

# Typage moléculaire de *Clostridium perfringens*

G. DAUBE, P. SIMON, B. LIMBOURG\*, K. RENIER\*, A. KAECKENBEECK

Université de Liège, Faculté de Médecine Vétérinaire, Service de Bactériologie et de Pathologie des Maladies Bactériennes, Sart-Tilman, Bât. B43, 4000 Liège.

\* Fédération de Lutte contre les Maladies Animales, 604, chaussée de Marche, 5101 Erpent

Ces résultats ont été présentés en partie lors des deuxièmes journées scientifiques de l'UREF-AUPFLF, section biotechnologies animales, organisées à l'Université de Liège, Faculté de Médecine Vétérinaire, du 13 au 15 octobre 1993.

Manuscrit déposé le 16/02/1994.

## INTRODUCTION

*Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) est une espèce bactérienne cosmopolite largement répandue dans de multiples niches écologiques. On la retrouve principalement dans le tube digestif de l'homme et de la plupart des espèces animales où elle peut être considérée comme saprophyte de l'intestin (Smith et Crabb, 1961; Correa 1986). Certaines souches, pourtant, peuvent proliférer et produire différentes toxines responsables des maladies attribuées à ce germe (Daube, 1992). Le diagnostic des affections d'origine digestive repose sur l'isolement, en grand nombre, de *C. perfringens* et la détermination du toxinotype d'une ou de quelques souches (Sterne et Batty, 1975) (tableau 1). Le typage est principalement effectué par la technique de séroneutralisation des toxines létales majeures complétée, éventuellement, par la détermination du sérotype

(Henderson 1940). Ces méthodes ne permettent pas une étude très approfondie de la population de *C. perfringens* présente dans l'intestin et sont, de plus, lourdes à mettre en œuvre.

Afin de pouvoir réaliser de vastes enquêtes épidémiologiques concernant les clostridioses, deux méthodes visant à la caractérisation génétique de cette espèce bactérienne ont été développées :

D'une part, la recherche des gènes codant pour différentes toxines (alpha, bêta, epsilon, iota, thêta et mu, entérotoxine) et pour la sialidase par hybridation ADN-ADN sur colonies en utilisant des sondes polynucléotidiques spécifiques marquées radioactivement.

D'autre part, la mise au point d'une méthode de typage basée sur l'étude du polymorphisme des fragments de restriction de l'ADN chromo-

## RESUME

Depuis le début de ce siècle, plusieurs méthodes de typage de l'espèce *Clostridium perfringens* ont été décrites; la détermination du toxinotype par séroneutralisation des propriétés létales sur souris est la seule véritablement répandue. La génétique moléculaire permet actuellement d'aller beaucoup plus loin dans la caractérisation de cette espèce bactérienne. D'une part, les gènes codant pour la plupart des toxines produites par cette bactérie (toxines alpha, bêta, epsilon, iota, thêta et mu, entérotoxine et sialidase) ont été recherchés par une technique d'hybridation ADN-ADN sur colonies. Onze cent vingt-trois souches sauvages ont été étudiées par cette méthode. Les 768 souches isolées de bovins morts d'entérotaxémie en Belgique possèdent toujours les gènes de la toxine alpha et de la sialidase, le plus souvent ceux des toxines thêta et mu, très rarement celui de l'entérotoxine et jamais celui des toxines bêta, epsilon et iota. D'autre part, un marqueur épidémiologique de *C. perfringens* a été défini par l'étude des polymorphismes de fragments de restriction par *Hind*III de l'ADN chromosomique après hybridation successive avec une sonde spécifique du gène de l'ARN ribosomal 16S et quatre sondes spécifiques des gènes situés sur le chromosome des toxines alpha, thêta et mu et de la sialidase. Cette méthode a permis de confirmer, par l'étude de 166 souches de *C. perfringens*, l'absence d'homogénéité génomique des différents toxinotypes, ce qui fait suspecter le caractère mobile des principaux gènes de virulence dans cette espèce bactérienne. Les souches isolées de bovins morts d'entérotaxémie se sont révélées génomiquement polymorphes tant chez un même individu que chez plusieurs individus différents, démontrant l'origine polyclonale de cette affection.

**TABLEAU 1**  
Toxinotypes de *Clostridium perfringens*

Toxinotype	Groupe	Toxines produites									
		α	β	ε	ι	ent*	δ	θ	κ	λ	μ
A	1	++	-	-	-	-	-	++	++	-	++
	2	++	-	-	-	++	-	+	++	-	++
B	1	++	++	++	-	-	-	++	-	++	++
	2	++	++	++	-	-	-	++	++	-	-
C	1	++	++	-	-	-	++	++	++	-	-
	2	++	++	-	-	-	-	++	++	-	-
	3	++	++	-	-	-	-	++	+	-	+
	4	++	++	-	-	-	-	++	+	-	++
	5	++	++	-	-	++	-	-	-	-	-
D		++	-	++	-	-	-	++	++	+	++
E		++	-	-	++	-	-	++	++	++	+

++ produite par toutes ou la plupart des souches

+ produite par moins de 50 % des souches

- non produite

\* entérotoxine (tous les toxinotypes n'ont pas encore été testés vis-à-vis de ce facteur d'où possibilités d'erreurs par défaut)

## MATERIEL ET METHODES

### Souches de *Clostridium perfringens*

Les 1123 souches sauvages de *C. perfringens* utilisées lors de cette étude sont principalement d'origine animale : la plupart d'entre elles (768) ont été isolées, en Belgique, entre 1987 et 1991 de bovins morts d'entérotaxémie. Les autres souches sont d'origine très variée. Les souches ovines et caprines proviennent essentiellement de cas d'entérotaxémie. Les autres souches d'origine animale ont été souvent isolées de cas pathologiques caractérisés par des lésions ou des troubles intestinaux. Le tableau 2 reprend la ventilation des souches en fonction de l'espèce animale à l'origine de leur isolement. Ces souches furent identifiées comme *C. perfringens* sur base de l'aspect des colonies et de l'hé-

**TABLEAU 2**

Origine des souches sauvages étudiées

Bovins	768 (68,39 %)
Petits Ruminants	132 (11,75 %)
Porcs	61 (5,43 %)
Volailles	34 (3,03 %)
Carnivores	25 (2,23 %)
Divers	26 (2,32 %)
Aliments*	41 (3,65 %)
Non déterminée	36 (3,21 %)
<b>Nombre total de souches</b>	<b>1123</b>

\* destinés à l'alimentation humaine

molyse, de l'aspect à la coloration de Gram et de l'hybridation avec une sonde génétique spécifique de la toxine létale majeure alpha. Une étude préliminaire (Daube, résultats non publiés) a montré que toutes les souches de *C. perfringens* hybrident avec cette sonde. Les 1123 souches ont été étudiées par hybridation ADN-ADN sur colonies; 166 souches

représentatives de tous les toxinotypes ont été caractérisées par étude du polymorphisme de fragments de restriction de l'ADN chromosomique. La sensibilité et la spécificité des méthodes ont été estimées grâce à une collection de souches de référence ou de souches de contrôle : i) des souches de référence internationales de *C. perfringens*; ii) des souches de contrôle, dont le phénotype a été confirmé par d'autres équipes de recherche et qui nous permettent de valider nos tests. L'ensemble de ces souches ont été reprises dans le tableau 3 avec mention du caractère principal pour lequel chaque souche est utilisée comme contrôle ainsi que du laboratoire qui l'a transmise. Des souches d'autres espèces de clostridies ont été incluses comme témoins de spécificité.

### Sondes génétiques

Les sondes génétiques ont été dérivées à partir des gènes codant pour les toxines alpha (Saint-Joanis et al., 1989), bêta (Hunter et al., 1993), epsilon (Daube et al., 1993), iota (Perelle et al., 1993), thêta (Tveten, 1988), mu (Canard et al., 1992), l'entérotoxine (Van Damme-longsten et al., 1989) et la sialidase (Roggentin et al., 1988) (tableau 4). La sonde pour le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S a été dérivée du plasmide recombinant pBA2 (Iglesias et al.,

**TABLEAU 3**  
Propriétés et origines des souches de référence et de contrôle

Appellation	Caractère principal	Origine
NCIB10716	<i>Clostr. bifementans</i>	L. Devriese (Gand)
NCIB10676	<i>Clostr. cadaveris</i>	L. Devriese (Gand)
CCM6066	<i>Clostr. clostridioforme</i>	L. Devriese (Gand)
CCM5943	<i>Clostr. histolyticum</i>	L. Devriese (Gand)
CCM5743	<i>Clostr. septicum</i>	L. Devriese (Gand)
NCIB10717	<i>Clostr. sordellii</i>	L. Devriese (Gand)
G12	<i>Clostr. sordellii</i>	R. Schauer (RFA)
CCM6065	<i>Clostr. symbiosium</i>	L. Devriese (Gand)
ATCC12922	entérotoxine	ATCC (USA)
F3686	entérotoxine	M. Van Damme (P-B)
NCTC8239	entérotoxine	M. Van Damme (P-B)
NCTC8798(8-6)	entérotoxine	M.R. Popoff (France)
A99	sialidase	R. Schauer (RFA)
DSM756	sialidase	R. Schauer (RFA)
ATCC13124	Type A	ATCC (USA)
ATCC3624A	Type A	J. Rood (Australie)
CW504	Type A	J. Rood (Australie)
JIR323	Type A	J. Rood (Australie)
NCTC6785	Type A	S.T. Cole (France)
CN3888	Type A	Wellcome (G-B)
G23	Type B	P. Pohl (Belgique)
CN3922	Type B	Wellcome (G-B)
CP232	Type C	M. Popoff (France)
CWC236	Type C	M. Popoff (France)
NCTC2062	Type D	M. Popoff (France)
CN3978	Type D	M. Popoff (France)
NCIB10748	Type E	Wellcome (G-B)
		M. Popoff (France)

1983), contenant le gène de l'ARN ribosomal 16S de *Bacillus subtilis*; la sonde correspond aux 1100 bases de l'extrémité 3' de ce gène. Les fragments-sondes ont été extraits des plasmides recombinants avec les endonucléases de restriction appropriées (tableau 4). La sonde bêta est constituée du gène de

structure complet de la toxine bêta, gène amplifié grâce à deux amorces spécifiques (AGGAGGTTTTTTTATGAAG et TCTAAATAGCTGTTACTTFTGTG). La sonde iota est dérivée du gène de la sous-unité iota-a par amplification en chaîne par la polymérase (amorces TTTTAACTAGTTCATTTCCTAGTTA

et TTTTGTATTCTTTTCTCTAG-GATT). Les conditions d'amplification ont été les suivantes : 5 minutes à 95°C suivies de 45 cycles constitués de 30 secondes de dénaturation à 95°C, de 30 secondes d'hybridation à 50°C et de 30 secondes d'élongation à 70°C. Une unité d'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* (Taq, Beckman) a été ajoutée à 50 microlitres de tampon (Tris-HCl 10 mM pH 8,5; KCl 50 µM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 µM; gélatine 0,01 %) contenant 200 µM de déoxynucléotides triphosphates (Pharmacia), 0,8 µM de chaque amorce et 1 µM d'ADN cible. L'ADN cible est constitué de l'ADN total extrait de la souche ATCC3626 pour le gène de la toxine bêta et de la souche NCIB10748 pour celui de la toxine iota. Les sondes ont été marquées radioactivement (Random Hexanucleotide Primer Kit, Boehringer Mannheim).

TABLEAU 4  
Dérivation des sondes génétiques

Gène du caractère recherché	Abréviation du gène	Appellation du plasmide recombinant	Endonucléases de restriction utilisées	Taille de la sonde (pb)
Toxine alpha	<i>plc</i>	pTOX5	<i>Bam</i> HI + <i>Hind</i> III	950
Toxine bêta	NP	NP	PCR*	1025
Toxine epsilon	<i>etx</i>	pGDS7	<i>Hind</i> III	505
Toxine iota	NP	NP	PCR*	298
Toxine thêta	<i>pfoA</i>	pRT1B	<i>Acc</i> I	736
Tonie mu	<i>nagH</i>	pNAG-S3	<i>Hind</i> III	1300
Entérotoxine	<i>cpe</i>	pLWL10	<i>Kpn</i> I + <i>Hind</i> III	504
Sialidase	<i>nanH</i>	pK14RFA	<i>Kpn</i> I + <i>Hind</i> III	1400

NP = Non publié.

\* = Fragment-sonde obtenu par amplification en chaîne par la polymérase

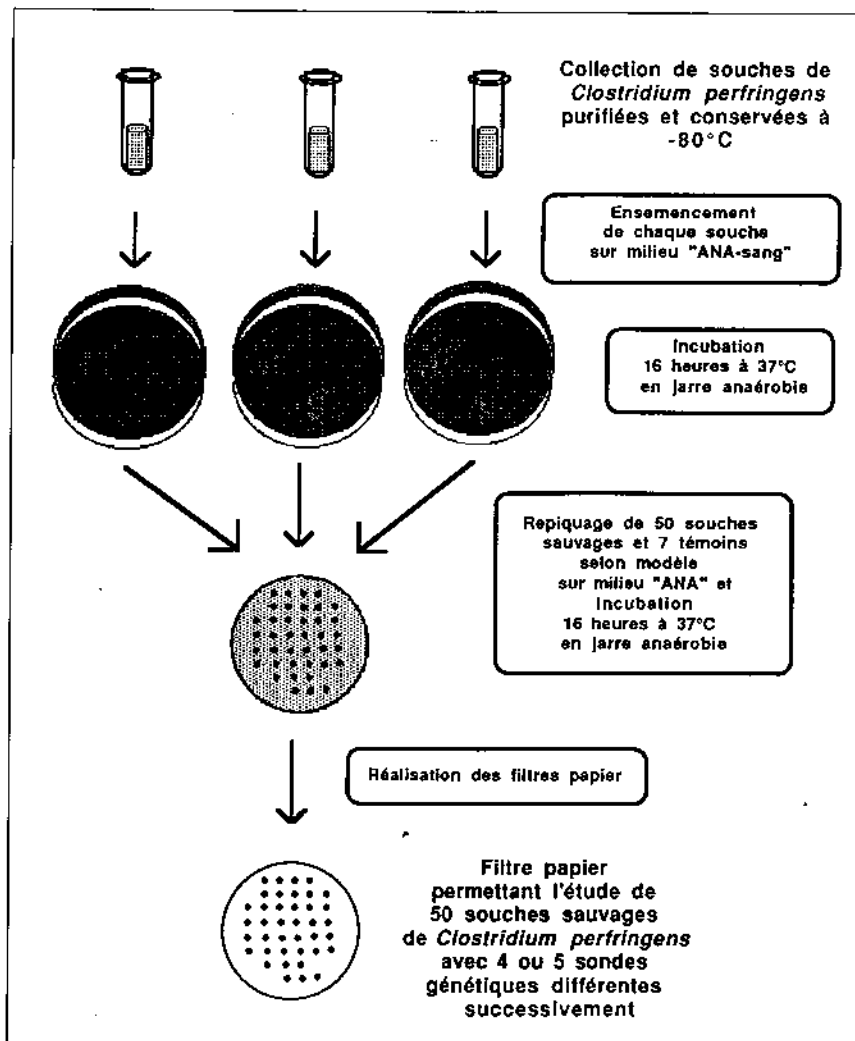


Figure 1  
Méthode de réalisation des filtres en vue de l'hybridation sur colonies.

### Méthodes d'hybridation

Les hybridations sur colonies ont été effectuées sur papier filtre Whatman 541 et les résultats ont été lus après autoradiographie (Mainil et al., 1990). Les adaptations de la technique originale sont les suivantes : le milieu Ana Blood Agar Base (Gibco) sans sang a été utilisé pour l'ensemencement de la matrice des souches de *C. perfringens* (50 souches à caractériser et 7 souches-témoins). L'ensemencement direct à partir de bouillons de culture de nuit s'est révélé inconstant et a dû être réalisé à partir d'une culture de nuit sur milieu solide (milieu Ana Blood Agar Base plus 8 % de sang de bovin) de chacune des souches (fig. 1).

Les hybridations sur profils de restriction de l'ADN total ont été réalisées de la manière suivante : la méthode d'extraction rapide de l'ADN total de *C. perfringens* a été adaptée de celle décrite par Van Damme-Jongsten et al. (1989). Un millilitre et demi d'une culture de nuit en BHI-thioglycollate de *C. perfringens* sont centrifugés dans un tube Eppendorf à 12.000 g pendant 10 minutes; le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 1,2 ml d'une solution TES (Tris-HCl 50 mM (pH 8)/EDTA 5 mM/NaCl 50 mM) et centrifugé 10 minutes à 4°C. Le culot est resuspendu dans 320 µL de TES contenant 25 % de sucrose et du lysozyme (concentration finale de 2 mg/ml) et incubé 20 minutes à 37°C. Soixante microlitres d'EDTA 0,25 M (pH 8), puis 300 µL de TES contenant 1 % de SDS et 1 µL de diéthylpyrocarbonate sont ajoutés successivement. Après incubation 10 minutes à 60°C,

l'ADN est extrait 2 fois avec 700  $\mu$ L de phénol-chloroforme-isoamylalcool (25:24:1) et une fois avec 700  $\mu$ L de chloroforme-isoamylalcool (24:1). Après addition de 2,5 volumes d'éthanol absolu et incubation 10 minutes à -20°C, le culot de centrifugation est rincé avec 300  $\mu$ L d'éthanol à 70 %. Après une nouvelle centrifugation, le culot est resuspendu dans 36  $\mu$ L d'eau distillée. Un tiers de l'ADN extrait est soumis à la digestion par endonucléases de restriction *Hind*III afin de réaliser, après électrophorèse en gel d'agarose 0,8 %, un profil de restriction de l'ADN total, appelé aussi empreinte génétique de la souche étudiée. Les fragments d'ADN sont ensuite transférés sur une membrane de Nylon chargé par la technique de «Vacuum-Blot» (Vacuum Blotter, Bio-Rad Laboratories) selon la méthode préconisée par la firme et hybridés avec la sonde marquée radioactivement. Les diverses étapes expérimentales sont reprises dans la figure 2.

### Méthodes d'analyse des profils d'hybridation

Les différents profils ont été comparés visuellement grâce aux marqueurs de taille ( $\lambda$  restreint par *Hind*III et pBR322 restreint par *Hin*I) et au profil d'hybridation de référence de la souche NCTC2062. Le profil obtenu grâce à la sonde pour le gène de l'ARN ribosomal 16S, appelé ribotype, a été développé par Grimont et Grimont (1986) et est largement utilisé en taxonomie bactérienne. Une matrice a été réalisée reprenant le nombre total de bandes distinguées pour chaque souche ainsi que le nombre de bandes de mobilité semblable pour chaque paire de souches possible. Une matrice traduisant le pourcentage d'homologie entre les souches a été réalisée au départ de la première par la transformation suivante :  $D = 2 \times n_{12} / (n_1 + n_2)$  où D est le coefficient de Dice (1945) traduisant l'homologie entre les souches 1 et 2;  $n_{12}$  est le nombre de bandes communes entre les souches 1 et 2;  $n_1$  est le nombre total de bandes repérées dans la souche 1;  $n_2$  est le nombre total de bandes repérées dans la souche 2. Cette matrice a été analysée par ordinateur selon l'algorithme de Li (1981) utilisant la méthode «Unweighted Pair Group Average Linkage» (UPG) afin de générer un dendrogramme de similarité. Les profils analysés sont constitués du profil d'hybridation avec la sonde pour le gène de l'ARN ribosomal 16S additionné des quatre profils obtenus après hybridation du filtre avec les sondes pour les gènes de la sialidase et des toxines alpha, mu

et thêta, quatre gènes situés sur le chromosome de *C. perfringens* (Canard et al., 1989).

## RESULTATS

### Prévalence des gènes codant pour huit toxines ou enzymes

Les résultats obtenus par hybridation ADN-ADN sur colonies sont présentés dans les tableaux 5 et 6. Les souches isolées de bovins morts d'entérotaxémie en Belgique n'hybrident jamais avec les sondes spécifiques des gènes codant pour les toxines bêta, epsilon et iota et pratiquement jamais avec celle pour le gène de structure de l'entérotoxine.

Les quelques souches positives avec la sonde spécifique du gène de la toxine bêta ont toutes été isolées de porcs souffrant d'entérite nécrotique au Danemark. La majorité de celles possédant le gène de la toxine epsilon ont été isolées de petits ruminants. Le gène de l'entérotoxine est rarement retrouvé et jamais parmi les 41 souches provenant d'aliment d'origine animale destinés à la consommation humaine.

### Typage par étude du polymorphisme de fragments de restriction de l'ADN

La sonde spécifique du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S a permis de détecter 10 bandes dans l'ADN

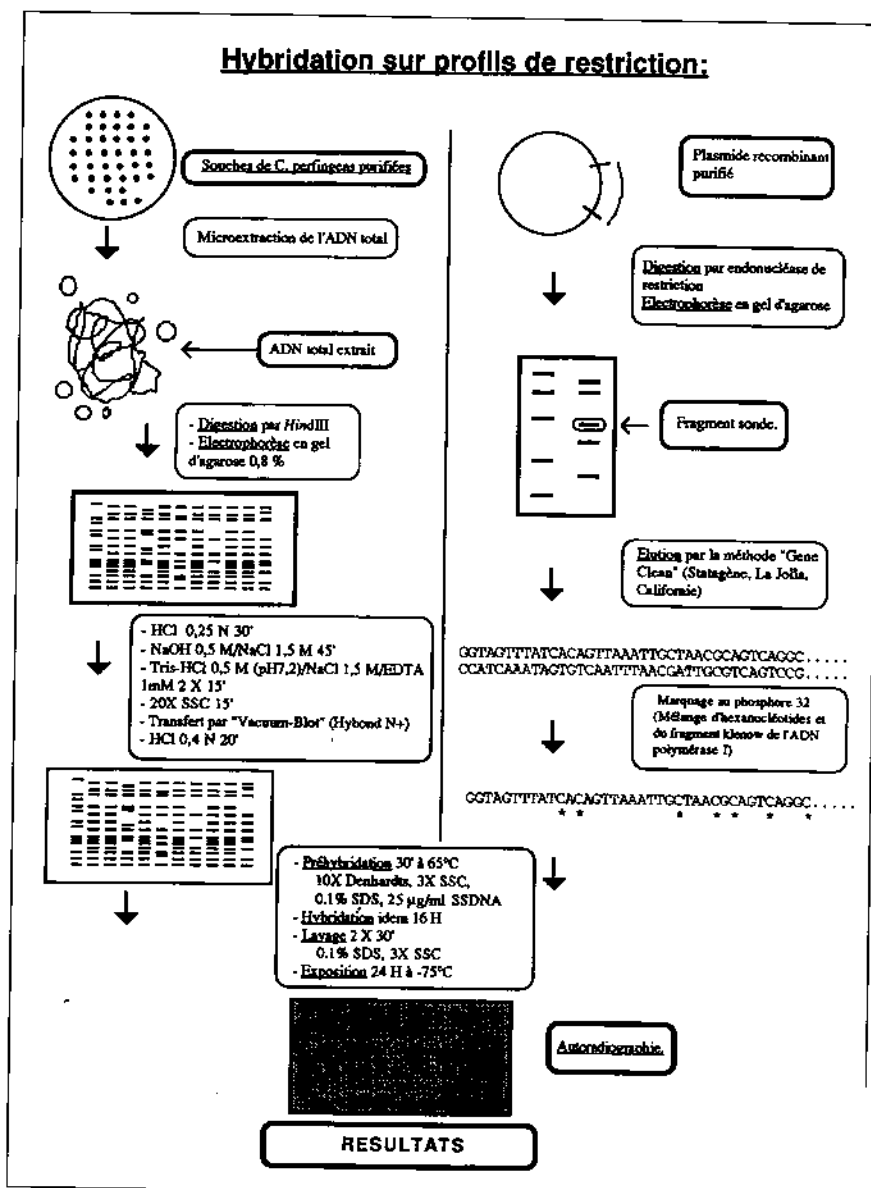


Figure 2  
Protocole d'hybridation sur profils de restriction. Etapes expérimentales.

restreint de la majorité des souches étudiées. Quarante-deux profils différents, appelés ribotypes, ont été distingués dans l'échantillon de 166 souches (résultats non montrés). La figure 3 montre les profils obtenus pour quatorze souches isolées de deux bovins morts d'entérotaxémie. L'utilisation successive des quatre autres sondes a permis de porter à 95 les classes différentes (résultats non montrés). Si on néglige les souches présentant un même profil, mais isolées d'un même animal, et pouvant donc constituer un clone, on obtient 95 catégories pour 116 souches, soit une variabilité corrigée de 82 %. Les souches isolées de bovins morts d'entérotaxémie sont différentes l'une de l'autre dans 94 % des cas, montrant ainsi qu'il ne s'agit pas d'un clone bactérien qui émerge lors de cette maladie. Un même individu peut, en outre héberger jusqu'à 9 électrophorotypes différents (résultats non montrés). Les souches des différents toxinotypes sont réparties sur toute la hauteur d'un dendrogramme exprimant l'homologie relative entre les souches (fig. 4). Malgré le polymorphisme important constaté entre les différentes souches, certaines bandes du ribotype sont fortement conservées et peuvent servir de marqueur ou de

carte d'identité d'espèce (fig. 3). L'étude par cette méthode d'espèces bactériennes phylogéniquement proches devrait être menée afin de voir si le ribotype, utilisé seul, peut être, à la fois, une méthode de différenciation de l'espèce et un marqueur épidémiologique au sein même de l'espèce *C. perfringens*.

## DISCUSSION

### Prévalence des gènes codant pour sept toxines ou enzymes

Les résultats d'hybridation avec chacune des sondes ont tous été exempts de bruit de fond; les souches qui possèdent le gène recherché ont été détectées par un spot noir sur l'autoradiographie, celles ne le possédant pas n'ont montré aucun signal ou de faibles traces lors d'une longue exposition (fig. 5). La lecture et l'interprétation des résultats sont donc très simples et parfaitement objectives.

Excepté trois études recherchant le gène de l'entérotoxine chez des souches de *C. perfringens* isolées de foyers d'intoxication alimentaire chez l'homme (6 % des souches positives), de porcs souffrant de diar-

rhée de sevrage (aucune souche positive) ou de matières fécales de divers animaux domestiques sains (Van Damme-Jongsten et al., 1990a et b, Tshirdewahn et al., 1991), aucun travail n'a jusqu'ici utilisé l'outil génétique pour l'étude épidémiologique de pathologies liées à *C. perfringens* (Daube, 1992). Les résultats rapportés ci-dessous détaillent l'absence ou la présence des gènes de plusieurs facteurs de virulence chez des souches isolées de cas de maladies animales. 41 souches isolées de substances alimentaires ont été ajoutées pour comparaison. La présence de chacun des gènes pris séparément a été étudiée ainsi que l'association de ces gènes dans chacune des souches.

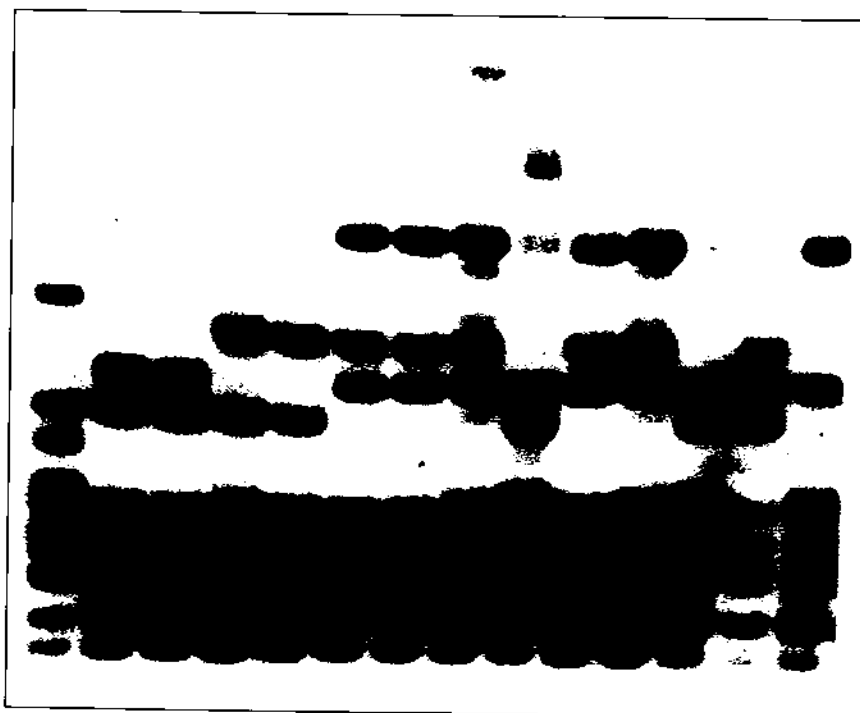


Figure 3

Profils d'hybridation de l'ADN total extrait de 14 souches de *Clostridium perfringens* et restreint par *HindIII* avec la sonde pour le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S.

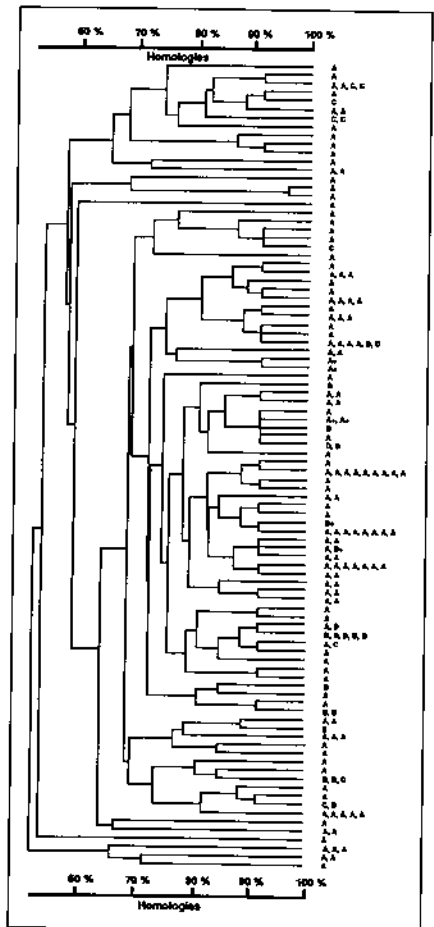


Figure 4

Dendrogramme représentant la classification des 166 souches de *Clostridium perfringens* étudiées en fonction des homologies de leurs profils d'hybridation avec les sondes spécifiques du gène de l'ARN ribosomal 16S et pour les gènes codant pour les toxines alpha, thêta et mu, ainsi que pour la sialidase. Les lettres indiquent les toxinotypes des souches localisées dans chacun des 95 électrophorotypes, le signe « + » indique que, en outre, la souche possède le gène de l'entérotoxine.

Parmi les 1123 souches isolées (appelées «souches sauvages»), une sous-population de 768 souches d'origine bovine isolées de cas suspects d'entérotoxémie bovine a été caractérisée pour tenter de cerner les facteurs de virulence importants pour la pathogénie et le pathotype impliqué.

Le gène de la toxine alpha est présent dans toutes les souches étudiées. La stabilité de ce facteur de virulence est à mettre en relation avec la position de son gène à proximité de l'origine probable de répllication du chromosome (Canard et Cole, 1989). Toutes les souches de référence hybrident également cette sonde (tableau 5). Les gènes des toxines bêta et epsilon ont été détectés dans 4 et 27 souches respectivement mais dans aucune des souches d'origine bovine; ceci exclut l'implication de ces toxines dans l'entérotoxémie bovine en Belgique. Aucune souche sauvage n'hybride avec la sonde spécifique du gène codant pour la toxine iota et la souche de référence NCIB 10748 de type E est la seule à donner un résultat positif. Ces données confirment la rareté de ce toxinotype. Toutes les souches de référence connues comme entérotoxinogènes ont été détectées par la sonde; celle-ci n'a détecté aucune autre souche de référence réputée non entérotoxinogène, excepté la souche NCIB 10748 de type E. Cette souche n'a pu être démontrée comme entérotoxinogène par des tests phénotypiques (M. Popoff, communication personnelle). Le gène de l'entérotoxine est présent dans 11 souches soit un peu moins d'un pourcent et seule une souche provient d'un bovin suspect d'entérotoxémie. Ces constatations font bien penser que ce facteur de virulence n'est pas impliqué dans le problème de l'entérotoxémie bovine bien que Niilo; en 1978, le rende responsable de diarrhées chez le veau au Canada. Le gène de la toxine thêta a été détecté dans un peu plus de 90 % des souches étudiées et dans une proportion légèrement moindre parmi les souches d'origine bovine. Quant aux souches de référence, elles sont toutes positives, excepté deux souches de type A (souches G23 et

CW504) et trois des quatre souches entérotoxinogènes (ATCC12922, NCTC8239 et NCTC8798). Cette propriété des souches entérotoxinogènes a déjà été rapportée (Niilo, 1980). La sonde pour le gène codant pour la toxine mu a détecté 95 % des souches étudiées dont 679 souches bovines sur 728 (soit 93,27 %). Le gène de la sialidase intracellulaire de *C. perfringens* est présent dans toutes les souches sauvages étudiées; seule la souche JIR323, souche receveuse pour électroporation (Scott et Rood, 1989), n'hybride pas avec la sonde spécifique du gène de ce facteur. Ce facteur semble donc essentiel à la bactérie pour son métabolisme propre plus qu'elle n'agit comme facteur de virulence proprement dit; cela pourrait être une raison qui explique sa stabilité dans les souches sauvages, la souche JIR323 étant une souche de laboratoire qui n'est sujette à aucune compétition.

L'ensemble de ces résultats permet, pour chaque souche la détermination d'un pathotype, pendant géné-

tique du toxinotype, qui permet d'associer la souche à un tableau pathologique particulier. Cette méthode permet donc de remplacer complètement les techniques classiques de typage sur animaux de laboratoire.

#### Typage par étude du polymorphisme de fragments de restriction de l'ADN chromosomique

Les hybridations sur profils de restriction par *Hind*III réalisées ici permettent de «tracer» des clones de *C. perfringens*. La sonde spécifique du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S a l'avantage de détecter dix opérons dispersés sur un tiers du chromosome autour de l'origine de répllication (Canard et al., 1989) et donc d'étudier la position relative de minimum 20 sites *Hind*III. Les autres sondes n'étudient que les quelques sites *Hind*III dans et autour de la séquence, présente en un seul exemplaire, repérée par chaque sonde.

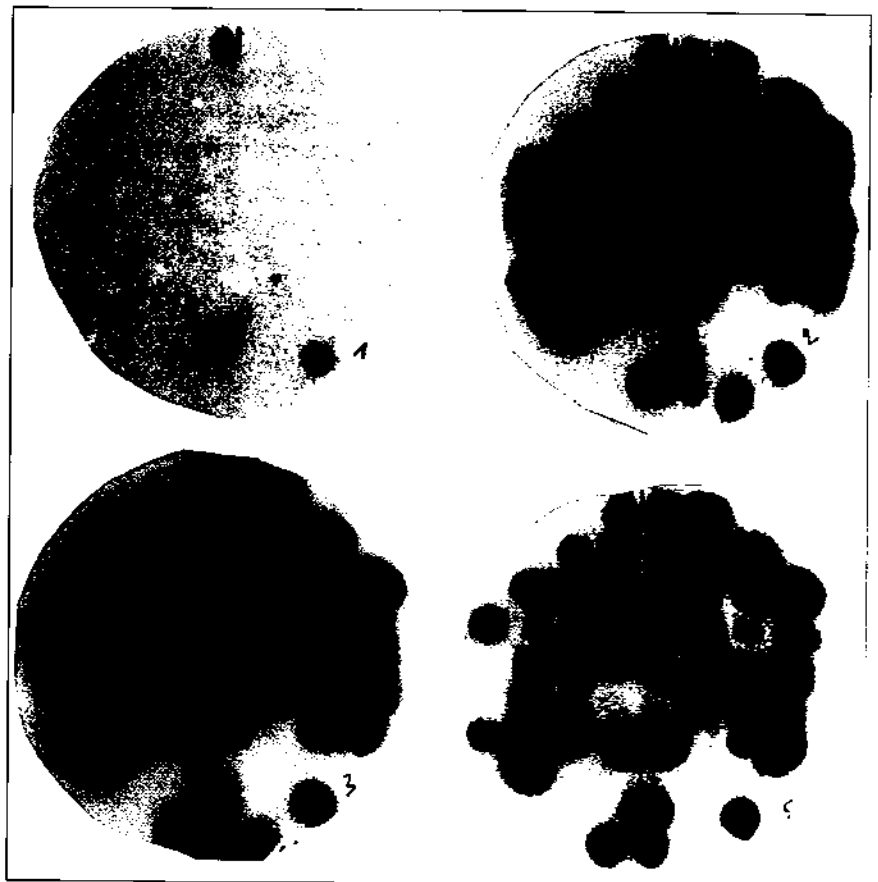


Figure 5  
Hybridation ADN-ADN sur colonies avec les sondes génétiques pour les gènes codant pour la toxine epsilon (1), la toxine alpha (2), la toxine thêta (3) et la toxine mu (4).

**TABLEAU 5**  
Pathotype des souches de référence

Souche	toxine alpha	toxine bêta	toxine epsilon	toxine iota	toxine thêta	toxine mu	entérottoxine	sialidase	Toxinotype
G12	-a	-	-	-	-	-	-	-	-
CCM5743	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCM5943	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NCIB10676	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NCIB10717	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCM6065	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCM6066	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NCIB10716	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JIR 323	+b	-	-	-	+	+	-	-	A
CW504	+	-	-	-	-	+	-	+	A
G23	+	-	-	-	-	+	-	+	Ac
A99	+	-	-	-	+	+	-	+	A
ATCC13124	+	-	-	-	+	+	-	+	A
ATCC3624A	+	-	-	-	+	+	-	+	A
CN 3888	+	-	-	-	+	+	-	+	A
DSM756	+	-	-	-	+	+	-	+	A
NCTC6785	+	-	-	-	+	+	-	+	A
CP232	+	+	-	-	+	+	-	+	C
CWC236	+	+	-	-	+	+	-	+	C
CN3922	+	+	+	-	+	+	-	+	B
CN3978	+	-	+	-	+	+	-	+	D
NCTC2062	+	-	+	-	+	+	-	+	D
ATCC12922	+	-	-	-	-	-	+	+	A Ent+d
NCTC8239	+	-	-	-	-	-	+	+	A Ent+
NCTC8798	+	-	-	-	-	+	+	+	A Ent+
F3686	+	-	-	-	+	+	+	+	A Ent+
NCIB10748	+	-	-	+	+	+	+	+	E

a Hybridation négative

b Hybridation positive

c Souche obtenue comme type B mais confirmée comme type A

d Souche de type A productrice d'entérottoxine

Le dendrogramme de similarité montre clairement que la classification établie ici n'est pas du tout superposable avec celle reposant sur le toxinotype. En effet, les souches productrices de toxine bêta, epsilon ou d'entérottoxine sont dispersées dans tout l'arbre. Le degré d'homologie entre certaines souches d'un

même toxinotype n'est que de 57,7 %. Pour la toxine epsilon, les divergences vont jusqu'à 30,9 %. De même des souches des divers toxinotypes se retrouvent génomiquement très proches dans notre classification. Seules les souches isolées de porcs au Danemark qu'elles soient de toxinotype C ou A sont très

semblables par étude des profils d'hybridation (résultats non montrés). Cette constatation avait déjà été faite par Hogh, en 1969, grâce au typage sérologique. Il reste à déterminer si cette proximité est liée à l'isolement géographique, à l'hôte (le porc) ou à la pathologie (l'entérite nécrotique du porc).

Il semble donc que la méthode utilisée suggère le caractère mobile des gènes gouvernant la synthèse de trois toxines importantes dans les pathologies liées à *C. perfringens*. Elle permet de rapprocher aisément des isolats de cette bactérie mais ne préjuge nullement des propriétés toxigènes de ces souches. Elle complète ainsi parfaitement la classification en pathotypes établie ci-dessus. Elle permet le suivi d'une souche particulière en fonction de marqueurs situés sur le chromosome. Des études devraient être menées afin de connaître la stabilité de ces marqueurs au cours du temps.

Si ces résultats demandent à être confirmés sur un échantillon plus large, il apparaît cependant que cet ensemble de techniques, relativement faciles à mettre en œuvre dans n'importe quel laboratoire, se révèle être un outil épidémiologique très performant, là où les techniques de sérotypage ou de bactériocinotypage se sont montrées lourdes, chères et difficiles à mettre en œuvre. Les foyers d'intoxication alimentaire de l'homme liées à l'entérottoxine seront notamment avantageusement investigués par cette méthode en confrontant les propriétés des souches isolées des aliments et celles des malades. Outre cet aspect épidémiologique au sens propre du terme, toutes les pathologies liées à *C. per-*

**TABLEAU 6**  
Nombre et proportion des souches sauvages positives avec chacune des sondes en fonction de l'origine des souches

Sonde	Bovins		Petits Ruminants		Porcs		Volailles		Carnivores		Divers		Aliments		Non déterminée	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Alpha	768	100%	132	100%	61	100%	34	100%	25	100%	26	100%	41	100%	36	100%
bêta	0	0%	0	0%	4	7%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
epsilon	0	0%	21	16%	0	0%	1	3%	0	0%	1	4%	0	0%	4	11%
iota	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
thêta	688	90%	131	99%	51	84%	31	91%	22	88%	24	92%	37	90%	34	94%
mu	719	94%	130	98%	61	100%	34	100%	20	80%	26	100%	41	100%	36	100%
entérottoxine	1	0%	5	4%	1	2%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	4	11%
sialidase	768	100%	132	100%	61	100%	34	100%	25	100%	26	100%	41	100%	36	100%

*fringens* ou même l'écologie de ce germe dans ses différents habitats peuvent être étudiées de cette manière.

Les deux méthodes mises en œuvre ont permis de remplacer avantageusement les méthodes classiques de typage développées au milieu de ce siècle: D'une part, la méthode d'hybridation ADN-ADN sur colonies permet de déterminer, rapidement et à un faible coût, les propriétés de virulence de multiples isolats de *C. perfringens*; cette méthode se révèle d'autant plus intéressante que les réactifs de typage classique ne sont plus disponibles; la seule limitation est le manque d'alternative au marquage radioactif des sondes. D'autre part, la détermination de l'électrophorétype a montré de multiples avantages sur les techniques classiques de sérotypage, bactériocinotypage ou lysotypage, à savoir que 100 % des souches sont typables par cette méthode, qu'aucun réactif spécifique n'est nécessaire et que le polymorphisme constaté est beaucoup plus grand que par les autres méthodes.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce au soutien financier de l'IRISA (Institut pour l'encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture) et de la Région Wallonne (Ministère de l'Agriculture). Les auteurs tiennent à remercier les Drs J. Alonso, L. Devriese, S.T. Cole, M.R. Popoff, J. Rood, R. Schauer, T.A. Trautner, R. Tweten et M. Vandamme-Jongsten pour l'envoi des plasmides recombinants ou des séquences des toxines.

## SUMMARY

### Molecular Typing of *Clostridium perfringens*

Since the beginning of the century, a few *Clostridium perfringens* typing methods were described; toxinotyping by seroneutralisation of mice lethality is the most widely used. Now molecular genetic allows to characterise much easier this species. On the one hand, genes coding for most of the toxins

( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\iota$ ,  $\theta$ ,  $\mu$ , enterotoxin and sialidase) were searched by colony DNA-DNA hybridisation. One thousand one hundred and twenty-three wild strains were studied. The 768 strains isolated from bovine enterotoxaemia cases in Belgium hybridise always with the alpha and sialidase probes, often with the theta and mu probes, rarely with the enterotoxin probe and never with the beta, epsilon and iota probes. On the other hand, a *C. perfringens* epidemiological marker was defined by *Hind*III restriction fragment polymorphism study after hybridisation with five probes, one specific for 16S rRNA gene and 4 specific for sialidase, alpha-, theta- and mu-toxin genes. This method allowed to confirm, on 166 isolates, the lack of genetic homogeneity of the different toxinotypes and the virulence genes mobility in this bacterial species. The isolates from cattle were genetically very different between several animals but also in one individual animal. Thus, many different toxinotype A clones could cause the bovine enterotoxaemia in Belgium.

## BIBLIOGRAPHIE

- CANARD B., COLE S.T. Genome organization of the anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, **86**, 6676-6680.
- CANARD B. 1991. Molecular genetic analysis of the nagH gene encoding the hyaluronidase (mu toxin) of *Clostridium perfringens*. in Organisation génomique de *Clostridium perfringens*, thèse, Université Paris VII, Biochimie-Microbiologie.
- CORREA A.E.E. 1986. Studies of *Clostridium perfringens* type A enteritis in the pig. Thèse, University of Glasgow, UK.
- DAUBE G. *Clostridium perfringens* et pathologies digestives. *Ann. Méd. Vét.*, 1992, **136**, 5-30.
- DAUBE G., SIMON P., KAECKENBEECK A. IS1151, an IS-like element of *Clostridium perfringens*. *Nucl. Acids Res.*, 1993, **21**, 352.
- DICE L.R. Majors of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 1945, **26**, 297.
- GRIMONT F., GRIMONT P.A.D. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann. Inst. Pasteur (Microbiologie)*, 1986, **137B**, 165-175.
- HENDERSON D.W. The somatic antigens of the *Clostridium welchii* group of organisms. *J. Hyg.*, 1940, **40**, 501-512.
- HUNTER S.E.C., BROWN J.E., OYSTON P.C.F., SAKURAI J., TITBALL R.W. Molecular genetic analysis of beta-toxin of *Clostridium perfringens* reveals sequence homology with alpha-toxin, gamma toxin, and leukocidin of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, 1993, **61**, 3958-3965.
- IGLESIAS A., CEGLOWSKI P., TRAUTNER T.A. Plasmid transformation in *Bacillus subtilis*. Effects of the insertion of *Bacillus subtilis* rRNA genes into plasmids. *Mol. Gen. Genet.*, 1983, **192**, 149-155.
- LI W.H. Simple method for constructing phylogenetic trees from distance matrices. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, **78**, 1085-1089.
- MAINIL J.G., BEX F., JACQUEMIN E., POHL P., COUTURIER M., KAECKENBEECK A. Prevalence of four enterotoxin (STaP, STaH, STb, and LT) and four adhesin subunit (K99, K88, 987P, and F41) genes among *Escherichia coli* isolated from cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 1990, **51**, 187-190.
- NIILO L. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolated from contents of cattle, sheep and chickens. *Can. J. Comp. Med.*, 1978, **42**, 357-363.
- NIILO L. *Clostridium perfringens* in animal disease: a review of current knowledge. *Can. Vet. J.*, 1980, **21**, 141-148.
- PERELLE S., GILBERT M., BOQUET P., POPOFF M.R. Characterization of *Clostridium perfringens* iota-toxin genes and expression in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 1993, **63**, 5147-5156.
- POPOFF M.R. 1993. Communication personnelle.
- ROGGENTIN P., ROTHE B., LOTTSPEICH F., SCHAUER R. Cloning and sequencing of a *Clostridium perfringens* sialidase gene. *F.E.B.S. Lett.*, 1988, **238**, 31-34.
- SCOTT P.T., ROOD J.I. Electroporation-mediated transformation of lysostaphin-treated *Clostridium perfringens*. *Gene*, 1989, **82**, 327-333.
- SMITH H.W., CRABB W.E. The faecal bacterial flora of animals and man: Its development in the young. *J. Pathol. Bacteriol.*, 1961, **82**, 53-66.
- STERNE M., BATTY I. 1975. In *Pathogenic clostridia* pp. 22-23. Butterworths Eds, London and Boston.
- 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.
- TWETEN R.K. Nucleotide sequence of the gene for perfringolysin O, theta-toxin, from *Clostridium perfringens*: significant homology with the genes for streptolysin O and pneumolysin. *Infect. Immun.*, 1988, **56**, 3235-3240.
- VAN DAMME-JONGSTEN M., WERNARS K., NOTERMANS S. Cloning and sequencing of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1989, **56**, 181-190.
- VAN DAMME-JONGSTEN M., RODHOUSE J., GILBERT R.J., NOTERMANS S. Synthetic DNA probes for detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains isolated from food borne disease outbreaks. *J. Clin. Microbiol.*, 1990a, **28**, 131-133.
- VAN DAMME-JONGSTEN M., HAAGSMA J., NOTERMANS S. Testing of *Clostridium perfringens* Type A strains isolated from piglets with diarrhea for the presence of the enterotoxin gene. *Vet. Rec.*, 1990b, **126**, 191-192.