence of *Clostridium perfringens* β 2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. *Epidemiol. Infect.* 124, 61–67.
- Gibert, M., Jolivet-Renaud, C., Popoff, M.R., 1997. Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene* 203, 65–73.
- Herholz, C., Miserez, R., Nicolet, J., Frey, J., Popoff, M., Gibert, M., Gerber, H., Straub, R., 1999. Prevalence of β 2-Toxigenic *Clostridium perfringens* in Horses with intestinal disorders. *J. Clin. Microbiol.* Feb. 358–361.
- Jost, B.H., Billington, S.J., Trinh, H.T., Bueschel, D.M., Songer, J.G., 2005. Atypical *cpb2* genes, encoding beta2-toxin in *Clostridium perfringens* isolates of nonporcine origin. *Infect. Immunol.* 73 (1), 652–656.
- Klaasen, H.L.B.M., Molkenboer, M.J.C.H., Bakker, J., Miserez, R., Häni, H., Frey, J., Popoff, M.R., van den Bosch, J.F., 1999. Detection of the β 2 toxin gene of *Clostridium perfringens* in diarrhoeic piglets in The Netherlands and Switzerland. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 24, 325–332.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., 1982. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Manteca, C., Daube, G., Jauniaux, T., Linden, A., Pirson, V., Dettleux, J., Ginter, A., Coppe, P., Kaekenbeeck, A., Mainil, J.G., 2002. A role for the *Clostridium perfringens* β 2 toxin in bovine enterotoxaemia? *Vet. Microbiol.* 86, 191–202.
- Ohtani, K., Kawsar, H.I., Okumura, K., Hayashi, H., Shimizu, T., 2003. The VirR/VirS regulatory cascade affects transcription

- of plasmid-encoded putative virulence gene in *Clostridium perfringens* strain 13. FEMS Microbiol. Lett. 222, 137–141.
- Petit, L., Gibert, M., Popoff, M.R., 1999. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. Trends Microbiol. 7, 104–110.
- Rood, J.I., 1998. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. Annu. Rev. Microbiol. 52, 333–360.
- Smedley, J.G., Fisher, D.J., Sayeed, S., Chakrabarti, G., Mc Clane, B.A., 2004. The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 152, 183–204.
- Songer, J.G., 1996. Clostridial enteric diseases of domestic animals. Clin. Microbiol. Rev. 9, 216–234.
- Thiede, S., Goethe, R., Amtsberg, G., 2001. Prevalence of β 2 toxin gene of *Clostridium perfringens* type A from diarrhoeic dogs. Vet. Rec. 149, 273–274.
- Waters, M., Savoie, A., Garmory, H.S., Bueschel, D., Popoff, M., Songer, J.G., Titball, R.W., McClane, B., Sarker, M.R., 2003. Genotyping and phenotyping of beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with gastrointestinal diseases in piglets. J. Clin. Microbiol. 41, 3584–3591.
- Waters, M., Raju, D., Garmory, H.S., Popoff, M.R., Sarker, M.R., 2005. Regulated expression of the beta2-toxin gene (*cpb2*) in *Clostridium perfringens* type a isolates from horses with gastrointestinal diseases. J. Clin. Microbiol. 43, 4002–4009.

5. ENTEROTOXAEMIA-LIKE SYNDROME AND *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* IN VEAL CALVES

Muylaert A.^a, Lebrun M.^b, Duprez J.N.^a, Labruzzo S.^a, Theys H.^c, Taminau B.^a, Mainil J.^a
Veterinary Record. 2010, **167** : 64-65. doi: 10.1136/vr.b4869.

^a Department of Infectious and Parasitic Diseases—Bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège 4000, Belgium.

^b ARSIA asbl (Regional association for Animal Health)—Ciney 5590, Belgium

^c Dierenarts at Sopraco NV.

Cette deuxième étude à caractère épidémiologique se penche sur l'importance de cpb2 dans les cas de mortalités subites de type entérotoxémie (Enterotoxaemic-like Syndrom) observés chez des veaux de boucherie donc dans un contexte d'élevage différent de l'étude précédente, d'où son intérêt.

Short Communications

Enterotoxaemia-like syndrome and *Clostridium perfringens* in veal calves

A. Muylaert, M. Lebrun, J-N. Duprez, S. Labruzzo, H. Theys, B. Taminiau, J. Mainil

SEVERAL enteritis/enterotoxaemia syndromes in mammals and birds are the consequence of an uncontrolled overgrowth of *Clostridium perfringens* invading the small intestine from the caecum and the colon and producing different exotoxins. In suckling beef calves the α , or CPA, and β 2, or CPB2, major toxins act in synergy to produce intestinal necrohaemorrhagic lesions. The CPA toxin subsequently transfers into the bloodstream and reaches the brain, causing sudden death (Manteca and Daube 1994, Songer 1996, Manteca and others 2002, Smedley and others 2004, Uzal and Songer 2003, Cooper and Songer 2009, Popoff and Bouvet 2009, van Asten and others 2010).

Different alleles of the *cpb2* gene have been identified and grouped into the consensus (*cpb2^{con}*) and the atypical (*cpb2^{atv}*) variants. While the atypical variant is more common in healthy individuals, the consensus variant can become more common in diseased animals. In newborn piglets with necrotic enteritis, 90 per cent of *C. perfringens* isolates harbour the *cpb2^{con}* gene. A similar observation has recently been reported in suckling beef calves with enterotoxaemia, but not in other animal species, or in human beings (Gibert and others 1997, Bueschel and others 2003, Fisher and others 2005, Jost and others 2005, Lebrun and others 2007, van Asten and others 2010).

Cases of enterotoxaemia-like syndrome with sudden death and lesions of haemorrhagic enteritis of the small intestine are also frequent in the veal calf industry, especially in calves belonging to beef cattle breeds (Manteca and others 2001). The present study took place on a Belgian farm with a production of approximately 120,000 veal calves per year, of which 75 per cent belonged to the Belgian blue breed. The aim was to isolate and toxin-type *C. perfringens* from such cases, with special reference to the identification of the *cpb2* gene variant(s) present.

Eighteen Belgian blue veal calves without any clinical signs observed before death, but with gaseous dilation, haemorrhagic lesions, and liquid and haemorrhagic contents in the small intestine at postmortem examination performed within a few hours after

TABLE 1: PCR results on 77 *Clostridium perfringens* isolates from calves affected with an enterotoxaemia-like syndrome (cases) and on 15 *C. perfringens* isolates from control calves for the *cpb2* gene family and for the *cpb2^{con}* and *cpb2^{atv}* gene variants

Calves	Lesions	<i>C. perfringens</i> count (cfu)	Calf	Number of colonies*	<i>cpb2⁺</i> colonies	<i>cpb2</i> variant
Case	Typical	$\geq 10^8$	1	10	-	-
			2	8	-	-
			3	12	-	-
			4	12	NO	NO
			5	12	NO	NO
			6	12	1	Consensus
	Suspicious	10^3 - 10^5	7	4	-	-
			8	12	6	Atypical (4) Consensus (2)
			9	2	-	-
			10	10	10	Atypical
			11	7	2	Consensus
			12	3	-	-
Control	Absent	10^1 - 10^3	13	4	-	-
			14	3	-	-
			15	5	-	-

* All colonies tested positive with the PCR targeting the *cpa* gene coding for the α toxin and negative with the PCRs targeting the *cpb*, *etx*, *iap* and *cpe* genes coding for the β , ϵ and ι major toxins and for the enterotoxin
NO: Not done (no colony was tested due to enterococcal overgrowth of the plates)

death, were sampled; these animals are thereafter referred to as the case calves. For each animal, a small intestinal loop with lesions was removed, stored in a jar in anaerobic conditions (Anaerocult; Merck) and transported to the laboratory to perform bacteriological analysis, as described by Lebrun and others (2007).

Six of the case calves (33 per cent) had high *C. perfringens* counts ($> 10^6$ cfu/ml of intestinal content) and five (28 per cent) had intermediate counts (between 10^3 and 10^6 cfu/ml of intestinal content) (Table 1). No *C. perfringens* growth (< 10 cfu/ml of intestinal content) was observed from the intestinal contents of the other seven case calves (39 per cent). Of the 11 case calves with intermediate or high cfu, 77 *C. perfringens* isolates were collected from the intestinal contents of nine animals, but the plates were overgrown by enterococci for the remaining two (calves 4 and 5) (Table 1). Fifteen isolates of *C. perfringens* were also collected at the slaughterhouse of the farm from the small intestinal contents of four six-month-old healthy veal calves with $< 10^3$ cfu/ml of intestinal content (the control calves and isolates) (Table 1).

All 92 *C. perfringens* isolates tested positive with a PCR targeting the *cpa* gene and negative with PCRs targeting the *cpb*, *etx*, *iap* and *cpe* genes coding for the β , ϵ and ι major toxins and for the enterotoxin, respectively (Daube and others 1994, Braun and others 2000, Albini and others 2003). Nineteen of the case isolates (25 per cent) from four calves (44 per cent) and none of the control isolates tested positive with the PCR targeting the *cpb2* gene family (Van Asten and others 2008). The relative frequency of *cpb2*-positive isolates varied from one isolate out of 12 (calf 6) up to all 10 isolates from calf 10 (Table 1). Five isolates from calves 6, 11 and 8 tested positive with three PCRs targeting the *cpb2^{con}* gene (Herholz and others 1999, Jost and others 2005, Van Asten and others 2008), while the remaining 14 isolates from calves 10 and 8 tested positive with one of two PCRs targeting the *cpb2^{atv}* gene (Jost and others 2005) (Table 1). The second *cpb2^{atv}* gene PCR (Van Asten and others 2008) did not give any results, even with the control strains, despite several changes of experimental conditions (data not shown). The sequencing of all amplified fragments confirmed the presence of the *cpb2^{con}* gene and of the *cpb2^{atv}* gene.

According to these results, neither CPB2 toxin nor the CPB2^{con} variant appears to have been involved in the enterotoxaemia-like syn-

Veterinary Record (2010) 167, 64-65 doi: 10.1136/vrb4869

A. Muylaert, DVM, MVSc,
M. Lebrun, DVM, MVSc,
J-N. Duprez,
S. Labruzzo,
H. Theys, DVM,
VILATCA, Kalverstraat 1, 2440 Geel,
Belgium
B. Taminiau, BSc, PhD,
J. Mainil, DVM, PhD, AES,
Bacteriology, Department of Infectious
Diseases, Faculty of Veterinary
Medicine, University of Liège, Campus
du Sart Tilman B43a, 4000 Liège,
Belgium

Correspondence to Dr Mainil, e-mail:
jg.mainil@ulg.ac.be

Provenance: not commissioned;
externally peer reviewed

Veterinary Record | July 10, 2010

drome in these veal calves. This is in contrast with results obtained during a study in suckling beef calves in which two-thirds of *C. perfringens* isolates (28 of 41) from 14 case calves were *cpb2*-positive and all 28 harboured the *cpb2^{con}* gene (Lebrun and others 2007). This suggests that *C. perfringens* may not have even been associated with the enterotoxaemia-like syndrome in the veal calves in the present study since only one-third (six of 18) of the case calves had high counts of *C. perfringens* (>10⁶ cfu/ml of intestinal content). In contrast, in a study by Manteca and others (2001), 79 per cent (62 of 79) of the suckling beef calves had high counts of *C. perfringens*.

However, rapid upregulation of toxin production by *C. perfringens* has been reported upon contact with host enterocytes (Vidal and others 2009, McClane 2010). Therefore, high counts of *C. perfringens* are not necessary to cause an enterotoxaemia-like syndrome if a subpopulation of *cpb2*-positive *C. perfringens* rapidly produces large amounts of the CPB^{con} toxin, which is 10 times as toxic as the CPB2^{sv} variant. It is therefore possible that the *cpb2*-negative case calves harboured a *cpb2^{con}*-positive *C. perfringens* population below the detection level of the authors' methodology. This might also explain the higher proportion of *cpb2^{sv}*-positive than *cpb2^{con}*-positive isolates in each of the *cpb2*-positive calves (Table 1).

Interestingly, all 19 *cpb2*-positive colonies were isolated from the four calves with 10³ to 10⁵ cfu of *C. perfringens* per ml of intestinal content and not from the calves with more than 10⁶ cfu of *C. perfringens* (Table 1). Although there is no straightforward explanation, it is possible to speculate that the intensive use of antibiotics in the veal calf industry directly or indirectly impaired the *C. perfringens* growth and/or rendered the plasmid carrying the *cpb2* genes more unstable in vitro. A larger study in more farms is required.

Acknowledgements

The authors thank the director of the VILATCA veal farm, and Marjorie Bardiau for helpful discussions.

References

- ALBINI, S., BRODARD, I., JAUSSE, A., WOLLSCHLAEBER, N., FREY, J., MISEREZ, R. & ABRIL, C. (2008) Real-time multiplex PCR assays for reliable detection of *Clostridium perfringens* toxin genes in animal isolates. *Veterinary Microbiology* **127**, 179-185.
- BRAUN, M., HERHOLZ, C., STRAUB, R., CHOISAT, B., FREY, J., NICOLET, J. & KUHNERT, P. (2000) Detection of the ADP-ribosyltransferase toxin gene (*idaA*) and its activity in *Clostridium difficile* isolates from Equidae. *FEMS Microbiology Letters* **184**, 29-33.
- BUESCHEL, D. M., JOST, B. H., BILLINGTON, S. J., TRINH, H. T. & SONGER, J. G. (2003) Prevalence of *cpb2*, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. *Veterinary Microbiology* **94**, 121-129.
- COOPER, K. K. & SONGER, J. G. (2009) Necrotic enteritis in chickens: a paradigm of enteric infection by *Clostridium perfringens* type A. *Anaerobe* **15**, 55-60.
- DAUBE, G., CHINA, B., SIMON, F., HWALA, K. & MAINIL, J. (1994) Typing of *Clostridium perfringens* by in vitro amplification of toxin genes. *Journal of Applied Bacteriology* **77**, 650-655.
- FISHER, D. J., MIYAMOTO, K., HARRISON, B., AKIMOTO, S., SARKER, M. R. & MCCLANE, B. A. (2005) Association of beta2 toxin production with *Clostridium perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates carrying a plasmid enterotoxin gene. *Molecular Microbiology* **56**, 747-762.
- GIBERT, M., JOLIVET-REYNAUD, C. & POPOFF, M. R. (1997) Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene* **203**, 65-73.
- HERHOLZ, C., MISEREZ, R., NICOLET, J., FREY, J., POPOFF, M., GIBERT, M., GERBER, H. & STRAUB, R. (1999) Prevalence of beta2-toxicogenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 358-361.
- JOST, B. H., BILLINGTON, S. J., TRINH, H. T., BUESCHEL, D. M. & SONGER, J. G. (2005) Atypical *cpb2* genes, encoding beta2-toxin in *Clostridium perfringens* isolates of nonporcine origin. *Infection and Immunity* **73**, 652-656.
- LEBRUN, M., FLEB, P., MOUSSET, B., DESMECHT, D., GALLEN, M., MAINIL, J. G. & LINDEN, A. (2007) The expression of *Clostridium perfringens* consensus beta2 toxin is associated with bovine enterotoxaemia syndrome. *Veterinary Microbiology* **120**, 151-157.
- MCCLANE, B. A. (2010) *Clostridium perfringens* type C isolates rapidly upregulate their toxin production upon contact with host cells. *Virulence* **1**, 1-4.
- MANTECA, C. & DAUBE, G. (1994) L'entérotaxémie bovine en Belgique. I. Introduction et contexte bibliographique. *Annales de Médecine Vétérinaire* **138**, 155-164.
- MANTECA, C., DAUBE, G., JAUNIAUX, T., LINDEN, A., FIRSON, V., DETILLEUX, J., GINTER, A., COPPE, F., KAECKENBEECK, A. & MAINIL, J. G. (2002) A role for the *Clostridium perfringens* beta2 toxin in bovine enterotoxaemia? *Veterinary Microbiology* **86**, 191-202.
- MANTECA, C., DAUBE, G., FIRSON, V., LIMBOURG, B., KAECKENBEECK, A. & MAINIL, J. G. (2001) Bacterial intestinal flora associated with enterotoxaemia in Belgian Blue calves. *Veterinary Microbiology* **81**, 21-32.
- POPOFF, M. R. & BOUVET, P. (2009) Clostridial toxins. *Future Microbiology* **4**, 1021-1064.
- SMEDLEY, J. G., III, FISHER, D. J., SAYEED, S., CHAKRABARTI, G. & MCCLANE, B. A. (2004) The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* **152**, 183-204.
- SONGER, J. G. (1996) Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clinical Microbiology Reviews* **9**, 216-234.
- UZAL, F. A. & SONGER, J. G. (2008) Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **20**, 253-265.
- VAN ASTEN, A. J., ALLAART, J. G., MEELES, A. D., GLOUDEMANS, F. W., HOUWERS, D. J. & GRÖNE, A. (2008) A new PCR followed by *Mbol* digestion for the detection of all variants of the *Clostridium perfringens cpb2* gene. *Veterinary Microbiology* **127**, 412-416.
- VAN ASTEN, A. J. A. M., NIKOLAOU, G. N. & GRÖNE, A. (2010) The occurrence of *cpb2*-toxicogenic *Clostridium perfringens* and the possible role of the beta2-toxin in enteric disease of domestic animals, wild animals and humans. *Veterinary Journal* **183**, 135-140.
- VIDAL, J. E., OHTANI, K., SHIMIZU, T. & MCCLANE, B. A. (2009) Contact with enterocyte-like Caco-2 cells induces rapid upregulation of toxin production by *Clostridium perfringens* type C isolates. *Cellular Microbiology* **11**, 1306-1328.

6. SÉQUENÇAGE DE GÈNES CPB2 D'ORIGINE BOVINE.

Cette dernière étude vise à mieux comprendre les divergences observées entre nos résultats et ceux d'études antérieures concernant la capacité des souches d'origine bovine à exprimer CPB2. Pour ce faire, nous avons séquencé le gène cpb2FM ainsi que la séquence nucléotidique en amont de celle-ci afin de la comparer à des séquences déjà publiées et dont l'origine, voire le contexte clinique associé, sont connus. Cette étude nous a également permis de comprendre les difficultés rencontrées au début de ce travail pour amplifier le gène cpb2 bovin dans son ensemble.

6.1. Introduction.

Après sélection de souches d'intérêt, nous avons rencontré des difficultés pour amplifier l'amont et l'aval de la séquence codant pour la forme mature de la protéine CPB2 d'origine bovine (Lebrun et al. 2007). Ces échecs d'amplification concernaient principalement la zone incluant le promoteur et la séquence signal contrôlant le gène *cpb2*. Vu les différents points de vue sur la capacité des souches à produire la toxine, notamment en fonction de l'espèce (animale) dont elles sont issues (Bueschel et al., 2003 ; Fisher et al., 2005 ; Vilei et al. 2005 ; Kircanski et al., 2012) ou des différents modes de régulation découverts au fur et à mesure des études, il a été décidé de réaliser le séquençage de l'amont et l'aval de *cpb2* de souches bovines préalablement caractérisées selon (i) leur origine clinique (bovin mort d'entérototoxicité ou présumé sain), (ii) leur caractérisation en PCR (consensus ou atypique), (iii) leur résultat en Western Blot (productrice ou non productrice de CPB2FM *in vitro*). Dans ce but, des amorces (i) dont les séquences ont été publiées après l'amplification et l'expression de la CPB2 bovine (Lebrun et al. 2007) ou (ii) dessinées spécifiquement pour cette phase d'amplification-séquençage ont été utilisées. Ces amorces ont pour objectif d'amplifier des fragments du gène *cpb2* allant de l'intérieur vers l'extérieur de celui-ci, vers l'amont comme vers l'aval.

6.2. Matériel et méthodes

6.2.1. Extraction

L'extraction de l'ADN a été réalisée par ébullition selon une technique précédemment décrite (Daube et al., 1994). Les bactéries, issues de culture pure, sont cultivées en BHI en conditions anaérobies strictes durant 12h. Un aliquot de 300 µl est centrifugé à 13000 rpm durant 1 min et le surnageant est éliminé. Après addition de 50 µl d'eau stérile au culot bactérien, la suspension est portée à ébullition durant 10 min puis centrifugée 1 min à 13000 rpm. Le surnageant est ensuite collecté et conservé à -20°C.

6.2.2. Amplification

Les amorces utilisées sont reprises dans la **table 1**, les conditions de PCR dans la **table 2**.

Les produits de PCR ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% après coloration au bromure d'éthidium et visualisation sous lumière UV.

Table 1 : Amorces utilisées pour le séquençage

Source	Nom	Séquence
Jost et al., 2005	eeb2F	5'-AACATAATAATCCTATAACCC-3'
	cpb2F	5'-AGATTTTAAATATGATCCTAACCC-3'
	eeb2R	5'-ATAAATATAATTCTCTAAACC-3'
	cpb2R R	5'-CAATACCCTTCACCAATACTC-3'
	cpb2atyF	5'-ATTATGTTTAGGAATACAGTTA-3'
	cpb2consF	5'-CAATTGGGGAGTTTATCCACAA_3'
	Ce travail	cpb2BEint
Sens1		5'-AATTTTCAGGGGGGAATATAA-3'
Asens1		5'-CTATGCACAATACCCTTCACC-3'
Sens2		5'-CCTGATTCTGCTAGACAAATA-3'
Asens2		5'-GAATTCCTATGCACAATACCCTTCACC-3'
cpb2int		5'-TTCCTAAACATAATAAGCA-3'

Table 1 : Cette table reprends les primers utilisés et leur origine (article antérieur ou cette thèse), ainsi que leur séquence.

Table 2 : Conditions de PCR utilisées pour produire les fragments à séquencer.

Nom amorce	Amorces	Tm	Souches
eeb2F	5'-AACATAATAAATCCTATAACCC-3'	52°C	T6.1
cpb2F	5'-AGATTTTAAATATGATCCTAACCC-3'		T6.1
eeb2R	5'-ATAAATATAATTCTCTAAACC-3'		T6.2
cpb2R	5'-CAATACCCTTCACCAAATACTC-3'		T6.2
			T8.2
			T8.2
Sens1	5'-AATTTTCAGGGGGGAATATAA-3'	52°C	C3.5.1
cpb2R	5'-CAATACCCTTCACCAAATACTC-3'		LE2.2
cpb2F	5'-AGATTTTAAATATGATCCTAACCC-3'		C3.2.5
cpb2interne	5'-TTCCTAAACATAATAAGCA-3'		T7.3D
			C3.10.5
			T13.5
			C3.5.3
			T7.4D
			T10.8
Sens1	5'-AATTTTCAGGGGGGAATATAA-3'	52°C	C3.5.1
Cpb2F	5'-CAATACCCTTCACCAAATACTC-3'		LE2.2
Asens1	5'-CTATGCACAATACCCTTCACC-3'		C3.2.5
cpb2int	5'-TTCCTAAACATAATAAGCA-3'		T7.3D
			C3.10.5
			T13.5
			C3.5.3
			C3.10.5
			LE5.1

Table 2 : cette table reprend les amorces (noms et séquence), les températures de melting (Tm) et les souches de *C. perfringens* ayant servi de matrice.

6.2.3. Séquençage

La pureté de l'ADN obtenu a été vérifiée sur un Nanodrop Lite (Thermo Scientific). Les conditions recherchées sont une concentration de 40 à 50 ng/μl et un ratio (A260/A280) > 1,8. La concentration utilisée lors du séquençage dépend de la taille de la séquence à déterminer. Dans ce cas-ci, l'objectif était de 4 ng/μl.

Le séquençage des produits de PCR a été réalisé par la plateforme de séquençage centralisée de l'Université de Liège (GIGA Genomics Facility) après purification avec le QIAquick® PCR Purification Kit (Westburg).

Les séquences obtenues ont été analysées avec les programmes Vector NTI (Invitrogen), Contig Express (Invitrogen), Softberry bprom (Linux), PSORTb (Brinkman Laboratory, Simon Fraser University, Canada) et Jpred 3 (University of Dundee, United Kingdom).

6.3. Résultats

6.3.1. Séquences en amont et en aval de la séquence codante de CPB2FM

Les premiers essais d'amplification de la zone amont du gène *cpb2* ont été effectués avec une amorce située dans le gène et une amorce, p385, définie par Gibert et associés sur base de la

séquence consensus L770965. Malgré l'usage de plusieurs conditions d'amplification différentes, ces essais n'ont pu aboutir pour aucune des souches testées.

Suite à la publication par Shimizu et al. de la séquence complète du génome de *Clostridium perfringens* str. 13 et de son plasmide de virulence pCP13, une amorce basée sur le gène *pcp16* situé en amont de *cpb2* a été définie (pCP13F). L'utilisation de cette amorce en combinaison avec l'amorce *cpb2*antisense-2 a permis l'amplification de cette zone pour 3 souches bovines (46433-C21, 46658-C3, 47001-C12).

Cette zone amont (représentant une fenêtre d'environ 200 pb en amont du codon ATG du peptide signal) a été séquencée et comparée aux 2 séquences de référence (séquence du plasmide pCP13 et la séquence d'origine porcine publiée par Gibert et associés en 1997 : L770965) et est illustrée à la **figure 1**. L'analyse de ces séquences en amont de l'ORF montre que les séquences des régions promotrices des souches bovines (consensus) sont identiques à celle du plasmide Pcp13. Par contre la séquence consensus L770965 ne partage que 84,2% d'identité nucléotidique avec ces séquences (bovines et pCP13) sur cette région amont. Ceci explique probablement l'échec de l'utilisation du primer p385 sur les souches bovines qu'elles soient porteuses d'un *cpb2* dit consensus ou atypique selon les critères PCR de Jost. Concernant les séquences *cpb2* bovines atypiques, elles partagent 68% d'identité avec la séquence correspondante du pCP13 et des consensus bovines et 62,4% avec la séquence d'origine porcine.

Si on restreint l'analyse de séquence aux 100 premières pb en amont du peptide signal, région incluant probablement le promoteur (et ses éléments proximaux), on observe une meilleure conservation entre les séquences : 98% d'identité entre la L770965 et les séquences consensus bovines, 83 à 83% d'identité entre la L770965, les séquences dites atypiques et la séquence du pCP13 donc également les consensus bovines. Au-delà de ces 100 premières pb en amont de l'ATG, on constate une diminution brutale de la conservation des nucléotides.

Figure 1 : comparaison des séquences en amont de *cpb2 fm*

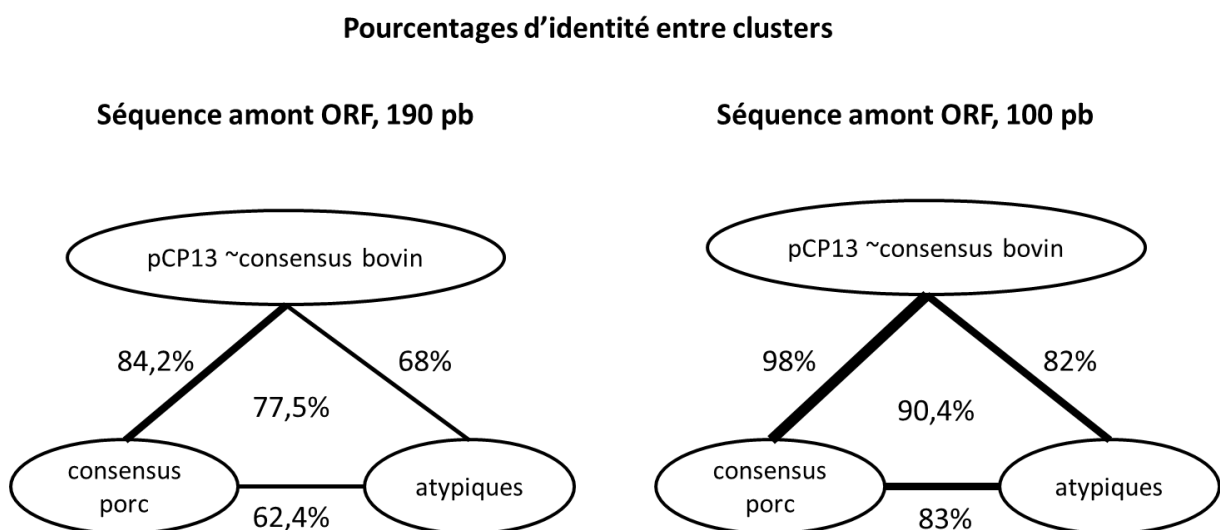


Figure 1 : Comparaison des séquences en amont du peptide signal (100 et ~200 pb) de différents clusters de *cpb2*

Dans les souches séquencées, la séquence en amont de l'ORF est représentée par 3 groupes de séquences (**figure 2**), les séquences associées aux *cpb2* atypiques étant les plus éloignées génétiquement des autres et ce qu'elle qu'en soit l'origine (bovine ou non).

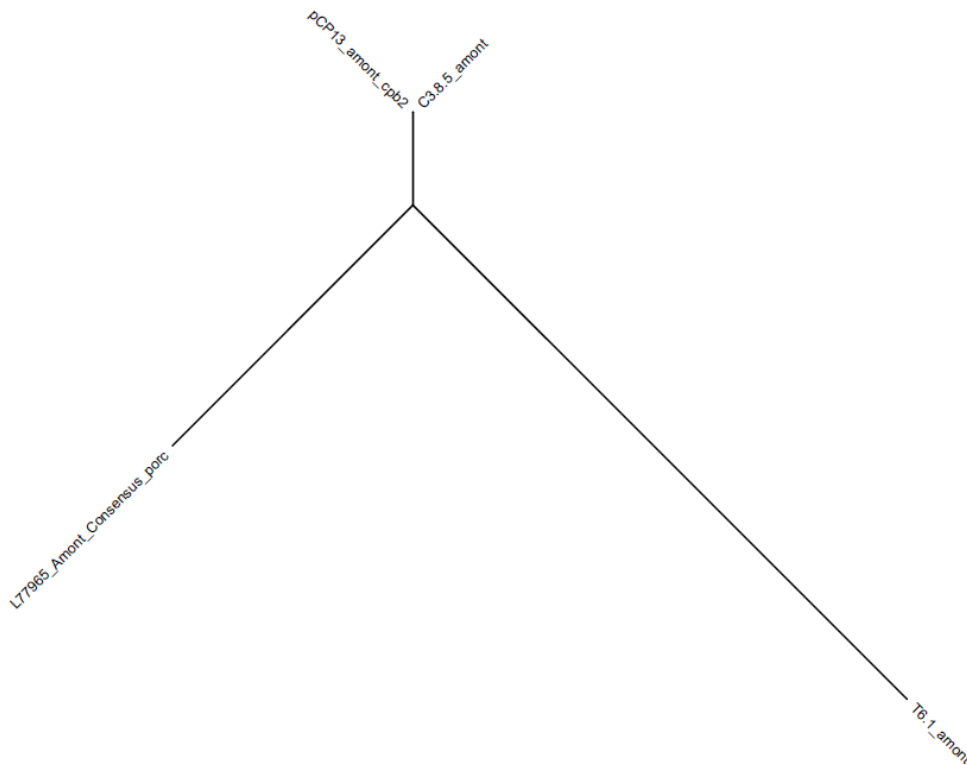


Figure 2 : Arbre phylogénique sur 190pb en amont du peptide signal avec une séquence type par cluster (C3.8.5 : consensus bovin ; T6.1 : atypique bovin)

C'est dans cette région, entre les gènes *pcp16* et *cpb2*, que le programme BPROM - Prediction of bacterial promoters a mis en évidence une séquence pouvant correspondre à un promoteur. Séquence qui contient 2 TATA box en position -10 et -35.

Résultats BPROM pour la séquence *pcp16_cpb2* (souche bovine consensus)

```

ATATTTATTATTGATTTAATTTTCCATTATAGTGCT-AGTTAT-
TTTTACTATTATAAAGTTTAATAATTTACATTGTTTAAACTA-
ATTGCTAAATAGAATTTTAACTCATGTTTTAAAAGTTAAATATATATTTTAAATTTAAGGTGTCCCACGGGGACA
TCTTTTTGTTTTTAAAAGGTAAATATGAATAAAATTTAGATAAAAGTGTAAGAATTATTTTATTTTAAATTTG
TTAAATTTGATATAATTGAATTGTAAAAAAATTTTCAGGGGGGAATATAA
  
```

Longueur de la séquence - 290

Seuil pour promoteur - 0.20

Nombre de promoteur prédit - 1

Promoteur Position: **263** LDF- 12.96

-10 box position 248 TGA**TATA**AT Score 82

-35 box position 229 **TTTAAA** Score 41

La comparaison et recherche des facteurs de transcription n'a pas été reprise vu l'absence de détection des facteurs de régulations de *Clostridium* dans cette zone (VirR/VirS, Agr, CodY, ...)

On observe (figures 3 et 4) que dans cette zone en amont de l'ORF, si il existe des différences de séquence, les éléments proximaux des promoteurs (-35 box, -10 box ou TATA box, codon start) sont conservés.

En aval de la séquence codante, on observe de légères différences de séquence qui correspondent à quelques acides aminés de différence entre les souches de différentes origines. Dans cette zone, le séquençage s'est avéré plus fastidieux, ce qui ne nous permet pas d'émettre de commentaire sur les séquences obtenues et les conséquences des différences observées.

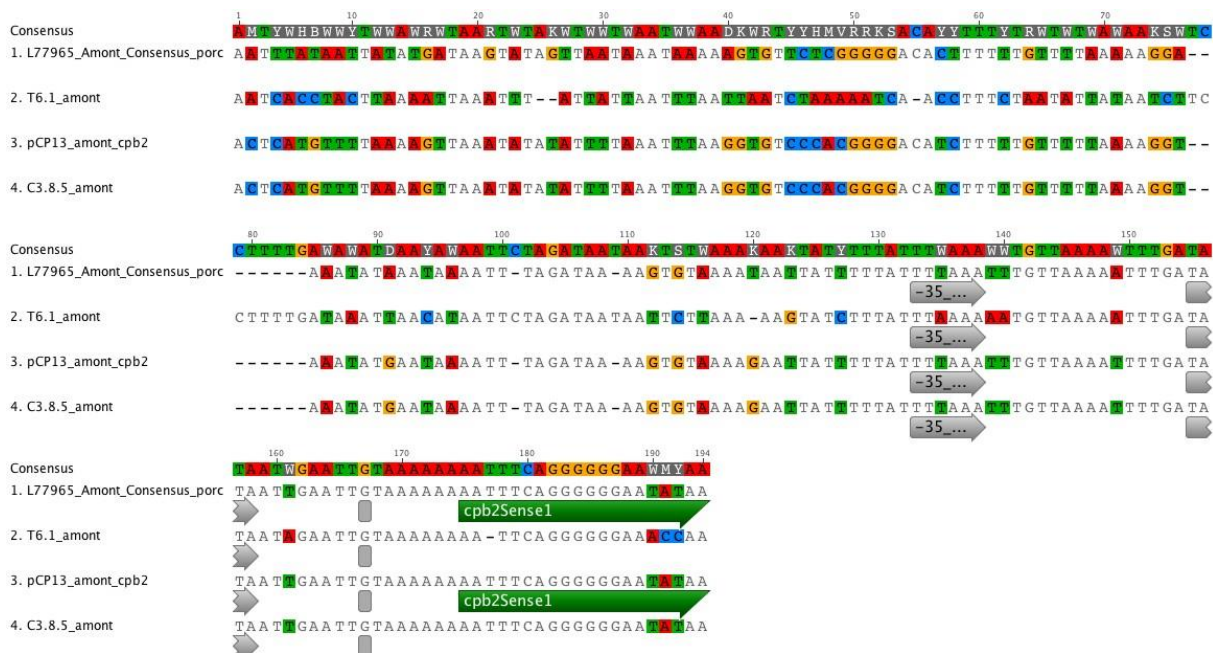


Figure 3 : Comparaison d'une séquence de chaque cluster : L77965 (souche de référence porcine CWC245), T6.1 (souche atypique d'origine bovine, ce travail), pCP13 (plasmide de référence), C3.8.5 (souche consensus d'origine bovine, ce travail).

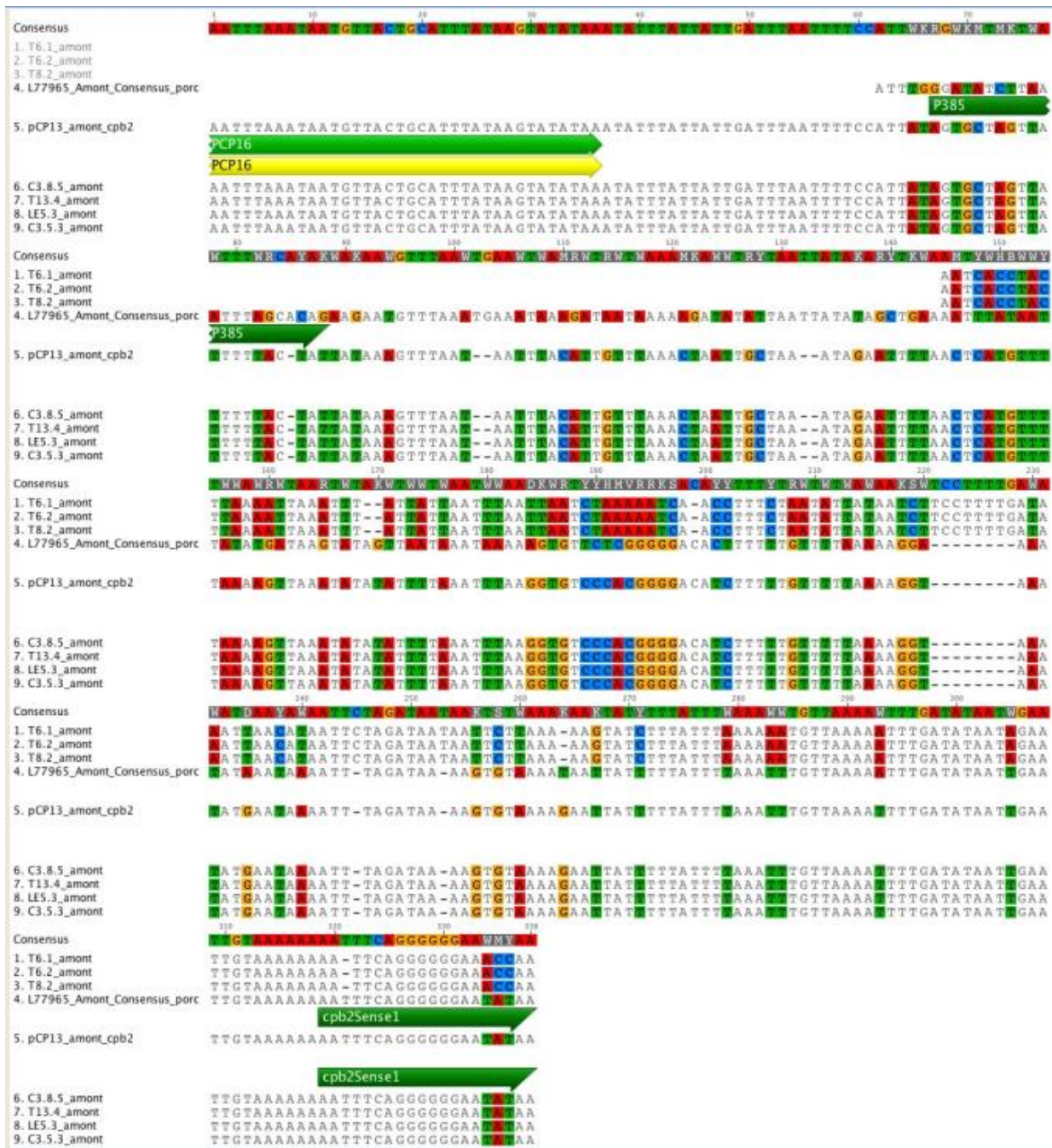


Figure 4 : Alignement de plusieurs séquences par cluster : L77965 (souche de référence porcine CWC245), T6.1 (souche atypique d'origine bovine, ce travail), pCP13 (plasmide de référence), C3.8.5 (souche consensus d'origine bovine, ce travail).

6.3.2. Analyse de la séquence codante

6.3.2.1. Peptide signal et exportation de la protéine

Dans les séquences consensus de référence (génomme séquencé pCP13 –AP003515 et consensus porc - L770965), le premier codon de l'ORF est un ATG suivi par un homopolymère de 7 adénines (A). Cette enchaînement se retrouve chez les souches C3.2.5 et LE2.2. Chez les souches C3.2.1, C3.2.3, C3.5.3, C3.8.5, LE5.3, T6.1, T6.2, T8.2, T13.4, on constate une délétion d'une adénine dans cette

séquence ce qui devient alors un hexamère de A. Cette différence peut entraîner l'introduction d'un STOP précoce dans l'ORF mais avec une possibilité de rétablissement de la phase de lecture en cas de glissement de la polymérase, situation déjà observée par l'équipe d'E. Vilei chez des souches d'origine équine (2005). De plus, cet homopolymère est situé dans le peptide signal et l'ORF se poursuit, avec un autre ATG.

Le peptide signal présent chez les souches bovines ou porcines possède des caractéristiques associées aux peptides signal de protéines exportées dans l'espace extracellulaire comme l'indiquent les résultats obtenus grâce au programme Psort. Le score de prédiction de localisation de la séquence analysée comme protéine extracellulaire est de 9,13, l'hypothèse étant considérée comme probable si ce score est supérieur à 7,5. L'analyse de ces séquences montre que la séquence, et donc la capacité d'exportation de la protéine, est conservée que la délétion d'une A en soit présente ou non.

Si l'on applique le même traitement à l'ORF complet, le résultat varie peu avec une prédiction de localisation finale comme protéine extracellulaire de 7,97 donc supérieure à 7,5. Les autres possibilités, cytoplasmique, de membrane cytoplasmique, de paroi (PDG) étant rejetées.

L'analyse de la séquence peptide signal comme de l'ORF complet portent à conclure que CPB2 est bien une protéine excrétée dans le milieu extracellulaire. Les mécanismes d'excrétion restent par contre inconnus.

6.3.2.2. Alignement des séquences

Les différentes séquences (contig) obtenues des souches bovines ont été alignées avec les séquences de référence PCP13, L770965 consensus (Gibert et al., 1997) et atypique (Jost et al., 2005) afin de déterminer leur parenté avec celles-ci. Ces alignements ont permis de classer les souches C3.2.1, C3.2.3, C3.2.5, C3.5.3, C3.8.5, LE2.2, LE5.3, T13.4, T7.3D comme consensus et les T6.1, T6.2, T7.4D, T8.2 comme atypiques. Cette classification correspond à celle réalisée sur base de la PCR triplex de Jost et associés (2005) à l'exception de la souche T7.4D qui avait été classée comme consensus par cette PCR. Les résultats sont repris dans le tableau ci-dessous (**table 3**).

Table 3 : Comparaison de souches classées selon leurs résultats PCR ou leur séquençage.

Souches	PCR P319- P320 (Herholz et al. 1999)	PCR <i>cpb2</i> <i>FM</i> (ce travail)	PCR triplex (Jost et al. 2005)	Western Blot, Ac1 CPB2FM (ce travail)	Séquençage	Nombre de A peptide signal
C3.2.1	pos	pos	400	pos	Consensus	6
C3.2.3	pos	pos	400	pos	Consensus	6
C3.2.5	pos	pos	400	pos	Consensus	7
C3.5.3	pos	nég	400	pos	Consensus	6
C3.8.5	pos	pos	400	nég	Consensus	6
LE2.2	pos	pos	400	pos	Consensus	7
LE5.3	pos	pos	400	pos	Consensus	6
T7.3D	pos	pos	400	pos	Consensus	N.D.
T13.4	pos	pos	400	pos	Consensus	6
T6.1	nég	nég	700	nég	Atypique	6
T6.2	pos	nég	700	pos	Atypique	6
T7.4D	pos	nég	400	pos	Atypique	N.D.
T8.2	nég	nég	700	nég	Atypique	6

Table 3 : Souches 'C' et 'LE' : bovins morts d'entérotoxémie. Souches 'T' : bovins témoins (abattus sains). Résultats 'pos' = positif, 'nég' = négatif, N.D. = non déterminé. PCR Triplex : produit de 400pb = *cpb2* consensus, 700 pb = *cpb2* atypique.

Comme pour les séquences en amont de l'ORF, les ORF d'origine bovine classées comme consensus présentent une identité marquée (>99%) avec la séquence *cpb2* du pCP13 et moindre vis-à-vis de la séquence de référence d'origine porcine L770965 (94% identité). Les séquences bovines dites atypiques quant à elles, sont identiques (ou presque : % identité >99%) aux séquences dites atypiques publiées par Jost et associés (2005) et Fisher et associés (2005 *cpb2h1*, diarrhée sporadique). Et ces séquences atypiques s'éloignent clairement des séquences consensus qu'elles soient d'origine humaine, porcine ou bovine (73-75% d'identité). Le gène *cpb2h2* (Fisher et al., 2005 ; diarrhée associée aux antibiotique) est lui plus proche de la séquence de référence porc et du pCP13. Cette phylogénie se reflète dans le dendrogramme ci-dessous. En résumé, on peut dire que les *cpb2* consensus bovines sont fortement apparentées au *cpb2* du pcp13, plus qu'aux *cpb2* d'origine porcine (consensus) et que les séquences dites atypiques forment un troisième cluster, plus éloigné des 2 autres.

Si on compare les séquences de ces 3 clusters sur un fragment d'une longueur de 470 pb on obtient un % d'identité nucléotidique global de 88,6%, contre 88% si elles sont comparées sur 706 pb (**figures 5 et 6**).

Pourcentages d'identité entre clusters

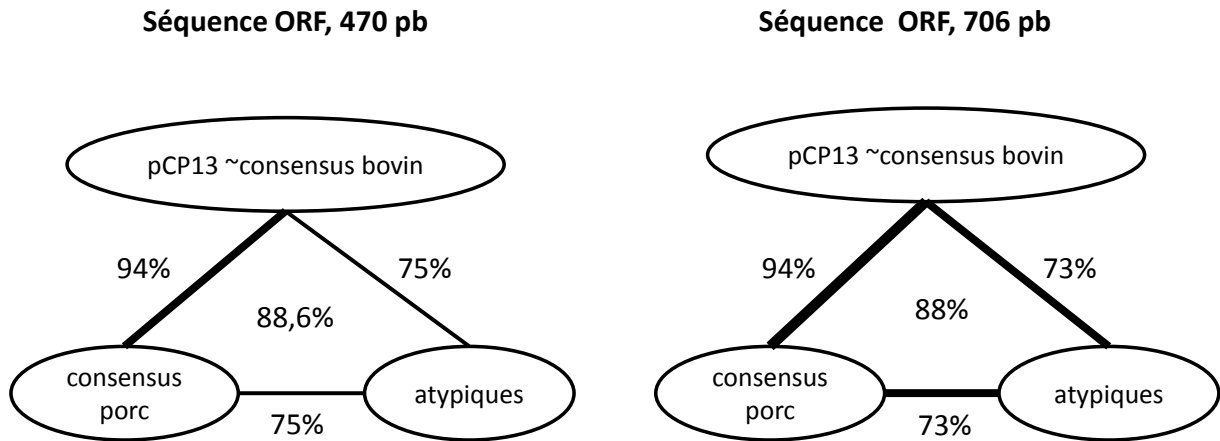


Figure 5: Comparaison sur 470 ou 706 pb des pourcentages d'identité des ORF de différents clusters de *cpb2* sous forme graphique

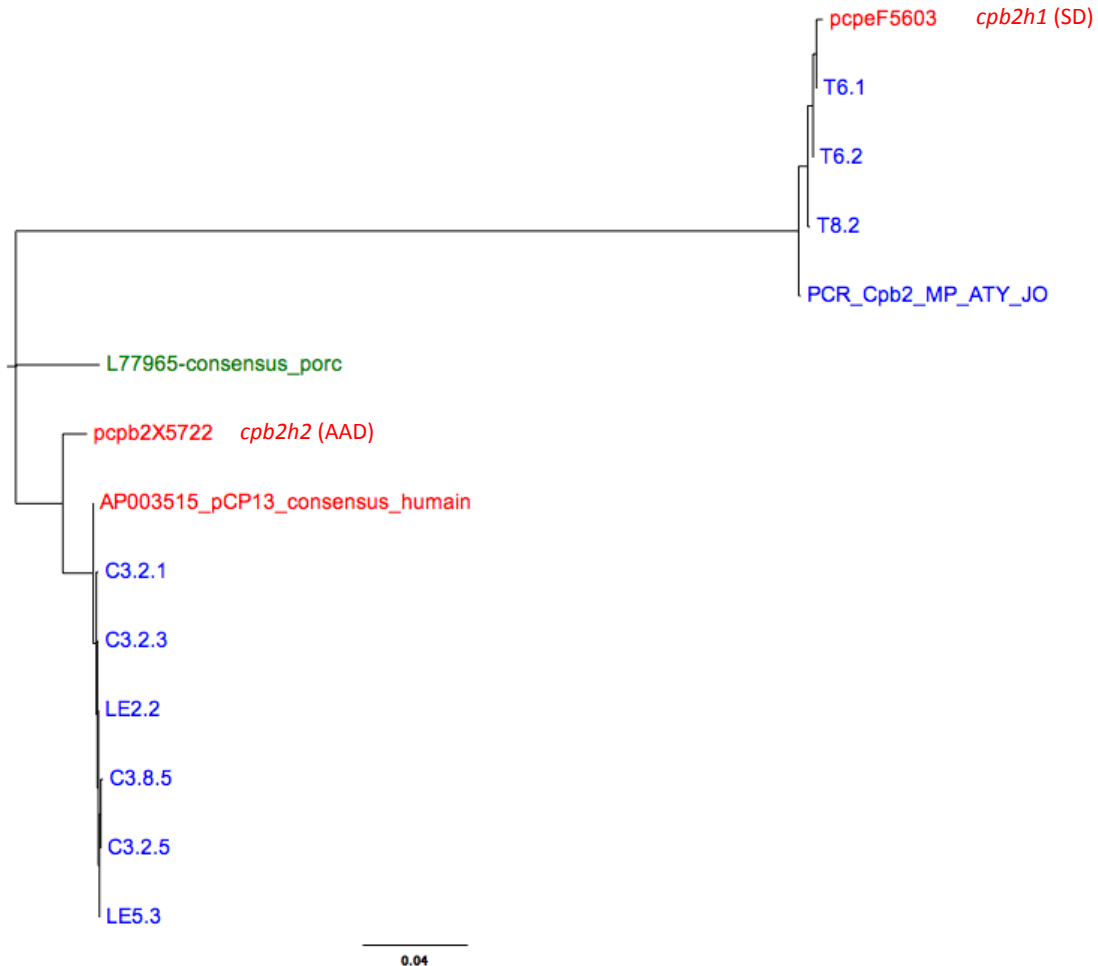


Figure 6: Comparaison sur 706 pb des pourcentages d'identité des ORF de différents clusters de *cpb2* sous forme d'arbre phylogénique. Souches 'C' et 'LE' : bovins morts d'entérotoxémie, souches 't' : bovins abattus sains. *cpb2h1* (DAA) : origine humaine, diarrhée associée aux antibiotiques, séquence *cpb2h2* (DS) : origine humaine, diarrhée sporadique.

6.3.2.3. Traduction

La présence de 6 A au lieu de 7 dans le peptide signal, se traduit par l'apparition d'un stop précoce (en gardant possibilité de retrouver une phase de lecture complète grâce au glissement de la fenêtre de lecture au niveau du ribosome (codons glissants) chez les souches bovines de cette étude classée comme consensus. Dans le cas des souches de ce travail possédant un gène *cpb2* dit atypique, les différences de séquences en aval de ces 6 A sont telles que l'on n'observe pas de codon stop précoce comme dans le cas des CPB2 dites « consensus » (**Figure 7**).

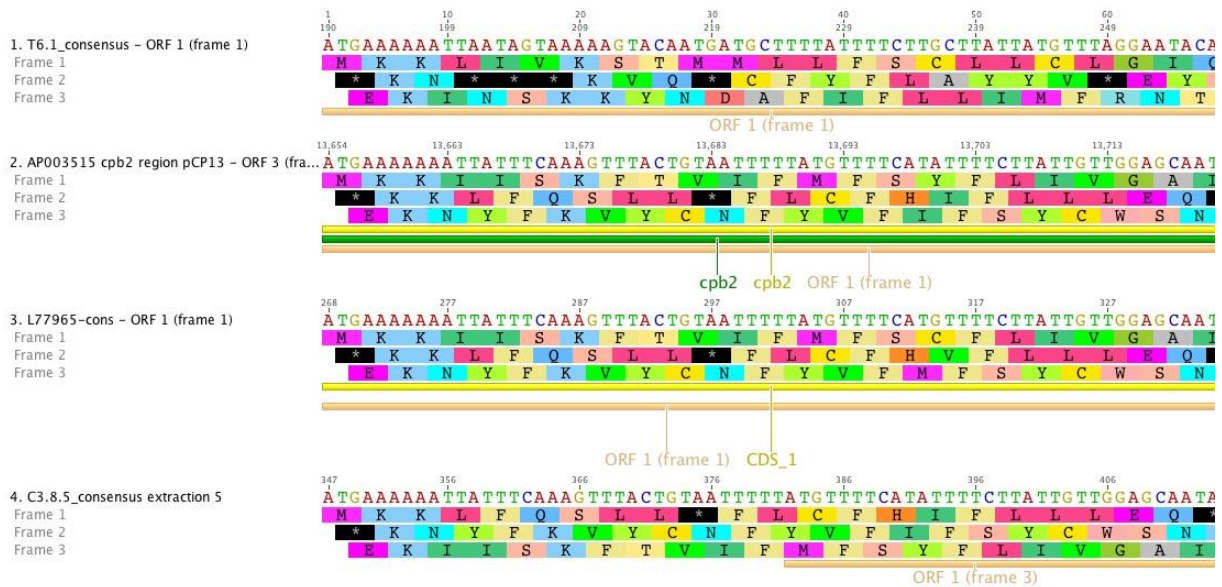


Figure 7 : Traduction du début de l'ORF : absence de codon stop chez les souches de cette étude, malgré la présence de 6 A au lieu de 7.

6.3.2.4. Structure secondaire

Les prédictions de structure secondaire réalisées sur base des séquences en A.a. de CPB2 de souches porcines (consensus), de la souche 13 (pCPC13, proche des séquences bovines) et de CPB2 bovines (consensus 6 ou 7 A, atypique) laissent présager des protéines de même conformation malgré leurs divergences en nucléotides et en A.a. (**Figure 8**)

Le programme pSORT utilisé pour la détection du peptide signal, prédit la présence de 25 hélices transmembranaire. Le programme Jpred4 a également permis de prédire une structure secondaire munie d'hélices α amphiphiles principalement dans la portion N-terminale. La portion C-terminale se compose majoritairement de feuillet beta.

Consensus porc (Gibert et al., 1997)

KEIDAYRKVMENYLNALKNYDINTVNI SEDERVNNVEQYREMLEDFKYDPNQQLSFEILNSQKSDNKEIFNVKTE
FLNGAIYDMEFTVSSKDGKLVSDMERTKVENEGKYILTPSFRTQVCTWDELAQAIGGVYPQTYSDRFTTYADNILL
NFRQYATSGSRDLKVEYSVVDHWMWKDDVKASQM VYGQNPDSARQIRLYIEKGQSFYKYRIRIKNFTPASIRVFG
GYCA

---HHHHHHHHHHHHHHHH---HHHHEEE-----HHHHHHHHHHHH-----EEEE--E-----EEEEEE-----
EEEEEEEEE--EEEE-----EEE-----EEEEHHHHH-----EEEE--EEEE-EEEEEEEEE-----EEEEEEEEE-----
EEE-EEEE-----EEEEEE-----EEEEEE--EEEE--EE--

Consensus pCP13

KEIDAYRKVMENYLNAFKNYDINTIVNVESEDERVNSDEKYKEMLEEFKYDPNQQLSFEILNSQKIDNKEIFNVKTEF
MNGAIYDMKFTVSSKDGELIVSDMERTKIENEGKYILTPSFRTQVCTWDELSQSIGGVDPKTYSTRFTTYADNILLN
FRQYATSGSRDLKVEYSVVDHWWLGDDVKASQM VYGQNPDSARQIRLYIEKGQSFYKYRIRIQNFTPASIRVFGEG
YCA

---HHHHHHHHHHHHHHHH---HHHHEEE-----HHHHHHHHHHHH-----EEEEEE--EEE-----EEEEEEEEE-----
EEEEEEEEE--EEEE--HHH-----EEEEEEHHHHH-----EEE--EEEE-EEEEEEEEE-----EEEEEEEEE-----
---EEEE-----EEEEEE-----EEEEEE-----HHHH--E---

C3.2.1 (bovin cas : consensus PCR, 6A)

KEIDAYRKVMENYLNAFKNYDINTIVNVESEDERVNSDEKYKEMLEEFKYDPNQQLSFEILNSQKIDNKEIFNVKTEF
MNGAIYDMKFTVSSKDGELIVSDMERTKIENEGKYILTPSFRTQVCTWDELSQSIGGVDPKTYSTRFTTYADNILLN
FRQYATSCSRDLKVEYSVVDHWWLGDDVKASQM VYGQNPDSARQIRLYIEKGQSFYKYRIRIQNFTPASIRVFGEG

---HHHHHHHHHHHHHHHH---HHHHEEE-----HHHHHHHHHHHH-----EEEEEEEEE-----EEEEEEEEE-----
EEEEEEEEE--EEEE--HHH-----EEEE-HHHHHHH-----EEE--EEEE-EEEEEEEEE-----EEEEEEEEE-----
---EEEE-----EEEEEE-----EEEEEE-----EEE---

C3.2.5 (bovin cas : consensus PCR, 7A)

KEIDAYRKVMENYLNAFKNYDINTIVNVESEDERVNSDEKYKEMLEEFKYDPNQQLSFEILNSQKIDNKEIFNVKTEF
MNGAIYDMKFTVSSKDGELIVSDMERTKIENEGKYILTPSFRTQVCTWDELSQSIGGVDPKTYSTRFTTYADNILLN
FRQYATSGSRDLKVEYSVVDHWWLGDDVKASQM VYGQNPDSARQIRLYIEKGQSFYKYRIRIQNFT

---HHHHHHHHHHHHHHHH---HHHHEEE-----HHHHHHHHHHHH-----EEEEEEEEE-----EEEEEEEEE-----
EEEEEEEEE--EEEE--HHH-----EEEE-HHHHHHH-----EEE--EEEE-EEEEEEEEE-----EEEEEEEEE-----
---EEEE-----EEEEEE-----EEEEEEEEE---

T6.1.D (bovin témoin : atypique PCR, 6A)

NEVNKYQSVMVQYLEAFKNYDIDTIVDISKDSRAVTKEEYKNMLMEFKYDPNQQKLSYEITGSRKIDNGEIFSVKTEF
LNGAIYNMEFTVSYIDNKLMSNMNRISIVNEGKYIPTPSFRTQVCTWDELSQYIGDAVSFTRSSKFQYSSNTITLN
FRQYATSGSRSLKVYSVVDHWMWGDDIRASQWVYGENPDYARQIKLYLGSGETFKNYRIKVENYTPASIKVFGEG
YC

```

---HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH--HHHHHHE-----HHHHHHHHHHHH-----EEEEEE--EEE---EEEEEEE-----
EEEEEEEEEE---EEEEEE---EEEEEE-----HHHHHHHHH--HHHHH-----EE---EEEEEEEEEEEEEE-----
EEEEEEEEEE-----EEEE-----EEEEEE-----EEEEEEEEEE-----EEEEEE-----

```

Figure 8 : Prédiction de la structure secondaire de CPB2 de diverses origines avec Jpred 4 d ('H' : Hélice alpha, 'E' : Feuillet beta, '-' boucles aléatoires). Les zones soulignées sont les plus variables d'une séquence à l'autre. La zone riche en H, probable hélice alpha, se trouve en portion N-terminale, alors que la partie C-terminale est plus riche en feuillets beta.

6.4. Discussion – Conclusion

L'analyse des séquences bovines et leur comparaison avec les séquences de référence a permis de clarifier leur place dans la généalogie des *cpb2* – CPB2.

D'abord, les difficultés rencontrées au début de ce travail pour amplifier la séquence en amont de l'ORF sur les souches bovines ont trouvé une explication. Les premiers essais avaient été faits sur base de la séquence consensus porcine (la seule publiée à l'époque). Or il s'avère qu'elle présente des divergences significatives avec les séquences bovines, contrairement à la séquence issue du pCP13 à laquelle s'apparentent les séquences bovines. C'est en travaillant sur base de cette dernière que des amorces permettant l'amplification de l'amont des ORFs bovins ont été dessinées. L'analyse des séquences obtenues a permis de montrer que les séquences bovines possèdent une séquence promotrice fonctionnelle (ce qui avait également été suspecté par Kircanski et associés en 2012) et particulièrement proche du promoteur *cpb2* du pCP13.

L'analyse des séquences a également permis de montrer que le peptide signal des *cpb2* bovines est caractéristique des protéines exportées dans le compartiment extracellulaire (exotoxine). Ce qui est confirmé par les essais de production en *B. subtilis* (ce travail) ou en *C. perfringens* (Kircanski et al., 2012) et par l'analyse de l'ORF complet par le même programme pSort.

La question de la présence de 6 ou 7 adénines (A) au niveau du peptide signal, et des conséquences que cela peut avoir sur la production de la protéine, a aussi trouvé un début de réponse. Cette délétion d'un A est fréquente au sein des souches bovines mais pas systématique dans les *cpb2* consensus analysées. Elle est associée à l'apparition d'un codon Stop précoce et a été évoquée comme raison de l'absence d'expression de CPB2 par certaines souches, dont les souches bovines (Bueschel et al., 2003). Mais cette délétion pourrait ne pas avoir de conséquence sur l'expression de CPB2 vu la présence d'un autre ATG au début de l'ORF (grâce aux divergence de séquence par rapport au gène de référence porcine) et / ou la possibilité de rétablir l'ORF grâce au mécanismes des codons glissants mis en évidence chez des souches équine (Vilei et al., 2005). Et cela semble se confirmer, vu que certaines souches testées positives en Western Blot dans ce travail ne possèdent que 6 A (poids moléculaire correspondant à CPB2).

Concernant la phylogénie des séquences, les *cpb2* bovines s'apparentent soit au *cpb2* du pcp13 (consensus bovines) soit aux *cpb2* dites atypiques (atypiques bovines), mais pas de façon étroite à la première *cpb2* séquencée (porcine, consensus). Ce qui s'apparente à l'existence de 3 clusters (1)

consensus porcine (2) consensus non porcine (3) atypiques. Ce type de raisonnement rejoint les observations de Fisher (2006, travail de thèse)

Mais malgré ces différences de séquences nucléotidiques, les protéines correspondant aux *cpb2* des différents clusters pourraient présenter une structure secondaire similaire. Ces protéines possèderaient notamment des hélices alpha amphiphiles, fréquemment associées au motif d'insertion transmembranaire des porines. Mais cette hypothèse, posée précocement par Gibert et associés (1997) n'a pas encore pu être confirmée.

La poursuite des analyses de séquences de *cpb2* de diverses origines, y compris environnementale, permettra peut-être à l'avenir de mieux comprendre l'évolution du gène et ses liens avec les souches de *C. perfringens*, pathogènes ou non. Au-delà, ce court travail sur les *cpb2* d'origine bovine a permis de montrer que certaines divergences de séquence permettent à des souches dotées de *cpb2* avec un codon stop précoce de retrouver une ORF complète et donc d'être potentiellement exprimées.

DISCUSSION GÉNÉRALE

LA PLACE DE LA TOXINE CPB2 DANS LE CONTEXTE CLINIQUE ET BACTÉRIOLOGIQUE DE L'ENTÉROTOXÉMIE BOVINE

L'entérotoxémie bovine est un syndrome aigu à suraigu qui aboutit presque inévitablement à la mort de l'animal. En terme de mortalité chez les veaux de moins 6 mois, elle serait à l'origine de 4% des pertes en élevage conventionnel (Manteca et al., 2003) et pourrait représenter 20% des pertes en veaux de boucherie (Pardon et al., 2012). Dans les 2 types de spéculation, l'alimentation et les conditions d'élevage intensives semblent jouer un rôle primordial (Manteca et al., 2000 ; Valgaeren et al., 2015). Ce syndrome associé à une multiplication anarchique de *C. perfringens* dans l'intestin (Manteca et al., 2001), est décrit depuis de nombreuses années (Rose et Edgar, 1936) mais reste difficile à appréhender. Cette difficulté tient en partie au fait que *C. perfringens* appartient à la flore digestive commensale et qu'il existe de multiples interactions au sein du microbiote intestinal. Elle tient également à la compréhension de la toxinogénèse de *C. perfringens* et de ses effets dont la complexité augmente avec le temps et la compréhension qu'on en a. En effet, si l'implication de certaines toxines, majeures et mineures, de *C. perfringens* semblait évidente il y a à peine 10 ans (Fukata et al., 1988, Manteca et al., 2002), elle est sans cesse soumise à controverse (Keyburn et al., 2006 ; Thompson et al., 2006). L'entérotoxémie a très probablement une étiologie multifactorielle dont de nombreux éléments restent à découvrir : facteurs déclenchants, interactions positives comme négatives entre les bactéries, les toxines qu'elles produisent et les cellules qui les entourent.

Dans ce contexte, le rôle de la toxine CPB2 de *C. perfringens* reste à démontrer, entre autres grâce à une meilleure compréhension du gène *cpb2* et des mécanismes qui contrôlent l'expression de la protéine correspondante.

1. PARTIE EXPÉRIMENTALE

Depuis la découverte de la toxine beta2 de *C. perfringens* (CPB2), son implication dans diverses pathologies digestives a fréquemment été évoquée, mais les premiers travaux ont majoritairement été réalisés chez le porc. Afin d'étudier le rôle de cette toxine dans l'entérotoxémie bovine, il était indispensable de produire une toxine CPB2 d'origine bovine, de la purifier et de se doter d'outils de détection spécifiques du gène et de la protéine. Les trois premières études sont dédiées à la production de CPB2 d'origine bovine et à la construction de ces outils de détection. Les deux études suivantes concernent l'épidémiologie de *cpb2*/CPB2 chez le bovin mort d'entérotoxémie ou non, chez des veaux issus d'élevages dits conventionnels et chez des veaux de boucherie. Enfin, la dernière étude, aborde le séquençage du gène *cpb2* d'origine bovine, sa place parmi les séquences déjà connues et l'impact potentiel de la séquence sur l'expression du gène.

1.1. Clonage du gène *cpb2* et production *in vitro* de la toxine CPB2

La première étape de ce travail sur la toxine CPB2 a consisté à isoler le gène d'une souche obtenue d'un bovin mort d'entérotoxémie afin d'exprimer la toxine *in vitro*. Les premières amorces ont été choisies sur base des séquences publiées à l'époque et qui provenaient d'une souche porcine de *C. perfringens*, responsable d'entérite nécrotique du porcelet (Gibert et al., 1997). Ces premiers essais ont subi des difficultés pour amplifier la séquence en amont de l'ORF chez des souches d'origine bovine suite à des différences de séquences, mises en évidence ultérieurement. C'est ce qui a motivé l'utilisation d'amorces spécifiques de la séquence *cpb2fm* codant pour la forme mature de la protéine CPB2FM.

Le gène a été cloné en *E. coli* et si le nombre de transformants obtenus était satisfaisant il a toujours été inférieur aux essais réalisés dans les mêmes conditions avec des protéines témoins.

Lors de la phase d'expression de la protéine CPB2 *in vitro*, malgré les différents essais réalisés pour optimiser la production, les rendements obtenus n'ont jamais été suffisants pour envisager une production à l'échelle industrielle ou l'étude de sa structure fine par cristallographie. Les différentes conditions de production mises en œuvre dans ce travail visaient à la fois à améliorer la production et à limiter la destruction de la protéine produite.

Au cours d'une première étape, des souches productrices ont été choisies. Les contraintes liées au caractère anaérobie de *Clostridium* ont orienté le choix vers des souches de *Bacillus subtilis* et d'*E. coli*, déjà utilisées pour la production de protéines recombinantes (Filée 2003). *Bacillus*, Gram positif, est dépourvu d'endotoxine et a un usage des codons plus proche de *C. perfringens* (Burger et al., 2003) que ne l'est celui d'*E. coli*, ce qui améliore la qualité de la traduction. *E. coli* a été utilisé pour ses compétences en production de protéines bactériennes recombinantes et, dans le contexte présent, pour l'existence de souches protéases déficientes ou adaptées à la production de toxines de bactéries Gram positif (Melville et al., 1994 ; Zhao et al., 2011 ; Pilehchian Langroudi et al., 2013)

Ensuite, pour limiter la dégradation de CPB2FM par des protéases, lors de sa production et des étapes de purification, les manipulations ont été réalisées en présence d'anti-protéases (Powers et al., 2002) et à basse température (à 4°C ou sur glace) pour en diminuer l'activité.

Même dans ces conditions, les rendements obtenus n'étaient pas optimaux ce qui pose la question de la toxicité de la protéine produite. Celle-ci pourrait agir directement sur la viabilité ou le métabolisme des bactéries qui la produisent. En effet, lors de l'optimisation de la production en *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, la CPB2FM, qui aurait dû se concentrer dans l'espace périplasmique, a été détectée dans le surnageant, probablement suite à la rupture de la membrane externe (Lebrun et al., 2007). Si jusqu'à présent, l'hypothèse initiale que la CPB2 soit une porine (Gibert et al., 1997) n'a pas été confirmée, nos observations ainsi que la structure secondaire de CPB2 peuvent renforcer cette hypothèse. Cependant, une étude très récente (Zeng et al., 2016) a permis, grâce à une CPB2-His tagged, de démontrer une toxicité sur des cultures de cellules humaines et porcines dans laquelle la toxicité, dose et temps dépendante, se traduit par de l'apoptose plus que par de la nécrose cellulaire. Après fixation à la membrane cellulaire, la toxine recombinante est progressivement transportée/transloquée dans les cellules où elle s'accumule et agit notamment sur le système caspase. Cette étude si elle appuie la toxicité de CPB2, met en évidence un mode d'action différent de celui observé précédemment (Gibert et al., 1997).

La toxine produite pourrait également induire des mécanismes de protection chez les bactéries productrices pour en limiter l'effet (Stragier 2006). Il n'est pas exclu que CPB2 soit une bactériocine plus qu'une toxine et agisse non pas contre des cellules eucaryotes mais contre d'autres bactéries de façon inter- ou intra-spécifique comme d'autres protéines clostridiennes (Timbermont et al., 2014 ; Miyamoto et al., 2015).

La question de son repliement correct *in vitro* suite aux nombreuses étapes de purification reste entière en l'absence d'épreuve de toxicité. Mais elle se pose vu la co-production en *E. coli* d'une chaperonine de la famille des GroEL (ce travail). Il en va de même pour sa structure tridimensionnelle, les essais de cristallographie n'ayant pas apporté de réponse définitive (Gurjar et al. 2007).

1.2. Les différents allèles du gène *cpb2*

Au début, la seule séquence du gène *cpb2* disponible était celle de Gibert et associés. Elle provenait d'une souche de *C. perfringens* isolée d'un porcelet mort d'entérite nécrotique. Par la suite, le séquençage de plusieurs gènes *cpb2* d'origine bovine classés comme atypiques ou consensus par PCR (Herholz et al., 1999 ; Jost et al., 2005), a permis de mettre en évidence des différences de séquence en amont de la séquence codant pour la forme mature de CPB2 entre les souches issues de porcs et celles de bovins. Ces différences expliquent les difficultés rencontrées au début de ce travail pour amplifier l'entièreté du gène *cpb2* d'origine bovine. Ces séquençages ont également permis de confirmer, grâce à l'analyse du promoteur, que la CPB2 était une exoprotéine, sécrétée dans le milieu extracellulaire.

Au niveau phylogénétique, 2 allèles différents (consensus et atypiques) ont été décrits pour le gène *cpb2*. Au début des études sur *cpb2*, les allèles décrits comme « consensus » sont détectés chez des souches de porcs atteints d'entérite nécrotique alors que les allèles dits atypiques proviennent majoritairement de *C. perfringens* d'autres espèces animales, avec ou sans entérite, ou de porcelets sains. Les allèles consensus de *cpb2* d'origine bovine sont extrêmement proches de la séquence *cpb2* du pCP13, plasmide d'une souche tellurique de *C. perfringens* de type A qui a été entièrement séquencée (Shimizu et al. 2002). Il s'agit d'un cluster indépendant de celui des allèles consensus d'origine porcine. Le gène *cpb2h2* d'origine humaine est également proche de ce cluster d'allèles consensus d'origine non porcine. Par contre, les allèles atypiques, d'origine bovine ou non, forment un cluster à part, plus éloigné phylogénétiquement des 2 autres clusters d'allèles consensus et incluant le *cpb2h1* humain. Les allèles *cpb2h1* et *cpb2h2* ont été définis en fonction de leur organisation génétique spécifique. L'allèle *cpb2h1* est sur le même plasmide que *cpe* et *cpe* est suivi d'une séquence d'insertion (IS) IS1151 alors que l'allèle *cpb2h2* et le gène *cpe* sont sur deux plasmides différents, *cpe* étant suivi d'une IS1470-like.

Ces évolutions légèrement divergentes pourraient avoir différentes explications.

La première explication, proposée par Johannson et collègues (2006), serait liée à leurs origines géographiques différentes, chacune ayant évolué « indépendamment ». Cette hypothèse est cohérente pour les souches d'origine animale ou tellurique, moins mobiles que les souches humaines. Mais elle est mise en défaut par la proximité entre le *cpb2* bovin consensus (belge), le *cpb2* tellurique du pCP13 et le *cpb2h2* d'origine humaine.

Deux études avancent l'hypothèse d'une coévolution génétique associée à un contexte clinique particulier (Fisher et al., 2005 et Harrison et al., 2005). Dans ces études, des souches de *C. perfringens* provenant de cas humains de diarrhée sporadique ou de cas associé à des traitements antibiotiques étaient très fréquemment porteuses de l'association des gènes *cpe* et *cpb2*, toujours sous forme plasmidique, alors que le gène *cpe* est principalement chromosomique au sein des souches responsables d'intoxication alimentaire (Smedley et al., 2004). Mais cette hypothèse doit être nuancée suite à une étude de 2007 (Lahti et al., 2007) dans laquelle 25% des souches responsables d'intoxication alimentaire possédaient un gène *cpe* plasmidique.

Une troisième hypothèse, qui rejoint la seconde, serait liée à une coévolution de la bactérie avec son hôte principal, comme cela a été suggéré par Justin et associés (2002) qui a mis en évidence des

différences de structure et d'activité entre des toxines alpha d'origine aviaire et celles provenant de mammifères. D'autres études vont également dans ce sens (Snel et al., 1995).

Ces différentes hypothèses doivent être éprouvées en comparant un grand nombre de séquences issues d'espèces et de localisation géographique différentes et associées ou non à une pathologie clairement définie.

1.3. Expression de CPB2 par les souches porteuses du gène

1.3.1. Capacité d'expression

Concernant la capacité des souches à exprimer la protéine-toxine CPB2, les premières études tendaient à prouver que seules les souches porteuses de l'allèle consensus de *cpb2* et issues de porcs malades étaient capables de produire la toxine CPB2 en quantité détectable. Il a ensuite été démontré (Kircansky et al., 2012) que de nombreuses souches issues d'espèces animales différentes et porteuses de l'allèle consensus ou atypique étaient capables de produire la toxine CPB2, mais à des niveaux plus faibles. Une des hypothèses proposées pour expliquer cette différence était la possible dégradation de la toxine avant qu'elle n'ait pu être détectée, à cause de temps de culture longs (48h), de sa sensibilité aux protéases et/ou de niveaux de production supposés inférieurs comparés aux souches d'origine porcine.

La possibilité, mise en évidence par Vilei et collègues (2005) de rétablir une phase de lecture (ORF) correcte chez des souches possédant 6 adénines au lieu de 7 en amont du « start » par un mécanisme de codons glissants a également ouvert de nouvelles perspectives. La délétion d'une adénine fait apparaître un codon « stop » précoce, ce qui rendrait *a priori* ces souches incapables de produire la toxine CPB2 (Bueschel et al., 2003). Cette possibilité de rétablissement de la phase de lecture par codons glissants semble également exister au sein de souches *cpb2+* d'origine bovine au vu des résultats de séquençages réalisés sur des allèles *cpb2* de type consensus ou atypiques. Ce mécanisme, connu chez les bactéries et les virus, est régulièrement associé à des séquences polyA (Kerrigan et al, 2008 ; Dinman 2012 ; Gueguen et al., 2014). Les séquençages de *cpb2* d'origine bovine ont également permis de mettre en évidence la présence d'un autre ATG, ou codon « start », au début de la phase de lecture et qui se situe donc dans une zone de divergence de séquence par rapport au gène de référence porcin. Cet autre codon start peut également rétablir une phase de lecture correcte. Ces deux observations sont cohérentes avec les résultats de ce travail dans lequel un nombre étonnamment élevé de souches *cpb2+* de type atypique se sont montrées capables d'exprimer la toxine CPB2 à un niveau détectable par Western Blot.

Au-delà de l'expression du gène, sa persistance au sein de souches de *C. perfringens* pose également question. En effet, la mobilité d'un gène est une caractéristique importante de son évolution. Le gène *cpb2* est plasmidique (Gibert et al., 1997 ; Fisher, 2005) et les plasmides qui le portent peuvent être conjugatifs (Miyamoto et al., 2006 ; Sayed et al, 2007 ; Bannam et al., 2011). *Cpb2* peut également être associé à des séquences mobiles de type IS (Fisher et al., 2005 ; Harrison et al., 2005). Cette mobilité potentielle est à la fois une opportunité de se propager de souches en souches (*in vivo*) et un risque de perte notamment lors de manipulations stressantes comme des phases d'aérobiose (Popoff, communication orale). À l'inverse, Vilei et collègues (2005) considèrent le gène *cpb2* comme un gène cryptique, dont on peut rétablir l'ORF dans certaines circonstances (comme les situations de

stress). Ce type de gène est en général stable et conservé, car il représente une capacité d'adaptation supplémentaire pour la bactérie.

1.3.2. Niveau d'expression

Il existe différents mécanismes de régulation qui peuvent influencer le couple *cpb2*-CPB2 et par conséquent le niveau de production de la toxine. Parmi ceux-ci, la production de la toxine CPB2 est soumise à un contrôle positif du système de quorum sensing Agr-like notamment via le tandem *virR/virS* (Ohtani et al., 2009 ; Li et al., 2011 ; Vidal et al., 2012). Ces systèmes de régulation complexes sont influencés à la fois par le milieu interne de la bactérie (auto-induction : Kashiwagi et al., 2015) mais également par son environnement physico-chimique et bactériologique (Marchand et al., 2013), qui sera évoqué plus tard dans la discussion sur l'entérotoxémie. Les mécanismes de quorum sensing auxquels participent les systèmes Agr et Agr-like sont étudiés depuis de nombreuses années mais restent insuffisamment compris. Néanmoins, ils représentent une possibilité d'alternative à l'utilisation des antibiotiques, car ils pourraient permettre de réduire voire de contrôler l'expression des facteurs de virulence de nombreuses bactéries (Gray et al., 2013).

L'expression de la toxine CPB2 est également stimulée lors de contact avec des cellules Caco-2 (de « type » intestinal, Vidal et al., 2009) ou, pour des souches d'origine équine, lors de mise en culture en présence d'antibiotiques de la famille des aminosides (Vilei et al., 2005). Par contre, un pH acide (4,5 à 7) va inhiber la production de toxine sans pour autant compromettre la viabilité des cellules productrices (Allaart et al., 2011).

Si des études montrent qu'une majorité des gènes *cpb2* sont exprimés (Kircanski et al., 2012), les scientifiques ne s'accordent pas sur le ou les mécanisme(s) qui différencient les souches fortement ou faiblement productrices de CPB2. Certains plaident pour des différences au niveau de la transcription (Harrisson et al., 2005 ; Waters et al., 2005), avec des niveaux de mRNA faibles ou des mRNA instables chez les souches dont le niveau de production est faible voire insuffisant pour être détecté par les méthodes classiques comme le Western blot. D'autres penchent pour une régulation principalement au niveau de la traduction (Vilei et al., 2005), l'augmentation de la quantité de CPB2 produite lors d'induction n'étant pas corrélée avec une augmentation des mRNA correspondants. Ces deux hypothèses ne sont pas contradictoires, l'augmentation de la traduction par induction pouvant toucher des souches possédant différents niveaux de mRNA.

Les prédictions de structures primaires et secondaires en a.a. de la toxine CPB2 ne semblent pas présenter de variations majeures entre-elles, mais Kircanski et associés (2012) ont montré que lors d'utilisation d'anticorps monoclonaux, il pourrait exister des différences d'épitopes et donc de capacité de détection en fonction de l'anticorps utilisé. À ce jour, les essais de détermination de la structure tridimensionnelle de CPB2 par cristallographie n'ont pas permis de déterminer quels sont les résidus responsables de son antigénicité et/ou de son activité (Gurjar et al., 2007), comme cela a été fait pour la toxine CPA (Justin et al., 2002 ; Vachieri et al., 2010).

Il reste d'autres points à éclaircir concernant la toxine CPB2, notamment son mode de libération *in vivo*, mode de libération qui pourrait la protéger et influencer sa toxicité (Fischer 2006) ou plus simplement sa structure tridimensionnelle évoquées ci-dessus.

1.4. L'alternative à la production de la protéine native

Les difficultés à produire la toxine CPB2 native nous ont conduit à construire des protéines tronquées N- et C-terminales sur base de la séquence en acides aminés. Cela a permis d'augmenter les niveaux de production de protéines spécifiquement détectées par des anticorps anti-CPB2 et de produire des anticorps spécifiques capables de détecter CPB2. Ce type de construction a également été réalisé dans d'autres études dans un but d'immunisation *in vivo* avec des résultats encourageants chez la souris (Xu et al., 2005, Zeng et al., 2011) ou en culture de cellules de type intestinal (Zeng et al., 2016).

1.5. Implication de *cpb2*-CPB2 dans l'entérotoxémie bovine

Dans les premières études réalisées sur des bovins ou plus récemment (Bueschel et al., 2003 ; Jost et al., 2005, Fohler et al., 2016), les gènes *cpb2* étaient presque majoritairement identifiés comme atypiques et les souches semblaient faiblement capables, *in vitro*, d'exprimer la toxine à un niveau détectable par Western Blot.

À l'inverse, dans le cadre de ce travail, l'étude de terrain réalisée sur des veaux d'élevage a mis en évidence (i) une dominance de gènes *cpb2* de type consensus au sein de souches isolées de bovins morts d'entérotaxémie et (ii) la faculté de ces souches à exprimer la toxine à des niveaux détectables par Western blot. Cette capacité d'expression était élevée pour les souches porteuses de l'allèle consensus et non nulle pour les souches porteuses de l'allèle atypique.

Ces différences de résultats peuvent notamment être liées au fait que les études de terrain ne ciblent pas les mêmes syndromes au départ. Notre travail concernait exclusivement des cas d'entérotaxémie (mort brutale avec des lésions d'entérite hémorragique segmentaire, prélèvement en zone lésionnelle et comptage $>10^6$ CFU/ml) alors que dans d'autres études, les cas sélectionnés étaient plus vagues, répondant uniquement à la définition de « pathologie digestive associée à *C. perfringens* ». De plus, les conditions de culture mises en œuvre (12 à 24h maximum en milieu anaérobie strict) pourraient aussi expliquer le meilleur taux d'expression de la toxine dans notre étude. Une étude de Kircansky et associés (2012) a également montré que la majorité des gènes *cpb2* dit atypiques étaient exprimés ou pour le moins possédaient les caractéristiques nécessaires pour l'être.

L'étude sur les veaux de boucherie semble ne pas répondre aux mêmes règles concernant les comptages clostridiens, les allèles détectés ainsi que le lien entre les symptômes et lésions observés, impression renforcée par les travaux de Valgaeren et associés (2013). Comparé à l'élevage dit conventionnel, ce type d'élevage présente des caractéristiques spécifiques tant au niveau de l'alimentation que des stress imposés à ces animaux. En effet, de jeunes veaux provenant de nombreux élevages différents sont regroupés et reçoivent un régime non physiologique pour leur âge : de grandes quantités de lactoreplaceurs et peu d'aliment solide. Ce régime a pour objectif un gain quotidien moyen satisfaisant et une viande légèrement rosée.

2. ÉTUDE DE L'ENTÉROTOXÉMIE

L'entérotoxémie est une toxémie d'origine digestive au sens large. Notre travail concerne plus précisément l'entérotoxémie à *Clostridium perfringens* chez les bovins et l'implication éventuelle des souches *cpb2+*/CPB2+.

Une première difficulté apparaît quant à la possibilité de réellement **comparer les études** publiées sur l'entérotoxémie du bovin. En effet, vu le peu de publications incluant les informations sur les symptômes et lésions observés chez les animaux « cas » (entérotoxémie, entérite +/- nécro-hémorragique, diarrhée, mort subite) et sur les méthodes utilisées pour identifier et éventuellement dénombrer les clostridies, il est souvent difficile voire impossible de confronter valablement les études réalisées. De plus, rares sont les études qui comportent une population témoin et lorsque c'est le cas, ces témoins sont rarement bien caractérisés (abattus, morts d'une autre pathologie, etc).

2.1. Aspects bactériologiques de l'entérotoxémie bovine

Concernant l'**aspect bactériologique**, la question du mode d'amplification de la population clostridienne et de son impact réel en cas d'entérotoxémie est débattue depuis longtemps (Manteca et al., 2004 ; Valgaeren et al., 2013).

2.1.1. Facteurs déclenchants - Initiation

De nombreuses études se sont intéressées aux facteurs déclenchant la multiplication anarchique des *C. perfringens*. Très souvent associée à des changements brutaux principalement de nature alimentaire (Valgaeren et al., 2013), l'initiation de cette multiplication n'a jusqu'à présent pas pu être reproduite en conditions expérimentales. Elle suppose des conditions avantageuses pour *C. perfringens* au sein de l'intestin et de sa flore. Ces conditions peuvent être de nature diverse comme un meilleur accès aux nutriments avec compensation de l'auxotrophie (Liu et al., 2010) et/ou un appauvrissement de la flore compétitrice (McFarland, 2008 ; Luzina et Lareva, 2013) qui favoriserait les clostridies elles-mêmes, ou une diminution des protéases à l'avantage de certaines toxines clostridiennes.

Un ralentissement du transit intestinal voire un iléus serait favorable à la multiplication des clostridies (Manteca et al., 2003) de même que la petite taille des particules alimentaires ou l'augmentation de la viscosité du bol alimentaire (Timbermont et al., 2011). Néanmoins, l'iléus pourrait aussi être une conséquence des lésions du système nerveux autonome intestinal associées à l'entérotoxémie (Manteca et al., 2002).

Parmi les situations qui pourraient favoriser la compensation de l'auxotrophie des *C. perfringens* on peut citer les troubles alimentaires, ou erreurs de ration à l'origine d'un excès de protéines ou d'hydrates de carbone au niveau intestinal. Ces nutriments étant alors accessibles aux clostridies suite au dépassement des capacités de digestion ou d'absorption du tube digestif (Timbermont et al., 2011 ; Valgaeren 2015). De plus, en cas d'excès de protéines, celles-ci peuvent monopoliser les protéases digestives, ce qui va réduire la destruction de certaines toxines clostridiennes. La présence d'agents infectieux induisant des lésions cellulaires et un état inflammatoire ou perturbant l'effet protecteur du biofilm intestinal pourrait également améliorer l'accès des clostridies à des nutriments essentiels propices à leur multiplication. Cette hypothèse est appuyée par des études récentes sur le

rôle des coccidies chez la volaille (Timbermont et al., 2011), et de Giardia chez l'homme (Buret et al., 2015 communication orale SNGTV 2016) en association avec des clostridies.

Concernant les flores inhibitrices ou compétitrices, plusieurs études ont démontré que des bactéries de la flore commensale étaient capables de limiter la prolifération des clostridies par différents mécanismes (Kizerwetter-Swida et Binek, 2005, 2015). Certaines agissent directement sur la multiplication des clostridies en modifiant le milieu (pH, H₂O₂) ou en produisant des bactériocines (Naaber et al., 2004 ; Teo et al., 2005 ; Klose et al., 2010). D'autres agissent sur la toxinogénèse des clostridies (Allaart et al., 2011 ; Woo et al., 2011, Schoster et al., 2013) ou modulent la réaction inflammatoire et immunitaire stimulée par les clostridies (Chen et al. 2006 ; Cao et al., 2012). D'autres enfin comme *E. coli* Nissle1917 agissent sur différents éléments du métabolisme clostridien (Jiang et al., 2014). L'altération de ces flores compétitrices, suite à un désordre alimentaire ou un traitement antibiotique, peut être à l'origine d'une prolifération anarchique de *C. perfringens*.

De plus, comme *C. perfringens* est capable de produire un biofilm, seule ou en association avec d'autres agents pathogènes (Fox et al., 2014) ces souches pourraient être moins exposées aux agressions des autres bactéries ou des antibiotiques.

2.1.2. Type d'amplification : mono ou polyclonale

Au-delà des facteurs initiant la multiplication de *C. perfringens*, il faut aussi déterminer s'il s'agit d'une multiplication multi ou monoclonale. À l'heure actuelle, l'amplification clonale ou l'amplification préférentielle de certains clones possédant des propriétés intéressantes est l'hypothèse la plus plausible. Plusieurs éléments plaident en ce sens. D'abord, l'amplification clonale a été démontrée dans le cas de l'entérite nécrotique de la volaille (Gholamiandekhordi et al., 2006 ; Chalmers et al., 2008, Timbermont et al., 2011), pathologie présentant des points communs avec l'entérotoxémie bovine. Ensuite, au cours de ce travail, chez les bovins d'élevage traditionnel morts d'entérotoxémie, lorsque le gène *cpb2* était détecté, il l'était dans la majorité des souches testées chez un même animal (Lebrun et al., 2007). Enfin, les plasmides porteurs de *cpb2* peuvent être des plasmides conjugatifs, ce qui permet un transfert rapide d'une souche à l'autre au sein de la flore (Miyamoto et al., 2006 ; Bannam et al., 2011). Cependant, une étude récente sur anses ligaturées, réalisée sur des veaux de boucherie, tend plutôt à montrer une amplification de l'ensemble de la population clostridienne (Valgaeren, données non publiées).

S'il s'agit effectivement d'une multiplication clonale ou « pauci-clonale », il reste à déterminer pourquoi un clone est amplifié au détriment des autres.

La cinétique de toxinogénèse de *C. perfringens* fournit probablement une réponse partielle à cette question. En effet, la production de toxines par *C. perfringens* est particulièrement précoce comparée à d'autres genres bactériens. Cette précocité est en partie expliquée par l'auxotrophie de *C. perfringens* (Schotte et al., 2004 ; Jost et al., 2006). Cette auxotrophie la contraint à se procurer, au départ de son environnement immédiat, certains éléments essentiels à sa croissance qu'elle est incapable de produire elle-même. Les clones les plus aptes à tirer profit rapidement et efficacement de leur environnement sont probablement favorisés. Le bagage enzymatique des souches a donc son importance, tant pour l'accès aux nutriments que pour l'initiation du processus pathologique. Ce dernier point remet en cause la hiérarchisation des toxines en majeures ou mineures. Plusieurs équipes de recherche ont découvert le rôle primordial de toxines dites « mineures » ou d'enzymes

protéolytiques dans les étapes essentielles de l'initiation des lésions et de la colonisation intestinale par *C. perfringens* (Olkowski et al., 2008, Li et al., 2011, Timbermont et al., 2011). Une étude récente (Prescott et al., 2016) a également montré l'importance de ces enzymes (glycoside hydrolases) dans l'initiation des lésions d'entérite nécrotique chez la volaille. D'autres ont démontré l'action synergique de toxines dites majeures et mineures (Verherstraeten et al., 2013 et 2015).

La capacité à inhiber le développement des autres souches de façon intra-spécifique par la production de bactériocines comme la Perfrin, semble être une autre technique utilisée par *C. perfringens* dans certaines circonstances (Barbara et al., 2008 ; Timbermont et al., 2009 ; Timbermont et al., 2014) et il n'est pas exclu que la toxine CPB2 puisse agir de la sorte, notamment si on se réfère à son possible effet délétère sur la membrane externe des *E. coli BL21 Codon+ RIL* ou à la difficulté d'obtenir des quantités élevées de CPB2 en *Bacillus subtilis* comme en *E. coli*.

Il n'est pas exclu non plus que *C. perfringens* agisse en synergie avec d'autres bactéries, notamment *Escherichia coli* (Morris et al., 2011), voire avec d'autres types d'agents pathogènes comme *Candida* (Fox et al., 2014), *Giardia* (Buret 2015), ou avec des coccidies (Timbermont et al., 2011). Les unes créant des conditions favorables au développement des autres.

En cas de toxicité, on ignore donc à l'heure actuelle, si cette toxicité est dirigée uniquement contre les cellules intestinales (Gibert et al., 1997 ; Allaart et al., 2014) ou aussi contre d'autres membres de la flore commensale dans un contexte de compétition interspécifique (Schoster et al., 2013).

2.2. Aspects toxiques de l'entérotoxémie bovine

Sur base des études récentes (Allaart et al., 2014 ; Zeng et al., 2016) et des difficultés à reproduire des lésions ou symptômes au départ de la toxine CPB2, celle-ci n'est clairement pas impliquée seule dans la genèse de l'entérotoxémie bovine. Elle pourrait agir dans certaines circonstances seulement et, en synergie ou en cascade avec d'autres toxines et/ou enzymes, les unes préparant le terrain ou optimisant l'effet des autres (Fernandez-Miyakawa et al., 2008 ; Olkowski et al., 2008 ; Timbermont et al., 2009 ; Li et al., 2011). Les potentiels co-effecteurs de CPB2 sont nombreux. Pour les toxines on peut citer CPA (Manteca et al., 2002 ; Cooper et al., 2010), CPE (Fisher et al., 2005 ; Harrison et al., 2005), Cna (Jost et al., 2006) et NetB (Keyburn et al., 2010 ; Hibberd et al., 2011 ; Prescott et al., 2016), Tpel (Coursodon et al., 2012; Pauillac et al., 2013 ; Chen et al., 2015). Concernant les trois dernières toxines, leur présence chez les bovins sains ou malades n'a pas encore été étudiée. En ce qui concerne CPE, elle n'a jamais été détectée parmi les souches bovines étudiées dans ce travail, ou dans des travaux antérieurs réalisés dans notre laboratoire (Daube et al., 1994 ; Daube et al., 1996).

Il se peut également que CPB2 soit produite dans un microenvironnement, entre des cellules intestinales et clostridiennes, où elle serait partiellement protégée puisqu'elle est sensible à divers éléments comme l'oxygène, la trypsine et la chaleur (Gibert et al., 1997 ; Fischer, 2006). Vidal et associés (2009) ont montré que le contact avec des cellules intestinales de type Caco2 induisait l'expression rapide de plusieurs toxines clostridiennes, dont CPB2 (Uzal et McLane, 2011). Il a également été démontré que les *C. perfringens* ont la capacité d'adhérer à certaines molécules de la matrice extracellulaire intestinale, surtout les souches pathogènes, ou à des cellules de « type intestinal », comme les Caco2, mais dans ce cas, sans que cela semble systématiquement lié à la virulence de la souche (Martin et Smyth, 2010 ; Li et Mc Lane, 2014). Les enzymes produites précocement lors de la toxinogénèse pourraient participer à ce phénomène en permettant aux

clostridies d'avoir un contact intime avec les cellules ou la matrice extracellulaire de l'intestin (Olkowski et al., 2008 ; Verhertraeten et al., 2013). Il en va de même pour les souches capables de former un biofilm, situation qui semble stimuler la formation de pili se fixant à la matrice extracellulaire (Varga et al., 2008). Ces différents éléments rendent plausible l'hypothèse d'un microenvironnement propice et la présence de co-effecteurs.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail a permis de caractériser les différents allèles présents au locus *cpb2* de souches de *C. perfringens* bovines et de produire et purifier une toxine CPB2 recombinante. Utilisée comme antigène dans un processus d'hyperimmunisation, elle nous a permis d'obtenir un antisérum polyclonal spécifique à visée diagnostique. Les 2 études de terrain réalisées ensuite ont révélé une situation très différente selon la spéculation envisagée. Les différences observées entre les études sur des veaux d'élevage conventionnel (Lebrun et al., 2007) d'une part, et sur des veaux de boucherie (Muylaert et al., 2010 ; Valgaeren et al. 2013) d'autre part, suggèrent que la toxine CPB2 pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie de l'entérite nécro-hémorragique chez les bovins, mais dans certaines circonstances seulement, lesquelles semblent réunies chez les veaux d'élevage. Il pose donc la question de la définition précise de l'entérotoxémie bovine et de son lien avec le type d'élevage considéré.

Dans le futur, l'étude des flores digestives et de leur complexe équilibre permettra de mieux comprendre la physiopathologie de l'entérotoxémie et de nombreuses autres pathologies, digestives ou non.

À l'échelle des populations microbiennes, à côté des modèles d'anses ligaturées, les puces ADN (Al-Khaldi et al., 2004), la métagénomique (Pitta et al., 2016) et les tubes digestifs artificiels (SHIME, Marzorati et Van de Wiele 2016) offrent de nouvelles perspectives concernant l'étude des flores et leurs dynamiques. En biologie moléculaire, le séquençage à haut débit et les progrès en protéomique permettront d'améliorer la compréhension de la diversité au sein même d'une espèce bactérienne ainsi que l'influence que certaines espèces exercent l'une sur l'autre. En ce qui concerne le couple *cpb2*-CPB2 et sa phylogénie, le séquençage d'un grand nombre de séquences dont l'origine géographique et clinique est clairement caractérisée serait nécessaire. Ainsi que l'étude des associations génétiques qui peuvent exister entre *cpb2* et d'autres gènes, tels que *cpe* (Fisher et al., 2005).

La combinaison de ces différentes techniques permettra, de déterminer quel type et quelle cinétique d'amplification subissent les *C. perfringens* en cas d'entérotoxémie. Peut-être également, de définir certains facteurs susceptibles de déclencher cette croissance exponentielle, des études récentes ayant permis de dégager certaines pistes liées à l'alimentation des veaux et sa composition (Valgaeren, 2015). L'étude des facteurs qui conduisent à la production des toxines, dont CPB2, méritent également d'être approfondie. En effet, la production des toxines clostridiennes dépend de multiples facteurs de régulation, positifs ou négatifs notamment via le quorum sensing (Hiscox et al., 2011).

Ces différentes avancées dans la compréhension du microbiote digestif et de son dynamisme ouvriront des perspectives en termes de contrôle de l'équilibre des flores commensales et par conséquent en termes de prévention de diverses pathologies digestives et métaboliques. Qu'il s'agisse de vaccins, de pré- ou de probiotiques, ces approches préventives sont stratégiques dans un contexte où l'usage non raisonné des antibiotiques est fortement remis en cause alors que la taille des élevages et les risques sanitaires associés tendent à augmenter.

BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

A

- ABILDGAARD L., SONDERGAARD T.E., ENGBERG R.M., SCHRARMM A., HOJBERG O. In vitro production of necrotic enteritis toxinB, NetB, by netB-positive and netB-negative *Clostridium perfringens* originated from healthy and diseased broiler chickens. *Vet. Microbiol.*, 2010, **144**(1-2),231-235.
- ABUTARBUSH S.M., CARMALT J.L., WILSON D.G., O'CONNOR B.P., CLARK E.G., NAYLOR J.M. Jejunal hemorrhage syndrome in 2 Canadian beef cows. *Can. Vet. J.*, 2004, **45**, 48-50.
- ABUTARBUSH S.M., RADOSTITS O.M. Jejunal hemorrhage syndrome in dairy and beef cattle: 11 cases (2001 to 2003). *Can. Vet. J.*, 2005, **46**, 711-715.
- ADAMSON R.H., LY J.C., FERNANDEZ-MIYAKAWA M., OCHI S., SAKURAI J., UZAL F., CURRY F.E. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin increases permeability of single perfused microvessels of rat mesentery. *Infect. Immun.*, 2005, **73**, 4879-4887.
- ADCOCK P.W., SAINT C.P. Rapid confirmation of *Clostridium perfringens* by using chromogenic and fluorogenic substrates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**, 4382-4384.
- ASCHFALK A., VALENTIN-WEIGAND P., MULLER W., GOETHE R. Toxin Types of *Clostridium perfringens* isolated from free-ranging, semi-domesticated reindeer in Norway. *Vet. Rec.* 2002, **15**, 202-213.
- AGRAWAL N., BETTEGOWDA C., CHEONG I., GESCHWIND J.F., DRAKE C.G., HIPKISS E.L., TATSUMI M., DANG H., DIAZ L.A. JR, POMPER M., ABUSEDERA M., WAHL R.L., KINZLER K.W., ZHOU S., HUSO D.L., VOGELSTEIN B. Bacteriolytic therapy can generate a potent immune response against experimental tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2004, **101**(42), 15172-15177.
- AKTORIES K., WEGNER,A. Mechanism of cytopathic action of actin-ADP-ribosylating toxins. *Mol. Microbiol.* 1992, **6**, 2905-2908.
- AL-KHALDI S.F., MYERS K.M., RASOOLY A., CHIZHIKOV V. Genotyping of *Clostridium perfringens* toxins using multiple oligonucleotide microarray hybridization. *Mol. Cell Probes.* 2004, **18**, 359-367.
- AL-KHALDI S.F., VILLANUEVA D., CHIZHIKOV V. (2004) Identification and characterization of *Clostridium perfringens* using single target DNA microarray chip. *Intern. J. Food Microbiol.* 2004, **91**, 289-296.
- ALBINI S., BRODARD I., JAUSSI A., WOLLSCHLAEGER N., FREY J., MISEREZ R., ABRIL C. Real-time multiplex PCR assays for reliable detection of *Clostridium perfringens* toxin genes in animal isolates. *Vet Microbiol.* 2008, **127**(1-2), 179-185.
- ALDAPE M.J., BRYANT A.E., STEVENS D.L. *Clostridium sordellii* infection: epidemiology, clinical findings, and current perspectives on diagnosis and treatment. *Clin. Infect. Dis.* 2006, **43**(11), 1436-1446.
- ALLAART JG, VAN ASTEN AJ, VERNOOIJ JC, GRÖNE A. Effect of *Lactobacillus fermentum* on beta2 toxin production by *Clostridium perfringens*. *Appl Environ. Microbiol.* 2011, **77**(13), 4406-4411. doi: 10.1128/AEM.03002-10.
- ALLAART J.G., VAN ASTEN A.J., VERNOOIJ J.C., GRÖNE A. Beta2 toxin is not involved in in vitro cell cytotoxicity caused by human and porcine cpb2-harboring *Clostridium perfringens*. *Vet. Microbiol.* 2014, **171**(1-2), 132-138. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.03.020.

ANNETT C.B., VISTE J.R., CHIRINO-TREJO M., CLASSEN H.L., MIDDLETON D.M., SIMKO E. Necrotic enteritis: effect of barley, wheat and corn diets on proliferation of *Clostridium perfringens* type A. *Avian Pathol.* 2002, **31**, 598-601.

ARBUCKLE J.B.R. The attachment of *Clostridium welchii* (Cl. *Perfringens*) type C to intestinal villi of pigs. *J. Pathol.* 1972, **106**, 65-72.

ARNON S.S. in ROOD J.I., MCCLANE B.A., SONGER J.G., TITBALL R.W. (1997) *The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis*, London : Academic Press (Ed), San Diego (United States). Pp 95-113.

ARONOFF D.M., BALLARD J.D. *Clostridium sordellii* toxic shock syndrome. *Lancet Infect. Dis.* 2009, **9**(12), 725-726.

ARROYO L.G., WEESE J.S., STAEMPFLI H.R. Experimental *Clostridium difficile* enterocolitis in foals. *J. Vet. Intern. Med.* 2004, **18**(5), 734-738.

ARROYO L.G., STÄMPFLI H.R., WEESE J.S. Potential role of *Clostridium difficile* as a cause of duodenitis-proximal jejunitis in horses. *J. Med. Microbiol.* 2006, **55**(Pt5), 605-608.

ASUBEL F.M., BRENT R., KINGSTON R.E., MOORE D.D., SEIDMAN J.G., SMITH J.A., STRUHL K. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley Intersciences : New York. 1991.

AWAD M.M., ELLEMOR D.M., BOYD R.L., EMMINS J.J., ROOD J.I. Synergistic Effects of Alpha-Toxin and Perfringolysin O in *Clostridium perfringens*-Mediated Gas Gangrene. *Infect. Immun.* 2001, **69**, 7904-7910.

B

BA-THEIN W., LYRITIS M., OHTANI K., NISBET I.T., HAYASHI H., ROOD J.I., SHIMIZU T. The *virR/virS* Locus Regulates the Transcription of Genes Encoding Extracellular Toxin Production in *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* 1996, **178**, 2514-2520.

BACCIARINI L.N., PAGAN O., FREY J., GRÖNE A. *Clostridium perfringens* β -toxin in an African elephant (*Loxodonta africana*) with ulcerative enteritis. *Vet. Rec.* 2001, **149**, 618-620.

BACCIARINI L.N., BOERLIN P., STRAUB R., FREY J., GRÖNE A. Immunohistochemical localization of *Clostridium perfringens* β -Toxin in the Gastrointestinal Tract of Horses. *Vet. Pathol.* 2003, **40**, 376-381.

BAI J.N., ZHANG Y., ZHAO B.H. (2006) Cloning of alpha-beta fusion gene from *Clostridium perfringens* and its expression. *World J. Gastroenterol.* 2006, **12**, 1229-1234.

BARBARA A.J., TRINH H.T., GLOCK R.D., GLENN SONGER J. Necrotic enteritis-producing strains of *Clostridium perfringens* displace non-necrotic enteritis strains from the gut of chicks. *Vet Microbiol.* 2008, **126**(4), 377-382.

BARBOSA T.M., SERRA C.R., LA RAGIONE R.M., WOODWARD M.J., HENRIQUES A.O. Screening for bacillus isolates in the broiler gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, **71**, 968-978.

BARKER I.K., VAN DREUMEL A.A., PALMER, N. (1993) *The alimentary system, Disease associated with enteric clostridial infection in : K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy , and N. Palmer (Ed.), Pathology of Domestic Animals (5th Ed., Vol. 2) Academic Press, San Diego p213-221.*

- BASAK A.K (2002) Clostridial Phospholipase Cs. Proceeding of the Meeting 2 of the European Concerted Action QLK2-CT2001-01267: Pathology and ecology of the genus Clostridium in humans, animals and foodstuffs: Protein toxins and vaccination. Salisbury, UK, November 20 to 22, 2002. p 69-81.
- BAUMS C.G., SCHOTTE U., AMTSBERG G., GOETHE R. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of Clostridium perfringens isolates. *Vet. Microbiol.* 2004, **100**, 11-16.
- BEAL D.R., TITBALL R.W., LINDSAY C.D. The development of tolerance to Clostridium perfringens type D epsilon-toxin in MDCK and G-402 cells. *Human Experim. Toxicol.* 2003, **22**, 593-605.
- BEAUCHEMIN K.A., YANG W.Z., MORGAVI D.P., GHORBANI G.R., KAUTZ W., LEEDLE J.A. Effects of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. *J. Anim. Sc.* 2003, **81**, 1628-1640.
- BELYI I.F., VARFOLOMEEVA N.A. Construction of a fusion protein carrying antigenic determinants of enteric clostridial toxins. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003, **225**, 325-329.
- BENNETT A.M., LESCOTT T., PHILLPOTTS R.J., MACKETT M., TITBALL, R.W. Recombinant vaccinia viruses protect against Clostridium perfringens alpha-toxin. *Viral Immunol.* 1999, **12**, 97-105.
- BENTANCOR A.B., FERMEPIN M.R., BENTANCOR L.D., DE TORRES RA. (1999) Detection of the etx gene (epsilon-toxin inducer) in plasmids of high molecular weight in Clostridium perfringens type D. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1999, **24**, 373-377.
- BERGEY D.H., BREED, R.S., MURRAY, E.D.G., HITCHENS, A.P. (1939) The genus Clostridium, in Bergey's manual of determinative bacteriology. 5th edition. Baltimore, William and Wilkins., p551-572.
- BERGHAUS R.D., MCCLUSKEY B.J., CALLAN, R.J. Risk factors associated with hemorrhagic bowel syndrome in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2005, **226**, 1700-1706.
- BILLINGTON S.J., WIECKOWSKI E.U., SARKER M.R., BUESCHEL D., SONGER J.G., MCCLANE B.A. Clostridium perfringens type E animal enteritis isolates with highly conserved, silent enterotoxin gene sequences. *Infect. Immun.* 1998, **66**, 4531-4536.
- Biological production of acetic acid from waste gases with Clostridium ljungdahlii. US Patent Issued on September 15, 1998
- Biological production of ethanol from waste gases with Clostridium ljungdahlii. US Patent Issued on October 24, 2000.
- BLAYNEY L.M., GAPPER P.W., NEWBY A.C. Phospholipase C isoforms in vascular smooth muscle and their regulation by G-proteins. *Brit. J. Pharmacol.* 1996, **118**, 1003-1011.
- BLOCKER D., BEHLKE J., AKTORIES K., BARTH H. Cellular uptake of the Clostridium perfringens binary iota-toxin. *Infect. Immun.* 2001, **69**, 2980-2987.
- BORGIA G, MARAOLO AE, FOGGIA M, BUONOMO A.R, Gentile I. Fecal microbiota transplantation for Clostridium difficile infection: back to the future. *Expert Opin Biol Ther.* 2015, **15**(7), 1001-1014.
- BOUJON P., HENZI M., PENSEYRES JH., BELLOY L. Enterotoxaemia involving beta2-toxigenic Clostridium perfringens in a white stork (Ciconia ciconia). *Vet. Rec.* 2005, **156**, 746-747.
- BRAUN U., STEINER A., GOTZ, M. Clinical signs, diagnosis and treatment of duodenal ileus in cattle. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 1993, **135**, 345-355.

BRAUN M., HERHOLZ C., STRAUB R., CHOISAT B., FREY J., NICOLET J., KUHNERT P. Detection of the ADP-ribosyltransferase toxin gene (cdtA) and its activity in *Clostridium difficile* isolates from Equidae. *FEMS Microbiol Lett.* 2000, **184**(1), 29-33.

BRYANT A.E., CHEN R.Y.Z., NAGATA Y., WANG Y., LEE C.H., FINEGOLD S., GUTH P.H., STEVENS D.L. Clostridial gas gangrene. I. Cellular and molecular mechanisms of microvascular dysfunction induced by exotoxins of *Clostridium perfringens*. *J. Infect. Dis.* 2000, **182**, 799-807.

BRYNESTAD S., SARKER M.R., MCCLANE B.A., GRANUM P.E., ROOD J.I. Enterotoxin plasmid from *Clostridium perfringens* is conjugative. *Infect. Immun.* 2001, **69**, 3483-3487.

BUESCHEL D., WALKER R., WOODS L., KOKAI-KUN J., MCCLANE B., SONGER, J.G. (1998) Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A necrotic enteritis in a foal. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1998, **213**, 1305-1307.

BUESCHEL D.M., JOST B.H., BILLINGTON S.J., TRINH H.T., SONGER J.G. Prevalence of cpb2, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. *Vet. Microbiol.* 2003, **94**, 121-129.

BULLIFENT H.L., MOIR A., AWAD M.M., SCOTT P.T., ROOD J.L., TITBALL R.W. The level of expression of β -toxin by different strains of *Clostridium perfringens* is dependent upon differences in promoter structure and genetic background. *Anaerobe.* 1996, **2**, 365-371.

BUNTING M., LORANT D.E., BRYANT A.E., ZIMMERMAN G.A., MCINTYRE T.M., STEVENS D.L., PRESCOTT S.M. Alpha Toxin from *Clostridium perfringens* Induces Proinflammatory Changes in Endothelial Cells. *J. Clin. Invest.* 1997, **100**(3), 565-574.

BURGER S., TATGE H., HOFMANN F., GENTH H., JUST I., GERHARD R. Expression of recombinant *Clostridium difficile* toxin A using the *Bacillus megaterium* system. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2003, **307**, 584-588.

BUXTON D., LINKLATER K.A., DYSON, D.A. Pulpy kidney disease and its diagnosis by histological examination. *Vet. Rec.* 1978, **102**, 241.

C

CAO L., YANG X.J., LI Z.J., SUN F.F., WU X.H., YAO J.H. Reduced lesions in chickens with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis by *Lactobacillus fermentum* 1.20291. *Poult. Sci.* 2012, **91**(12), 3065-3071. doi: 10.3382/ps.2012-02548.

CARNEY T., PERRY J.D., FORD M., MAJUMDAR S., GOULD F.K. Evidence for antibiotic induced *Clostridium perfringens* diarrhea. *J. Clin. Pathol.* 2002, **55**, 240.

http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/id_Csordellii.html Consulté le 23/02/10

CECI L., PARADIES P., SASANELLI M., DE CAPRARIIS D., GUARDA F., CAPUCCHIO M.T., CARELLI, G. Haemorrhagic bowel syndrome in dairy cattle: possible role of *Clostridium perfringens* type A in the disease complex. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.* 2006, **53**, 518-523. Erratum in: *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 2007, **54**, 55.

CHAKRABARTI G., ZHOU X., MCCLANE B.A. Death pathways activated in CaCo-2 cells by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infect. Immun.* 2003, **71**, 4260-4270.

CHEN X., KOKKOTOU E.G., MUSTAFA N., BHASKAR K.R., SOUGIOULTZIS S., O'BRIEN M., POTHOUKAKIS C., KELLY C.P. *Saccharomyces boulardii* inhibits ERK1/2 mitogen-activated protein kinase activation both in vitro and in vivo and protects against *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis. *J. Biol Chem.* 2006, **281**(34), 24449-24454.

CHEN J., MCCLANE B.A. Characterization of *Clostridium perfringens* TpeL toxin gene carriage, production, cytotoxic contributions, and trypsin sensitivity. *Infect Immun.* 2015, **83**(6), 2369-2381. doi: 10.1128/IAI.03136-14.

CHEUNG J.K., KEYBURN A.L., CARTER G.P., LANCKRIET A.L., VAN IMMERSEEL F., MOORE R.J., ROOD J.I. The VirSR two-component signal transduction system regulates NetB toxin production in *Clostridium perfringens*. *Infect Immun.* 2010, **78**(7), 3064-3072.

CHO H.Y., YUKAWA H., INUI M., DOI RH, WONG S.L. Production of Minicellulosomes from *Clostridium cellulovarans* in burger subtilis WB800. *Appl. Env. Microbiol.* 2004, **70** (9), 5704-5707

CLARKSON M.J., FAULL W.B., KERRY J.B. Vaccination of cows with clostridial antigens and passive transfer of clostridial antibodies from bovine colostrum to lambs. *Vet. Rec.* 1985, **116**, 467-469.

CLAVERT P., BONNEMET F. Société française et francophone des plaies et cicatrisation http://www.sffpc.org/index.php?pg=connaiss_prevention3 (consulté 15/02/2010). Paru dans JPC n°19, septembre 1999

COETZER J.A.W., TUSTIN R.C. (2005) *Infectious Diseases of Livestock*. 2nd Edition. Oxford, Oxford University Press.

COLE A.R., GIBERT M., POPOFF M., MOSS D.S., TITBALL R.W., BASAK A.K. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin shows structural similarity to the pore-forming toxin aerolysin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004, **11**, 797-798.

COOPER K.K., SONGER J.G. Necrotic enteritis in chickens: a paradigm of enteric infection by *Clostridium perfringens* type A. *Anaerobe.* 2009, **15**(1-2), 55-60.

COOPER K.K., SONGER J.G. Virulence of *Clostridium perfringens* in an experimental model of poultry necrotic enteritis. *Vet. Microbiol.* 2010, **142**(3-4), 323-328.

COOPER K.K., THEORET J.R., STEWART B.A., TRINH H.T., GLOCK R.D., SONGER J.G. Virulence for chickens of *Clostridium perfringens* isolated from poultry and other sources. *Anaerobe.* 2010, **16**(3), 289-292.

COURSODON C.F., GLOCK R.D., MOORE K.L., COOPER K.K., SONGER J.G. TpeL-producing strains of *Clostridium perfringens* type A are highly virulent for broiler chicks. *Anaerobe.* 2012, **18**(1), 117-121.

D

DANG L.H., BETTEGOWDA C., AGRAWAL N., CHEONG I., HUSO D., FROST P., LOGANZO F., GREENBERGER L., BARKOCZY J., PETTIT G.R., SMITH A.B. 3RD, GURULINGAPPA H., KHAN S., PARMIGIANI G., KINZLER K.W., ZHOU S., VOGELSTEIN B. Targeting vascular and avascular compartments of tumors with C. novyi-NT and anti-microtubule agents. *Cancer Biol. Ther.* 2004, **3**(3), 326-337.

DANG L.H., BETTEGOWDA C., HUSO D.L., KINZLER K.W., VOGELSTEIN B. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2001, **98**(26), 15155-15160.

- DAUBE G., MAINIL J., LIMBOURG B., KAECKENBEECK A. Etude de l'antibiorésistance de *Clostridium perfringens* par l'emploi de sonde génétique. *Ann. Méd. Vét.* 1992, **136**, 53-56.
- DAUBE G., CHINA B., SIMON P., HAVLA K., MAINIL J. Typing of *Clostridium perfringens* by in vitro amplification of toxin genes. *J. Appl. Bacteriol.* 1994, **77**, 650-655.
- DAUBE G., SIMON P., LIMBOURG B., MANTECA C., MAINIL J., KAECKENBEECK A. Hybridization of 2659 *Clostridium perfringens* isolates with gene probes for seven toxins (α , β , ϵ , ι , θ , μ , enterotoxin) and for sialidase. *Appl. J. Vet. Res.* 1996, **57**, 496-501.
- DAUBE G., GINTER A., MANTECA C., LIMBOURG B., COPPE P., MAINIL J., KAECKENBEECK A. (1996) L'entérotoxémie bovine: Rôle de *Clostridium perfringens*. Ministère des Classes Moyennes et de l'Agriculture. Bruxelles, Administration Recherche et Développement.
- DE GUZMAN D. <http://www.icis.com/Articles/2009/02/23/9195088/biobutanol-development-makes-headway.html>. Consulté le 22/12/09
- DE LA ROSA C., HOGUE D.E., THONNEY M.L. Vaccination schedules to raise antibody concentrations against epsilon-toxin of *Clostridium perfringens* in ewes and their triplet lambs. *J. Anim. Sc.* 1997, **75**, 2328-2234.
- DEBUE-BARAZER C. Gangrène gazeuse endant la première guerre mondiale sur le front de l'Ouest [Gas gangrene during World War I on the Western Front]. *Ann. Demogr. Hist. (Paris)*. 2002, **1**, 51-70.
- DENISON A.C., VAN METRE D.C., CALLAN R.J., DINSMORE P., MASON G.L., ELLIS, R.P. Hemorrhagic bowel syndrome dairy cattle: 22 cases (1997-2000). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2002, **221**, 686-689.
- DENISON A.C., VAN METRE D.C., MORLEY P.S., CALLAN R.J., PLAMPIN E.C., ELLIS, R.P. Comparison of the odds of isolation, genotypes, and in vivo production of major toxins by *Clostridium perfringens* obtained from the gastrointestinal tract of dairy cows with hemorrhagic bowel syndrome or left-displaced abomasum. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2005, **227**, 132-138.
- DI FRANCESCO V., GARNIER J., MUNSON P.J. Improving protein secondary structure prediction with aligned homologous sequences. *Protein Sci.* 1996, **5**(1), 106-113.
- DINMAN J.D. Mechanisms and implications of programmed translational frameshifting. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2012, **3**(5), 661-673.
- DONELLI, G., FIORENTINI C., MATARRESE P., FALZANO L., CARDINES R., MASTRANTONIO P., PAYNE D.W., TITBALL R.W. Evidence for cytoskeletal changes secondary to plasma membrane functional alterations in the in vitro cell response to *Clostridium perfringens* epsilon-toxin. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2003, **26**, 145-156.
- DRAY T. *Clostridium perfringens* type A and beta2 toxin associated with enterotoxaemia in a 5-week-old goat. *Can. Vet. J.* 2004, **45** (3), 251-253.
- DUBBERKE E.R., RESKE K.A., SEILER S., HINK T., KWON J.H., BURNHAM C.A. Risk Factors for Acquisition and Loss of *Clostridium difficile* Colonization in Hospitalized Patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015, **59**(8), 4533-4543. doi: 10.1128/AAC.00642-15.
- DUBREUIL L., CALVET L., NEUT C. (2003) Antianaerobic activity of ertapenem compared to seven other agents, Proceedings of the 43th Intersciences Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) September 14-17 Chicago, IL, Abstract E2010.

DUBREUIL L., NEUT C. (2004) Clostridia : antibiotic susceptibility, present and near future, Proceedings of Meeting 3 of the European Concerted Action QLK2-CT2001-01267. Diagnosis, Epidemiology and Antibiotic Resistance of the Genus Clostridium, Parma, Italy, October 17-18, pp 49-55

DUCHESNES C., MAINIL J., POPOFF M., TITBALL R. (2003) Scientific booklet of the Meeting 2 of the European Concerted Action QLK2-CT2001-01267: Pathology and ecology of the genus Clostridium in humans, animals and foodstuffs: Protein toxins and vaccination, Presses de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège, p 45-49 (Salisbury, UK, November 22 to 22, 2002).

E

EFUNTOYE M.O., ADETOSOYE A.I. (2003) Clostridial diarrhoea in food animals in Ibadan, Nigeria. Israel Veterinary Medicine Association 58, http://www.isrvma.org/article/58_1_5.htm consulted 24 april 2006

ENGSTRÖM B.E., FERMÉR C., LINDBERG A., SAARINEN E., BÅVERUD A., GUNNARSSON A. Molecular typing of isolates of Clostridium perfringens from healthy and diseased poultry. *Vet. Microbiol.* 2003, **94**, 225–235.

EWASCHUK J.B., NAYLOR J.M., CHIRINO-TREJO M., ZELLO G.A. Lactobacillus rhamnosus strain GG is a potential probiotic for calves. *Can. J. Vet. Res.* 2004, **68**, 249-253.

EZEJI T.C., QURESHI N., BLASCHEK H.P. Production of acetone, butanol and ethanol by Clostridium beijerinckii BA101 and in situ recovery by gas stripping. *World J. Microbiol. Biotech.* 2003, **19** (6), 595-603.

F

FACH P., POPOFF M.R. Detection of enterotoxigenic Clostridium perfringens in food and fecal samples with a duplex PCR and the slide latex agglutination test. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, **63**, 4232-4236.

FERNANDEZ-MIYAKAWA 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. Comm.* 2003, **27**, 231-241.

FERNANDEZ-MIYAKAWA M.E., PISTONE CREYDT V., UZAL F.A., MCCLANE B.A., IBARRA C. Clostridium perfringens enterotoxin damages the human intestine in vitro. *Infect. Immun.* 2005, **73**, 8407-8410.

FERNANDEZ-MIYAKAWA M.E., UZAL F.A. Morphologic and physiologic changes induced by clostridium perfringens type A ϵ toxin in the intestine of sheep. *Am. J. Vet. Res.* 2005, **66**, 231-241.

FERNANDEZ-MIYAKAWA M.E., FISHER D.J., POON R., SAYEED S., ADAMS V., ROOD J.I., MCCLANE B.A., UZAL F.A. Both epsilon-toxin and beta-toxin are important for the lethal properties of Clostridium perfringens type B isolates in the mouse intravenous injection model. *Infect. Immun.* 2007, **75**, 1443-1452. Epub 2007 Jan 8.

FERNANDEZ-MIYAKAWA M.E., MARCELLINO R., UZAL F.A. Clostridium perfringens type A toxin production in 3 commonly used culture media. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2007, **19**, 184-186.

FERNANDEZ-MIYAKAWA M.E., JOST B.H., BILLINGTON S.J., UZAL F.A. Lethal effects of Clostridium perfringens epsilon toxin are potentiated by alpha and perfringolysin-O toxins in a mouse model. *Vet. Microbiol.* 2008, **127**, 379-385.

- FILÉE P. Thesis « Etude du répresseur BlaI de Bacillus licheniformis 749/I impliqué dans la régulation de la beta-lactamase BlaP. University of Liège, 2001, 139p.
- FINK D., CONTRERAS M.L., LELKES P.I., LAZAROVICI P. Staphylococcus aureus alpha-toxin activates phospholipases and induces a Ca²⁺ influx in PC12 cells. *Cell Signal*. 1989, **1**(4), 387-393.
- FINNIE J.W., BLUMBERGS P.C., MANAVIS J. Neuronal damage produced in rat brains by Clostridium type D epsilon toxin. *J. Comp. Pathol*. 1999, **120**, 415-420.
- FINNIE J.W. Pathogenesis of brain damage produced in sheep by Clostridium perfringens type D epsilon toxin: a review. *Aust. Vet. J.* 2003, **81**, 219-221.
- FISHER J.D., MIYAMOTO K., HARRISON B., AKIMOTO S., SERKER M.R., MCCLANE B.A. Association of beta2 toxin production with Clostridium perfringens type A human gastrointestinal disease isolates carrying a plasmid enterotoxin gene. *Mol. Microbiol*. 2005, **56**, 747-762.
- FISHER DJ. Clostridium perfringens BETA2 toxin: a potential accessory toxin in gastrointestinal diseases of humans and domestic animals. 2006, October 12. Thesis in Philosophy. University of Pittsburg, USA
- FLEMING S. Enterotoxemia in neonatal calves. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 1985, **1**, 509-514.
- FLORES-DIAZ M., ALAPE-GIRÓN A., TITBALL R.W., MOOS M., GUILLOUARD I., COLE S., HOWELLS A.M., VON EICHEL-STREIBER C., FLORIN I., THELESTAM M. UDP-glucose Deficiency Causes Hypersensitivity to the Cytotoxic Effect of Clostridium perfringens Phospholipase C. *J. Biol. Chem*. 1998, **273**, 24433-24438.
- FLORES-DIAZ M., ALAPE-GIRON A. Role of Clostridium perfringens phospholipase C in the pathogenesis of gas gangrene. *Toxicon*. 2003, **42**, 979-986.
- FLORES-DIAZ M., HIGUITA J-C., FLORIN I., OKADA T., POLLESELLO P., BERGMAN T., THELESTAM M., MORI K., ALAPE-GIRON A. A cellular UDP-glucose deficiency Causes Overexpression of Glucoses/Oxygen-regulated Proteins Independent of the Endoplasmic Reticulum Stress Elements. *J. Biol. Chem*. 2004, **279**, 21724-21731.
- FLORES-DIAZ M., ALAPE-GIRÓN A., CLARK G., CATIMEL B., HIRABYASHI Y., NICE E., GUTIÉRREZ J-M., TITBALL R., THELESTAM M. A cellular deficiency of gangliosides causes hypersensitivity to Clostridium perfringens phospholipase C. *J. Biol. Chem*. 2005, **280**, 26680-26689.
- FOHLER S., KLEIN G., HOEDEMAKER M., SCHEU T., SEYBOLDT C., CAMPE A., JENSEN K.C., ABDULMAWJOOD A. Diversity of Clostridium perfringens toxin-genotypes from dairy farms. *BMC Microbiol*. 2016, **16**(1), 199.
- FOX E.P., COWLEY E.S., NOBILE C.J., HARTOONI N., NEWMAN D.K., JOHNSON A.D. Anaerobic bacteria grow within Candida albicans biofilms and induce biofilm formation in suspension cultures. *Curr Biol*. 2014, **24**(20), 2411-2416.
- FREY J. Molecular genetics of Clostridia in vitro and in vivo. Introductory meeting of the european CA QLK2-CT2001-01267, Château de Colonster : Liège, 2002.
- FRIEDL A., QURESHI N., MADDOX I.S. Continuous acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation using immobilized cells of Clostridium acetobutylicum in a packed bed reactor and integration with product removal by pervaporation. *Biotechnol. Bioeng*. 1991, **38**(5), 518-527.

FUJII Y., NOMURA S., OSHITA Y., SAKURAI J. (1986) Excitatory effect of Clostridium perfringens alpha toxin on the rat isolated aorta. *Brit. J. Pharmacol.* 1986, **88**, 531-539.

FUKATA T., HADATE Y., BABA E., UEMURA T., ARAKAWA A. Influence of Clostridium perfringens and its toxin in germ-free chickens. *Res. Vet. Sci.* 1988, **44**, 68-70.

G

GARMORY H.S., CHANTER N., FRENCH N.P., BUESCHEL D., SONGER J.G., TITBALL R.W. Occurrence of Clostridium perfringens beta2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. *Epidemiol. Infect.* 2000, **124**, 61-67.

GENY B., KHUN H., FITTING C., ZARANTONELLI L., MAZUET C., CAYET N., SZATANIK M., PREVOST M.C., CAVAILLON J.M., HUERRE M., POPOFF M.R. Clostridium sordellii lethal toxin kills mice by inducing a major increase in lung vascular permeability. *Am. J. Pathol.* 2007, **170**(3), 1003-1017.

GHAZI F., YOUNAN M., ARDEHALLI M., MULLER W. Differentiation of proteinase (minor toxin lambda) in Clostridium perfringens strains from sheep and goats in Iran. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 1997, **104**, 443-445.

GHOLAMIANDEKHORDI A.R., DUCATELLE R., HEYNDRIKX M., HAESBROUCK F., VAN IMMERSEEL F. Molecular and phenotypical characterization of Clostridium perfringens isolates from poultry flocks with different disease status. *Vet. Microbiol.* 2006, **113**, 143-152. Epub 2005 Dec 5.

GIBERT M., JOLIVET-RENAUD C., POPOFF M.R. Beta2 toxin, a novel toxin produced by Clostridium perfringens. *Gene.* 1997, **203**, 65-73.

GIBERT M., PETIT L., RAFFESTIN S., OKABE A., POPOFF M.R. Clostridium perfringens iota-toxin requires activation of both binding and enzymatic components for cytopathic activity. *Infect. Immun.* 2000, **68**, 3848-3853.

GINTER A., RENIER K., COLLARD A., LIMBOURG B., DAUBE G., SIMON P., MANTECA C., COPPE P. (1994) Caracterisation et typage de souches de Clostridium perfringens par la méthode ELISA, in: Libbey J. (Ed.), Biotechnologie du diagnostic et de la prévention des maladies animales, Paris, pp 31-48.

GINTER A., WILLIAMSON E.D., DESSY F., COPPE P., BULLIFENT H., HOWELLS A., TITBALL R.W. Molecular variation between the β -toxins from the type strain (NCTC 8237) and clinical isolates of Clostridium perfringens associated with diseases in man and animals. *Microbiol.* 1996, **142**, 191-198.

GKIOURTZIDIS K., FREY J., BOURTZI-HATZOPOULOU E., ILIADIS N., SARRIS K. PCR detection and prevalence of alpha-, beta-, beta 2-, epsilon-, iota- and enterotoxin genes in Clostridium perfringens isolated from lambs with clostridial dysentery. *Vet Microbiol.* 2001, **82**, 39-43.

GLOCK R.D., DEGROOT B.D. Sudden Death of Feddlot Cattle. *J. Anim. Sci.* 1998, **76**, 315-319

GOSWAMI P.P., RUPA P., PRIHAR N.S., GARG L.C. Molecular cloning of Clostridium perfringens epsilon-toxin gene and its high level expression in E. coli. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996, **226**, 735-740.

GRAY B., HALL P., GRESHAM H. Targeting agr- and agr-Like quorum sensing systems for development of common therapeutics to treat multiple gram-positive bacterial infections. *Sensors (Basel)*. 2013, **13**(4), 5130-5166.

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. J.* 2005, **170**, 346-350.

GRECO G., MADIO A., MARTELLA V., CAMPOLO M., CORRENTE M., BUONAVOGLIA D., BUONAVOGLIA C. Enterotoxaemia associated with beta2 toxin-producing Clostridium perfringens type A in two Asiatic black bears (*Selenarctos thibetanus*). *J. Vet. Diagn. Invest.* 2005, **17** (2), 186-189.

GREEN D.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.

GREENE C.E., JANG, S.S., Anaerobic Infections in Infectious Diseases of the Dog and Cat. (2003) Revised Reprint. 3rd edition. Saunders-Elsevier. St Louis. P 381-388

GRINER L.A. BRACKEN F.K. Clostridium perfringens (type C) in acute hemorrhagic enteritis of calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1953, **122**, 99-102.

GUBASH S.M., INGHAM L. Comparison of a new, bismuth-iron-sulfite-cycloserine agar for isolation of Clostridium perfringens with the tryptose-sulfite-cycloserine and blood agars. *Zentralbl. Bakteriol.* 1997, **285**, 397-402.

GUEGUEN E., WILLS N.M., ATKINS J.F., CASCALES E. Transcriptional frameshifting rescues *Citrobacter rodentium* type VI secretion by the production of two length variants from the prematurely interrupted *tssM* gene. *PLoS Genet.* 2014, **10**(12):e1004869.

GURJAR A.A., YENNAWAR N.H., YENNAWAR H.P., RAJASHANKAR K.R., HEGDE N.V., JAYARAO B.M. Expression, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of recombinant Clostridium Perfringens beta 2-toxin. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2007, **63**(Pt 6), 484-487.

GUSTAFSON C., SJODAHL R., TAGESSON C. Phospholipase activation and arachidonic acid release in intestinal epithelial cells from patients with Crohn's disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 1990, **25**, 1151-1160.

GUSTAFSON C., TAGESSON C. (1990) Phospholipase C from Clostridium perfringens stimulates phospholipase A2-mediated arachidonic acid release in cultured intestinal epithelial cells (INT 407). *Scand. J. Gastroenterol.* 1990, **25**, 363-371.

H

HALE M.L., MARVAUD J.C., POPOFF M.R., STILES B.G. Detergent-resistant membrane microdomains facilitate I_b oligomer formation and biological activity of Clostridium perfringens iota-toxin. *Infect. Immun.* 2004, **72**, 2186-2193.

HAMMITT MC, BUESCHEL DM, KEEL MK, GLOCK RD, CUNEO P, DEYOUNG DW, REGGIARDO C, TRINH HT, SONGER JG. A possible role for Clostridium difficile in the etiology of calf enteritis. *Vet. Microbiol.* 2008, **127**(3-4), 343-352. Epub 2007 Sep 18.

HARRISON B, RAJU D, GARMORY HS, BRETT MM, TITBALL RW, SARKER MR. Molecular characterization of Clostridium perfringens isolates from humans with sporadic diarrhea: evidence for transcriptional regulation of the beta2-toxin-encoding gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, **71**(12), 8362-8370.

HATHEWAY C.L. Toxigenic Clostridia. *Clin. Microbiol. Rev.* 1990, **3**, 66-98.

HEIKINHEIMO A., LINDSTROM M., GRANUM P.E., KORKEALA H. Humans as reservoir for enterotoxin gene--carrying *Clostridium perfringens* type A. *Emerg. Infect. Dis.* 2006, **12**, 1724-1729.

HERHOLZ C., MISEREZ R., NICOLET J., FREY J., POPOFF M., GERBER H., STRAUB R. Prevalence of β -Toxigenic *Clostridium perfringens* in Horses with Intestinal Disorders. *J. Clin. Microbiol.* 1999, **37**, 358-361.

HEWITT, K.J., AGARWAL, R., MORIN, P.J. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer.* 2006, **6**, 186.

HIBBERD MC, NEUMANN AP, REHBERGER TG, SIRAGUSA GR. Multilocus sequence typing subtypes of poultry *Clostridium perfringens* isolates demonstrate disease niche partitioning. *J. Clin. Microbiol.* 2011, **49**(4), 1556-1567.

HISCOX T.J., CHAKRAVORTY A., CHOO J.M., OHTANI K., SHIMIZU T., CHEUNG J.K., ROOD J.I. Regulation of virulence by the RevR response regulator in *Clostridium perfringens*. *Infect. Immun.* 2011, **79**(6), 2145-2153.

HOGH P. Experimental studies on serum treatment and vaccination against *Cl. perfringens* type C infection in piglets. *Dev. Biol. Stand.* 1976, **32**, 69-76.

HUIS IN 'T VELD J.H. (1991) [Gastrointestinal flora and health in man and animal]. *Tijdschr. Diergeneeskde.* 1991, **116**, 232-239.

J

JANKOVIC J. and HALLET M. (eds) (1994) *Therapy with Botulinum Toxin*. Marcel Dekker, New York.

JEPSON M., TITBALL R. Structure and function of clostridial phospholipases C. *Microbes Infect.* 2000, **2**, 1277-1284.

JIANG Y., KONG Q., ROLAND K.L., WOLF A., CURTISS R. 3rd. Multiple effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 on growth, biofilm formation, and inflammation cytokines profile of *Clostridium perfringens* type A strain CP4. *Pathog Dis.* 2014, **70**(3), 390-400.

JOHANSSON A., GREKO C., ENGSTROM B., KARLSSON M. (2004) Antimicrobial susceptibility in Swedish, Norwegian and Danish *Clostridium perfringens* isolated from poultry and distribution of tetracycline resistance genes., Proceedings of Meeting 3 of the European Concerted Action QLK2-CT2001-01267. Diagnosis, Epidemiology and Antibiotic Resistance of the Genus *Clostridium*, Parma, Italy, October 17-18, pp 75, 86-87.

JOHANSSON A., ENGSTROM B.E., FREY J., JOHANSSON K.E., BAVERUD V. Survival of *Clostridium perfringens* during simulated transport and stability of some plasmid-borne toxin genes under aerobic conditions. *Acta Vet. Scand.* 2005, **46**, 241-247.

JOHANSSON A., ASPAN A., BAGGE E., BAVERUD V., ENGSTROM B.E., JOHANSSON, K.E. Genetic diversity of *Clostridium perfringens* type A isolates from animals, food poisoning outbreaks and sludge. *BMC Microbiol.* 2006, **6**, 47.

JOHANSSON A, ASPAN A, KALDHUSDAL M, ENGSTROM BE. Genetic diversity and prevalence of netB in *Clostridium perfringens* isolates from a broiler flock affected by mild necrotic enteritis. *Vet Microbiol.* 2010, **144**(1-2), 87-92.

JOST B.H., BILLINGTON S.J., TRINH H.T., BUESCHEL D.M., SONGER J.G. Atypical cpb2 Genes, encoding Beta2-Toxin in Clostridium perfringens Isolates of Nonporcine Origin. *Infect. Immun.* 2005, **73**, 652-656.

JOST B.H., TRINH H.T., SONGER J.G. Clonal relationships among Clostridium perfringens of porcine origin as determined by multilocus sequence typing. *Vet. Microbiol.* 2006, **116**, 158-165.

JOUANY J.P. Optimizing rumen functions in the close-up transition period and early lactation to drive dry matter intake and energy balance in cows. *Anim. Reprod. Sci.* 2006, **96**, 250-264.

JUSTIN N., WALKER N., BULLIFENT H.L., SONGER G., BUESCHEL D.M., JOST H., NAYLOR C., MILLER J., MOSS D.S., TITBALL R.W., BASAK A.K. The first strain of Clostridium perfringens isolated from an avian source has an alpha-toxin with divergent structural and kinetic properties. *Biochemistry.* 2002, **41**, 6253-6262.

K

KASHIWAGI I., MORITA R., SCHICHITA T., KOMAI K., SAEKI K., MATSUMOTO M., TAKEDA K., NOMURA M., HAYASHI A., KANAI T., YOSHIMURA A. Smad2 and Smad3 Inversely Regulate TGF- β Autoinduction in Clostridium butyricum-Activated Dendritic Cells. *Immunity.* 2015, **43**(1), 65-79.

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 Immunol. Med. Microbiol.* 1999, **24**, 259-266.

KANAKARAJ R., HARRIS 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. *Vet. Microbiol.* 1998, **63**, 29-38.

KATAYAMA S.I., MATSUSHITA O., MINAMI J., MIZOBUCHI S., OKABE A. Comparison of the alpha-toxin genes of Clostridium perfringens type A and C strains : evidence of extragenic regulation of transcription. *Infect. Immun.* 1993, **61**, 457-463.

KATITCH R.V. Observation on the epidemiology, pathogenesis and prophylaxis of enteritis due to Clostridium perfringens types A and C. *Bull. Acad. Vét. Fr.* 1987, **60**, 95-101.

KEEL M.K., SONGER J.G. The comparative pathology of Clostridium difficile-associated disease. *Vet. Pathol.* 2006, **43**(3), 225-240.

KELNERIĆ Z., NAGLIĆ T., UDOVICIĆ I. Prevention of necrotic enteritis in piglets by vaccination of pregnant gilts with a Clostridium perfringens type C and D bacterin-toxoid. *Vet. Med.* 1996, **41**, 335-338.

KERRIGAN J.J., MCNULTY D.E., BURNS M., ALLEN K.E., TANG X., LU Q., TRULLI J.M., JOHANSON K.O., KANE J.F. Frameshift events associated with the lysyl-tRNA and the rare arginine codon, AGA, in Escherichia coli: a case study involving the human Relaxin 2 protein. *Protein Expr Purif.* 2008, **60**(2), 110-116.

KETO-TIMONEN R., HEIKINHEIMO A., EEROLA E., KORKEALA H. Identification of Clostridium species and DNA fingerprinting of Clostridium perfringens by amplified fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2006, **44**, 4057-4065. Epub 2006 Sep 13.

KEYBURN A.L., SHEEDY S.A., FORD M.E., WILLIAMSON M.M., AWAD M.M., ROOD J.I., MOORE R.J. Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. *Infect Immun*. 2006, **74**, 6496-6500. Epub 2006 Aug 21.

KEYBURN A.L., BOYCE J.D., VAZ P., BANNAM T.L., FORD M.E., PARKER D., DI RUBBO A., ROOD J.I., MOORE R.J. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog*. 2008, **4**, e26.

KEYBURN A.L., YAN X.X., BANNAM T.L., VAN IMMERSEEL F., ROOD J.I., MOORE R.J. Association between avian necrotic enteritis and *Clostridium perfringens* strains expressing NetB toxin. *Vet. Res*. 2010, **41**(2), 21.

KIM P.I., JUNG M.Y., CHANG Y.H., KIM S., KIM S.J., PARK Y.H. Probiotic properties of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains isolated from porcine gastrointestinal tract. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2007, **74**, 1103-1111. Epub 2006 Nov 29.

KIMURA A.C., HIGA J.I., LEVIN R.M., SIMPSON G., VARGAS Y., VUGIA D.J. Outbreak of necrotizing fasciitis due to *Clostridium sordellii* among black-tar heroin users. *Clin. Infect. Dis*. 2004, **38**(9), e87-91. Epub 2004 Apr 14.

KIRCANSKI J., PARREIRA V.R., WHITESIDE S., PEI Y., PRESCOTT J.F. The majority of atypical *cpb2* genes in *Clostridium perfringens* isolates of different domestic animal origin are expressed. *Vet. Microbiol*. 2012, **159**(3-4), 371-374.

KIZERWETTER-SWIDA M., BINEK M. Selection of potentially probiotic *Lactobacillus* strains towards their inhibitory activity against poultry enteropathogenic bacteria. *Pol. J. Microbiol*. 2005, **54**, 287-294.

KIZERWETTER-SWIDA M., BINEK M. Assessment of potentially probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from chickens. *Pol. J. Vet. Sci*. 2016, **19**, 15-20. doi: 10.1515/pjvs-2016-0003.

KLAASEN H.L.B.M., MOLKENBOER M.J.C.H., BAKKER J., MISEREZ R., HÄNI H., FREY J., POPOFF M.R., VAN DEN BOSCH J.F. Detection of the ϵ_2 toxin gene of *Clostridium perfringens* in diarrhoeic piglets in The Netherlands and Switzerland. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. 1999, **24**, 325-332.

KLOSE V., BAYER K., BRUCKBECK R., SCHATZMAYR G., LOIBNER A.P. In vitro antagonistic activities of animal intestinal strains against swine-associated pathogens. *Vet. Microbiol*. 2010, **144**(3-4), 515-521.

KNAPP O., BENZ R., GIBERT M., MARVAUD J.C., POPOFF M.R. (2002) Interaction of *Clostridium perfringens* iota-toxin with lipid bilayer membranes, Demonstration of channel formation by the activated binding component Ib and channel block by the enzyme component Ia. *J. Biol.Chem*. 2002, **277**, 6143-6152.

KOKAI-KUN J.F., McCLANE B.A. (1997) The clostridium perfringens enterotoxin In : Rood J.I., McClane B.A., Songer J.G., and Titball R.W. (Ed), *The Clostridia : Molecular biology and pathogenesis*, Academic Press, San Diego, p 325-357.

KOMINSKY S.L., VALI M., KORZ D., GABIG T.G., WEITZMAN S.A., ARGANI P., SUKUMAR S. *Clostridium perfringens* enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *Am. J. Pathol*. 2004, **164**, 1627-1633.

KREFT B. DALHOFF, K., SACK K. (2000) [Necrotizing enterocolitis: a historical and current review]. *Med. Klin. (Munich)*. 2000, **95**, 435-441.

L

- LAHTI P., HEIKINHEIMO A., JOHANSSON T., KORKEALA H. Clostridium perfringens type A strains carrying a plasmid-borne enterotoxin gene (genotype IS1151-cpe or IS1470-like-cpe) as a common cause of food poisoning. *J Clin Microbiol.* 2008, **46**(1), 371-373.
- LAMBIN P., THEYS J., LANDUYT W., RIJKEN P., VAN DER KOGEL A., VAN DER SCHUEREN E., HODGKISS R., FOWLER J., NUYTS S., DE BRUIJN E., VAN MELLAERT L., ANNÉ J. Colonisation of Clostridium in the body is restricted to hypoxic and necrotic areas of tumours. *Anaerobe*, 1998, **4**(4), 183-188.
- LAWRENCE G., COOKE R. Experimental pigbel: the production and pathology of necrotizing enteritis due to Clostridium welchii type C in the guinea-pig. *Br. J. Exp. Pathol.* 1980, **61**, 261-271.
- LEARY S.E.C, TITBALL R.W. The Clostridium perfringens β -toxin In : Rood J.I., McClane B.A., Songer J.G., and Titball R.W. (Ed), *The Clostridia : Molecular biology and pathogenesis*, Academic Press, San Diego, 1997, pp 243-250
- LEBRUN M., FILÉE P., DESMECHT D., GALLEN M., MAINIL J.G., LINDEN, A. The expression of Clostridium perfringens consensus beta2 toxin is associated with bovine enterotoxaemia syndrome. *Vet. Microbiol.* 2007, **120**, 151-157.
- LEPP D., ROXAS B., PARREIRA V.R., MARRI P.R., ROSEY E.L., GONG J., SONGER J.G., VEDANTAM G., PRSCOTT J.F. Identification of novel pathogenicity loci in Clostridium perfringens strains that cause avian necrotic enteritis. *PLoS One*, 2010, **5**(5), e10795.
- LESLIE D., FAIRWEATHER N., PICKARD D., DOUGAN G., KEHOE M. Phospholipase C and haemolytic activities of Clostridium perfringens alpha-toxin cloned in Escherichia coli: sequence and homology with a Bacillus cereus phospholipase C. *Mol Microbiol.* 1989 , **3**(3), 383-392.
- LI J., MIYAMOTO K., MCCLANE B.A. Comparison of virulence plasmids among Clostridium perfringens type E isolates. *Infect. Immun.* 2007, **75**, 1811-1819. Epub 2007 Jan 29.
- LI J., MCCLANE B.A. Contributions of NanI sialidase to Caco-2 cell adherence by Clostridium perfringens type A and C strains causing human intestinal disease. *Infect. Immun.* 2014, **82**(11), 4620-4630.
- LI J, SAYEED S, ROBERTSON S, CHEN J, MCCLANE BA. Sialidases affect the host cell adherence and epsilon toxin-induced cytotoxicity of Clostridium perfringens type D strain CN3718. *PLoS Pathog.* 2011, **7**(12), e1002429. doi:10.1371/journal.ppat.1002429.
- LI Z., FALLON J., MANDELI J., WETMUR J., WOO S.L. The oncopathic potency of Clostridium perfringens is independent of its alpha-toxin gene. *Hum. Gene Ther.* 2009, **20**(7), 751-758.
- LIN Y.T., LABBE R. Enterotoxigenicity and genetic relatedness of Clostridium perfringens isolates from retail foods in the United States. *Appl. Env. Microbiol.* 2003, **69**, 1642-1646.
- LIU D., GUO Y., WANG Z., YUAN J. Exogenous lysozyme influences Clostridium perfringens colonization and intestinal barrier function in broiler chickens. *Avian Pathol.* 2010, **39**(1), 17-24. doi: 10.1080/03079450903447404.

LONG H., CREAN C.D., LEE W.H., CUMMINGS O.W., GABIG T.G. Expression of Clostridium perfringens enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in prostate cancer epithelium. *Cancer Res.* 2001, **61**, 7878-7881.

LOZANO E.A., CATLIN J.E., HAWKINS W.W. Incidence of Clostridium perfringens in neonatal enteritis of Montana calves. *Cornell Vet.* 1970, **60**, 347-359.

LUCEY B.P., HUTCHINS G.M. William H. Welch, MD, and the discovery of Bacillus welchii. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2004, **128**, 1193-1195.

LUZINA E.V., LAREVA N.V. [Antibiotic-associated diarrhea in clinical practice]. *Ter Arkh.* 2013, **85**(2), 85-88.

LYRAS D., ROOD J.I. Genetic organization and distribution of tetracycline resistance determinants in Clostridium perfringens. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 1996, **40**, 2500-2504.

LYRAS D., ROOD J.I. Transposable genetic elements and antibiotic resistance determinants from Clostridium perfringens and Clostridium difficile. In : Rood J.I., McClane B.A., Songer J.G., and Titball R.W. (Ed), *The Clostridia : Molecular biology and pathogenesis*, Academic Press, San Diego, 1997, pp73-92.

M

MA M., LI J., MCCLANE B.A. Structure-function analysis of peptide signaling in the Clostridium perfringens Agr-like quorum sensing system. *J. Bacteriol.* 2015, **197**(10), 1807-1818. doi: 10.1128/JB.02614-14.

MAEGAWA T., WANG X., KARASAWA T., ZUKA M., KITA H., NAKAMURA S. Intraperitoneal fluid accumulation induced by Clostridium perfringens alpha-toxin (phospholipase C). *Acta Microbiol. Pol.* 2002, **51**, 387-389.

MAGDESIAN K.G., DUJOWICH M., MADIGAN J.E., HANSEN L.M., HIRSH D.C., JANG S.S. Molecular characterization of Clostridium difficile isolates from horses in an intensive care unit and association of disease severity with strain type. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2006, **228**(5), 751-755.

MANIATIS T., FRITSCH E.F.: SAMBROOK J. *Molecular cloning A Laboratory Manual*. 1982. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

MANTECA C., DAUBE G. Etude de l'entérotoxémie bovine en Belgique I – Introduction et contexte bibliographique. *Ann. Méd. Vét.* 1994, **138**, 155-164.

MANTECA C., DAUBE G., JAUNIAUX T., LIMBOURG B., KAECKENBEECK A., MAINIL J.G. Etude de l'entérotoxémie bovine en Belgique II - Epizootiologie descriptive. *Ann. Méd. Vét.* 2000, **145**, 75-82.

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 C., JAUNIAUX T., DAUBE G., CZAPLICKI G., MAINIL J.G. Isolation of Clostridium perfringens from three neonatal calves with haemorrhagic abomasitis. *Rev. Méd. Vét.* 2001, **152**, 8-9

MANTECA C., 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 ϵ 2 toxin in bovine enterotoxaemia ? *Vet. Microbiol.* 2002, **86**, 191-202.

MANTECA VILLANUEVA CHRISTOPHE. Thèse en médecine vétérinaire : Etude étiologique de l'entérotoxémie bovine. Défendue le 23 juin 2003 à l'Université de Liège. Département des maladies infectieuses et parasitaires, section bactériologie.

MANTECA C. Etude étiologique de l'entérotoxémie bovine. *Ann. Méd. Vét.* 2004, **148** (S,) 16-20.

MANTECA C., GINTER A., LIMBOURG B., COPPE P., MAINIL J., DAUBE G. (2004) Etude de l'entérotoxémie bovine en Belgique. III. Comparaison de différents protocoles d'immunisation contre la toxine ϵ de *Clostridium perfringens*. *Ann. Med. Vet.* 2004, **148**, 147-152.

MARCHAND N., COLLINS C.H. Peptide-based communication system enables *Escherichia coli* to *Bacillus megaterium* interspecies signaling. *Biotechnol Bioeng.* 2013, **110**(11), 3003-3012.

MARKS S.L., KATHER E.J. 2003. *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* associated diarrhea. In *Infectious Diseases of the Dog and Cat 3rd edn Revised Reprint* Ed. G.E. Greene, Saunder Elsevier pp363-369.

MARTIN T.G., SMYTH J.A. Prevalence of netB among some clinical isolates of *Clostridium perfringens* from animals in the United States. *Vet. Microbiol.* 2009, **136**, 202-205.

MARTIN T.G., SMYTH J.A. The ability of disease and non-disease producing strains of *Clostridium perfringens* from chickens to adhere to extracellular matrix molecules and Caco-2 cells. *Anaerobe.* 2010, **16**(5), 533-539.

MARZORATI M., VAN DE WIELE T. An Advanced In Vitro Technology Platform to Study the Mechanism of Action of Prebiotics and Probiotics in the Gastrointestinal Tract. *J. Clin. Gastroenterol.* 2016, 50 Suppl 2, Proceedings from the 8th Probiotics, Prebiotics & New Foods for Microbiota and Human Health meeting held in Rome, Italy on September 13-15, 2015:S124-S125.

MCCLANE B.A., SNYDER J.T. (1987) Development and preliminary evaluation of a slide latex agglutination assay for detection of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *J. Immun. Meth.* 1987, **100**, 131-136.

MCCLANE B.A., CHAKRABARTI G. New insights into the cytotoxic mechanisms of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Anaerobe.* 2004, **10**, 107-114.

MCCLANE B. *Clostridium perfringens* type C isolates rapidly upregulate their toxin Production upon contact with host cells: new insights into virulence? *Virulence.* 2010, **1**(2), 97-100.

MCFARLAND L.V. Antibiotic-associated diarrhea: epidemiology, trends and treatment. *Future Microbiol.* 2008, **3**(5), 563-578.

MEER R.R., SONGER J.G. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *Am. J. Vet. Res.* 1997, **58**, 702-705.

MELVILLE S.B., LABBE R., SONENSHEIN A.L. Expression from the *Clostridium perfringens* cpe promoter in *C. perfringens* and *Bacillus subtilis*. *Infect Immun.* 1994, **62**(12), 5550-5558.

MENESTRINA G., SERRA M.D., PREVOST G. Mode of action of beta-barrel pore-forming toxins of the staphylococcal alpha-hemolysin family. *Toxicon.* 2001, **39**, 1661-1672.

MENGESHA A., DUBOIS L., CHIU R.K., PAESMANS K., WOUTERS B.G., LAMBIN P., THEYS J. Potential and limitations of bacterial-mediated cancer therapy. *Front Biosci.* 2007, **12**, 3880-3891.

- MENOZZI M.G., ROSSI S., SOMENZI P., BERTONCINI L., ZERBINI I., CHEZZI C., DETTORI G. (2004) Antimicrobial resistance among clinical isolates of Clostridium in Parma. Proceedings of Meeting 3 of the European Concerted Action QLK2-CT2001-01267: Diagnosis, Epidemiology and Antibiotic Resistance of the Genus Clostridium, Parma, Italy, October 17-18, pp 86-87.
- METE A., GARCIA J., ORTEGA J., LANE M., SCHOLLES S., UZAL F.A. Brain lesions associated with clostridium perfringens type D epsilon toxin in a Holstein heifer calf. *Vet. Pathol.* 2013, **50**, 765-768.
- MICHL P., BUCHHOLZ M., ROLKE M., KUNSCH S., LOHR M., MCCLANE B., TSUKITA S., LEDER G., ADLER G., GRESS T.M. Claudin-4: a new target for pancreatic cancer treatment using Clostridium perfringens enterotoxin. *Gastroenterol.* 2001, **121**, 678-684.
- MIECH R.P. Pathophysiology of mifepristone-induced septic shock due to Clostridium sordellii. *Ann Pharmacother.* 2005, **39**(9), 1483-1488. Epub 2005 Jul 26.
- MINTON N.P., MAUCLINE M.L., LEMMON M.J., BREHM J.K., FOX M., MICHAEL N.P., GIACCIA A., BROWN J.M. Chemotherapeutic tumour targeting using clostridial spores. *FEMS Microbiol Rev.* 1995, **17**(3), 357-364.
- MINTON N.P., BROWN J.M., LAMBIN P., ANNÉ J. Clostridia in Cancer Therapy (chapter 8) in Clostridia, Biotechnology and Medical Applications, Bahl H and Dürre P (eds), Morlenbac, Germany, 2001, pp 264-265.
- MIYAMOTO K., WEN Q., MCCLANE B.A. Multiplex PCR genotyping assay that distinguishes between isolates of Clostridium perfringens type A carrying a chromosomal enterotoxin gene (cpe) locus, a plasmid cpe locus with an IS1470-like sequence, or a plasmid cpe locus with an IS1151 sequence. *J. Clin Microbiol.* 2004, **42**, 1552-1558.
- MIYAMOTO K., FISHER D.J., LI J., SAYEED S., AKIMOTO S., MCCLANE B.A. (2006) Complete sequencing and diversity analysis of the enterotoxin-encoding plasmids in Clostridium perfringens type A non-food-borne human gastrointestinal disease isolates. *J. Bacteriol.* 2006, **188**, 1585-1598.
- MIYAMOTO K., SEIKE S., TAKAGISHI T., OKUI K., ODA M., TAKEHARA M., NAGAHAMA M. Identification of the replication region in pBCNF5603, a bacteriocin-encoding plasmid, in the enterotoxigenic Clostridium perfringens strain F5603. *BMC Microbiol.* 2015, **15**, 118.
- MIYATA S., MATSUSHITA O., MINAMI J., KATAYAMA S., SHIMAMOTO S., OKABE A. Cleavage of a C-terminal peptide is essential for heptamerization of Clostridium perfringens epsilon-toxin in the synaptosomal membrane. *J. Biol. Chem.* 2001, **276**, 13778-13783
- MIYATA S., MINAMI J., TAMAI E., MATSUSHITA O., SHIMAMOTO S., OKABE A. Clostridium perfringens epsilon-toxin forms a heptameric pore within the detergent-insoluble microdomains of Madin-Darby canine kidney cells and rat synaptosomes. *J. Biol. Chem.* 2002, **277**, 39463-39468.
- MORRIS W.E., VENZANO A.J., ELIZONDO A., VILTE D.A., MERCADO E.C., FERNANDEZ-MIYAKAWA M.E. Necrotic enteritis in young calves. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2011, **23**(2), 254-259.
- MSADEK T., DARTOIS V., KUNST F., HERBAUD M.L., RAPAPORT G. ClpP of bacillus subtilis is required for competence development, motility degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation. *Mol. Microbiol.* 1998, **27**, 899-914.
- MURASHIMA K., CHEN C.L., KOSUGI A., TAMARU Y., DOI R.H., WONG S.L. Heterologous production of Clostridium cellulovorans engB, using protease-deficient Bacillus subtilis, and preparation of active recombinant cellulosomes. *J. Bacteriol.* 2002, **184**(1), 76-81.

MUSKENS J., VELDHORST G.J., SNOEP J.J., VOS J. [High mortality in a herd with signs of jejunal hemorrhage syndrome]. *Tijdschr. Diergeneeskd.* 2007, **132**, 116-119.

N

NAABER P., SMIDT I., STSEPETOVA J., BRILENE T., ANNUK H., MIKELSAAR M. Inhibition of *Clostridium difficile* strains by intestinal *Lactobacillus* species. *J. Med. Microbiol.* 2004, **53**(Pt 6), 551-554.

NAGAHAMA M., SAKURAI J. High-affinity binding of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin to rat brain. *Infect. Immunol.* 1992, **60**, 1237-1240.

NAGAHAMA M., MICHIE K., SAKURAI J. Membrane-damaging action of *Clostridium perfringens* alpha-toxin on phospholipid liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1996, **1280**, 120-126.

NAGAHAMA M., MICHIE K., SAKURAI J. Production and purification of *Clostridium perfringens* alpha-toxin using a protein-hyperproducing strain, *Bacillus brevis* 47. *FEMS Microbiol. Lett.* 1996, **145**, 239-243.

NAGAHAMA M., MICHIE M., MUKAI M., OCHI S., SAKURA, J. Mechanism of membrane damage by *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *Microbiol. Immunol.* 1998, **42**, 533-538.

NAGAHAMA M., OCHI S., SAKURAI J. Assembly of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin on MDCK cell membrane. *J. Nat. Toxins.* 1998, **7**, 291-302.

NAGAHAMA M., SAKAGUCHI Y., KOBAYASHI K., OCHI S., SAKURAI J. Characterization of the enzymatic component of *Clostridium perfringens* iota-toxin. *J. Bacteriol.* 2000, **182**, 2096-2103.

NAGAHAMA M., HAYASHI S., MORIMITSU S., SAKURAI J. Biological activities and pore formation of *Clostridium perfringens* beta toxin in HL 60 cells. *J. Biol. Chem.* 2003, **278**, 36934-36941. Epub 2003 Jul 8.

NAGAHAMA M., MORIMITSU S., KIHARA A., AKITA M., SETSU K., SAKURAI J. Involvement of tachykinin receptors in *Clostridium perfringens* beta-toxin-induced plasma extravasation. *Br. J. of Pharmacol.* 2003, **138**, 23-30.

NAGAHAMA M., YAMAGUCHI A., HAGIYAMA T., OHKUBO N., KOBAYASHI K., SAKURAI J. Binding and internalization of *Clostridium perfringens* iota-toxin in lipid raft. *Infect. Immun.* 2004, **72**, 3267-3275.

NAUERBY B., PEDERSEN K., MADSEN M. Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among *Clostridium perfringens* isolates from chickens. *Vet. Microbiol.* 2003, **94**, 257-266.

NCBI Sequence Viewer, Protein AAC27654 beta2 toxin [*Clostridium perfringens*] [en ligne] (24/10/2001) Adresse URL :

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=protein&list_uids=3342215&dopt=GenPep Consulté le 18/04/2002.

NCBI Sequence Viewer, Protein NP_150010 beta2-toxin [*Clostridium perfringens*] [en ligne] (24/10/2001) Adresse URL :

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=protein&list_uids=15081497&dopt=GenPept Consulté le 18/04/2002.

NIILO L., RUTH E., MOFFAT E., AVERY R.J. Bovine enterotoxaemia : 2. Experimental reproduction of the disease. *Can. Vet. J.* 1963, **4**, 288-299.

NIILO L., HARRIS W.N., JONES G.A. Clostridium perfringens type C in hemorrhagic enterotoxaemia of neonatal calves in Alberta. *Rev. Vet. Can.* 1994, **15**, 224-226.

NIILO L. Experimental Production of Hemorrhagic Enterotoxaemia by Clostridium perfringens type C in Maturing Lamb. *Can. J. Vet. Res.* 1986, **50**, 32-35.

NIILO L. Toxigenic characteristics of Clostridium perfringens type C in enterotoxemia of domestic animals. *Can. J. Vet. Res.* 1987, **51**, 224-228.

NINOMIYA M., MATSUSHITA O., MINAMI J., SAKAMOTO H., NAKANO M., OKABE A. Role of Alpha-Toxin in Clostridium perfringens Infection by Using Recombinants of C. perfringens and Bacillus subtilis. 1994, *Infect. Immun.* **62**, 5032-5039.

O

O'BRIEN D.K., MELVILLE S.B. Effects of Clostridium perfringens Alpha-Toxin (PLC) and Perfringolysin O (PFO) on Cytotoxicity to Macrophages, on Escape from the Phagosomes of Macrophages, and on Persistence of C. perfringens in Host Tissues. *Infect. Immun.* 2004, **72**, 5204-5215.

OCHI S., HASHIMOTO K., NAGAHAMA M., SAKURAI J. Phospholipid metabolism induced by Clostridium perfringens alpha-toxin elicits a hot-cold type of hemolysis in rabbit erythrocytes. *Infect. Immun.* 1996, **64**, 3930-3933.

OCHI S., MIYAWAKI T., MATSUDA H., ODA M., NAGAHAMA M., SAKURAI J. Clostridium perfringens α -toxin induces rabbit neurophil adhesion. *Microbiol.* 2002, **148**, 237-245.

OCHI S., ODA M., NAGAHAMA M., SAKURAI J. Clostridium perfringens alpha-toxin-induced hemolysis of horse erythrocytes is dependent on Ca²⁺ uptake. *Biochim. Biophys. Acta.* 2003, **1613**, 79-86.

ODENDAAL M.W., VISSER J.J., BOTHA W.J., PRINSLOO H. The passive protection of lambs against Clostridium perfringens type D with semi-purified hyperimmune serum. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 1988, **55**, 47-50.

ODENDAAL M.W., VISSER J.J., BERGH N., BOTHA W.J. The effect of passive immunization on active immunity against Clostridium perfringens type D in lambs. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 1989, **56**, 251-255.

OHTANI K., BHOWMIK SK., HAYASHI H., SHIMIZU T. Identification of a novel locus that regulates expression of toxin genes in Clostridium perfringens. *FEMS Microbiol. Lett.* 2002, **209**, 113-118.

OHTANI K., HAYASHI H., SHIMIZU T. The luxS gene is involved in cell-cell signalling for toxin production in Clostridium perfringens. *Mol. Microbiol.* 2002, **44**, 171-179.

OHTANI K., KWASAR H.I., OKUMURA K., HAYASHI H., SHIMIZU T. The VirR/VirS regulatory cascade affects transcription of plasmid encoded putative virulence genes in Clostridium perfringens strain 13. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003, **222**, 137-141.

OHTANI K., YUAN Y., HASSAN S., WANG R., WANG Y., SHIMIZU T. Virulence gene regulation by the agr system in Clostridium perfringens. *J. Bacteriol.* 2009, **191**(12), 3919-3927. doi: 10.1128/JB.01455-08.

OKEWOLE P.A., ITODO A.E., OYETUNDE I.L., CHIMA J.C., IROKANULO E.A., OCHOLI R.A. Clostridium perfringens type A enterotoxaemia in pigs: a report of five cases, *Br. Vet. J.* 1991, **147**, 484-485.

OLKOWSKI A.A., WOJNAROWICZ C., CHIRINO-TREJO M., LAARVELD B., SAWICKI G. Sub-Clinical necrotic enteritis in broiler chickens: Novel etiological consideration based on ultra-structural and molecular changes in the intestinal tissue. *Res. Vet. Sci.* 2008, **85**(3), 543-553.

OYSTON P.C., PAYNE D.W., HAVARD H.L., WILLIAMSON E.D., TITBALL R.W. Production of a non-toxic site-directed mutant of Clostridium perfringens epsilon-toxin which induces protective immunity in mice. *Microbiol.* 1998, **144**, 333-341.

P

PAUILLAC S., D'ALLAYER J., LENORMAND P., ROUSSELLE J.C., BOUVET P., POPOFF M.R. Characterization of the enzymatic activity of Clostridium perfringens TpeL. *Toxicon.* 2013, **75**, 136-143.

PEEK S.F., SEMRAD S.D., PERKINS G.A. Clostridial myonecrosis in horses (37 cases 1985-2000). *Equine Vet. J.* 2003, **35**(1), 86-92.

PETIT L., GIBERT M., POPOFF M.R.) Clostridium perfringens : toxinotype and genotype. *Trends Microbiol.* 1999, **7**, 104-110.

PETIT L., MAIER E., GIBERT M., POPOFF M.R., BENZ R.(2001) Clostridium perfringens epsilon toxin induces a rapid change of cell membrane permeability to ions and forms channels in artificial lipid bilayers. *J. Biol. Chem.* 2001, **276**, 15736-15740.

PETIT L., GIBERT M., GOURCH A., BENS M., VANDEWALLE A., POPOFF M.R. Clostridium perfringens epsilon toxin rapidly decreases membrane barrier permeability of polarized MDCK cells. *Cell Microbiol.* 2003, **5**, 155-164.

PERSSON S., OLSEN K.E. Multiplex PCR for identification of Campylobacter coli and Campylobacter jejuni from pure cultures and directly on stool samples. *J. Med. Microbiol.* 2005, **54**, 1043-1047.

PHILIPPE V.A., MENDEZ M.B., HUANG I.H., ORSARIA L.M., SARKER M.R., GRAU R.R. Inorganic phosphate induces spore morphogenesis and enterotoxin production in the intestinal pathogen Clostridium perfringens. *Infect. Immun.* 2006, **74**, 3651-3656.

PHILIPPEAU C., GONÇALVES S., JULLIAND V.) Morts Subites des Bovins – Diagnostic bactériologiques des entérotoxémies. *Point Vét.* 2003, **237**, 12-13.

PHILLIPS-JONES M.K. Use of a lux reporter system for monitoring rapid changes in ϵ -toxin gene expression in Clostridium perfringens during growth. *FEMS Microbiol. Lett.* 2000, **188**, 29-33.

PILEHCHIAN LANGROUDI R., SHAMSARA M., AGHAIYPOUR K. Expression of Clostridium perfringens epsilon-beta fusion toxin gene in E. coli and its immunologic studies in mouse. *Vaccine.* 2013, **31**(32), 3295-3299.

PITTA D.W., PINCHAK W.E., INDUGU N., VECCHIARELLI B., SINHA R., FULFORD J.D. Metagenomic Analysis of the Rumen Microbiome of Steers with Wheat-Induced Frothy Bloat. *Front Microbiol.* 2016, **7**, 689.

POPOFF M.R. Les Enterotoxémies. *Rev. Méd. Vét.* 1989, **140**, 479-491.

POPOFF M.R. Interactions between bacterial toxins and intestinal cells. *Toxicon*. 1998, **36**, 665-685.

POWERS J.C., ASGIAN J.L., EKICI O.D., JAMES K.E. Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chem. Rev.* 2002, **102**(12),4639-4750.

R

RADOSTITS, O.M., GAY, C.C., HINCHCLIFF, K.W., & CONSTABLE, P.D. (2007) Enteric diseases associated with *Clostridium perfringens* in *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th edition, Saunders Edition, St Louis, p 836.

RADOSTITS, O.M., GAY, C.C., HINCHCLIFF, K.W., & CONSTABLE, P.D. (2007) Enterotoxemia associated with *Clostridium perfringens* type A in *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th edition, Saunders Edition, St Louis. p 836-838.

RADOSTITS, O.M., GAY, C.C., HINCHCLIFF, K.W., & CONSTABLE, P.D. (2007) Enterotoxemia associated with *Clostridium perfringens* type B, C and E in *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th edition, Saunders Edition, St Louis. p 838-840.

RADOSTITS, O.M., GAY, C.C., HINCHCLIFF, K.W., & CONSTABLE, P.D. (2007) Enterotoxemia associated with *Clostridium perfringens* type D in *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th edition, Saunders Edition, St Louis. p 841-844.

RAMEY E. and RAMEY S. <http://www.butanol.com/> consulté le 21/12/09

REGAL J.F., SHIDEMAN, F.E. The effect of phospholipase C on the responsiveness of cardiac receptors. I. Inhibition of the adrenergic inotropic response. *J. Pharmacol. Experim. Ther.* 1980, **214**, 282-290.

REGAL J.F., SHIDEMAN F.E. The effect of phospholipase C on the responsiveness of cardiac receptors. II. The specificity of phospholipase C inhibition of receptor-mediated responses. *J. Pharmacol. Experim. Ther.* 1980, **214**, 291-296.

REID G., FRIENDSHIP R. (2002) Alternatives to antibiotic use: probiotics for the gut. *Anim. Biotech.* 2002, **13**, 97-112.

RICHARD J.F., MAINGUY G., GIBERT M., MARVAUD J.C., STILES B.G., POPOFF M.R. Transcytosis of iota-toxin across polarized CaCo-2 cells. *Mol. Microbiol.* 2002, **43**, 907-917.

RIDDELL C., KONG X.M. The influence of diet on necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Dis.* 1992, **36**, 499-503.

ROBERTS I., HYLEMON P.B., HOLMES W.M. Isolation of promoters from two anaerobic bacteria. *Microbios.* 1988, **54**(219), 87-99.

ROOD J.I., COLE S.T. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Rev.* 1991, **55**, 621-648.

ROOD J.I., LYRISTIS M. Regulation of extracellular toxin production in *Clostridium perfringens*. *Trends Microbiol.* 1995, **5**, 192-196.

ROOD J.I., MCCLANE B.A., SONGER J.G., TITBALL R.W. (1997) *The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis*, London : Academic Press (Ed), San Diego (United States).

ROOD J.I. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. *Ann. Rev. Microbiol.* 1998, **52**, 333-360.

ROONEY A.P., SWEZEY J.L., FRIEDMAN R., HECHT D.W., MADDOX C.W. Analysis of core housekeeping and virulence genes reveals cryptic lineages of *Clostridium perfringens* that are associated with distinct disease presentations. *Genetics*. 2006, **172**, 2081-2092.

RØRBYE C., PETERSEN I.S., NILAS L. Postpartum *Clostridium sordellii* infection associated with fatal toxic shock syndrome. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2000, **79**(12), 1134-1135.

ROSE A.L., EDGAR G. Enterotoxaemic jaundice of sheep and cattle. *Austral. Vet. J.* 1936, **12**, 212-220.

ROSSKOPF-STREICHER U., VOLKERS P., NOESKE K., WERNER E. Quality assurance of *C. perfringens* epsilon toxoid vaccines-ELISA versus mouse neutralization test. *ALTEX*. 2004, **21-S3**, 65-69.

RUTSCHMANN O. Conférences Médecins. Prophylaxie antitétanique aux urgences. URGENCES 2004. Chapitre 31. Page 415-424. http://www.sfm.org/fr/formation/cours_sup (consulté 15/02/2010)

S

SAKURAI K. Necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens* type A in dairy cows with a discussion of the aetiology. *J. Jap. Vet. Med. Assoc.* 1985, **38**, 587-590.

SAKURAI J., OSHITA Y., FUJII Y. Effect of *Clostridium perfringens* alpha toxin on the cardiovascular system of rats. *Toxicon*. 1985, **23**, 903-912.

SAKURAI J., FUJII Y. Purification and characterization of *Clostridium perfringens* beta toxin. *Toxicon*. 1987, **25**(12), 1301-1310.

SAKURAI J., FUJII Y., SHIROTANI M. Contraction induced by *Clostridium perfringens* alpha toxin in the isolated rat ileum. *Toxicon*. 1990, **28**, 411-418.

SAKURAI J., KOBAYASHI K. Lethal and dermonecrotic activities of *Clostridium perfringens* iota toxin: biological activities induced by cooperation of two nonlinked components. *Microbiol. Immunol.* 1995, **39**, 249-253.

SAKURAI J., NAGAHAMA M., HISATSUNE J., KATUNUMA N., TSUGE H. *Clostridium perfringens* iota-toxin, ADP-ribosyltransferase: structure and mechanism of action. *Adv. Enz. Regul.* 2003, **43**, 361-377.

SAKURAI J., NAGAHAMA M., ODA M. *Clostridium perfringens* Alpha-toxin: Characterization and Mode of Action. *J. Biochem.* 2004, **136**, 569-574.

SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. *Molecular Cloning : a laboratory manual*, second edition. Ford, N., Nolan, C., Ferguson, M. : Cold Spring Harbor, 1989, volume 3.

SANTIN A.D., ZHAN F., CANE S., BELLONE S., PALMIERI M., THOMAS M., BURNETT A., ROMAN J.J., CANNON M.J., SHAUGHNESSY J. JR, PECORELLI S. Gene expression fingerprint of uterine serous papillary carcinoma: identification of novel molecular markers for uterine serous cancer diagnosis and therapy. *Brit. J. Cancer*. 2005, **92**, 1561-1573.

SANTIN A.D, BELLONE S., SIEGEL E.R., MCKENNEY J.K., THOMAS M., ROMAN J.J., BURNETT A., TOGNON G., BANDIERA E., PECORELLI S. Overexpression of *Clostridium perfringens* enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in uterine carcinosarcomas. *Clin. Cancer Res.* 2007, **13**, 3339-3346.

SANTIN A.D., BELLONE S., MARIZZONI M., PALMIERI M., SIEGEL E.R., MCKENNEY J.K., HENNINGS L., COMPER F., BANDIERA E., PECORELLI S. Overexpression of claudin-3 and claudin-4 receptors in

uterine serous papillary carcinoma: novel targets for a type-specific therapy using *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE). *Cancer*. 2007, **109**, 1312-1322.

SATO Y. A case of necrotic enteritis in beef cattle harboring caused by *Clostridium perfringens* type A. *J. Jap. Vet. Med. Assoc.* 1985, **38**, 122-125.

SAWIRES Y.S., SONGER J.G. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for strain typing of *Clostridium perfringens*. *Anaerobe*. 2005, **11**, 262-272.

SAWIRES Y.S., SONGER J.G. *Clostridium perfringens*: insight into virulence evolution and population structure. *Anaerobe*. 2006, **12**, 23-43.

SAYEED S., LI J., MCCLANE B.A. Virulence plasmid diversity in *Clostridium perfringens* type D isolates. *Infect Immun*. 2007, **75**(5), 2391-2398.

SHATURSKY O., BAYLES R., ROGERS M., JOST B.H., SONGER J.G., TWETEN R.K. *Clostridium perfringens* beta-toxin forms potential-dependent, cation-selective channels in lipid bilayers. *Infect. Immun*. 2000, **68**, 5546-5551.

SCHOEPE H., PACHE C., NEUBAUER A., POTSCSKA H., SCHLAPP T., WIELER L.H., BALJER G. (2001) Naturally Occuring *Clostridium perfringens* Nontoxic Alpha-Toxin Variant as a Potential Vaccine Candidate against Alpha-Toxin-Associated Diseases. *Infect. Immun*. 2001, **69**, 7194-7196.

SCHOEPE H., NEUBAUER A., SCHLAPP T., WIELER L.H., BALJER G. Immunization with an alphatoxin variant 121A/91-R212H protects mice against *Clostridium perfringens* alphatoxin. *Anaerobe*. 2006, **12**, 44-48. .

SCHOSTER A., KOKOTOVIC B., PERMIN A., PEDERSEN P.D., DAL BELLO F., GUARDABASSI L. In vitro inhibition of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* by commercial probiotic strains. *Anaerobe*. 2013, **20**, 36-41.

SCHOTTE U., TRUYEN U., NEUBAUER, H. Significance of β -Toxigenic *Clostridium perfringens* infection in Animals and their Predisposong Factors – A Review. *J. Vet. Med.* 2004, **51**, 423-426.

SCHUBERT A.M., SINANI H., SCHLOSS P.D. Antibiotic-Induced Alterations of the Murine Gut Microbiota and Subsequent Effects on Colonization Resistance against *Clostridium difficile*. *MBio*. 2015, **6**(4). pii: e00974-15.

SHEPARD L.A., SHATURSKY O., JOHNSON A.E., TWETEN R.K. The mechanism of pore assembly for a cholesterol-dependent cytolysin: formation of a large prepore complex precedes the insertion of the transmembrane beta-hairpins. *Biochem*. 2000, **39**, 10284-10293.

SHIMAMOTO S., TAMAI E., MATSUSHITA O., MINAMI J., OKABE A., MIYATA S.(2005) Changes in ganglioside content affect the binding of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin to detergent-resistant membranes of Madin-Darby canine kidney cells. *Microbiol. Immunol*. 2005, **49**, 245-253.

SHIMIZU T., OHSHIMA S., OHTANI K., SHIMIZU T., HAYASHI H. Genomic map of *Clostridium perfringens* strain 13. *Microbiol. Immunol*. 2001, **45** (2), 179-189.

SHIMIZU T., OHTANI K., HIRAKAWA H., OHSHIMA K., YAMASHITA A., SHIBA T., OGASAWARA N., HATTORI M., KUHARA S., HAYASHI H. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002, **99**(2), 996-1001.

SHIRLEY GN. Clostridial enteritis in cattle. *Vet. Rec.* 1958, **70**, 478-480.

- SHORTT S.J., TITBALL R.W., LINDSAY C.D. An assessment of the in vitro toxicology of Clostridium perfringens type D epsilon-toxin in human and animal cells. *Hum. Exp. Toxicol.* 2000, **19**, 108-116.
- SICARD D., CHAUVELOT-MOACHON L. Comment: pathophysiology of mifepristone-induced septic shock due to Clostridium sordellii. *Ann Pharmacother.* 2005, **39**(12), 2142-2143.
- SIPOS W., FISCHER L., SCHINDLER M., SCHMOLL F. Genotyping of Clostridium perfringens isolated from domestic and exotic ruminants and swine. *J. Vet. Med. B, Infect. Dis. Vet. Public Health.* 2003, **50**, 360-362.
- SIRARD J.C., WEBER M., DUFLOT E., POPOFF M.R., MOCK M. A recombinant Bacillus anthracis strain producing the Clostridium perfringens Ib component induces protection against iota toxins. *Infect. Immun.* 1997, **65**, 2029-2033.
- SKJELKVALE R., UEMURA T. Experimental diarrhoea in human volunteers following oral administration of Clostridium perfringens enterotoxin. *J. Appl. Bacteriol.* 1977, **3**, 281-286.
- SMEDLEY J.G., FISHER D.J., SAYEED S., CHAKRABARTI G., MCCLANE B.A. The enteric toxins of Clostridium perfringens. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2004, **152**, 183-204.
- SMYTH J.A., MARTIN T.G. Disease producing capability of netB positives isolates of C. Perfringens recovered from normal chickens and a cow, and netB positive and negative isolates from chickens with necrotic enteritis. *Vet. Microbiol.* 2010, **146**(1-2), 76-84.
- SNEL J., HEINEN P.P., BLOK H.J., CARMAN R.J., DUNCAN A.J., ALLEN P.C., COLLINS M.D. Comparison of 16S rRNA sequences of segmented filamentous bacteria isolated from mice, rats, and chickens and proposal of "Candidatus Arthromitus". *Int J Syst Bacteriol.* 1995, **45**(4), 780-782.
- SOLER-JOVER A., BLASI J., GÓMEZ DE ARANDA I., NAVARRO P., GIBERT M., POPOFF M.R., MARTÍN-SATUÉ M. Effect of epsilon toxin-GFP on MDCK cells and renal tubules in vivo. *J. Histochem. Cytochem.* 2004, **52**, 931-942.
- SONGER J.G. Clostridial Enteric Diseases of Domestic Animals. *Clin. Microbiol. Rev.* 1996, **9**, 216-234.
- SONGER J.G. Bovine enteritis and enterotoxaemia. *ACVIM* 2004.
- SONGER J.G., MISKIMMINS D.W. Clostridium perfringens type E enteritis in calves: two cases and a brief review of the literature. *Anaerobe.* 2004, **10**, 239-242.
- SONGER J.G., UZAL F.A. Clostridial enteric infections in pigs. *J. Vet. Diag. Invest.* 2005, **17**, 528-536.
- SOPER D.E. Abortion and clostridial toxic shock syndrome. *Obstet. Gynecol.* 2007, **110**(5), 970-971.
- SPARKS S.G., CARMAN R.J., SARKER M.R., MCCLANE B.A. Genotyping of enterotoxigenic Clostridium perfringens fecal isolates associated with antibiotic-associated diarrhea and food poisoning in North America. *J. Clin. Microbiol.* 2001, **39**, 883-888.
- SPRINGER S., SELBITZ H.J. The control of necrotic enteritis in sucking piglets by means of a Clostridium perfringens toxoid vaccine. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 1999, **24**, 333-336.
- STACKEBRANDT E., RAINEY FA in ROOD, J.I., MCCLANE, B.A., SONGER, J.G., TITBALL, R.W. (1997) The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis – Phylogenetic relationships, London : Academic Press (Ed), San Diego (United States). pp 3-5, 6-10,12.

STEIN D.R., ALLEN D.T., PERRY E.B., BRUNER J.C., GATES K.W., REHBERGER T.G., MERTZ K., JONES D., SPICER L.J. Effects of feeding propionibacteria to dairy cows on milk yield, milk components, and reproduction. *J. Dairy Sci.* 2006, **89**, 111-125.

STEINTHORSDOTTIR V., FRIDRIKSDOTTIR V., GUNNARSSON E., ANDRESSON, O.S. Expression and purification of *Clostridium perfringens* beta-toxin glutathione S-transferase fusion protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 1995, **130**, 273-278.

STEINTHORSDOTTIR V., HALLDÓRSSON H., ANDRÉSSON O.S. *Clostridium perfringens* beta-toxin forms multimeric transmembrane pores in human endothelial cells. *Microb Pathog.* 2000, **28**(1), 45-50.

STEPHEN J., PIETROWSKI R.A. (1986) *Bacterial Toxins*, 2nd Edition. Wokingham, England : van Nostrand Reinhold (United Kingdom)

STEVENS D.L., TROYER B.E., MERRICK D.T., MITTEN J.E., OLSON R.D. Lethal Effects and Cardiovascular Effects of Purified ϵ - and β - toxins from *Clostridium perfringens*. *J. Infect. Dis.* 1988, **157**, 272-279.

STEVENS D.L., BRYANT A.E. Pathogenesis of *Clostridium perfringens* infection: Mechanisms and Mediator of Shock. *Clin. Infect. Dis.* 1997, **25-S2**, S160-S164.

STILES B.G., HALE M.L., MARVAUD J.C., POPOFF M.R. *Clostridium perfringens* iota toxin: characterization of the cell-associated iota b complex. *Biochem. J.* 2002, **367**, 801-808.

STOKKA G.L., EDWARDS A.J., SPIRE M.F., BRANDT R.T. JR , SMITH, J.E. Inflammatory response to clostridial vaccines in feedlot cattle. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 1994, **204**, 415-419.

STRAGIER P. To kill but not be killed: a delicate balance. *Cell.* 2006, **124**(3), 461-463.

STYRT B., WALKER R.D., WHITE J.C. Neutrophil oxidative metabolism after exposure to bacterial phospholipase C. *J. Lab. Clin. Med.* 1989, **114**, 51-57.

SUDARIC F., NADAZDIN M. Endemic clostridial infection on cattle farm. *Vet. Glasn.* 1983, **37**, 383-391.

T

TAMAI E., ISHIDA T., MIYATA S., MATSUSHITA O., SUDA H., KOBAYASHI S., SONOBE H., OKABE A. Accumulation of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin in the mouse kidney and its possible biological significance. *Infect. Immun.* 2003, **71**, 5371-5375.

TEO A.Y., TAN H.M. Inhibition of *Clostridium perfringens* by a novel strain of *Bacillus subtilis* isolated from the gastrointestinal tracts of healthy chickens. *Appl Environ Microbiol.* 2005, **71**(8), 4185-4190.

THIEDE S., GOETHE R., AMTSBERG G. Prevalence of beta2 toxin gene of *Clostridium perfringens* A from diarrhoeic dogs. *Vet. Rec.* 2001, **149**, 273-274.

THOMPSON J.D., HIGGINS D.G., GIBSON T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994, **22**(22), 4673-4680.

THOMPSON D.R., PARREIRA V.R., KULKARNI R.R., PRESCOTT J.F. (2006) Live attenuated vaccine-based control of necrotic enteritis of broiler chickens. *Vet. Microbiol.* 2006, **113**, 25-34.

TIMBERMONT L., DE SMET L., VAN NIEUWERBURGH F., PARREIRA V.R., VAN DRIESSCHE G., HAESBROUCK F., DUCATELLE R., PRESCOTT J., DEFORCE D., DEVREESE B., VAN IMMERSEEL F. Perfrin,

a novel bacteriocin associated with netB positive *Clostridium perfringens* strains from broilers with necrotic enteritis. *Vet Res.* 2014, **45**, 40.

TIMBERMONT L., LANCKRIET A., PASMANS F., HAESEBROUCK F., DUCATELLE R., VAN IMMERSEEL F. Intra-species growth-inhibition by *Clostridium perfringens* is a possible virulence trait in necrotic enteritis in broilers. *Vet. Microbiol.* 2009, **137**(3-4), 388-391.

TIMBERMONT L., HAESEBROUCK F., DUCATELLE R., VAN IMMERSEEL F. Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. *Avian Pathol.* 2011, **40**(4), 341-347.

TIMMERMAN H.M., MULDER L., EVERTS H., VAN ESPEN D.C., VAN DER WAL E., KLAASSEN G., ROUWERS S.M., HARTEMINK R, ROMBOUITS FM, BEYNEN A.C. Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics. *J. Dairy Sci.* 2005, **88**, 2154-2165.

TIRANDAZ H., HAMED J., MARASHI S.A. Application of beta-lactamase-dependent prodrugs in clostridial-directed enzyme therapy (CDEPT): a proposal. *Med Hypotheses.* 2006, **67**(4), 998-999.

TITBALL R.W., HUNTER S.E.C., MARTIN K.L., MORRIS B.C., SHUTTLEWORTH AD., RUBIDGE T, ANDERSON DW, KELLY DC. Molecular cloning and nucleotide sequence of the alpha-toxin (phospholipase C) of *Clostridium perfringens*. *Infect. Immun.* 1989, **57**, 367-376.

TITBALL R.W. Bacterial Phospholipases C. *Microbiol. Rev.* 1993, **57**, 347-366.

TSCHIRDEWAHN B., NOTERMANS S., WERNARS K., UNTERMANN F. The presence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains in faeces of various animals. *Int. J. Food Microbiol.* 1991, **14**, 175-178.

TSUGE H., NAGAHAMA M., NISHIMURA H., HISATSUNE J., SAKAGUCHI Y., ITOGAWA Y., KATUNUMA N., SAKURAI J. (2003) Crystal structure and site-directed mutagenesis of enzymatic components from *Clostridium perfringens* iota-toxin. *J. Mol. Biol.* 2003, **325**, 471-483.

TSUTSUI K., MINAMI J., MATSUSHITA O., KATAYAMA S.I., TANIGUCHI Y., NAKAMURA S., NISHIOKA M., OKABE A. Phylogenetic analysis of phospholipase C genes from *Clostridium perfringens* types A et E and *Clostridium novyi*. *J. Bacteriol.* 1995, **177**, 7164-7170

TWETEN R.K. *Clostridium perfringens* beta toxin and *Clostridium septicum* alpha toxin: their mechanisms and possible role in pathogenesis. *Vet. Microbiol.* 2001, **82**, 1-9.

TWETEN R.K., PARKER M.W., JOHNSON A.E. The cholesterol-dependent cytolysins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2001, 257, 15-33.

U

UZAL F.A., KELLY W.R. Protection of goats against experimental enterotoxaemia by vaccination with *Clostridium perfringens* type D epsilon toxoid. *Vet. Rec.* 1998, **142**, 722-725.

UZAL F.A., ROLFE B.E., SMITH N.J., THOMAS A.C., KELLY W.R. Resistance of ovine, caprine and bovine endothelial cells to *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in vitro. *Vet. Res. Commun.* 1999, **23**, 275-284.

UZAL F.A., WONG J.P., KELLY W.R., PRIEST J. Antibody response in goats vaccinated with liposome-adjuvanted *Clostridium perfringens* type D epsilon toxoid. *Vet. Res. Commun.* 1999, **23**, 143-150.

UZAL F.A., KELLY W.R., MORRIS W.E., ASSIS R.A. (2002) Effects of Intravenous injection of *Clostridium perfringens* Type D Epsilon Toxin in Calves. *J. Comp. Pathol.* 2002, **126**, 71-75.

UZAL F.A., KELLY W.R., MORRIS W.E., BERMUDEZ J., BAISON M. The pathology of peracute experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia in sheep. *J. Vet. Diag. Invest.* 2004, **16**, 403-411.

UZAL F.A., MCCLANE B.A. Recent progress in understanding the pathogenesis of *Clostridium perfringens* type C infections. *Vet. Microbiol.* 2011, **153** (1-2), 37-43. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.02.048

V

VACHERI S.G., CLARK G.C., ALAPE-GIRÓN A., FLORES-DÍAZ M., JUSTIN N., NAYLOR C.E., TITBALL R.W., BASAK A.K. Comparison of a nontoxic variant of *Clostridium perfringens* α -toxin with the toxic wild-type strain. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2010, **66**(Pt 10), 1067-1074.

VAISHNAVI C., KAUR S., SINGH K. *Clostridium perfringens* type A and antibiotic associated diarrhea. *Indian. J. Med. Res.* 2005, **122**, 52-56.

VALGAEREN B.R., PARDON B., VERHERSTRAETEN S., GOOSSENS E., TIMBERMONT L., HAESEBROUCK F., DUCATELLE R., DEPRez P.R., VAN IMMERSEEL F. Intestinal clostridial counts have no diagnostic value in the diagnosis of enterotoxaemia in veal calves. *Vet Rec.* 2013, **172**(9), 237.

VAN ASTEN A.J., ALLAART J.G, MEELES A.D, GLOUDEMANS P.W, HOUWERS D.J, GRÖNE A. A new PCR followed by Mbol digestion for the detection of all variants of the *Clostridium perfringens* cpb2 gene. *Vet Microbiol.* 2008, **127**(3-4), 412-416.

VAN ASTEN A.J., NIKOLAOU G.N., GRÖNE A. The occurrence of cpb2-toxigenic *Clostridium perfringens* and the possible role of the beta2-toxin in enteric disease of domestic animals, wild animals and humans. *Vet. J.* 2008, **183**(2), 135-140.

VAN DEN BERG R.J., KUIJPER E.J., VAN COPPENRAET L.E., CLAAS E.C. Rapid diagnosis of toxinogenic *Clostridium difficile* in faecal samples with internally controlled real-time PCR. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006, **12**, 184-186.

VARGA J.J., THERIT B., MELVILLE S.B. Type IV pili and the CcpA protein are needed for maximal biofilm formation by the gram-positive anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. *Infect Immun.* 2008 , **76**(11), 4944-4951.

VEILLON A., ZUBER A. Recherches sur quelques microbes strictement anaérobies et leur rôle en pathologie. *Arch. Med. Expérim. Anat. Pathol.* 1898, **10**, 517-545.

VESCHI J.L., BRUZZONE O.A., LOSADA-EATON D.M., DUTRA I.S., FERNANDEZ-MIYAKAWA M.E. Naturally acquired antibodies against *Clostridium perfringens* epsilon toxin in goats. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2008, **125** (1-2), 198-202.

VIDAL J.E., OHTANI K., SHIMIZU T., MCCLANE B.A. Contact with enterocyte-like Caco-2 cells induces rapid upregulation of toxin production by *Clostridium perfringens* type C isolates. *Cell Microbiol.* 2009, **11**(9), 1306-1328.

VIDAL J.E., MA M., SAPUTO J., GARCIA J., UZAL F.A., MCCLANE B.A. Evidence that the Agr-like quorum sensing system regulates the toxin production, cytotoxicity and pathogenicity of *Clostridium perfringens* type C isolate CN3685. *Mol. Microbiol.* 2012, **83**(1), 179-194.

VILEI E.M., SCHLATTER Y., PERRETEEN V., STRAUB R., POPOFF M.R., GIBERT M., GRONE A., FREY J. Antibiotic-induced expression of a cryptic cpb2 gene in equine beta2-toxigenic Clostridium perfringens. *Mol. Microbiol.* 2005, **57**, 1570-1581.

VISSIENNON T., MENGER S., LANGHOF, I. Hepatic and renal ultrastructural lesions in experimental Clostridium perfringens type A enterotoxemia in chickens. *Avian Dis.* 1996, **40**, 720-724.

VOGEL L.C. Antibiotic-induced diarrhea. *Orthop. Nurs.* 1995, **14**, 38-41.

W

WATERS M., SAVOIE A., GARMORY H.S., BUESCHEL D., POPOFF M., SONGER J.G., TITBALL R.W., MCCLANE B., SARKER M.R. Genotyping and Phenotyping of beta2-Toxigenic Clostridium perfringens fecal Isolates Associated with Gastrointestinal Diseases in Piglets. *J. Clin. Microbiol.* 2003, **41**, 3584-3591.

WATERS M., RAJU D., GARMORY H.S., POPOFF M.R., SARKER M.R. Regulated expression of the beta2-toxin gene (cpb2) in Clostridium perfringens type a isolates from horses with gastrointestinal diseases. *J. Clin. Microbiol.* 2005, **43**, 4002-4009.

WEISSMAN J.S. The ins and outs of GroEL-mediated protein folding. *Mol. Cell.* 2001, **8**(4),730-732.

WELCH W.H., NUTTALL G.H.F. A gas producing bacillus (Bacillus aerogenes capsulatus, Nov. Spec.) capable of rapid development in the blood vessels after death. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 1892, **3**, 81-91.

WITTE V., WOLF N., DIEFENTHAL T., REIPEN G., DARGATZ H. Heterologous expression of the clostripain gene from Clostridium histolyticum in Escherichia coli and Bacillus subtilis: maturation of the clostripain precursor is coupled with self-activation. *Microbiology.* 1994, **140** (Pt 5), 1175-1182.

WOO T.D., OKA K., TAKAHASHI M., HOJO F., OSAKI T., HANAWA T., KURATA S., YONEZAWA H., KAMIYA S. Inhibition of the cytotoxic effect of Clostridium difficile in vitro by Clostridium butyricum MIYAIRI 588 strain. *J. Med. Microbiol.* 2011, **60**(Pt 11), 1617- 1625.

WORRALL E.E., NATALIA L., RONOARDJO P., PARTOUTOMO S., TARMUDJI. Enterotoxaemia in water buffaloes caused by Clostridium perfringens type A. *Vet. Rec.* 1987, **121**, 278-279.

X

XU C.B., ZENG J., XU C.L., WANG Y.J. [Fusion of betal-toxin gene and beta2-toxin gene from Clostridium perfringens type C]. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 2005, **45**(2), 205-208.

Y

YASUDA K., HASHIKAWA S., SAKAMOTO H., TOMITA Y., SHIBATA S., FUKATA T. A new synbiotic consisting of Lactobacillus casei subsp. casei and dextran improves milk production in Holstein dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.* 2007, **69**, 205-208.

YOO H.S., LEE S.U., PARK K.Y., PARK Y.H. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of Clostridium perfringens types by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1997, **35**, 228-232.

Z

ZDANOVSKY A.G., ZDANOVSKAIA M.V. Simple and efficient method for heterologous expression of clostridial proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, **66**(8), 3166-3173.

ZHANG B.W., LI M., MA L.C., WEI F.W. A widely applicable protocol for DNA isolation from fecal samples. *Biochem. Genet.* 2006, **44**, 503-512.

ZHAO Y., KANG L., GAO S., ZHOU Y., SU L., XIN W., SU Y., WANG J. Expression and purification of functional *Clostridium perfringens* alpha and epsilon toxins in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 2011, **77**(2), 207-213.

ZENG J., DENG G., WANG J., ZHOU J., LIU X., XIE Q., WANG Y. Potential protective immunogenicity of recombinant *Clostridium perfringens* α - β 2- β 1 fusion toxin in mice, sows and cows. *Vaccine.* 2011, **29**(33), 5459-5466.

ZENG J., SONG F., YANG Y., MA C., DENG G., LI Y., WANG Y., LIU X. The Generation and characterization of Recombinant Protein and Antibodies of *Clostridium perfringens* Beta2 Toxin. *J. Immunol. Res.* 2016, **2016**, 5708468.

ZOPPI G., CINQUETTI M., LUCIANO A., BENINI A., MUNER A., BERTAZZONI MINELLI E. The intestinal ecosystem in chronic functional constipation. *Acta Paediatr.* 1998, **87**, 836-841.

Presses de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège

4000 Liège (Belgique)

D/2018/0480/2

ISBN 978-2-87543-122-6



9 782875 431226
