

THESE de L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

**Pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE**

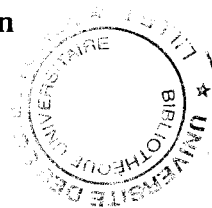
Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée par

' Mathilde DECAUDIN-MEYER

**ETUDE DE NOUVEAUX FACTEURS PERMETTANT
UNE MEILLEURE REPRODUCTIBILITE DE LA SPORULATION *IN VITRO*,
DE LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINE ET
ETUDE DU METABOLISME CARBONE DE *Clostridium perfringens* DE TYPE A**

Soutenue le 23 Octobre 1996 devant la Commission d'Examen



Président Pr. J.P. BOHIN (Université des Sciences et Technologies de Lille)
Rapporteurs Pr. A. RIMBAULT (Université René Descartes - Paris V)
Dr. A. PAUSS (Université de Technologie de Compiègne)
Examineurs Pr. S. BOUQUELET (Université des Sciences et Technologies de Lille)
Pr. R. TAILLIEZ (Université des Sciences et Technologies de Lille)
Dr. J.L. THOLOZAN (Institut National de la Recherche Agronomique)

Remerciements

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Génie des Procédés et Technologie Alimentaires de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Villeneuve d'Ascq.

Mes remerciements,

à Monsieur J.F. MAINGONNAT, Directeur de Recherche du LGPTA, de m'avoir accueillie pour y effectuer ce travail.

à Monsieur J.P BOHIN, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de Lille pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de participer à ce jury. Je tiens à lui exprimer mes remerciements les plus sincères.

à Messieurs A. RIMBAULT, Professeur à l'Université René Descartes - Paris V - et A. PAUSS, Maître de conférences à l'Université Technologique de Compiègne pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et de participer à ce jury. Je leur exprime ma profonde reconnaissance.

à Messieurs S. BOUQUELET et R. TAILLIEZ, Professeurs à l'Université des Sciences et Techniques de Lille pour avoir accepté de juger ce travail et de faire partie du jury de thèse. Je tiens à leur exprimer mes sincères remerciements.

à Monsieur J.L. THOLOZAN, Chargé de Recherche à l'INRA, pour m'avoir guidée dans l'élaboration de ce travail et pour la confiance qu'il m'a accordée. Je tiens à lui exprimer mes remerciements les plus chaleureux.

Mes remerciements vont également,

à Mademoiselle M. SEBALD de l'Institut Pasteur (Paris) et Monsieur G. DAUBE, de la Faculté de Médecine Vétérinaire de Liège (Belgique) pour nous avoir fourni les souches de Clostridium perfringens, les références bibliographiques et pour les conseils techniques.

à Monsieur M.R. POPOFF de l'Institut Pasteur (Paris) pour les références bibliographiques et les conseils techniques.

à Monsieur D. CHEVALIER pour son travail effectué pendant ses 10 mois de service militaire et avec qui j'ai eu plaisir à travailler.

à Monsieur G. DELATTRE pour les analyses chromatographiques et pour le temps passé à résoudre les problèmes de chromatographes.

à Monsieur J.P. TISSIER pour ses compétences en microscopie électronique.

à Messieurs P. GUERLAVA et N.E. CHIHIB pour leur collaboration, leur sympathie et pour le partage du bureau.

à Monsieur J. JACQUEMONT et Mademoiselle J.M. MEMBRE pour l'aide précieuse qu'ils m'ont apportée lors de la rédaction de ce rapport.

à Mademoiselle C. BACQUEART pour son aide à ce travail au cours de son stage au laboratoire.

Je remercie l'ensemble du personnel de l'INRA de Villeneuve d'Ascq pour la sympathie qu'ils m'ont toujours témoignée et qui a largement contribué au bon déroulement de cette thèse.

Je tiens à remercier ma famille et tout particulièrement mon mari pour leur soutien moral et leur aide pour la relecture de ce mémoire.

Ce travail a fait l'objet des présentations suivantes :

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

DECAUDIN M., THOLOZAN J.L., 1996. A comparative study on the conditions of growth and sporulation of three strains of *Clostridium perfringens* type A. *Can. J. Microbiol.* **42** : 298-304.

DECAUDIN-MEYER M., THOLOZAN J.L., 1996. Application of the basal carbonate yeast trypticase culture medium as a growth and *in vitro* sporulation medium of *Clostridium perfringens* type A. *J. Appl. Bacteriol.* (soumis)

DECAUDIN-MEYER M., THOLOZAN J.L., 1996. Comparison metabolism of *Clostridium perfringens* type A during vegetative and sporulation phase. *Arch. Microbiol.* (soumis)

DECAUDIN M., THOLOZAN J.L., 1997. Comparison of growth, sporulation and enterotoxin production abilities of three strains of *Clostridium perfringens* type A. *Int. J. Food Microbiol.* (sous presse).

COMMUNICATIONS

Texte intégral

DECAUDIN M., THOLOZAN J.L. Influence of some culture parameters on sporulation of *Clostridium perfringens* type A. IXth Forum for Applied Biotechnology. 27-29 septembre 1995. Gent. Belgique. *Dans* : Med. Fac. Landbouww Univ. Gent. **60/4a** : 1871-1874.

DECAUDIN M., THOLOZAN J.L. Comparison of growth, sporulation and enterotoxin production abilities of three strains of *Clostridium perfringens* type A. 16th International Committee on Food Microbiology and Hygiene. Food Micro '96. 26-30 août 1996. Technology, Safety, Stability. Book of Abstract / Final program. Budapest. Hongrie. **1/L12** : 56.

DECAUDIN-MEYER M., CHEVALIER D., THOLOZAN J.L. Metabolic variations of *Clostridium perfringens* type A do not affect maximal concentration of enterotoxin produced in the defined medium D. Xth Forum for Applied Biotechnology. 26-27 septembre 1996. Brugge. Belgique. *Dans* : Med. Fac. Landbouww Univ. Gent. **61/4a** : 1661-1664.

DECAUDIN-MEYER M., THOLOZAN J.L. Comparison of different culture media for the measurement of growth and sporulation of *Clostridium perfringens*. International Symposium of Environmental Biotechnology. 21-24 avril 1997. Ostende. Belgique (sous presse).

THOLOZAN J.L., DECAUDIN M., GUERLAVA P., CHIHIB N., JACQUEMONT J. Réponse bactérienne aux traitements minimaux de stabilisation des aliments. Rencontre Agoral 97. "La conservation des aliments". 9^{ème} rencontres scientifiques et technologiques des industries alimentaires. Nancy. 2-3 avril 1997. Texte intégral des communications dans Recueil des Rencontres Agoral 97. Collection Tec et Doc, Lavoisier, Paris (sous presse).

L'intégralité de ce travail sera présenté au cours du colloque "Microbiologie anaérobie" de la Société Française de Microbiologie organisé à Lille en les 20 et 21 mars 1997.

Résumé

DECAUDIN M., THOLOZAN J.L. Métabolisme et sporulation de *Clostridium perfringens*. Colloque "Recherche" de la Formation Doctorale de l'Université Paris XI. 7 juin 1994. Massy. France.

DECAUDIN M., THOLOZAN J.L. Métabolisme de *Clostridium perfringens* en phase végétative et lors de la sporulation. 4^{ème} Congrès National de la Société Française de Microbiologie. 2-5 mai 1995. Tours. France. Dans : La microbiologie dans tous ses états. SFM (ed) Paris. VE 28.

DECAUDIN M., THOLOZAN J.L. Physiologie comparée de trois souches de *Clostridium perfringens*. XXII^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs de la Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire. 4-7 juillet 1995. Grenoble. France. N4. p. 116.

DECAUDIN M., THOLOZAN J.L. Physiology of a food-borne pathogen, *Clostridium perfringens*. IXth World Congress of Food Science and Technology. 31 juillet-4 août 1995. Budapest. Hongrie. Abstract vol. 2. P460. p. 159.

DECAUDIN-MEYER M., CHEVALIER D., THOLOZAN J.L. Métabolisme de *Clostridium perfringens* type A au cours de la sporulation en présence de différents substrats dans le milieu D de sporulation. XXIII^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs de la Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire. 2-5 juillet 1996. Poitiers. France. Actes du Forum p. 107.

Mémoires encadrés

BACQUAERT C. 1995. Etude du métabolisme de *Clostridium perfringens* en phase végétative et au cours de la sporulation. Mémoire de BTS Analyses Biologiques et Biotechnologiques au Lycée Agricole de Douai.

CHEVALIER D. 1996. Etude du métabolisme, de la production d'entérotoxine et de la sporulation par *Clostridium perfringens*. Etudiant en maîtrise qui a effectué son service militaire de 10 mois au laboratoire.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : GENERALITES	
1 . <i>Clostridium perfringens</i> : CARACTERES GENERAUX	5
1.1 ORIGINES	5
1.2 CARACTERISTIQUES DE L'ESPECE <i>Clostridium perfringens</i>	6
1.2.1 Habitat	6
1.2.2 Taxonomie	6
1.2.3 Morphologie	7
1.2.4 Infections alimentaires	7
1.2.5 Identification	8
1.2.6 Métabolisme	9
1.2.7 Synthèse d'enzymes	10
1.2.8 Résistance aux antibiotiques	11
1.2.9 Organisation du génome	12
1.2.10 Profil plasmidique	12
1.3 FACTEURS AFFECTANT LA CROISSANCE ET LA SURVIE DES CELLULES VEGETATIVES	13
1.3.1 Température	13
1.3.2 pH	14
1.3.3 Potentiel d'oxydo-réduction	14
1.3.4 Activité de l'eau	14
1.3.5 Sels	15
2 . MECANISME DE SPORULATION ET DE GERMINATION	15
2.1 SPORULATION	16
2.1.1 Morphologie	16
2.1.2 Modifications morphologiques	17
2.1.3 Synthèse d'enzymes	19
2.1.4 Résistance des spores	20
2.1.4.1 A la chaleur	20
2.1.4.2 Aux autres agents	21
2.1.5 Aspects génétiques de la régulation de la sporulation	22
2.2 GERMINATION	25
2.2.1 Caractères généraux	25
2.2.2 Facteurs affectant la germination	26
2.2.3 Aspects génétiques de la régulation de la germination	27
2.3 METHODES DE MESURE DE LA SPORULATION ET DE LA GERMINATION	27
3 . SYNTHESE DE TOXINES PAR LES FLORES DE CONTAMINATION	28
3.1 BACTERIES PRODUCTRICES DE TOXINES	29
3.1.1 Caractères généraux	29
3.1.2 Exemples	30
3.1.2.1 <i>Clostridium botulinum</i>	30
3.1.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	30
3.1.2.3 <i>Bacillus cereus</i>	31
3.1.2.4 <i>Vibrio cholerae</i>	31
3.1.2.5 <i>Salmonella</i>	32
3.1.2.6 <i>Escherichia coli</i>	32
3.1.2.7 <i>Shigella dysenteriae</i>	33
3.1.2.8 <i>Campylobacter jejuni</i>	33

3.2 PRINCIPALES TOXINES DE <i>Clostridium perfringens</i>	34
3.2.1 Toxines létales majeures	34
3.2.1.1 Toxine α	34
3.2.1.2 Toxine β	35
3.2.1.3 Toxine ϵ	36
3.2.1.4 Toxine ι	37
3.2.2 Toxines létales mineures	37
3.2.2.1 Toxine δ	37
3.2.2.2 Toxine θ	38
3.2.2.3 Toxine κ	39
3.2.2.4 Toxine λ	39
3.2.2.5 Toxine μ	39
3.2.2.6 Toxine ν	40
3.2.2.7 Sialidases	40
3.2.2.8 Autres molécules	41
4 . PRODUCTION DE L'ENTEROTOXINE DE <i>Clostridium perfringens</i>	42
4.1 ENTEROTOXINE	42
4.1.1 Etudes préliminaires	42
4.1.2 Lien entre la production d'entérotoxine et la sporulation	42
4.1.3 Caractéristiques biochimiques	43
4.1.4 Activité biologique	44
4.1.5 Gène <i>cpe</i>	46
4.1.6 Méthodes de dosage	47
4.2 FACTEURS AFFECTANT LA SPORULATION ET LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINE	48
4.2.1 Influence du milieu de culture	48
4.2.2 Température	49
4.2.3 pH	49
4.2.4 Potentiel d'oxydo-réduction	50
4.2.5 Activité de l'eau	50
4.2.6 Autres facteurs	51
5 . CONCLUSION ET PROGRAMME DE RECHERCHE	51

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

1 . TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES	53
1.1 SOUCHES	53
1.2 METHODES DE CULTURE ANAEROBIE	53
1.3 MILIEUX DE CULTURE	53
1.3.1 Préparation	53
1.3.2 Conditions de croissance	53
1.3.3 Conditions de sporulation	54
1.3.4 Entretien et conservation des souches	55
1.3.5 Identification et vérification des souches	55
1.4 OBSERVATION DES CELLULES	55
1.4.1 Observation au microscope optique	56
1.4.1.1 Coloration	56
1.4.1.2 Microscopie à contraste de phase	56
1.4.2 Observation au microscope électronique à balayage (MEB)	57

2 . TECHNIQUES ANALYTIQUES	57
2.1 SPECTROPHOTOMETRIE	57
2.1.1 Suivi de croissance	57
2.1.2 Dosage du glucose	58
2.1.3 Dosage de la dextrine	58
2.1.4 Dosage des protéines	59
2.2 DOSAGES CHROMATOGRAPHIQUES	59
2.2.1 Dosage des acides gras volatils et des alcools	59
2.2.1.1 Chromatographie en phase gazeuse	59
2.2.1.2 Chromatographie liquide haute pression (HPLC)	60
2.2.2 Dosage du raffinose	60
2.2.3 Dosage des gaz	61
2.2.3.1 CO ₂ dissous	61
2.2.3.2 Hydrogène et CO ₂ gazeux	61
2.3 DOSAGE IMMUNOLOGIQUE DE L'ENTEROTOXINE	61

CHAPITRE III : TRAVAUX PERSONNELS

1 . ETUDE DE NOUVEAUX FACTEURS PERMETTANT UNE MEILLEURE REPRODUCTIBILITE <i>IN VITRO</i> DE LA CROISSANCE ET DE LA SPORULATION CHEZ <i>Clostridium perfringens</i>	63
1.1 MILIEU FTG	64
1.1.1 Croissance	64
1.1.2 Choc thermique sur la culture	64
1.2 CROISSANCE ET SPORULATION SUR UN MILIEU TYPE DE SPORULATION : LE MILIEU DS	65
1.2.1 Action sur la préculture	66
1.2.1.1 Nature	66
1.2.1.2 Présence ou absence de lysozyme	67
1.2.2 Croissance, sporulation et production d'entérotoxine	68
1.3 CROISSANCE ET SPORULATION SUR UN MILIEU CARACTERISTIQUE DES BACTERIES ANAEROBIES STRICTES : LE MILIEU BCYT	69
1.3.1 Action sur la préculture	70
1.3.1.1 Nature	70
1.3.1.2 Volume de l'inoculum	70
1.3.1.3 Présence ou absence de lysozyme	72
1.3.2 Action sur le milieu de culture	72
1.3.2.1 Nature du tampon	72
1.3.2.2 Concentration variable en extrait de levure	73
1.3.3 Croissance, sporulation et production d'entérotoxine	75
1.4 CROISSANCE ET SPORULATION SUR UN MILIEU PERMETTANT UNE PLUS GRANDE REPRODUCTIBILITE DE LA CROISSANCE ET DE LA SPORULATION <i>IN VITRO</i> : LE MILIEU D	76
1.4.1 Effet de la préculture	77
1.4.1.1 Nature	77
1.4.1.2 Age	78
1.4.1.3 Présence ou absence de lysozyme	79
1.4.1.4 Choc thermique	80
1.4.2 Importance du milieu de culture	81
1.4.2.1 Volume du milieu	81
1.4.2.1.1 Croissance et sporulation	82
1.4.2.1.2 Production d'entérotoxine	82
1.4.2.2 Concentration variable en substrats de croissance	83
1.4.2.2.1 Glucose	83
1.4.2.2.2 Dextrine	85

1.4.3 Conditions optimales de croissance, sporulation et production d'entérotoxine	87
1.4.3.1 Cinétique de croissance	87
1.4.3.2 Cinétique de sporulation	87
1.4.3.3 Dosage de l'entérotoxine	89
1.5 CONCLUSION SUR LA CROISSANCE ET LA SPORULATION	90
2 . MODIFICATION DU METABOLISME DE <i>Clostridium perfringens</i> EN PHASE DE CROISSANCE ET AU COURS DE LA SPORULATION	93
2.1 MILIEU FTG	94
2.2 MILIEU DS	96
2.3 MILIEU BCYT + GLUCOSE	98
2.3.1 Production d'acides gras volatils et d'alcools	98
2.3.2 Bilan métabolique	98
2.4 MILIEU D	100
2.4.1 Métabolisme du glucose	100
2.4.1.1 Au cours de la croissance	101
2.4.1.2 Au cours de la sporulation	102
2.4.1.2.1 Production d'acides gras volatils et d'alcools	102
2.4.1.2.2 Bilan métabolique	102
2.4.1.3 Comparaison des métabolites issus de la fermentation du glucose présent dans le milieu D	104
2.4.2 Métabolisme de la dextrine	105
2.4.3 Métabolisme du glucose et de la dextrine	107
2.4.3.1 Au cours de la croissance	107
2.4.3.2 Au cours de la sporulation	108
2.4.3.2.1 Production d'acides gras volatils et d'alcools	108
2.4.3.2.2 Bilan métabolique	109
2.4.3.3 Comparaison des métabolites issus de la fermentation du glucose et de la dextrine présents dans le milieu D	110
2.4.3.4 Métabolisme des souches en fonction de la concentration en glucose	112
2.5 CONCLUSION	113
CONCLUSION GENERALE	117
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	120
ANNEXES	136

LISTE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1 : Différentes voies métaboliques empruntées par les <i>Clostridia</i>	10
Figure 2 : Carte génomique de la souche de <i>Cl. perfringens</i> CPN50	12
Figure 3 : Structure de la spore	16
Figure 4 : Changements morphologiques de la cellule végétative au cours de la sporulation chez <i>B. subtilis</i> .	17
Figure 5 : Carte des régions fonctionnelles de l'entérotoxine de <i>Cl. perfringens</i>	43
Figure 6 : Action de l'entérotoxine de <i>Cl. perfringens</i>	44
Figure 7 : Principe de la méthode enzymatique du dosage du glucose	58
Figure 8 : Croissance des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu FTG et effet de la température sur la croissance de la souche R3	64
Figure 9 : Effet du lysozyme (250000 UI/L) ajouté à la préculture (après traitement thermique) sur la croissance des souches 8-6 et R3 sur le milieu DS	67
Figure 10 : Croissance des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu DS sans traitement thermique de la préculture	68
Figure 11 : Effet du volume de l'inoculum sur la croissance et la sporulation de la souche R3 réalisée sur le milieu BCYT + glucose (11 mM)	71
Figure 12 : Effet de la nature des tampons sur la croissance des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu BCYT + glucose (30 mM)	73
Figure 13 : Effet de la concentration en extrait de levure sur les croissances des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu BCYT + glucose (30 mM) contenant du tampon HEPES et consommation de glucose	74
Figure 14 : Effet de la concentration en extrait de levure sur la croissance de la souche NCTC 8798 sur le milieu BCYT + glucose (30 mM) selon la nature du tampon	74
Figure 15 : Croissance et sporulation de la souche R3 sur le milieu BCYT + glucose (11 mM)	75
Figure 16 : Influence de l'âge de la préculture sur la croissance et la sporulation de la souche R3 sur le milieu D	78
Figure 17 : Influence de l'addition de lysozyme (250000 UI/L) sur la croissance des souches 8-6 et R3 sur le milieu D à partir des précultures sur le milieu BCYT + glucose (11 mM) ou le milieu FTG	79
Figure 18 : Influence de l'addition de lysozyme (250000 UI/L) sur la sporulation des souches 8-6 et R3 sur le milieu D à partir des précultures sur le milieu BCYT + glucose (11 mM) ou le milieu FTG	79

Figure 19 :	Influence d'un traitement thermique de la préculture sur la croissance et la sporulation des souches 8-6 et R3 sur le milieu D	80
Figure 20 :	Effet du volume du milieu de culture sur la croissance et la sporulation des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu D	82
Figure 21 :	Effet du volume du milieu de culture D sur la production d'entérotoxine par les souches NCTC 8798, 8-6 et R3	82
Figure 22 :	Effet de la concentration en glucose sur l'absorbance maximale et le taux de sporulation maximum obtenu pour les souches 8-6 et R3 sur le milieu D	84
Figure 23 :	Effet de la concentration en glucose sur la sporulation des souches 8-6 et R3 sur le milieu D	84
Figure 24 :	Effet de la concentration en dextrine sur la croissance et la sporulation des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 dans le milieu D	85
Figure 25 :	Croissance et sporulation des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu D	87
Figure 26 :	Dénombrement des cellules totales, des cellules végétatives, des endospores et des spores pour les souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu D	88
Figure 27 :	Production d'entérotoxine par les souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu D	89
Figure 28 :	Relation linéaire entre le nombre de spores comptées et le taux d'entérotoxine produite	93
Figure 29 :	Equations théoriques métaboliques établies d'après Thauer <i>et al.</i> (1977)	95
Figure 30 :	Production d'acides gras volatils et d'alcools et consommation de glucose par la souche NCTC 8798 sur le milieu BCYT + glucose (11 mM)	98
Figure 31 :	Production des métabolites terminaux issus de la fermentation du glucose (6 mM) par la souche R3 sur le milieu D	102
Figure 32 :	Production des métabolites issus de la fermentation du glucose (6 mM) et de la dextrine (3,5 g/L) par les souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu D	108
Figure 33 :	Effet de la concentration en glucose sur la production d'acides gras volatils et d'alcools par les souches 8-6 et R3 sur le milieu D	112
Figure 34 :	Effet de la concentration en glucose sur la valeur du pH final obtenu pour les souches 8-6 et R3 sur le milieu D	113
Figure 35 :	Produits terminaux de fermentation des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 en fonction de la concentration en glucose et en dextrine présents dans le milieu D	115

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1 : Répartition des 5 types de <i>Cl. perfringens</i> en fonction des toxines produites	6
Tableau 2 : Bilan de fermentation du glucose par <i>Cl. perfringens</i> obtenu sur milieu avec présence ou absence en fer	10
Tableau 3 : Effet de la température sur la croissance de <i>Cl. perfringens</i>	13
Tableau 4 : Effet du pH sur la croissance de <i>Cl. perfringens</i>	14
Tableau 5 : Effet du NaCl sur le temps de génération de <i>Cl. perfringens</i>	15
Tableau 6 : Evolution de la structure de la cellule végétative au cours de la sporulation	18
Tableau 7 : Toxines de <i>Bacillus cereus</i>	31
Tableau 8 : Activités biologiques des toxines produites par <i>Cl. perfringens</i>	34
Tableau 9 : Nature et principales caractéristiques des toxines produites par <i>Cl. perfringens</i>	34
Tableau 10 : Principales caractéristiques de l'entérotoxine de <i>Cl. perfringens</i>	43
Tableau 11 : Croissance des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu FTG ayant été préalablement chauffé (75°C pendant 15 min) ou non avant incubation	64
Tableau 12 : Effet de la nature de la préculture sur les paramètres de cinétique de croissance des souches 8-6 et R3 sur le milieu DS	66
Tableau 13 : Effet du lysozyme (250000 UI/L) ajouté à la préculture FTG (après traitement thermique) sur les paramètres de croissance des souches 8-6 et R3 sur le milieu DS	67
Tableau 14 : Paramètres de cinétique de croissance des souches de <i>Cl. perfringens</i> dans le milieu DS	68
Tableau 15 : Effet de la nature du milieu de préculture sur la croissance de la souche R3 réalisé sur le milieu BCYT + glucose (11 mM)	70
Tableau 16 : Effet du volume de l'inoculum sur la cinétique de sporulation effectuée sur le milieu BCYT + glucose (11 mM)	71
Tableau 17 : Effet du lysozyme (250000 UI/L) dans le milieu de préculture FTG (après traitement thermique) sur la croissance de la souche R3 sur le milieu BCYT + glucose (11 mM)	72
Tableau 18 : Effet du tampon sur la croissance des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu BCYT + glucose (30 mM) et valeur du pH final	73
Tableau 19 : Effet du tampon sur la croissance des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu BCYT + glucose (30 mM) additionné de 5 g/l d'extrait de levure et valeur du pH final	73

Tableau 20 :	Paramètres de croissance des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu BCYT + glucose (11 mM) contenant le tampon HEPES	75
Tableau 21 :	Taux de sporulation et comptages des cellules végétatives, des endospores et des spores de la souche R3 dans les conditions optimales de sporulation sur le milieu BCYT + glucose (11 mM) contenant du tampon HEPES	76
Tableau 22 :	Effet de la nature du milieu de préculture sur la croissance des souches 8-6 et R3 sur le milieu D	77
Tableau 23 :	Effet de la nature du milieu de préculture sur la sporulation des souches 8-6 et R3 sur le milieu D	77
Tableau 24 :	Influence de l'âge de la préculture sur la croissance des souches 8-6 et R3 sur le milieu D	78
Tableau 25 :	Influence de l'âge de la préculture sur la sporulation des souches 8-6 et R3 sur le milieu D	78
Tableau 26 :	Effet du lysozyme (250000 UI/L) présent dans la préculture sur la croissance des souches 8-6 et R3 sur le milieu D	79
Tableau 27 :	Effet du lysozyme (250000 UI/L) présent dans la préculture sur la sporulation des souches 8-6 et R3 sur le milieu D	79
Tableau 28 :	Influence d'un traitement thermique de la préculture sur la croissance des souches 8-6 et R3 sur le milieu D	80
Tableau 29 :	Influence d'un traitement thermique de la préculture sur la sporulation des souches 8-6 et R3 sur le milieu D	80
Tableau 30 :	Influence d'un traitement thermique de la préculture sur la production maximale d'entérotoxine par les souches 8-6 et R3 sur le milieu D	80
Tableau 31 :	Effet du volume du milieu D sur les paramètres de croissance des souches NCTC 8798, 8-6 et R3	82
Tableau 32 :	Effet du volume du milieu D sur la sporulation des souches NCTC 8798, 8-6 et R3	82
Tableau 33 :	Effet du volume du milieu D sur la production maximale d'entérotoxine par les souches NCTC 8798, 8-6 et R3	82
Tableau 34 :	Influence de la concentration initiale de glucose présent dans le milieu D sur la croissance des souches 8-6 et R3	84
Tableau 35 :	Influence de la concentration initiale de glucose présent dans le milieu D sur le taux de sporulation des souches 8-6 et R3	84
Tableau 36 :	Effet de la concentration de dextrine présent dans le milieu D sur la croissance des souches NCTC 8798, 8-6 et R3	85
Tableau 37 :	Effet de la concentration de dextrine présent dans le milieu D sur la sporulation des souches NCTC 8798, 8-6 et R3	85

Tableau 38 :	Effet de la concentration de dextrine présent dans le milieu D sur la production maximale d'entérotoxine par les souches NCTC 8798, 8-6 et R3	86
Tableau 39 :	Paramètres de cinétique de croissance des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 dans le milieu D	87
Tableau 40 :	Taux maximum de sporulation et comptages des spores et des cellules végétatives pour les souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu D	87
Tableau 41 :	Production maximale d'entérotoxine par les souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu D	89
Tableau 42 :	Tableau récapitulatif des différents paramètres physiologiques pouvant influencer la croissance des souches sur les milieux FTG, DS, BCYT + glucose et D	90
Tableau 43 :	Tableau récapitulatif des différents paramètres physiologiques pouvant influencer la sporulation des souches sur les milieux FTG, DS, BCYT + glucose et D	90
Tableau 44 :	Métabolites terminaux de la fermentation du glucose (30 mM) sur le milieu FTG	94
Tableau 45 :	Concentrations théoriques des métabolites issus de la fermentation du glucose (30 mM) sur le milieu FTG	95
Tableau 46 :	Coefficients affectés aux différentes équations permettant d'établir le bilan théorique du métabolisme du glucose (30 mM) des souches 8-6 et R3 sur le milieu FTG	95
Tableau 47 :	Métabolites terminaux de la fermentation du raffinose (7,93 mM) par les souches 8-6 et R3 sur le milieu DS	96
Tableau 48 :	Concentrations théoriques des métabolites issus de la fermentation du raffinose (7,93 mM) par les souches 8-6 et R3 sur le milieu DS	96
Tableau 49 :	Bilan matière des souches NCTC 8798 et R3 sur le milieu BCYT + glucose (11 mM)	99
Tableau 50 :	Métabolites terminaux de la fermentation du glucose (56 mM) sur le milieu D	101
Tableau 51 :	Métabolites terminaux de la fermentation du glucose (6 mM) sur le milieu D	102
Tableau 52 :	pH final obtenu pour les souches 8-6 et R3 selon la concentration en glucose dans le milieu D	105
Tableau 53 :	Métabolites terminaux de la fermentation de la dextrine (3,5 g/L) sur le milieu D	105
Tableau 54 :	Concentrations théoriques des métabolites issus de la fermentation de la dextrine (3,5 g/L) sur le milieu D	106

Tableau 55 :	Métabolites terminaux de la fermentation du glucose (56 mM) et de la dextrine (3,5 g/L) sur le milieu D	107
Tableau 56 :	Bilan matière des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu D contenant 56 mM de glucose et 3,5 g/L de dextrine	107
Tableau 57 :	Métabolites terminaux de la fermentation du glucose (6 mM) et de la dextrine (3,5 g/L) sur le milieu D	109

LISTE DES PHOTOS

	Page	
Photo 1 :	Aspect de la souche de <i>Clostridium perfringens</i> après coloration au Gram (x 1600)	7
Photo 2 :	Degré d'agglutination de l'entérotoxine de <i>Cl. perfringens</i> après dosage par le kit Oxoid	62
Photo 3 :	Aspect des cellules végétatives de la souche 8-6 sur le milieu D à 7 h d'incubation après coloration de Gram (x 1600)	88
Photo 4 :	Aspect des endospores de la souche 8-6 sur le milieu D à 15 h d'incubation après coloration de Gram (x 1600)	88
Photo 5 :	Aspect des cellules végétatives, des endospores et des spores de la souche 8-6 sur le milieu D à 30 h d'incubation après coloration de Gram (x 1600)	89
Photo 6 :	Aspect des cellules végétatives, des endospores et des spores de la souche 8-6 sur le milieu D à 30 h d'incubation après coloration au vert malachite (x 1600)	89
Photo 7 :	Aspect au MEB des cellules végétatives, des endospores et des spores de la souche 8-6 sur le milieu D à 72 h d'incubation (x 3000)	89
Photo 8 :	Aspect au MEB des spores de la souche 8-6 sur le milieu D à 72 h d'incubation (x 7200)	89

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADP	Adénosine DiPhosphate
AMP	Adénosine MonoPhosphate
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Adénosine TriPhosphate
a_w	Activité de l'eau
BCYT	Milieu de base complété de peptone trypsique de caséine et d'extrait de levure
CPE	Entérotoxine de <i>Clostridium perfringens</i> de type A
D	Milieu Défini D
D_T	Durée de réduction décimale à une température donnée
DDASS	Direction Départementale d'Aide Sanitaire et Sociale
DDSV	Direction Départementale des Services Vétérinaires
DDT	DiThioThreitol
DPA	Acide Dipicolinique
DS	Milieu Duncan et Strong
DL	Dose Létale
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ent	entérotoxine
FTG	Milieu ThioGlycollate à la résazurine
HACCP	Analyse des points critiques
HEPES	Acide 4-(2-HydroxylEthyl)-1-PipérazineEthaneSulfonique
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Pression
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
IP	Protéine d'Initiation extracellulaire
LT	ThermoLabile
MBC	Concentration Minimale Bactéricide
MIC	Concentration Minimale Inhibitrice
MLS	Macrolide-Lincosamide-Streptogramine
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MES	Acide (4-morpholineEthaneSulfonique)
NCTC	National Collection Type Culture
ND	Non Déterminé
PCH	PhosphatidylCholine Hydrolase
PCR	Technique d'amplification génique
PGH	Hydrolase du peptidoglycane
PIH	PhosphatidylInositol Hydrolase
PIPES	Acide 1,4-Piperazinebis-(EthaneSulfonique)
PYG	Milieu Peptone-Extrait de levure-Glucose

SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
ST	ThermoStable
TIAC	Toxi-Infection Alimentaire Collective
z	Elévation de la température nécessaire pour diviser la valeur D_T par 10
UI	Unité Internationale
UHT	Ultra Haute Température

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Si de nombreuses études ont porté sur les approches "classiques" de la microbiologie et sur les applications industrielles des micro-organismes au cours du 20^{ème} siècle, la montée en puissance de la microbiologie des flores de contamination alimentaire est paradoxalement un phénomène beaucoup plus récent.

Les contaminations bactériennes dues à un aliment infecté peuvent être de deux natures selon les conséquences affectant l'homme ou l'animal : la contamination non pathogène n'entraîne que des désagréments alors que la contamination pathogène provoque souvent la maladie chez l'individu. Les maladies gastro-intestinales résultant de ces contaminations sont appelées **intoxications alimentaires** ou **toxi-infections alimentaires collectives** (TIAC) et sont divisées en 4 groupes (Granum *et al.*, 1995) dont les intoxications à *Clostridium perfringens* et à *Bacillus cereus* qui en constituent un type. Au cours de ces intoxications, une entérotoxine est produite dans l'organisme avant que la bactérie interagisse avec les cellules épithéliales de l'intestin. Ces maladies gastro-intestinales, rarement mortelles, se manifestent souvent par les mêmes symptômes (vomissements, diarrhées, fièvres, douleurs abdominales, déshydratations...), après une période d'incubation allant de 1 à 24 h selon le micro-organisme impliqué.

Bien que de nombreuses études sur ces principaux micro-organismes pathogènes concernant essentiellement la caractérisation de l'espèce, la structure des toxines responsables, la localisation du gène de cette protéine aient été réalisées, les données épidémiologiques des toxi-infections alimentaires provoquées par ces bactéries sont souvent fragmentaires. Si le nombre de ces intoxications officiellement déclarées a considérablement augmenté ces dernières années, il est cependant faible par rapport au nombre réel d'accidents de toxi-infections alimentaires (Jouve, 1993 ; Scott, 1996). De telles infections ne sont pas l'apanage de certaines nations. En effet, dans les pays sous-développés, les toxi-infections alimentaires touchent essentiellement les enfants en dessous de 5 ans. Elles sont reconnues comme responsables de malnutrition et correspondent à une des principales causes de mortalité (Allen et Kaferstein, 1983 ; Baird-Parker, 1994). En Europe, tous les pays rapportent une augmentation régulière du nombre de cas depuis le milieu des années 1980 (Jouve, 1993). Ces caractéristiques sur la fréquence de l'infection concernent les malades demandant

des soins particuliers et représentent probablement les personnes les plus sérieusement atteintes ou les plus sensibles (jeunes enfants, personnes âgées...); elles n'incluent pas les individus faiblement infectés ou soignés par eux-mêmes (Scott, 1996).

En France, toute toxi-infection alimentaire collective doit faire l'objet d'une déclaration aux autorités sanitaires (Direction Départementale d'Aide Sanitaire et Sociale (DDASS), Direction Départementale des Services Vétérinaires (DDSV)). Cette déclaration est obligatoire pour identifier les causes des TIAC permettant ainsi de prendre des mesures spécifiques pour empêcher les récurrences (Lepoutre *et al.*, 1995). Parmi les foyers où un agent a été identifié, *Salmonella* a été isolée dans 89 % des cas en restauration familiale, *Staphylococcus aureus* dans 4 % et *Clostridium perfringens* dans 3,5 % des foyers. Ces 2 dernières bactéries pathogènes sont essentiellement trouvées en restauration collective. La gravité des cas est estimée par le taux d'hospitalisation et de décès. En 1993, la contamination des matières premières et le non-respect de la chaîne du froid lors de la préparation des repas représentaient les principaux facteurs favorisant le développement de ces bactéries (Lepoutre *et al.*, 1995).

L'augmentation des infections alimentaires est probablement due au résultat d'une combinaison d'un certain nombre de facteurs : changement dans les pratiques agricoles, dans le marketing alimentaire, dans les habitudes alimentaires, identification de nouvelles souches pathogènes (Baird-Parker, 1994). Les nouveaux produits alimentaires apparus récemment, comme les produits de IV^{me} et de V^{me} gamme, et utilisant de nouvelles technologies peuvent également favoriser le développement des bactéries pathogènes. Par le manque de données et d'études réalisées sur ces produits, ceux-ci constituent une niche écologique favorable au développement des micro-organismes anaérobies et augmentent la fréquence des intoxications alimentaires (Catteau, 1989 ; Carlin *et al.*, 1990). C'est pourquoi ces dernières années, un effort de sensibilisation destiné aux consommateurs, surtout aux enfants, a été réalisé pour instaurer des règles d'hygiène efficaces et insister sur les risques éventuels que le manque d'attention peut provoquer (Allen et Kaferstein, 1983 ; Scott, 1996).

D'un point de vue économique, les intoxications alimentaires constituent une charge financière importante. En effet, les campagnes de sensibilisation de la population et le contrôle des foyers à risques demandent un investissement important de la part de personnels spécialisés. En 1994,

aux USA, l'impact économique de ces infections bactériennes est estimé à 7,89 milliards de dollars par an et correspond à 86 % du coût total des intoxications alimentaires. Les 14 % restant sont dûs à l'action de parasites, de virus, de champignons, de toxines marines et d'empoisonnements chimiques (Anonyme, 1995).

Face au développement des toxi-infections alimentaires déclarées, les industries alimentaires tentent de maîtriser au mieux les conditions de fabrication, l'hygiène dans la préparation et les risques liés à une éventuelle recontamination au cours de leur transformation. Ainsi, de nouvelles méthodes d'identification des risques de développement des bactéries pathogènes ont vu le jour ces dernières années : au niveau de la chaîne des produits alimentaires, il s'agit des concepts HACCP (analyse des points critiques) (Jouve, 1991 ; Hui, 1992) ou de la "hurdle technology" (Leistner, 1994) ; sur les produits finis, il existe des techniques rapides d'identification bactérienne : PCR (technique d'amplification génique) (Fach *et al.*, 1993), impédancemétrie, cytométrie de flux... Par ailleurs, l'utilisation de l'outil informatique permet une analyse statistique de la modélisation du développement des bactéries pour prédire le comportement des micro-organismes pathogènes et/ou d'altération, c'est la microbiologie prédictive (Buchanan et Whiting, 1996).

Les travaux menés par l'INRA dans l'hygiène des transformations des produits agro-alimentaires concernent l'étude des bactéries de contamination des aliments et ont pour objectif la production de bases scientifiques de connaissances permettant de répondre aux demandes du consommateur et des industriels. Certains aspects biologiques de *Clostridium perfringens* sont bien connus ; en effet, les différentes toxines produites, la structure de l'entérotoxine et la localisation du gène de cette protéine, les interactions entérotoxine-hôte, l'organisation du génome de *Cl. perfringens* et le mécanisme de production des spores sont déjà connus avec beaucoup de précision. Cependant, les conditions de libération de cette toxine au cours de la sporulation de la bactérie ont très peu été étudiées. C'est pourquoi l'objectif de ce travail est de comparer, d'une part la capacité de sporulation et de production de l'entérotoxine par 3 souches de *Cl. perfringens* de même origine, et d'autre part d'étudier leur métabolisme au cours de la croissance et pendant leur sporulation. Après une synthèse bibliographique rappelant les caractères généraux de *Cl. perfringens*, les mécanismes de la sporu-

lation ainsi que les données sur la production d'entérotoxine de cette espèce au cours de la sporulation et les toxines produites par les autres bactéries contaminant les aliments, nous présentons nos travaux personnels subdivisés en deux grandes parties.

Dans un premier temps, nous avons mis au point les conditions optimales de sporulation permettant d'obtenir *in vitro* des taux de sporulation élevés et reproductibles. Nous avons donc étudié la sporulation des 3 souches sur différents milieux plus ou moins spécifiques de la sporulation et modifié certains des paramètres portant sur les conditions de préculture ou de culture.

Dans une seconde partie, nous avons caractérisé le métabolisme des cellules végétatives de *Cl. perfringens* et mis en évidence les variations métaboliques intervenant pendant la sporulation et la production d'entérotoxine. Nous avons comparé le métabolisme carboné en fonction de la nature de la souche, du milieu de culture, des substrats de croissance et de l'état physiologique de la cellule.

CHAPITRE I

GENERALITES

1 . *Clostridium perfringens* : CARACTERES GENERAUX

Par ses caractéristiques physiologiques, *Clostridium perfringens* présente un certain nombre de problèmes dans l'industrie agro-alimentaire. En effet, par sa croissance très rapide, cette bactérie peut se développer dans des aliments préparés et gardés à température constante (30-37°C) lors de restaurations collectives par exemple, et être ainsi ingérée par les consommateurs. De plus, les formes végétatives et sporulées de ce micro-organisme résistent à des conditions de croissance relativement drastiques (chaleur, concentration en sels...) alors que ces mêmes conditions inhibent le développement d'autres souches bactériennes. Par ailleurs, cette bactérie libère de nombreuses toxines, notamment une entérotoxine, responsable des intoxications alimentaires chez l'homme. La synthèse de ces toxines est complexe et leur présentation fera partie d'un prochain paragraphe. Ainsi dans ce chapitre, nous présenterons l'état actuel des connaissances sur la physiologie de *Cl. perfringens* et nous détaillerons les facteurs qui peuvent modifier la croissance et la survie des cellules végétatives de ce micro-organisme.

1.1 ORIGINES

Clostridium perfringens est un micro-organisme anaérobie décrit pour la première fois par Veillon et Zuber en 1898 sous le nom de *Bacillus perfringens*. A la fin du siècle dernier, *Clostridium perfringens* possède une variété de noms : *Clostridium welchii*, *Bacterium emphysematosum*... pour prendre définitivement le nom actuel au début du 20^{ème} siècle. Cette bactérie est tout d'abord associée à des cas de gangrènes gazeuses et de diarrhées humaines chroniques et peu sévères. Dans les années 1940, des premiers cas d'intoxications alimentaires dues à *Cl. perfringens* sont observés en Angleterre, mais l'étude des intoxications alimentaires provoquées par cette bactérie est estimée sans intérêt jusqu'en 1953 quand Hobbs *et al.* décident d'étudier ce micro-organisme de façon approfondie. Des variétés de souches sont alors décrites selon différents critères, notamment sur des capacités de β hémolyse et de résistance à la chaleur des spores (Hobbs, 1953 ; Smith, 1975 ; Labbé, 1989). A partir de 1960, le nombre de cas d'intoxications alimentaires provoquées par *Cl. perfringens* a augmenté de façon considérable. Depuis cette date, de nombreuses études ont été effectuées sur cette espèce, notamment sur les différentes toxines libérées, sur la structure et le mode d'action de l'entérotoxine, principale responsable des intoxications alimentaires.

Tableau 1 : Répartition des 5 types de *Cl. perfringens* en fonction des toxines produites (Smith, 1975 ; McDonel, 1980).

		Toxines produites									
		Toxines majeures					Toxines mineures				
Toxinotype	Groupe	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

1.2 CARACTERISTIQUES DE L'ESPECE *Clostridium perfringens*

1.2.1 Habitat

Clostridium perfringens est peut-être la bactérie pathogène la plus largement répandue et de ce fait, elle est beaucoup étudiée. Ses principaux habitats sont les souillures, les aliments à base de viande, l'eau, l'air, le sol et les contenus intestinaux des animaux et des hommes. Le type A est trouvé à la fois dans les souillures et les tractus intestinaux. Le taux de *Cl. perfringens* de type A dans la flore normale du tube digestif est compris entre $2,0 \times 10^2$ et $2,5 \times 10^6$ bactéries/g de selles chez les sujets sains et varie selon les pays et les régimes alimentaires des individus (Smith, 1975 ; Labbé, 1989). Les types B, C, D et E sont principalement parasites des animaux et parfois des hommes mais ne sont pas trouvés dans la terre (Smith, 1975).

1.2.2 Taxonomie

Cl. perfringens peut synthétiser toute une série d'enzymes ou toxines répartissant les souches en divers types (McDonel, 1980 ; Hatheway, 1990 ; Rood et Cole, 1991) (Tableau 1). Ces molécules, suite à leurs actions néfastes sur les organismes vivants, sont à l'origine des différentes pathologies attribuées à cette bactérie.

La répartition s'effectue en 5 types, de A à E, selon leur capacité à synthétiser 4 exotoxines létales (provoquant la mort) pour la souris et appelées pour cette raison, **toxines létales majeures** (α , β , ϵ , ι) (Smith, 1975 ; McDonel, 1980). Un sixième type (type F) était proposé mais il est maintenant considéré comme le type C et la désignation du type F a été abandonnée (Cato *et al.*, 1986). Les autres sont dénommées les **toxines mineures** de *Cl. perfringens*, leur implication comme agent primaire dans une maladie n'ayant pas été démontrée jusqu'ici (Niilo, 1980). Enfin, l'**entérotoxine** décrite plus récemment, est une toxine dont l'essentiel de son activité se situe sur les cellules de l'épithélium intestinal. Ces trois grandes classes de toxines seront détaillées dans un paragraphe consacré aux différentes toxines.

Cl. perfringens se caractérise par un génome dont le contenu GC % est extrêmement faible : il est de l'ordre de 24 à 27 % (Cato *et al.*, 1986).

1.2.3 Morphologie

Sur le milieu PYG (milieu peptone - extrait de levure - glucose), *Clostridium perfringens* apparaît comme une bactérie anaérobie, non mobile et positive à la coloration de Gram. Elle se présente comme un bâtonnet de 0,6 à 2,4 μm sur 1,3 à 19 μm aux bords parallèles et aux extrémités franches (Photo 1). Les cellules se trouvent isolées ou par paire (Cato *et al.*, 1986). Elles forment des spores dans certaines conditions. Leurs capacités de sporulation lui permettent de mieux résister dans le milieu extérieur et donc de se propager directement par l'intermédiaire d'aliments souillés (Daube, 1992).



Photo 1 : Aspect de la souche de *Clostridium perfringens* après coloration au Gram (x 1600)

1.2.4 Infections alimentaires

Chez l'être humain, les toxi-infections alimentaires dues à *Cl. perfringens* de type A sont provoquées par des aliments à base de viande mal refroidis ou restés trop longtemps à température ambiante. Parmi les infections, 28 % sont dues à des aliments mixtes, le plus souvent viandes en sauce ou plats composés, et 59 % sont dues à des viandes ou volailles seules (Lombard *et al.*, 1993). Les cellules végétatives se multiplient rapidement dans l'aliment et sont consommées lors

de l'ingestion de celui-ci. Alors que quelques cellules sont tuées par l'acidité de l'estomac, des cellules végétatives survivent si l'aliment contient au moins 10^6 - 10^7 cellules/g d'aliment (Granum, 1990). Elles pénètrent dans le côlon où elles sporulent ensuite. Pendant la sporulation, une entérotoxine protéique appelée **entérotoxine de *Cl. perfringens* de type A** (CPE) est produite. Cette protéine agit sur les cellules épithéliales du côlon provoquant des modifications morphologiques de celles-ci. Les symptômes caractérisés par des diarrhées dans 100 % des cas et des douleurs abdominales (81 % des cas) apparaissent entre 6 et 12 h après l'ingestion de l'aliment contaminé et sont généralement résorbés spontanément 12 à 24 h plus tard (Sébald et Cassier, 1970 ; Smith, 1975). Les intoxications provoquées par *Cl. perfringens* sont rarement mortelles. Cependant, cette maladie peut être fatale chez les personnes âgées et les jeunes enfants. Si la vaccination a depuis longtemps fait ses preuves dans les infections provoquées par les toxines β et ϵ , rien n'est moins sûr en ce qui concerne la toxine α et l'entérotoxine. Pour cette dernière, la vaccination ne semble pas être une solution efficace pour contrer la diarrhée et donc ici, seul le contrôle du degré de contamination de l'aliment ingéré semble essentiel (Daube, 1992). L'administration d'épinéphrine et d'atropine chez ces malades peut favoriser, cependant, le retour à un état normal (Smith, 1975 ; McClane, 1992).

1.2.5 Identification

Faute de méthodes simples et rapides d'identification, la détection de *Clostridium perfringens* entérotoxigène dans les aliments reste très peu pratiquée à l'heure actuelle. En hygiène alimentaire, le diagnostic se limite essentiellement au dénombrement des bactéries sulfite-réductrices se développant à 46°C et à l'identification de *Cl. perfringens* par des techniques biochimiques classiques. Cette situation est notoirement insuffisante et peu satisfaisante car le dénombrement et la caractérisation de cette espèce entérotoxigène ne sont pas pris en compte (Fach *et al.*, 1993). Cependant, la législation prévoit le dénombrement de ces bactéries dans chaque type de produit alimentaire et fixe le taux minimum admis pour chacun de ces aliments (Anonyme, 1980).

La caractérisation complète des *Clostridia* demande du temps mais pour identifier *Cl. perfringens*, quelques tests suffisent. Quatre réactions (absence de mobilité, réduction des nitrates, liquéfaction de la gélatine et fermentation du lactose) sont généralement suffisantes pour distinguer *Cl. perfringens* des autres micro-organismes présents. Dans d'autres cas, des tests additionnels

peuvent être nécessaires : fermentation du raffinose, de la salicine. Par ailleurs, des kits de détection commercialisés sous le nom de API 20 A (20 tests à lire après 24 h d'incubation), RAPID-ID 32A (32 tests à lire après 4 h d'incubation en anaérobiose) ont l'avantage d'être de réponse rapide et permettent, de ce fait, un certain élargissement des caractères biochimiques analysés. De plus, l'analyse par chromatographie en phase gazeuse des acides gras volatils produits lors d'une culture en milieu contrôlé (PYG) constitue une autre méthode d'identification de cette souche : *Cl. perfringens* produit de grandes quantités d'acétate, butyrate et lactate et parfois de faibles quantités de propionate, formiate et succinate (Cato *et al.*, 1986). Parmi les méthodes récentes d'identification, les techniques de biologie moléculaire et en particulier la technique d'amplification génique (PCR) connue pour sa facilité d'application, sa sensibilité et sa très haute spécificité sont des techniques de choix pour l'identification rapide de *Cl. perfringens* entérotoxigène dans les aliments présumés responsables de toxi-infections alimentaires (Fach *et al.*, 1993 ; Baez et Juneja, 1995). Une autre méthode récente mise au point par Brazier et Val Hall (1995) consiste à réaliser un test à partir des enzymes préformées sélectionnées et réagissant avec leurs substrats pour différencier, de façon optimale, les souches de *Cl. perfringens* des autres souches de *Clostridia*. Par ailleurs, la recherche de *Cl. perfringens* peut être réalisée par la présence d'entérotoxine. Plusieurs tests ont été décrits pour la recherche de cette protéine. Ils seront décrits dans le paragraphe 4.1.6 (p 47) ; cependant, un seul test (agglutination sur latex) a été commercialisé. Il est toutefois peu employé car la caractérisation d'une souche de *Cl. perfringens* nécessite la sporulation préalable de celle-ci qui est longue et difficile à obtenir. Par ailleurs, l'entérotoxine est très rarement préformée dans l'aliment et est le plus souvent produite dans le tube digestif. Par conséquent, le test d'agglutination au latex présente des limites certaines et ne peut être utilisé de façon systématique en industrie agro-alimentaire (Fach *et al.*, 1993).

1.2.6 Métabolisme

Etant donnée sa croissance rapide, *Cl. perfringens* est relativement facile à cultiver et à étudier (Rood et Cole, 1991 ; McClane, 1992). Cette bactérie est capable d'utiliser différents substrats. Ainsi les glucides et les acides aminés sont métabolisés pour libérer des acides gras volatils (acétate, butyrate et propionate) et des alcools (éthanol, propanol). Nous pouvons aussi observer des

Tableau 2 : Bilan de fermentation du glucose par *Cl. perfringens* obtenu sur milieu en présence ou absence en fer (mM produits pour 100 mM de glucose consommé) (Wood, 1961)

Produits	Absence de fer	Présence de fer
Acétate	15	60
Ethanol	10	26
Butyrate	9	34
Lactate	160	33
Dioxyde de carbone	24	176
Hydrogène	21	214
Bilan carboné %	98	97

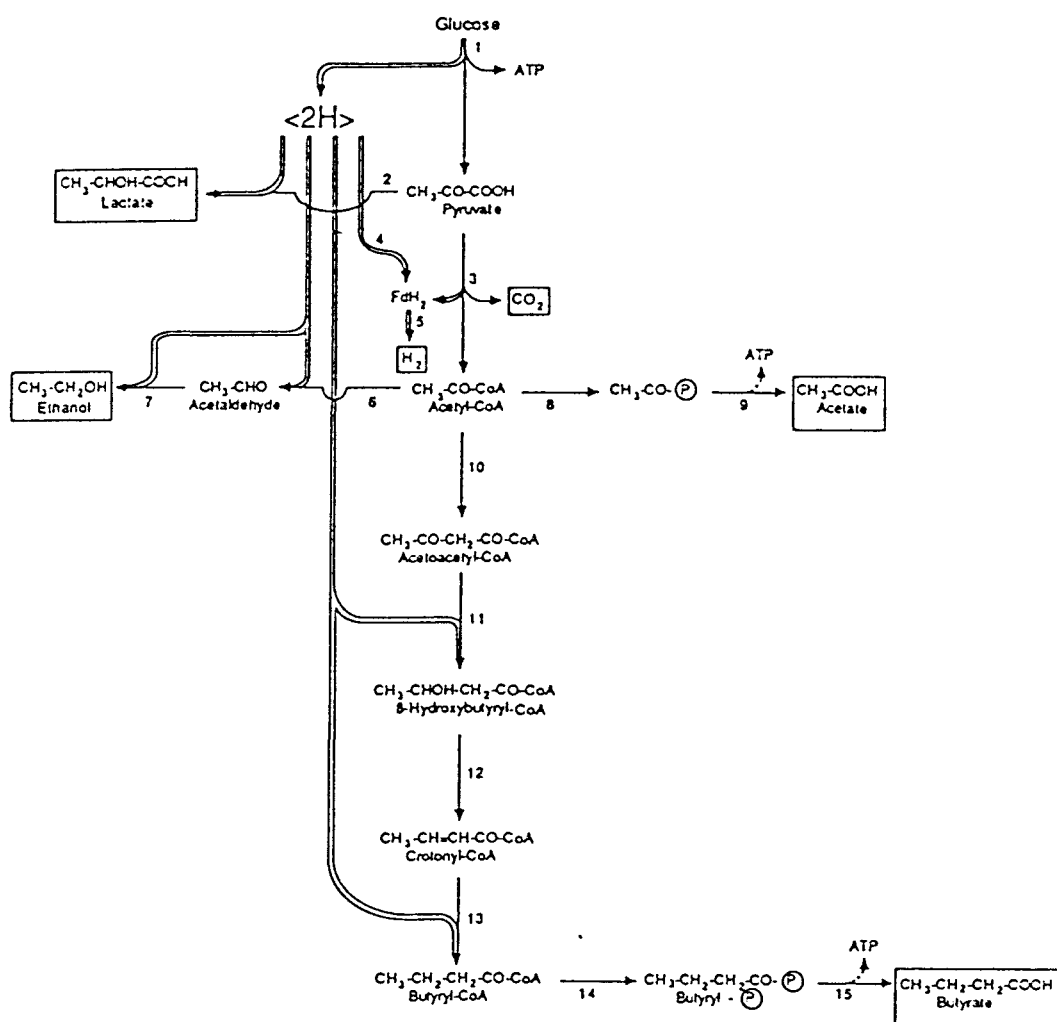


Figure 1 : Différentes voies métaboliques empruntées par les *Clostridia* (Andreesen *et al.*, 1989)

productions importantes de CO₂ et H₂ qui favorisent le maintien de l'anaérobiose. Ainsi, Wood en 1961, a établi le bilan de fermentation du glucose en présence ou en absence de fer et montre que le lactate est produit majoritairement en absence de fer alors qu'il est en quantité infime en présence de fer (Tableau 2). Par ailleurs, cette bactérie a besoin de 13 acides aminés différents pour se développer (Granum, 1990) et des quantités variables de CO₂ n'affecte aucunement la croissance de ce micro-organisme (Reilly, 1980).

Les voies métaboliques empruntées par l'espèce *Cl. perfringens* ne sont pas, pour le moment, définies avec précision. Elles sont, cependant, bien connues pour le genre *Clostridium*. Nous présentons dans ce paragraphe les différentes voies métaboliques empruntées par les *Clostridia* à partir du glucose conduisant à la formation d'éthanol et d'acides organiques (Figure 1) (Doelle, 1975 ; Gottschalk, 1979 ; Andreesen *et al.*, 1989)

Ces microorganismes utilisent la voie d'Embden-Meyerof pour hydrolyser les monosaccharides et produire du pyruvate comme produit intermédiaire central dans la formation des produits de fermentation. Dans la plupart des fermentations, il est converti en acetylCoA. Le taux de ce dernier composé peut être variable selon l'espèce de *Clostridium*. Il peut être ensuite converti en un mélange d'éthanol, d'acétate et/ou de butyrate. Le taux de chacun de ces produits métaboliques formés dépend de la quantité d'hydrogène libéré.

Cependant les *Clostridia* ont la possibilité de dégrader les polysaccharides (amidon, pectine et cellulose) mais aussi des acides organiques (malate, fumarate), des alcools et des acides aminés simples et ramifiés.

1.2.7 Synthèse d'enzymes

Cinq types d'estérases, désignés E-I à E-V, sont issus de souches humaines et animales de *Cl. perfringens* et peuvent être utilisés comme outil pour une caractérisation épidémiologique de ces souches (Pons *et al.*, 1993). Par ailleurs, Rafii et Cerniglia en 1993 montrent qu'une azoréductase est produite dans le cytoplasme des cellules de *Cl. perfringens* et est ensuite sécrétée sans accumulation de l'enzyme à l'intérieur de la cellule.

Une hydrolase présente dans le peptidoglycane (PGH) a été codée et purifiée partiellement à partir de cellules végétatives (Labbé *et al.*, 1990). Il a été montré qu'elle est produite pendant la croissance en absence de sporulation et provoquerait la germination et la lyse des tuniques des spores. Cette enzyme semble distincte de la protéine extracellulaire d'initiation produite par *Cl. perfringens* et peut être une autolysine avec une activité corticolytique. Cependant, les études réalisées jusqu'à présent sur ce sujet ne permettent pas de définir avec précision la fonction de la PGH.

1.2.8 Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques constitue un des moyens de typage des souches de *Cl. perfringens*.

La résistance à la tétracycline est probablement le type d'antibiorésistance le plus répandu chez *Cl. perfringens*. Actuellement, la séquence nucléotidique complète et le mécanisme d'action du facteur de résistance Tet P ont été déterminés. Deux gènes chevauchant par 17 paires de bases sont identifiés : le gène *tetA(P)* qui code pour une protéine transmembranaire régule le flux actif de tétracycline et le gène *tetB(P)* codant pour une protéine de résistance à la tétracycline (Rood, 1983 ; Sloan *et al.*, 1994).

Plusieurs auteurs mentionnent la résistance au chloramphénicol comme plus rare que la résistance à la tétracycline et à l'érythromycine chez des souches d'origine porcine (Rood *et al.*, 1978a ; Rood *et al.*, 1985). Les mécanismes de résistance impliqués jusqu'à présent font tous intervenir des chloramphénicol acétyltransférases (=Cat) (Rood *et al.*, 1978b ; Bannam et Rood, 1991). A ce jour, les gènes de deux groupes de molécules de ce type ont été clonés, séquencés et étudiés chez *Cl. perfringens* : il s'agit de CatP et CatQ. Ce dernier a été cloné à partir d'une souche américaine et semble être localisé sur le chromosome (Rood *et al.*, 1978a). Ce gène n'hybride pas avec le gène CatP et ne semble présent que chez des souches d'origine américaine.

Dutta et Devriese en 1984, étudient les profils de résistance à trois groupes d'antibiotiques : les macrolides, les lincosamides et les streptogramines. Ils peuvent distinguer quatre types de combinaisons de résistance. Les résistances à l'érythromycine chez *Cl. perfringens* qui sont les mieux

connues sont celles associées à une résistance à la clindamycine et à la lincosamine et qui sont regroupées sous le nom de macrolide-lincosamide-streptogramine résistance (MLS résistance) (Brefort *et al.*, 1977 ; Rood *et al.*, 1978a ; Dutta et Devriese, 1984 ; Rood *et al.*, 1985).

Les résistances aux antibiotiques sont classiquement déterminées par des mesures de concentrations minimales inhibitrices (MIC) et de concentrations minimales bactéricides (MBC) par une méthode de dilution des antibiotiques en tubes de milieu de culture liquide (Stevens *et al.*, 1987) ou sur milieu gélosé (Sapico *et al.*, 1972). Certains auteurs utilisent la technique classique des disques imprégnés des différents antibiotiques et mesurent la zone d'inhibition (Sapico *et al.*, 1972 ; Rood *et al.*, 1985). Les souches multirésistantes ne sont pas rares (Rood *et al.*, 1985). La proportion de souches résistantes semble augmenter par l'usage d'antimicrobiens comme additifs dans les aliments (Rood *et al.*, 1978a ; Rood *et al.*, 1985).

1.2.9 Organisation du génome

Ces dernières années ont vu des avancées rapides dans le domaine de la génétique de *Cl. perfringens*. Des séries de plasmides ont été séquencées et caractérisées ainsi que les gènes de résistance aux antibiotiques. Des éléments génétiques transposables ont été identifiés ; un plasmide codant pour une bactériocine a été séquencé. Toutes ces données ont permis de construire la carte génétique du génome de *Cl. perfringens* (Figure 2) (Katayama *et al.*, 1995). Cette bactérie possède un seul chromosome double brin, circulaire d'environ 3,58 millions de paires de bases. Plus de 100 sites de restriction et 24 loci génétiques ont été localisés sur le génome qui est légèrement plus grand en taille que celui d'autres bactéries Gram⁺ (Canard et Cole, 1989).

1.2.10 Profil plasmidique

A côté du chromosome double brin et circulaire, le support de l'information génétique est constitué aussi de multiples plasmides circulaires bicaténaires d'une taille allant de quelques kilobases (Kb, soit 10³ paires de bases) à plus de cent Kb, de prophages et de transposons. Ces trois structures sont facultatives mais elles ont toutes été détectées chez *Cl. perfringens* (Rood et Cole, 1991). Cependant, les techniques d'extraction de plasmides mises au point pour ces études montrent de nombreux plasmides dans la plupart des souches étudiées. La réalisation de profils plasmidiques de

Tableau 3 : Effet de la température sur la croissance de *Cl. perfringens*
(Smith, 1972)

Température (°C)	Temps de génération à pH 7 (min)
25	100
30	50
35	34
40	12,5
45	10
50	15

différents isolats peut donc être exploitée comme un outil épidémiologique (Daube, 1993). La localisation sur des plasmides des gènes de plusieurs facteurs de résistance aux antibiotiques et d'une bactériocine a suscité l'intérêt pour l'étude de ce support génétique chez *Cl. perfringens* (Sasarman et Antohi, 1963 ; Sébald et Brefort, 1975 ; Sébald *et al.*, 1975 ; Ionesco, 1976 ; Rood et Cole, 1978a et b ; Labbé, 1989). Rapidement, Blaschek et Solberg (1981) ont essayé d'associer certains de ces plasmides à la production de l'une ou l'autre des toxines. Rokos *et al.*, en 1978, soupçonnent la présence du gène de la toxine bêta sur un plasmide de 74 MDa. Le gène de la toxine lambda (caséinase) est présent sur un petit plasmide d'une souche de *Cl. perfringens* de toxinotype B (Blaschek et Solberg, 1981).

1.3 FACTEURS AFFECTANT LA CROISSANCE ET LA SURVIE DES CELLULES VEGETATIVES

Parce que les intoxications alimentaires dues à *Cl. perfringens* se situent au troisième rang mondial des intoxications et qu'elles constituent un réel problème pour l'industrie, il est apparu nécessaire d'étudier les facteurs pouvant favoriser sa croissance ou au contraire la limiter. La température et le pH de croissance, le potentiel d'oxydo-réduction, l' a_w (activité de l'eau) et la présence de sels constituent certains de ces facteurs. Nous présentons dans ce paragraphe, l'influence de chacun de ces éléments sur la croissance de cette espèce.

1.3.1 Température

La principale caractéristique de *Cl. perfringens* est sa capacité à se développer à des températures élevées. La température optimale de croissance est généralement comprise entre 43 et 45°C. Cependant, nous pouvons observer une croissance entre 15 et 50°C (Labbé, 1991). Les températures maximale et minimale varient en fonction de la souche étudiée, du pH et du milieu de croissance utilisé. Le temps de génération est un des plus courts enregistré parmi les bactéries étudiées : il varie de 7,1 à 100 min ; cependant, il diminue quand la température augmente (Tableau 3) (Juneja *et al.*, 1994).

Tableau 4 : Effet du pH sur la croissance de *Cl. perfringens* (Smith, 1972)

pH	Temps de génération à 37° C (min)
5,0	100
5,5	30
6,0	22
6,5	21
7,0	23
7,5	25
8,0	48

En outre, l'effet des basses températures sur les cellules de *Cl. perfringens* est important : en effet, la sécurité alimentaire est largement basée sur la conservation des aliments à faible température. Les cellules végétatives de *Cl. perfringens* sont sensibles aux températures basses de stockage ainsi qu'aux températures de congélation. Par ailleurs, les cultures dans le milieu à la viande cuite survivent plus longtemps à + 4°C que celles obtenues dans le milieu au thioglycolate (FTG) (Labbé, 1989).

1.3.2 pH

Cl. perfringens se développe très bien à des pH compris entre 6,0 et 7,0 mais il est capable de se développer à des pH compris entre 5,5 et 8,0. Aux valeurs extrêmes, la croissance est sévèrement diminuée (Smith, 1972 ; Labbé, 1989) (Tableau 4).

1.3.3 Potentiel d'oxydo-réduction

Le potentiel d'oxydo-réduction reflète l'état d'anaérobiose du milieu dans lequel *Cl. perfringens* se développe. Il varie de -125 à +350 mV selon les souches, la taille de l'inoculum, la nature du milieu de croissance, l'état métabolique des cellules et la méthode de mesure du potentiel d'oxydo-réduction (Labbé, 1989). Le potentiel d'oxydo-réduction peut être abaissé après addition de thioglycolate de sodium ou de cystéine mais aussi par les gaz CO₂ et H₂ libérés après fermentation du substrat carboné (Cato *et al.*, 1986).

1.3.4 Activité de l'eau

La valeur de l'activité de l'eau (a_w) est importante pour prévenir la croissance des bactéries pathogènes. L' a_w dépend du pH, du potentiel d'oxydo-réduction, de la température et de la nature du soluté. En moyenne, elle s'étend de 0,93 à 0,97.

Comparé à *Staphylococcus aureus*, *Cl. perfringens* ne supporte pas de faibles a_w . Une a_w de 0,995 permet d'obtenir un nombre maximum de cellules et une phase de latence courte quand la température est de 45°C et le pH de croissance de 7,0. L' a_w est de l'ordre de 0,95-0,97 avec NaCl, KCl ou glucose (Labbé, 1989) et elle peut atteindre 0,93-0,95 dans le cas du glycérol (Bartsch et Walker, 1982).

Tableau 5 : Effet du NaCl sur le temps de génération de *Cl. perfringens*
(Smith, 1972)

% NaCl	Temps de génération (pH 7 et 45°C)
0	10
1	11
2	11
3	27
4	30

1.3.5 Sels

Les sels sont impliqués dans la conservation des aliments. En effet, ils agissent sur l' a_w , la force ionique et le pH et peuvent créer un environnement favorable pour les micro-organismes qui génèrent la croissance des bactéries pathogènes (c'est le cas dans les fermentations lactiques) (Tableau 5). Les sels de chlorure et de nitrate agissent ensemble pour inhiber la croissance de *Cl. perfringens*.

La croissance de *Cl. perfringens* n'est sérieusement affectée que par des concentrations en NaCl au moins supérieures à 3 %. Mais l'effet des sels est plus ou moins important selon les souches (Smith, 1972). Par contre, certains micro-organismes peuvent croître en absence de potassium mais ne peuvent pas se développer sans sodium. En 1957, Fuchs et Bonde ont mis en évidence une inter-dépendance entre ces ions. Individuellement, le chlorure de sodium à 7 ou 8 % et le nitrate de sodium à la concentration de 300 µg/mL inhibent la croissance des souches.

Cette première partie nous a permis de faire le point sur les connaissances actuelles de l'espèce *Cl. perfringens*. Cependant, les caractéristiques physiologiques et morphologiques ainsi que les facteurs physiologiques pouvant intervenir sur la croissance datent des années 1980-90 alors que les informations sur le génome sont plus récentes et sont relativement bien connues et détaillées. Cependant, le métabolisme de cette souche n'a été étudié que sur le milieu de référence, le milieu PYG. De plus, les voies métaboliques empruntées par cette souche ne sont qu'hypothétiques. Par conséquent, le métabolisme de cette bactérie devrait être étudié de façon plus précise. Par ailleurs, une des principales propriétés de *Cl. perfringens* est sa capacité à sporuler dans des conditions difficiles et à germer lorsque le milieu devient favorable. Ce phénomène de sporulation et de germination peu étudié jusqu'à maintenant chez cette souche est présenté au cours du paragraphe suivant à partir des travaux réalisés sur une souche-modèle.

2 . MECANISME DE SPORULATION ET DE GERMINATION

Le phénomène de sporulation et de germination va être présenté sur une souche-type, *Bacillus subtilis* ainsi que quelques propriétés des spores (Hanson *et al.*, 1970 ; Hoch, 1993). Nous ferons

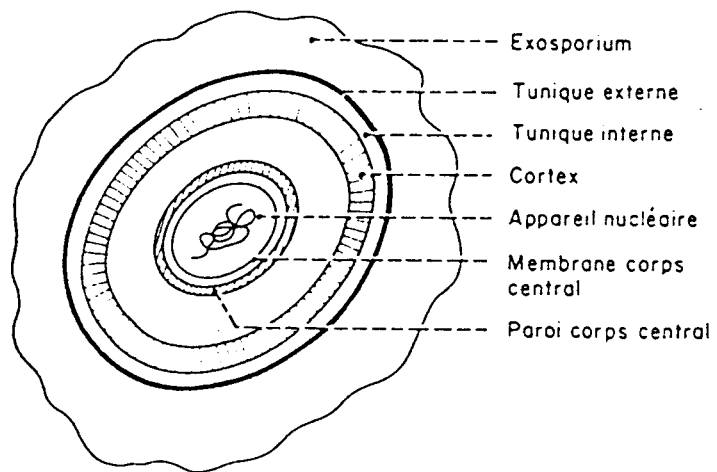


Figure 3 : Structure de la spore (Leclerc, 1975 ; Foster, 1994).

aussi le point sur les connaissances de ces 2 mécanismes observés chez *Cl. perfringens*. Dans une dernière partie, les différentes techniques pour mettre en évidence l'un ou l'autre état physiologique seront détaillées.

2.1 SPORULATION

Dans un contexte physiologique qui peut être variable suivant les espèces et lorsque le milieu s'épuise en éléments nutritifs, certaines bactéries ont le pouvoir de se transformer en petites unités ovales ou sphériques douées d'une résistance extraordinairement élevée : il s'agit de **spores** ou d'**endospores** puisque leur formation est intracellulaire. Les endospores caractérisent différents genres bactériens classés selon leur GC %, notamment *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporosarcina* (Leclerc, 1975 ; Berkeley et Ali, 1994). Toutes ces bactéries sont Gram⁺ surtout au cours de la phase exponentielle de leur croissance ; elles ont ensuite tendance à se décolorer et à devenir Gram⁻ (Leclerc, 1975).

2.1.1 Morphologie

La présence ou l'absence de la spore et sa position dans la cellule est recherchée dans un but taxonomique (Leclerc, 1975). Les spores sont rarement observées *in vivo* et dans les conditions usuelles *in vitro*. Mais quand elles sont présentes, elles apparaissent larges, ovales, centrales ou subterminales, comme un espace clair, réfringent, ovoïde, limité par un contour régulier et déformant parfois la cellule (Cato *et al.*, 1986).

La spore libre observée en microscopie électronique présente une structure complexe, résultant de modifications cytologiques et biochimiques. La région cytoplasmique centrale présente une texture homogène, peu dense aux électrons. Elle comprend des zones claires correspondant au matériel nucléaire ; les autres régions, sombres, localisant les acides ribonucléiques et les substances de réserve.

Les enveloppes situées autour de la membrane sporale ont des structures et des compositions variées. Sur la Figure 3, nous distinguons :

- la **paroi du corps central** (ou paroi sporale) contenant le peptidoglycane normal qui deviendra, après germination de la spore, la paroi de la cellule végétative ;

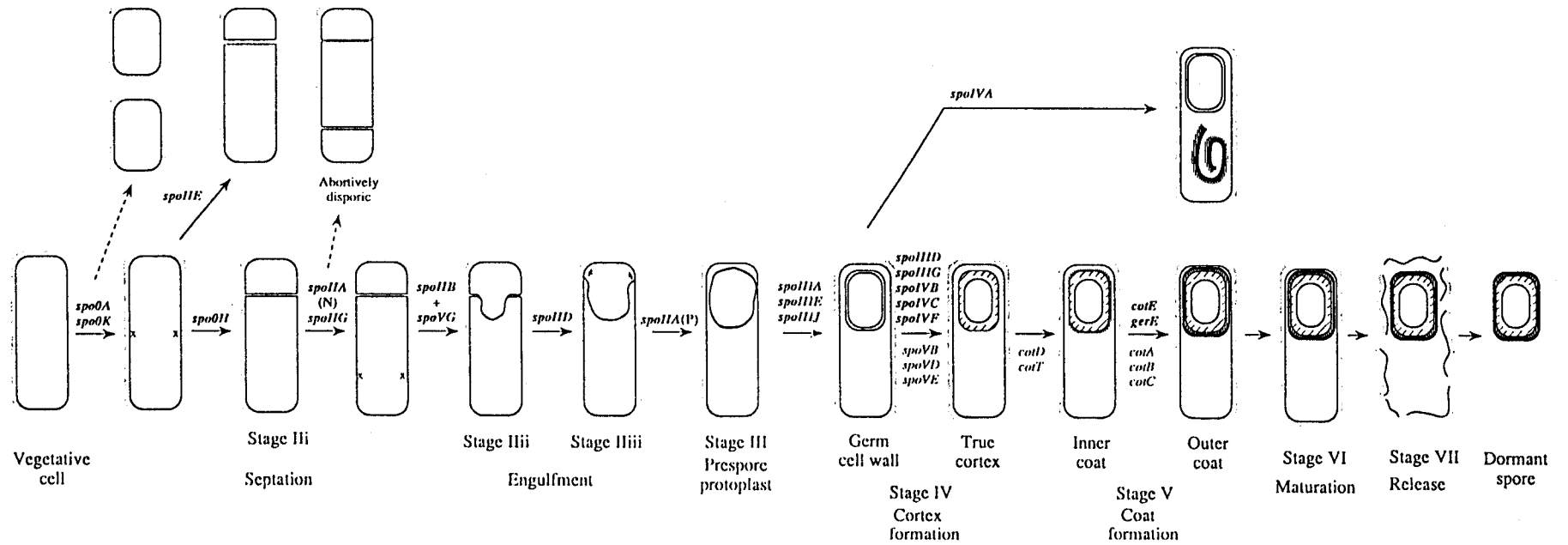


Figure 4 : Changements morphologiques de la cellule végétative au cours de la sporulation chez *B. subtilis* (Errington, 1993).

- le **cortex** qui représente 10 à 20 % de l'ensemble est une couche épaisse d'aspect monomorphe, très transparente aux électrons. Il est formé d'un peptidoglycane inhabituel avec beaucoup moins de liaisons internes et est très sensible au lysozyme. Il contient une forte proportion de dipicolinate de calcium ; son autolyse constitue une étape déterminante de la germination ;

- les **tuniques (interne et externe)** représentent 20 à 35 % de l'ensemble ; elles sont composées d'une protéine de type kératine riche en liaisons disulfure ; imperméables, elles sont responsables de la résistance aux agents chimiques ;

- l'**exosporium** enfin, la couche la plus externe, est une membrane lipoprotéinique contenant 20 % de sucres ; il n'est pas essentiel à la survie de la spore (Foster, 1994).

2.1.2 Modifications morphologiques

La spore qui prend naissance dans la cellule végétative est une cellule entièrement nouvelle et différente au niveau de sa structure, de sa composition chimique et enzymatique (Leclerc, 1975). Les observations de microscopie électronique effectuées en 1965 par Ryter avaient permis de définir 7 stades principaux de la sporulation sur des critères morphologiques (Figure 4). Les cellules végétatives sont généralement dites au stade 0 du cycle de la sporulation.

Stade II :

Le cycle de sporulation commence avec la division asymétrique de la cellule végétative, les deux cellules filles présentant une différence de taille très marquée. L'achèvement de ce septum spécial a été défini comme le stade II. Le stade I de la sporulation défini originellement par Ryter n'est plus considéré aujourd'hui comme un stade spécifique de la sporulation.

Stade III :

La petite préspore est ensuite engloutie par la grande cellule pour former le stade III. Cette grande cellule végétative portant la future spore est le sporange. Cette étape comprend en réalité plusieurs étapes intermédiaires différentes.

Tableau 6 : Evolution de la structure de la cellule végétative au cours de la sporulation (Halvorson, 1962)

Etape de développement	Structure	Réfractibilité	Aptitude à se colorer	Thermo résistance (%)	DPA ^a (% de la concentration totale)
cellule végétative	homogène	aucune	entièrement	0	0
sporange granuleux	granuleux	aucune	entièrement	0	0
endospore	tunique externe simple	aucune	entièrement	0	0
spore intermédiaire I	exosporium et cortex primaire	rapidement croissante	rapidement croissante	0	0-40
spore intermédiaire II	cortex plus épais et membrane interne	forte	faiblement	0-100	40-100
spore mature	différenciation complète	entière	aucune	100	100

^a acide dipicolinique

Stade IV :

Après le stade III, les membranes entourant la présore ont un aspect amorphe dû à l'absence de peptidoglycane. La forme distincte et ovoïde de la spore commence à apparaître quand le cortex, une paroi cellulaire modifiée, commence à être synthétisée entre les membranes de la présore.

Stade V :

L'enveloppe protéique du cortex est alors déposée sur la face externe de la spore.

Stade VI :

La période finale de développement de la spore est appelée le stade VI. Elle présente peu de variations morphologiques mais coïncide avec l'acquisition successive des propriétés caractéristiques de résistance, dormance et possibilité de germination de la spore.

Stade VII :

La cellule végétative qui lui a donné naissance (sporangie) se lyse et libère la spore libre.

Le Tableau 6 décrit l'évolution de la structure de la cellule végétative au cours de la sporulation (Halvorson, 1962). Au cours de sa formation, la spore devient réfringente alors qu'elle perd sa capacité à se colorer.

A partir de ces différents stades décrits et pour clarifier notre étude, l'endospore est définie du stade III au stade VI. A partir du stade VII, nous parlons de **spore libre**. Dans la pratique, les différences entre la forme endospore et la spore libre sont parfois difficiles à faire au niveau des comptages proposés par les publications qui ne séparent pas ces 2 états différents de la sporulation.

De 75 à 90 % des protéines solubles de la spore de *B. subtilis* et des fractions similaires de la protéine de la spore d'autres espèces sont synthétisées pendant la sporulation (Hanson *et al.*, 1970). Les modifications structurales qui caractérisent le phénomène de sporulation coïncident avec un véritable bouleversement des activités métaboliques de la cellule (Leclerc, 1975). Par ailleurs, Magill

et al. en 1994 montrent que chez *B. megaterium*, le pH interne des endospores diminue d'environ 1 unité pH pendant la sporulation mais augmente dans les premières minutes de la germination (phénomène inverse de la sporulation).

2.1.3 Synthèse d'enzymes

Au cours de la sporulation, différentes enzymes sont libérées par les souches. En effet, une protéase sérine alcaline, spécifique de la sporulation et une métallo-protéase neutre synthétisée au tout début de la sporulation sont produites. Les fonctions de ces enzymes intracellulaires pendant la sporulation sont inconnues bien que leur rôle dans le turnover protéique, spécialement dans le processus de fabrication des protéines des tuniques, apparaît évident (Loffler et Labbé, 1983). Par ailleurs, cinq protéases ont été identifiées chez *Cl. perfringens* de type A en phase de sporulation (Bin Park et Labbé, 1990). La protéase I-A-1, principale enzyme intracellulaire représente 74 % de l'activité caséinolytique intracellulaire. Elle a un poids moléculaire de 330 kDa. Cette protéase aurait peut-être un rôle dans la formation de l'entérotoxine et un rôle secondaire dans la formation de la paroi sporale.

Par ailleurs, la souche NCTC 8679 de *Cl. perfringens* libère au cours de la sporulation, une α -amylase extracellulaire en quantité optimale en présence de glucose (6 à 10 mM) (Shih et Labbé, 1995). Cette amylase purifiée a une taille de 76 kDa et est inactive entre 35 et 40°C. La synthèse d'amylase régulée par la température (Garcia-Alvarado *et al.*, 1992) ne nécessiterait pas l'énergie apportée par la source de carbone. Cependant, l'enzyme est sensible à la répression catabolique quand la source de carbone est en excès (Shih et Labbé, 1994). De plus, les amylases de *Cl. perfringens* joueraient un rôle-clé dans l'association de la formation de l'entérotoxine avec le processus de sporulation (Shih et Labbé, 1995). Cependant, la répression catabolique des enzymes amylolytiques et la sporulation sont régulées par plusieurs mécanismes chez les *Clostridium* (Fisher et Sonensheim, 1991).

2.1.4 Résistance des spores

Les propriétés physiques des spores sont remarquables. Leur faculté à résister à certains agents physiques ou chimiques est exceptionnelle (Labbé, 1989 ; Labbé et Chang, 1995). La thermorésistance est certainement une de leurs propriétés les plus étudiées.

2.1.4.1 A la chaleur

La thermorésistance varie considérablement d'une espèce à l'autre ou entre les souches d'une même espèce. D'une façon générale, les spores survivent après un chauffage de 70 à 80°C pendant 10 min. Cette thermorésistance des spores pose des problèmes au cours des opérations de stérilisation aussi bien dans les hôpitaux, les salles de chirurgie que dans les industries alimentaires où nous recherchons les moyens les plus adaptés à la stabilisation des conserves, par exemple (Leclerc, 1975).

Le test de résistance à la chaleur correspond à la capacité des bactéries à résister à 100 °C pendant 1 h. Cette résistance des spores à la chaleur dépend de deux éléments : **D** et **z**. **D**, durée de réduction décimale correspond à la "durée" de traitement pour laquelle 90 % de la population de cellules vivantes sont détruites. Elle est définie à une température donnée et sera appelée D_T . **z**, l'élévation de la température nécessaire pour diviser la valeur D_T par 10. D_T diminue quand la résistance du micro-organisme diminue donc quand la température (**T**) augmente. Les valeurs de D_T et de **z** varient très largement avec l'environnement du micro-organisme (Watier, 1994). Les conditions de culture (âge de la suspension bactérienne, le pH, l' a_w) influencent également la thermorésistance des spores (Craven, 1990 ; Hermier et Cerf, 1991 ; Watier, 1994). Par exemple, la thermorésistance est généralement maximale à pH 7,0 (Hermier et Cerf, 1991). La thermorésistance varie selon les espèces et peut également varier selon les souches d'une même espèce. En effet, chez *Cl. perfringens*, D_T varie de 3 à 145 min à 90°C (Labbé, 1989 ; Labbé et Chang, 1995), D_{90C} de 0,015 à 9 min (Frazier et Westhoff, 1978) ou encore de 14 min (3 % de sel à pH 5,5) à 123 min (3 % à pH 7) (Juneja et Majka, 1995). D'une façon générale, celles-ci ont une valeur de **D** comprises entre 26 et 31 min à 99°C (Juneja *et al.*, 1994).

La thermorésistance de la spore est en rapport avec la présence d'un constituant chimique spécifique absent des formes végétatives, l'**acide dipicolinique** (acide pyridine 2-6-dicarboxylique). Formé exclusivement au cours de la sporulation, l'acide dipicolinique est vraisemblablement produit

à partir de l'acide diamino-pimélique. Il se trouve sous forme de dipicolinate de calcium et représente 10 à 15 % du poids sec de la spore. Un autre constituant, l'acide L+ N-succinyl-glutamique, inexistant dans les premiers stades de la sporulation, est également susceptible de jouer un rôle dans la thermorésistance (Leclerc, 1975).

La déshydratation progressive de la spore au cours de sa maturation constitue un des événements majeurs conditionnant la propriété de thermorésistance (Hermier et Cerf, 1991). Cet état déshydraté est conservé grâce à l'imperméabilité des enveloppes et principalement du cortex (Leclerc, 1975).

2.1.4.2 Aux autres agents

La spore n'est pas uniquement thermorésistante. Sa résistance est aussi significative vis-à-vis d'autres agents physiques comme les rayons UV, les rayons X et surtout les hautes pressions (Leclerc, 1975).

La résistance des spores de *Cl. perfringens* aux radiations est variable : les spores isolées d'intoxications alimentaires sont plus résistantes aux radiations que les spores des souches dites "classiques". En général, les spores sont 5 à 15 fois plus résistantes aux radiations que les cellules végétatives de la même espèce. Cette différence est cependant plus petite que la différence entre leur thermorésistance. L'irradiation des spores augmente leur sensibilité au pH du milieu et cet effet est accru quand la température d'incubation s'éloigne de la température optimale de croissance.

Le contact des bactéries avec de nombreux agents chimiques ne semble pas exercer une influence néfaste sur leurs propriétés générales et leur survie. Les spores des bactéries sont beaucoup moins sensibles aux agents antiseptiques et aux désinfectants que les formes végétatives correspondantes (Farkas, 1994).

Par ailleurs, la haute pression agit sans délais de temps et est indépendante de la taille du produit et de sa géométrie. Elle est appliquée via un milieu la propageant (le plus souvent l'eau) et peut être efficace à température ambiante réduisant ainsi la quantité d'énergie thermique nécessaire pour la fabrication des produits alimentaires (Hoover, 1993). La technique de la haute pression connue depuis le siècle dernier permet, outre la modification des biopolymères (dénaturation des protéines, activation/inactivation des enzymes, formation de gels...), la modification de la flaveur ou de l'odeur,

l'inactivation des micro-organismes (Knorr, 1993). Les premières études de cette technique sur les micro-organismes concernaient les bactéries marines : *Pseudomonas bathycetes*, *Vibrio parahaemolyticus*... Ce dernier apparaît comme une des bactéries pathogènes la plus sensible à la haute pression. Les différents essais de résistance aux hautes pressions utilisaient des pressions allant de 1 000 à 10 000 atm. Cependant, les endospores des bactéries Gram⁺ *Bacillus* et *Clostridium* ne sont pas inactivées de façon importante par la pression hydrostatique alors que le nombre de spores d'autres bactéries peut être fortement abaissé après exposition à de très fortes pressions (Hoover, 1993).

2.1.5 Aspects génétiques de la régulation de la sporulation

Les progrès récents sur la génétique de la sporulation ont permis une meilleure compréhension de la sporulation, notamment grâce à l'obtention de très nombreux mutants qui bloquent la sporulation à certains stades nécessitant l'action d'une protéine spécifique. De façon générale, les gènes impliqués dans la sporulation sont dispersés sur le chromosome de *B. subtilis* et sont juxtaposés à côté de gènes n'ayant aucun rôle dans la sporulation. Deux grandes familles de gènes, les **gènes *spo*** (sporulation) et les **gènes *ger*** (germination) sont impliqués dans la sporulation. Les gènes de sporulation avaient été nommés en fonction du stade auquel une mutation du locus pouvait bloquer la cellule, indiquant ainsi par exemple qu'une mutation des gènes *spoII* et *spoIII* bloquent la sporulation aux stades II et III respectivement. Le lecteur intéressé trouvera des informations détaillées sur cette technique d'étude dans la revue de Piggot et Coote (1976). Les loci donnant un même phénotype mais placés en différentes positions du chromosome ont été distingués par des lettres capitales *spoIIA*, *spoIIB*, *spoIIC*... Leur dénomination originelle en gènes de sporulation ou de germination (Piggot et Coote, 1976) a toutefois été battue en brèche par les découvertes postérieures sur leur régulation. Outre ces deux grandes familles de gènes, d'autres gènes codant pour la production de petites protéines de l'enveloppe sporale qui sont solubles en milieu acide, les protéines des enveloppes sporales, ainsi que des enzymes intervenant durant la sporulation sont également impliqués dans la sporulation. La régulation est à considérer selon plusieurs directions.

a. Contrôle temporel de l'expression des gènes durant la sporulation

Les gènes de la sporulation sont divisés en 3 grandes familles selon qu'ils sont exprimés avant l'apparition du septum de sporulation (jusqu'à 65 min de sporulation), après son apparition (entre 65 et 105 min) ou après l'individualisation de la spore. En particulier, les gènes *spo0* sont souvent exprimés dans les cellules végétatives : en effet, leur expression contrôle l'initiation de la sporulation. Certains de ces gènes comme *spo0B* ne sont plus exprimés après l'initiation de la sporulation, d'autres montrent une expression croissante pendant les 30 premières minutes. Cette régulation transcriptionnelle est complexe et comprend des changements séquentiels d'activité durant une période d'environ 6 h après l'initiation de la sporulation.

b. Localisation cellulaire de l'expression des gènes

La surface externe de la spore contient au moins douze protéines différentes qui sont produites dans la cellule-mère. De même, la plupart des gènes exprimés après la formation du septum ne paraissent être exprimés que dans l'une des deux cellules formées. C'est le cas notamment du facteur σ^E qui semble localisé dans la cellule-mère, le futur sporange. Des expériences de fractionnement cellulaire semblent également démontrer que les gènes contrôlés par ce facteur σ ne sont exprimés que dans cette cellule également.

c. Dépendance de l'expression des gènes

Les interactions entre les gènes de sporulation ont été mesurées par l'étude de la dépendance de l'expression des gènes sur les produits codés par d'autres gènes. Aujourd'hui 12 classes de dépendances sont identifiées. Chaque classe comprend des gènes présentant une localisation et une période d'expression communes. Ainsi les gènes *spoIIA*, *spoIIIE* et *spoIIG* sont exprimés au stade préseptal et avant la formation du septum, soit avant 80 à 90 min de sporulation. C'est à cette période qu'est synthétisé également le facteur σ^E dans la cellule-mère. La classe 4 diffère de la classe 3 car elle démontre une expression plus importante des gènes *spoIIID* dans les mutants obtenus et la classe 5 montre au contraire une réduction de l'expression des gènes *spoIIID*. La classe 6 contient les gènes *gpr* spécifiques de la présore, tandis que les gènes *spoIIIG* (classe 7) répondent de façon différente aux mutations de *spoIIG*. Les gènes de la classe 8 *spoIVB*, *spoVA*, *gdh*, *gerA*, *gerD* et les gènes *ssp*

sont exprimés spécifiquement au stade de la présore à 150 min. Les 4 classes restantes contiennent des gènes répondant aux mutations de *gerE*. La classe 10 n'est pas influencée par les mutations de *gerE*, la classe 11 est surexprimée, les gènes de la classe 12 comprennent les gènes dépendants de *gerE*. La plupart des gènes dont les mutations interrompent le programme génétique codant pour des protéines de régulation. La dépendance apparente de l'expression des gènes à certains événements morphologiques pourrait indiquer l'existence d'une régulation de type feed back de la structure morphologique sur l'expression des gènes. Ces régulations semblent toutefois cantonnées aux tous premiers stades de la morphogénèse.

d. Facteurs de transcription

Les changements les plus significatifs dans la régulation des gènes au cours de la sporulation sont dues à l'apparition de nouveaux facteurs σ qui confèrent de nouvelles spécificités à l'ARN polymérase et activent de nombreux gènes. Le facteur de transcription majoritaire au stade de la cellule végétative est le facteur σ^A . Cinq facteurs σ minoritaires interviennent également dans la régulation de la transcription des gènes pendant la sporulation : σ^H , σ^E , σ^F , σ^G et σ^K . La régulation de la transcription peut être divisée en 5 étapes différentes, échelonnées dans le temps mais également localisées dans la cellule, chaque étape étant sous l'action d'un facteur σ spécifique. Les gènes exprimés au stade végétatif ou durant la première heure de la sporulation sont transcrits par la RNA polymérase contenant ou le facteur majoritaire σ^A , ou éventuellement le facteur σ^H . Après l'apparition du septum, 4 nouvelles activités de facteurs σ spécifiques de la sporulation apparaissent. Chacun contrôle un ou plusieurs gènes à même classe de dépendance : tous les gènes contrôlés par σ^E appartiennent à la classe 3, 4 et 5 ; σ^F dirige la transcription des gènes *gpr* et *spoIII*G des classes 6 et 7 ; σ^G contrôle les gènes de la classe 8 et certains gènes des classes 6 et 7 ; enfin σ^K contrôle la transcription des gènes des classes 9 à 12.

Dans le temps, la transcription des gènes dans la présore et la cellule-mère est dirigée par les facteurs $E\sigma^F$ et $E\sigma^E$, respectivement, durant les 2 premières heures après l'apparition du septum. Plus tard, ce sont les facteurs $E\sigma^G$ dans la présore et $E\sigma^F$ dans le sporange qui contrôlent la transcription.

D'autres protéines de la cellule exercent également un contrôle positif ou négatif sur la transcription des gènes de sporulation. Il est aujourd'hui démontré que les effecteurs de la régulation fonctionnent selon une cascade hiérarchique. Chaque facteur active une nouvelle classe temporelle de gènes et est nécessaire à la synthèse du facteur de transcription suivant. Il faut toutefois remarquer que la plupart des gènes de sporulation ne sont pas directement des régulateurs de transcription, mais contribuent à la fabrication des structures ou des enzymes de la spore. Le lecteur intéressé par ces aspects trouvera une mise au point détaillée de ces régulations dans la revue d'Errington (1993).

2.2 GERMINATION

La **germination** peut être définie comme la perte des propriétés de résistance de la spore et correspond à une série de transformations progressives de celle-ci pour devenir, finalement, une **nouvelle cellule végétative** (Moir *et al.*, 1994). Cette transformation peut se produire spontanément à la fin de la sporulation et peut s'effectuer en fonction de divers facteurs environnementaux comme la température, le pH, la force ionique... La germination non spontanée des spores exige l'apport de composés de faible poids moléculaire spécifique de l'espèce et de la souche tels que certains acides aminés (L-alanine), les riboses, les sucres, le lysozyme mais ce phénomène peut être atteint plus rapidement et plus complètement par l'utilisation combinée de substances germinatrices ou de milieux de culture complexes favorables à la germination (Gould, 1970 ; Leclerc, 1975).

2.2.1 Caractères généraux

Ce processus de germination comprend, après une phase facultative d'activation, deux phases principales :

- la phase initiale ou **initiation** : c'est une phase catabolique, irréversible, insensible aux inhibiteurs de la synthèse protéique ; elle se traduit par la perte de la thermorésistance, de la réfringence, de la perméabilité aux colorants et par la libération de constituants sporaux (Ca^{2+} , acide dipicolinique, fragments peptidiques). Le degré de thermorésistance des spores est lié à la composition du milieu de germination.

- la phase active ou **outgrowth** : c'est une phase de synthèses macromoléculaires aboutissant à l'émergence, puis à la division de la cellule végétative (Cassier et Sébald, 1969).

La germination complète est de durée variable, d'une spore individuelle à une autre. Ce phénomène peut s'effectuer en moins d'une heure mais il peut atteindre plusieurs jours à plusieurs semaines : nous parlons alors de "dormance" (Leclerc, 1975 ; Hermier et Cerf, 1991).

2.2.2 Facteurs affectant la germination

Un certain nombre de substances active la germination des spores : NaCl, chlorure d'ammonium (en action avec l'extrait de levure), L-cystine (en absence de glucose) et le bicarbonate de soude ainsi que des actions mécaniques (température de traitement thermique, pression) (Labbé, 1989 ; Sojka et Ludwig, 1994). Des spores peuvent germer en présence d'inosine, L-alanine, CaCl₂ ; par contre, le KCl ne favorise pas la germination. Un faible potentiel d'oxydo-réduction pourrait activer la germination (Labbé, 1989).

L'influence du pH sur la germination des spores de *Cl. perfringens* a été parfaitement étudiée dans un milieu complexe (Ahmed et Walker, 1971) : les spores germent aussi bien à pH 5,5 qu'à pH 7,0. Par contre à pH 9,5, le pourcentage de germination est réduit d'environ deux tiers. A pH 6,0, 85 % et 75 % de germination sont obtenus respectivement après 40 min à 45°C et 7°C, pourtant aucune croissance n'est observée à ces températures (Labbé, 1989).

Tout comme les spores de *Bacillus*, les spores de *Cl. perfringens* peuvent germer à la suite d'un traitement à la chaleur (65-80°C pendant 1 à 120 min). Ce traitement augmente l'hydrophobicité des spores intactes mais diminue celle des enveloppes sporales isolées (Craven et Blankenship, 1987 ; Ando *et al.*, 1985). Entre 30 et 50 % des spores de souches "classiques" (sensible à la chaleur et β-hémolyse) se développent sans traitement thermique. Cependant, entre 0,13 et 3,6 % des spores de souches impliquées dans les intoxications alimentaires (résistante à la chaleur et non hémolytique) se développent aussi sans ce traitement thermique (Labbé, 1989). En effet, le degré de thermorésistance des spores est lié à la composition du milieu de germination. Chez *Cl. perfringens*, les spores de toutes les souches dites thermosensibles réagissent au lysozyme après traitement thermique ; par contre, celui-ci est sans action sur la germination des spores des souches thermorésistantes (Cassier et Sébald, 1969). Pour certaines souches, de faibles valeurs de pH et de fortes températures sont efficaces pour accélérer le taux de germination.

Le traitement avec des solutions aqueuses d'alcools monohydriques active les spores de *Cl. perfringens* vers le processus de germination et suggère un site hydrophobe pour l'activation des spores (Craven et Blankenship, 1985).

2.2.3 Aspects génétiques de la régulation de la germination

Nous ne connaissons pas de façon précise le mécanisme moléculaire de l'étape d'initiation par des substances germinatrices. Cependant, les théories invoquent, en général, des rôles métaboliques ou allostériques pour ces molécules initiatrices : la substance germinatrice interagit avec un site spécifique dans la spore, appelé **récepteur de germination**. Ceci génère une sorte d'altération allostérique dans la structure et les propriétés du récepteur protéique. Si le récepteur est situé dans la membrane, ses modifications peuvent altérer les propriétés de perméabilité conduisant ainsi à la redistribution des ions et de l'eau dans la spore et à l'activation des processus spécifiques de dégradation. Selon un autre mécanisme possible, l'interaction de la substance germinatrice avec le récepteur conduit à l'activation par protéolyse spécifique d'une enzyme du cortex. Ces deux modèles existent mais les auteurs ne montrent pas de prépondérance de l'un par rapport à l'autre (Moir *et al.*, 1994).

Cependant, chez *Cl. perfringens*, le second modèle semble le plus probable. En effet, les spores de *Cl. perfringens* en germination contiennent de grandes quantités d'enzyme lytique qui agit directement sur les spores en dormance. L'enzyme est produite rapidement dans le milieu à pH 6,0 et à 45°C (Ando, 1979). Cette protéine d'initiation extracellulaire (IP) correspond probablement à une N-acetyl-muramyl-L-alanine-amidase de 31 kDa. Elle hydrolyse des fragments de spore corticale avec relargage de groupes aminés libres (Tang et Labbé, 1987 ; Miyata *et al.*, 1995). L'altération des spores par chauffage ou par action de produits alcalins inactive apparemment le système lytique normal, responsable de la dégradation du cortex pendant la germination (Duncan *et al.*, 1972a).

2.3 METHODES DE MESURE DE LA SPORULATION ET DE LA GERMINATION

Les quantités de spores bactériennes viables sont mesurées traditionnellement en chauffant à température élevée (75-80°C pendant 15 à 20 min). Cette technique inactive les cellules végétatives en les détruisant et active les spores. Un milieu composé de trypticase (1,5 %), d'extrait de levure

(1 %), et d'agar (1,5 %) est utilisé pour dénombrer les spores et les spores en germination (Harmon et Kauter, 1986). Par ailleurs, les spores peuvent être observées à l'état frais au microscope optique à contraste de phase où elles apparaissent réfringentes. Selon cette technique, nous pouvons dénombrer les spores libres, les cellules végétatives et les endospores (Labbé, 1989). Comme il a été expliqué précédemment, ces techniques sont complétées par des méthodes plus ou moins spécifiques de coloration (coloration de Gram, bleu de méthylène et vert malachite) mettant en évidence les cellules végétatives et les spores. Ces colorations seront présentées dans le chapitre "Matériels et Méthodes".

La sporulation est un phénomène relativement complexe mais bien connu grâce aux études réalisées sur des souches-type tels que *Bacillus subtilis* : en effet, de nombreuses études sur la structure de la spore, sur les modifications morphologiques de la cellule végétative pour obtenir une spore et sur la régulation génétique de la spore sont bien détaillées. Toutefois, peu d'essais ont été réalisés pour les souches de *Cl. perfringens* : en effet, la sporulation *in vitro* est difficile à maîtriser pour ce micro-organisme. Par ailleurs, le phénomène de germination est relativement peu étudié chez les souches modèle. Pourtant, par leur capacité à résister aux fortes températures et aux hautes pressions, les spores peuvent ensuite germer, se développer dans des conditions favorables et contaminer alors les aliments ; par conséquent, ce phénomène de sporulation et de germination devrait être plus étudié. En outre, pendant leurs transformations en spores, les cellules végétatives élaborent de nombreuses molécules notamment des toxines ou entérotoxines. Celles-ci sont principalement responsables des intoxications alimentaires et vont être présentées dans le paragraphe suivant.

3 . SYNTHÈSE DE TOXINES PAR LES FLORES DE CONTAMINATION

Le mot toxine est un terme très général pour désigner des molécules, plus spécifiquement des protéines, produites par différents organismes. La nature a doté ces molécules d'autant de vertus que de vices. En effet, certaines peuvent être dangereuses en provoquant des symptômes variés (fièvre,

insuffisance circulatoire, mort) alors que d'autres peuvent renforcer les défenses naturelles de l'organisme contre les bactéries, les virus ou les cellules cancéreuses. Ces toxines sont de nature bactérienne, virale ou peuvent provenir de champignons, d'insectes ou de serpents.

La classification des toxines bactériennes et principalement des entérotoxines est basée sur un ensemble de caractéristiques, notamment sur leurs activités diarrhéogéniques. Cependant, l'effet sécrétoire de ces molécules ne résulte pas toujours du même mécanisme, ce qui permet ainsi de les classer en deux catégories distinctes. Pour nombre d'entre elles, il invoque l'activation d'un système cyclasique et leur confère alors un véritable pouvoir cytotoxique (toxine cholérique, toxines de *Escherichia coli*, de *Shigella*, de *Salmonella*). Pour d'autres, cette réponse sécrétoire résulte principalement de leur pouvoir cytotoxique, de la réponse inflammatoire et des lésions qu'elles induisent dans l'intestin (entérotoxine de *Cl. perfringens* et vérotoxine de *Shigella*). Par ailleurs, la structure binaire est une caractéristique commune de certaines de ces entérotoxines. Celles-ci sont en effet constituées de deux unités :

- la sous-unité A porte l'activité biologique (toxique) et pénètre généralement dans la cellule ;
- la sous-unité B contient 4-5 sous-unités qui constituent l'étape initiale de la pathologie et en conséquence, ces récepteurs jouent un rôle aussi important que les toxines elles-mêmes au niveau des infections intestinales (Lucas *et al.*, 1991).

3.1 BACTERIES PRODUCTRICES DE TOXINES

3.1.1 Caractères généraux

Parmi les bactéries pathogènes impliquées dans les maladies intestinales, certaines libèrent des **toxines** ou des **entérotoxines**. Cette dernière est principalement responsable d'intoxications alimentaires chez l'homme. En effet, l'entérotoxine est une macroprotéine agissant essentiellement dans l'intestin d'où le terme "entérotoxine" utilisé pour la définir. La structure et le mode d'action de ces toxines sont hétérogènes (Lucas *et al.*, 1991). Sans reprendre les données de chaque souche, nous détaillerons les principales caractéristiques de ces molécules produites par les bactéries.

3.1.2 Exemples

3.1.2.1 *Clostridium botulinum*

Les neurotoxines botuliques sécrétées par *Cl. botulinum* sont les toxines les plus puissantes parmi les toxines bactériennes, animales, végétales et les composés chimiques toxiques (Sterne, 1981). Elles présentent une haute affinité pour les cellules nerveuses et provoquent des paralysies flasques en inhibant la libération de neuromédiateurs. Les neurotoxines botuliques sont synthétisées sous la forme d'une protéine d'environ 150 kDa, peu ou pas active. Cette protéine précurseur est activée par protéolyse en une forme mature qui est constituée d'une chaîne légère (L) d'environ 50 kDa et d'une chaîne lourde (H) d'environ 100 kDa reliées toutes les deux par un pont disulfure. Les neurotoxines botuliques sont associées à d'autres protéines non toxiques par des liaisons non covalentes pour former des complexes. Leurs tailles varient de 300 à 500 kDa selon le type toxinique. La fonction de ces complexes n'est pas clairement comprise. Cependant ils auraient un rôle protecteur de la neurotoxine botulique vis à vis des pH acides et des protéases. La neurotoxine botulique seule a une activité réduite par voie orale alors qu'elle est nettement plus activée après injection intrapéritonéale (Popoff, 1994).

3.1.2.2 *Staphylococcus aureus*

S. aureus est une des principales causes de nombreuses infections et est responsable de 10 à 15 % des épidémies bactériennes mondiales (Lehn *et al.*, 1995). Il produit 7 toxines de toxicité variable. Les différentes entérotoxines sont de simples protéines de poids moléculaire compris entre 26 et 30 kDa. Les simples chaînes de polypeptides sont reliées par un pont disulfure pour former une boucle cystine caractéristique. Quelques acides aminés de cette boucle sont identiques à chaque type d'entérotoxine et pourraient correspondre à la partie toxique de la molécule (Bergdoll et Robbins, 1973). Il a été rapporté que la toxine est produite à un taux appréciable à une température comprise entre 15,6 et 46,1°C mais le taux maximal est atteint à 40°C après 4 à 6 h d'incubation. La toxine est produite plus abondamment en absence de compétition entre bactéries. La nature de l'aliment a évidemment une influence sur la quantité d'entérotoxine produite : par exemple, peu de toxine est produite dans les saumons alors qu'elle est libérée en plus grande quantité dans la pâtisserie à base

Tableau 7 : Toxines de *Bacillus cereus* (Granum, 1994).

Toxines	Poids moléculaire de la molécule mature	Taille du signal peptidique	Caractéristiques
Entérotoxine	40 kDa	ND	altération de la membrane, sensible à la chaleur, protéolyse possible
Hémolysines			
cérolysine	56 kDa	ND	activée par un groupe thiol, sensible à la chaleur, protéolyse possible
hémolysine II	30 kDa	ND	sensible à la chaleur, protéolyse possible
sphingomyelinase	34 kDa	27 acides aminés	voir plus loin
Phospholipase C			
phosphatidylinositol hydrolase (PIH)	34 kDa	31 acides aminés	non métallo-enzyme, séquence homologue avec des enzymes eucaryotes et procaryotes
phosphatidylcholine hydrolase (PCH)	27 kDa	38 acides aminés	métallo-enzyme stable (Zn^{2+} ; Ca^{2+})
sphingomyelinase	34 kDa	27 acides aminés	métallo-enzyme stable (Mg^{2+}), hémolysine
Toxine hémétique	5-7 kDa		stable à 121°C, produit non métabolique, lipide (?)

ND : non déterminé

de crème ; en effet, la présence d'amidon en quantité importante dans la pâtisserie est supposée favoriser la production de toxine par *S. aureus*. L'entérotoxine est résistante à la chaleur : des traitements de pasteurisation (72°C pendant 15 min) ou UHT (143,3°C pendant 95 sec) ne sont pas suffisants pour inactiver l'entérotoxine. Le taux de mortalité suite à l'intoxication à *S. aureus* est faible. Aucun traitement n'est donné sauf dans le cas extrême où une solution saline peut être administrée pour restaurer la balance en sels et éviter la déshydratation (Frazier et Westhoff, 1978).

3.1.2.3 *Bacillus cereus*

Sept toxines sont produites par *B. cereus* : 6 d'entre elles sont libérées au cours de la croissance végétative et sont sécrétées par les cellules (Schultz et Smith, 1994). Toutes ces toxines ont perdu un peptide-signal au cours de leur sortie ; par conséquent, la protéine mature est plus petite que la protéine transcrite. La septième toxine, l'hémétique est probablement produite à partir d'éléments présents dans les aliments pendant la croissance de *B. cereus* mais peu d'études ont été réalisées à ce sujet.

Le Tableau 7 présente les différentes caractéristiques des toxines de *B. cereus*. L'entérotoxine est responsable d'intoxications alimentaires dont les symptômes apparaissent après une période d'incubation de 8 à 16 h. L'entérotoxine est une protéine simple sans activité hémolytique. Elle est produite dans le côlon et possède un poids moléculaire de 40 kDa. Elle est instable à pH inférieur à 4, elle est dégradée par la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine. Elle peut être produite dans des conditions anaérobies à un taux comparable à celui obtenu en anaérobiose (Granum *et al.*, 1993). Cependant, l'entérotoxine de *B. cereus* est au moins 100 fois plus toxique que l'entérotoxine de *Cl. perfringens* (Granum, 1994).

3.1.2.4 *Vibrio cholerae*

La toxine cholérique est produite au cours d'infections intestinales dues à *V. cholerae*, micro-organisme se développant dans l'intestin grêle de l'homme. La maladie du choléra jadis tant redoutée n'est aujourd'hui mortelle que dans les zones sous-médicalisées. La toxine est une molécule de 54 kDa formée de deux entités séparément non toxiques : l'une d'elles (le composant B) est constituée de 5 sous-unités de 11,6 kDa chacune et porte le site de fixation de la toxine sur son

récepteur membranaire. L'autre (le composant A) comporte deux sous-unités de 24 et 5,4 kDa (A1 et A2) reliées par un pont disulfure. Le composant A est responsable de l'activité toxique de la molécule. Cette toxine agit en activant un système adénylate cyclase dans l'entérocyte et provoque un flux d'eau et d'électrolytes dans la lumière intestinale (Lucas *et al.*, 1991).

3.1.2.5 *Salmonella*

Les salmonelloses résultent de l'ingestion de cellules du genre *Salmonella* et correspondent aux infections les plus fréquentes (80 %). Les souches produisent au moins deux facteurs proches de la toxine cholérique au niveau de leur activité biologique. Quelques unes de ces molécules sont thermostables, leurs poids moléculaires seraient assez élevés (proche de 90 kDa). Par ailleurs, certaines souches de *Salmonella* élaborent une entérotoxine thermolabile dont l'activité biologique est proche de celle de la toxine cholérique (Lucas *et al.*, 1991). Cependant, cette protéine est difficile à étudier parce qu'elle est produite en très faible quantité et cela présente, par conséquent, des difficultés d'étude, notamment pour l'homogénéité de la purification (Chopra *et al.*, 1994). *S. typhimurium* produit une entérotoxine dont le gène a été cloné. Cette protéine serait codée par une séquence de 6,3 Kbase similaire à celle du gène de la toxine cholérique ou de l'entérotoxine labile d'*Escherichia coli*. Elle serait constituée de plusieurs sous-unités de 45, 26 et 12 kDa (Lucas *et al.*, 1991).

3.1.2.6 *Escherichia coli*

E. coli, bien que présent dans la flore normale de l'intestin humain et de plusieurs animaux est responsable chez ces individus, principalement chez le porc, d'infections intestinales parfois hémorragiques quand le taux de bactéries est important (Sacks, 1975). *E. coli* produit 2 classes d'entérotoxines différentes par leur stabilité thermique. L'entérotoxine thermolabile (LT) est très proche de la toxine cholérique avec qui elle possède notamment une forte parenté antigénique et un mode d'action analogue. Cette toxine de 85 kDa est constituée de deux composantes. L'une d'elles comporte 5 sous-unités B de 11,5 kDa chacune, l'autre est un peptide de 25,5 kDa constitué de deux entités : A (21-23,5 kDa) et A2 (11-13 kDa) (Gill *et al.*, 1981 ; Lucas *et al.*, 1991). Le composant B se lie avec un récepteur gangliosidique et le composant A active l'adénylate cyclase sur l'entérocyte ;

ceci conduit aux mêmes effets sécrétoires dans l'intestin que la toxine cholérique (Panda *et al.*, 1995). Les toxines thermostables (ST) sont produites par certaines souches d'*E. coli* mais également par d'autres bactéries (*Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* et certaines souches de *Salmonella*). Elles sont constituées d'une seule chaîne polypeptidique de 2,5-10 kDa. Les toxines ST produites par *E. coli* appartiennent à deux catégories (STa et STb). Elles comportent à l'état mature, 18 et 48 acides aminés respectivement, et leurs poids moléculaires oscillent entre 2,5 et 5 kDa. Elles disposent également de 6 molécules de cystéine reliées par 3 ponts disulfure qui leur confèrent une grande résistance à la chaleur. La fixation de la STa sur son récepteur cellulaire induit l'activation de la guanylate cyclase intestinale (Dreyfus *et al.*, 1993). A l'inverse de la toxine cholérique ou de la LT, la STa de *E. coli* est spécifique de l'épithélium intestinal et n'exerce son activité toxique que sur l'entérocyte (Lucas *et al.*, 1991).

3.1.2.7 *Shigella dysenteriae*

S. dysenteriae type 1, micro-organisme de cette espèce bien connue, produit une entérotoxine dans l'intestin, qualifiée de shiga-toxine ou vérotoxine suite à l'effet toxique qu'exerce cette molécule sur les cellules Véro. Cette toxine de 70 kDa est constituée de deux unités. L'unité A est un polypeptide de 30,5 kDa portant l'activité toxique de la protéine clivable en deux sous-unités A1 et A2 de 27,5 et 3 kDa, respectivement. La seconde unité de cette toxine est constituée de 4-5 sous-unités B de 7-11 kDa chacune. Cette structure est analogue à celle de la toxine cholérique ou de la LT de *E. coli*, bien que la vérotoxine ne présente pas de parenté antigénique avec ces dernières (Lucas *et al.*, 1991).

3.1.2.8 *Campylobacter jejuni*

Parmi les souches de *Campylobacter*, *C. jejuni* est impliqué dans des cas d'intoxications alimentaires. En effet, cette bactérie libère 3 principales toxines ; la plus fréquente est une entérotoxine labile de 60 à 70 kDa. Elle est sécrétée activement dans l'iléon et agit sur les cellules épithéliales en se fixant à un récepteur gangliosidique. Elle possède une activité ADP-ribosylase (Smibert, 1986 ; Granum *et al.*, 1995 ; Sears et Kaper, 1996). Les 2 autres toxines sont des cytotoxines labiles pour lesquelles peu d'études ont été réalisées ; c'est pourquoi leur rôle dans la maladie n'est pas encore connu (Sears et Kaper, 1996).

Tableau 8 : Activités biologiques des toxines produites par *Cl. perfringens*. Les doses létales 50 (DL 50) sont données pour la souris après injection intraveineuse (d'après McDonel, 1980 ; Hatheway, 1990 ; Rood et Cole, 1991)

Toxine	Nature des activités biologiques (outre la dermonécrose, l'hémolyse et la létalité)	Nécrose du derme	Hémolyse <i>in vitro</i>	Létalité	DL 50 ng
α	augmentation de la perméabilité capillaire hémolyse intravasculaire, thrombose capillaire cytotoxicité (cellules musculaires, leucocytes, plaquettes) hypotension, bradycardie	+	+	+ a	50
β	augmentation de la perméabilité capillaire cytotoxicité nécrose de la muqueuse intestinale paralysie de la motricité intestinale hypertension, bradycardie	+	-	+ a	8
ϵ	augmentation de la perméabilité capillaire hyperglycémie, glucosurie cytotoxicité (macrophages de lapins et cobayes) augmentation du péristaltisme intestinal oedème et nécrose du cerveau, nécrose des reins hypertension	+	-	+ a	0,32
ι	augmentation de la perméabilité capillaire cytotoxicité	+	-	+ a	1560
δ	cytotoxicité (leucocytes, plaquettes sanguines) dilatation de l'anse ligaturée du cobaye	ND	+	+ b	60
θ	hémolyse intravasculaire, thrombose capillaire cytotoxicité oedème pulmonaire	+	+	+ b	167
κ	oedème et hémorragies du poumon hémorragies intramusculaires	+	-	+ b	30000
λ	destruction tissulaire	-	-	-	-
μ	digestion tissulaire	-	-	-	-
ν	ND	-	-	-	-
sial 1	hémagglutination augmentation de la viscosité du sang, thrombose capillaire destruction récepteurs et jonctions cellulaires	-	-	-	-
sial 2	hémagglutination augmentation de la viscosité du sang, thrombose capillaire destruction récepteurs et jonctions cellulaires	-	-	-	ND
non $\alpha\theta\delta$	ND	-	+	ND	ND
ent.	cytotoxicité (épithélium intestinal, cellules Vero) dilatation de l'anse ligaturée de nombreuses espèces érythèmes de la peau chez le lapin et le cobaye	+	-	+ b	1400

+ : activité présente
 - : activité absente
 sial 1 : sialidases extracellulaires
 sial 2 : sialidase intracellulaire
 a : létale sans concentration
 b : létale avec concentration
 ND : non déterminé
 ent. : entérotoxine

Tableau 9 : Nature et principales caractéristiques des toxines produites par *Cl. perfringens* (Hatheway, 1990)

Toxine	Protéine mature					Support génétique	Gène cloné
	Nature	Taille (kDa)	Nbre d'acides aminés	pI	Activité enzymatique		
α	simple chaîne	43	370	5,4	phospholipase C, sphingomyélinase	chromosome	oui
β	simple chaîne	40	ND	5,6	ND	(plasmide)	non
ϵ	simple chaîne	34	311 297 ^a	8 5,5	"perméase"	ND	non
ι	double chaîne	48	ND	5,2	ADP-ribosylase	ND	non
	iota-a	72	ND	4,2	ND		
δ	simple chaîne	42	391	9,1	ND	ND	non
θ	simple chaîne	51	466	6,9	ND	chromosome	oui
κ	simple chaîne	81	ND	5	collagénase	ND	non
λ	ND	36	ND	ND	protéase	plasmide	oui
μ	ND	11	943	ND	hyaluronidase	chromosome	oui
ν	ND	ND	ND	ND	désoxyribonucléase	ND	non
sial 1	ND	64, 105, 310	ND	4,7 à 5,4	ac.N-acétylneuraminique glycohydrolase	ND	non
sial 2	simple chaîne	43	382	??	ac.N-acétylneuraminique glycohydrolase	chromosome	oui
ent.	simple chaîne	35	320 296 ^a	4,3 ??	"perméase" "perméase"	chromosome	oui

sial 1 : sialidases extracellulaires

sial 2 : sialidase intracellulaire

^a : nombre d'acides aminés après activation par la trypsine

ND : non déterminé

() : demande confirmation

Nbre : nombre

3.2 PRINCIPALES TOXINES DE *Clostridium perfringens*

Cl. perfringens a la capacité de synthétiser toute une série de toxines ou d'enzymes pouvant transformer divers substrats. Chaque grande classe de toxines majeures et mineures sera successivement décrite et les principales méthodes de détection pour chacune d'elles seront exposées. Les toxines majeures sont impliquées dans la manifestation de la maladie alors que les toxines mineures ne le sont pas. Le Tableau 8 présente l'activité biologique déterminée pour la majorité des protéines ainsi que la dose létale (DL 50) pour laquelle 50 % de mortalité dans la population de souris est obtenu. Par ailleurs, le Tableau 9 montre la nature, la taille et l'activité enzymatique des toxines qui n'ont pas été, jusqu'à présent, déterminées pour chacune. Il en est de même pour le support génétique et le gène de la toxine.

3.2.1 Toxines létales majeures

3.2.1.1 Toxine α

La toxine alpha est une zinc métalloenzyme multifonctionnelle possédant à la fois une activité phospholipase C et une activité sphingomyélinase responsable de cytotoxicité, nécrose et hémolyse. C'est la première toxine bactérienne reconnue comme une enzyme (phosphatidylcholine choline-phosphohydrolase ; E.C. 3.1.4.3.). La toxine purifiée est une protéine simple chaîne d'un poids moléculaire de 43 kDa avec un pI de 5,4 (Jolivet-Reynaud *et al.*, 1988 ; Hatheway, 1990). Le clonage du gène de la toxine a été réalisé en 1989 (Saint-Joanis *et al.*, 1989). Le gène de structure de 1197 bases code pour un peptide de 399 acides aminés (Hatheway, 1990). Une modification de ce gène a été réalisée pour produire une toxine modifiée pour l'étude des vaccins. Cette étude a clairement montré le rôle essentiel de cette molécule dans les cas de gangrènes gazeuses dues à *Cl. perfringens* (Rood et Lyrstis, 1995). Dans les cinq toxinotypes de *Cl. perfringens*, le gène de la toxine alpha est situé sur le chromosome au même locus, près de l'origine présumée de répllication entre deux opérons codant pour les ARN ribosomiaux, zone la mieux conservée. La toxine mature de 370 acides aminés, après libération du peptide-signal de 29 acides aminés, a été étudiée et comparée à la phospholipase C de *B. cereus* au niveau de sa séquence et de sa structure cristalline (Rood et Cole, 1991). L'extrémité NH₂-terminale de la phospholipase C correspond à la structure de l'enzyme trouvée chez *B. cereus*

(Saint-Joanis *et al.*, 1989). L'activité sphingomyélinase est portée par l'extrémité COOH-terminale chez *Cl. perfringens*. Cette extrémité COOH contribue au maintien de la forme active de la toxine (Nagahama *et al.*, 1994) et ne montre pas d'homologie avec celle du gène de la sphingomyélinase de *B. cereus*. L'hémolyse résulte des deux activités enzymatiques conjointes (Rood et Cole, 1991). Les quantités variables de toxines observées dans les différents milieux ont été attribuées aux différences de concentration de Zn^{2+} et Ca^{2+} , cofacteurs essentiels au fonctionnement de la toxine (Rood et Cole, 1991 ; Nagahama *et al.*, 1995). La présence de toxine alpha repose sur le caractère hémolytique de ces enzymes.

L'omniprésence de *Cl. perfringens* dans l'intestin de la plupart des espèces ainsi que la production d'un grand nombre de toxines différentes par toutes les souches de *Cl. perfringens* font qu'il est difficile de développer un test suffisamment sensible et spécifique pour la toxine alpha dans des liquides biologiques complexes en recourant à des antisérums polyclonaux. C'est pourquoi, plusieurs équipes ont préparé des anticorps monoclonaux spécifiques qui permettront à l'avenir, par l'intermédiaire de tests de type ELISA par exemple, la détection, la quantification et l'étude de l'activité de cette toxine (Sato *et al.*, 1989 ; Titball *et al.*, 1991). L'expression du gène cloné dans *E. coli* permettra également d'obtenir plus facilement des antisérums polyclonaux spécifiques (Rood et Cole, 1991).

3.2.1.2 Toxine β

La toxine bêta est une protéine produite par les toxinotypes B et C de *Cl. perfringens* (Tableau 1). La toxine purifiée est constituée d'une simple chaîne et possède un poids moléculaire de 40 kDa et un pI de 5,6. Ces propriétés sont très proches de celles de la toxine alpha et rendent la purification de la toxine bêta difficile (Sakurai et Fujii, 1987 ; Hatheway, 1990). Une autre équipe rapporte un poids moléculaire de 28 kDa pour la même protéine et mentionne sa sensibilité à la chaleur et à la trypsine ; cette enzyme clive rapidement la molécule en 2 fragments de 15 et 13 kDa (Jolivet-Reynaud *et al.*, 1986). Bien qu'un groupe de recherche ait rapporté la présence du gène de la bêta-toxine sur un plasmide, cette affirmation n'a jamais pu être confirmée (Rood et Cole, 1991).

La difficulté de purification de cette toxine a longtemps empêché la fabrication en grande quantité d'un sérum spécifique pour ce facteur. Les techniques immunologiques, telles que l'immunodiffusion, ont été fort peu utilisées, excepté pour le contrôle lors du processus de purification de la toxine (Sakurai et Fujii, 1987). Le caractère labile de cette toxine dans les produits biologiques ainsi que la faible sensibilité des tests biologiques ont rendu nécessaire le développement de tests immunologiques de seconde génération tels que des tests ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) de type sandwich faisant intervenir des anticorps polyclonaux (Cato *et al.*, 1986) ou monoclonaux (Hansen *et al.*, 1992). Un de ces tests permet de détecter la présence d'un ng de toxine purifiée par mL (Sakurai et Fujii, 1987). Récemment, Borrmann et Schulze (1995) ont montré l'utilité des lignées cellulaires Vero pour la détection de cette toxine.

3.2.1.3 Toxine ϵ

Comme les toxines α , β et ι , la toxine ϵ est à la fois létale et nécrosante bien que son activité biologique n'ait pas été déterminée avec précision. La toxine epsilon est libérée par les souches de toxinotypes B et D de *Cl. perfringens* (Tableau 1). Elle est produite comme une prototoxine qui peut être activée par des enzymes protéolytiques libérées par le même organisme (les toxines kappa et lambda) par la trypsine ou la chymotrypsine. La prototoxine purifiée est une protéine de 311 acides aminés et d'un poids moléculaire de 34 kDa (Habeeb, 1975). L'activation par la trypsine correspond à la scission d'une liaison entre les acides aminés 14 et 15 de l'extrémité NH₂-terminale (Lys-14-Ala-15) et à la libération d'un peptide de 14 résidus (Hatheway, 1990 ; Rood et Cole, 1991).

Outre les tests classiques faisant intervenir la létalité chez la souris ou la nécrose du derme chez le cobaye, des tests immunologiques ont été développés pour détecter spécifiquement cette protéine, comme par exemple des techniques d'immunodiffusion radiale ou des tests d'héماغglutination passive réverse. Des tests de type ELISA sandwich faisant intervenir des sérums polyclonaux ont été décrits (Nagahama *et al.*, 1991). Un de ces tests permet de détecter jusqu'à 0,1 ng de toxine purifiée par millilitre. Des anticorps monoclonaux spécifiques, neutralisant l'effet toxique ou non ont été produits et pourront être utilisés dans des tests diagnostiques encore plus spécifiques

(Daube, 1993). Ces dernières années ont vu apparaître un test de détection basé sur l'agglutination sur latex (Martin et Naylor, 1994). Cette méthode facile à mettre en oeuvre permet d'obtenir une sensibilité et une spécificité plus faibles que par la méthode ELISA.

3.2.1.4 Toxine ι

La toxine iota est la dernière des 4 toxines létales majeures et est produite uniquement par le toxinotype E (Tableau 1). Cette toxine est constituée de deux protéines distinctes qui sont immunologiquement et biochimiquement différentes, appelées iota-a et iota-b. Les deux composants sont séparables par isoélectrofocalisation et montrent des pI de 5,2 et 4,2. Les poids moléculaires sont de 48 et 72 kDa. Un mélange des deux est nécessaire à l'activité biologique mesurée par les tests de létalité sur souris ou de dermonécrose chez le cobaye. La chaîne légère (iota-a) possède une activité enzymatique ADP-ribosylante vis-à-vis de la polyarginine (Simpson *et al.*, 1987) et de l'actine non musculaire comme vis-à-vis de celle des muscles striés (Hatheway, 1990). La chaîne lourde (iota-b) ne semble pas avoir d'activité enzymatique, ni d'influence sur l'activité enzymatique de la chaîne légère mais est probablement nécessaire à la fixation de la toxine iota-a aux cellules-cibles (Simpson, 1987 ; Perelle, 1993). Rien n'est actuellement connu au sujet de la génétique de la production de la toxine iota (Rood et Cole, 1991).

Les deux tests classiques de séroneutralisation de la létalité et de la dermonécrose ont été utilisés depuis 1943 pour détecter ce facteur de virulence. Récemment, un test ELISA sandwich utilisant des anticorps polyclonaux a été développé et permet de détecter jusqu'à 1 ng de protéine purifiée par mL (Nagahama *et al.*, 1991).

3.2.2 Toxines létales mineures

3.2.2.1 Toxine δ

La toxine delta a été décrite seulement dans les toxinotypes B et C (Tableau 1). La protéine purifiée est une simple chaîne d'un poids moléculaire de 42 kDa, d'un pI de 9,1 et est composée de 391 acides aminés. L'activité est inhibée par les gangliosides mais non par les autres composés lipidiques comme la sphingomyéline, lécithine ou cholestérol (Hatheway, 1990). Rien n'est connu

du rôle génétique de cette toxine.

La seule méthode de détection utilisée met à profit le caractère hémolytique de cette toxine. Pour la distinguer de l'action des toxines alpha ou thêta, celles-ci sont inhibées spécifiquement : la première par adjonction de citrate de sodium et la seconde de cholestérol ou par un antisérum anti-toxinotype A qui contient des anticorps neutralisants pour ces deux hémolysines (Alouf et Jolivet-Reynaud, 1981).

3.2.2.2 Toxine θ

La toxine thêta, aussi appelée perfringolysine O, peut être produite par des souches appartenant aux cinq toxinotypes. C'est une cytolysine sensible à l'oxygène, thiol-activée, similaire mais non identique à des hémolysines (streptolysine O, pneumolysine, alvéolysine, thuringiolysine, listériolysine O...) produites par d'autres espèces bactériennes (*Streptococcus pyogenes* et *pneumoniae*, *Clostridium tetani* et *novyi* et des espèces des genres *Bacillus* et *Listeria*). Elle est inactivée de façon irréversible par le cholestérol libre et de façon réversible par l'oxydation. Le gène de structure (*pfoA*) a récemment été cloné, séquencé et caractérisé. Une séquence ouverte de lecture a été détectée en amont du gène de la toxine (*pfoR*) et pourrait être impliquée dans le contrôle de l'expression de celui-ci. La séquence primaire de la toxine thêta déduite de la séquence du gène, révèle une protéine native de 494 acides aminés de laquelle un peptide-signal de 28 acides aminés est libéré au moment de la sécrétion. La protéine mature a un poids moléculaire de 51 kDa. La toxine possède une homologie de séquence de 65 % avec la streptolysine et de 42 % avec la pneumolysine. Ces trois hémolysines montrent une région identique de 12 acides aminés qui inclut le seul résidu cystéine de la molécule et qui est identique dans la thiol-activation de celle-ci (Hatheway, 1990 ; Rood et Cole, 1991). La toxine thêta pourrait être avec la toxine alpha un des facteurs essentiels impliqué dans la gangrène gazeuse par son effet nécrosant (Rood et Cole, 1991).

Les principales méthodes de détection sont basées sur le caractère hémolytique de cette protéine et sur la propriété de létalité (Yamakawa *et al.*, 1977).

3.2.2.3 Toxine κ

La toxine kappa peut être produite par les cinq toxinotypes. C'est une collagénase qui découpe le muscle en cellules musculaires par hydrolyse enzymatique du collagène (Aikat et Dible, 1956). L'enzyme a un haut degré de spécificité ; elle n'attaque que le collagène et les dérivés du collagène. Cette protéine est une simple chaîne de 81 kDa. Son rôle génétique n'est pas connu (Rood et Cole, 1991).

La digestion d'un fragment de collagène (morceau de tendon) est le test le plus spécifique pour détecter la présence de toxine kappa ; cependant, ce test est beaucoup moins sensible que la méthode à l'"azocoll" (poudre de cuir couplée avec un colorant) basée sur la mesure de la quantité de colorant libérée dans le milieu (Oakley *et al.*, 1946 ; Oakley et Warrack, 1953) ou que la méthode mesurant son action sur la gélatine (Pivnick *et al.*, 1964). Ces deux derniers tests demandent la neutralisation de l'effet de la toxine lambda, éventuellement présente, par un antisérum spécifique anti-toxine lambda non disponible dans le commerce (Daube, 1993).

3.2.2.4 Toxine λ

La toxine lambda n'a pas été détectée dans les toxinotypes A et C. C'est une enzyme de type protéinase qui digère la gélatine, l'hémoglobine et la caséine mais pas le collagène. Elle est antigéniquement différente de la toxine kappa. Le poids moléculaire de la protéine mature est de 36 kDa (Jin *et al.*, 1996). Le gène de cette protéine est porté par un plasmide de 70 kDa dans une souche de type B de *Cl. perfringens* (Blaschek et Solberg, 1981).

Cet antigène peut être détecté par deux méthodes, l'une utilisant de la poudre de cuir couplée à un colorant (méthode à l'"azocoll") (Oakley *et al.*, 1946 ; Oakley et Warrack, 1953) et l'autre de la gélatine (Pivnick *et al.*, 1964). L'action de la toxine kappa doit être neutralisée par un sérum préparé contre une souche ne produisant pas de toxine lambda.

3.2.2.5 Toxine μ

La toxine mu est une hyaluronidase qui dégrade l'acide hyaluronique en glucosamine. Elle peut être produite par les cinq toxinotypes. Son poids moléculaire est de 114 kDa. Cette toxine semble

être organisée en 2 domaines, une extrémité N-terminal de 700 acides aminés et un segment de 300 résidus (Canard *et al.*, 1994). Récemment le gène *nagH* d'une endo-bêta-N-acétylglucosaminidase qui semble correspondre à la toxine mu a été cloné. Le gène est présent sur le chromosome, près de l'origine de réplication et en aval du gène de la toxine thêta, dans toutes les souches de *Cl. perfringens* et code pour une protéine sécrétée (peptide-signal de 30 acides aminés) de 97 kDa (Rood et Cole, 1991).

Cette activité "hyaluronidase" peut être mesurée en déterminant la diminution de viscosité qui se produit durant l'incubation de l'enzyme avec de l'acide hyaluronique (Daube, 1993).

3.2.2.6 Toxine ν

La toxine nu est une nucléase qui pourrait correspondre à une endonucléase extracellulaire récemment caractérisée. Son poids moléculaire n'est pas connu. Cette molécule est très thermolabile et est inhibée par des ions divalents de cuivre et de zinc ainsi que le citrate de sodium et le monoiodoacétate (Rood et Cole, 1991).

Les seuls tests décrits datent de 1951 et font intervenir l'action de la toxine sur des frottis de leucocytes (Warrack *et al.*, 1951) ou de désoxyribonucléate de sodium, extraits de la rate de cheval. Actuellement, la disponibilité d'ADN purifié permet d'utiliser des méthodes plus simples de diffusion en milieu gélosé contenant de l'ADN pour identifier cette activité (Daube, 1993).

3.2.2.7 Sialidases

La plupart des souches de *Cl. perfringens* produisent une neuraminidase ou sialidase (E.C. 3.2.1.18) qui clive les résidus d'acide acétylneuraminique des glycoprotéines, glycolipides et oligosaccharides essentiellement à la surface des cellules eucaryotes supérieures où ils participent aux procédés de communications et d'étiquetage cellulaire. Trois formes distinctes de l'enzyme (64, 105 et 310 kDa) ont été mises en évidence. Les deux plus grosses molécules correspondent à différents multimères et sont associées à des hémagglutinines (Rood et Cole, 1991). La molécule de 64 kDa montre un pI de 4,3. Récemment, elle a été complètement purifiée en une seule forme de 69 kDa. Cette toxine peut être produite par des souches des cinq toxinotypes (Hatheway, 1990). Cependant, des tests sensibles n'ont pu démontrer la production de cette toxine par certaines souches (Fraser,

1978). Le gène *nanH* a été cloné et le produit du gène possède une activité "neuraminidase" qui ne correspond pas aux formes précédemment décrites. Ce produit est une protéine cytoplasmique de 382 acides aminés de 43 kDa dont la présence montre des homologies avec d'autres sialidases déjà identifiées. La présence de ce gène a été localisée sur le chromosome près du site d'intégration d'un bactériophage (Canard et Cole, 1989 ; Hatheway, 1990).

La détection de l'activité enzymatique est effectuée par la mesure spectrophotométrique de la quantité d'acide N-acétyl-neuraminique libérée à partir d'un substrat glycoprotéique bien défini en un temps donné (Fraser, 1978).

3.2.2.8 Autres molécules

Les toxines gamma et éta ont été définies en fonction des résultats de neutralisation obtenus avec des antisérums spécifiques mais des substances correspondant à ces entités n'ont pas encore été identifiées (McDonel, 1980). Une hémolysine appelée non $\alpha\delta\theta$ car elle n'est détectée qu'après neutralisation des trois autres a été décrite. Rien n'est connu de son rôle génétique, ni de sa nature. Elle est produite par certaines souches de type C et n'est pas neutralisée par des antisérums contenant des anticorps contre les autres hémolysines. D'autres hydrolases que celles décrites ci-dessus ont aussi été rapportées : une β -D-glucuronidase, des α et β -D-galactosidases, plusieurs N-acétyl- β -D-glucosaminidases exocellulaires et endocellulaires et une α -L-fucosidase (Daube, 1993).

Ces données énoncées dans ce paragraphe nous informent que de nombreuses toxines libérées par les micro-organismes sont impliquées dans les intoxications alimentaires et très souvent responsables de diarrhées parfois associées à des dommages tissulaires. Leur structure, leurs modes d'action et les techniques de dosage sont très bien connus et sont hétérogènes. Cependant, les conditions et les cinétiques de production de ces toxines ainsi que le métabolisme carboné lors de la libération de ces toxines ne sont pas actuellement étudiés.

La classification des toxines est basée sur un ensemble de caractéristiques que nous venons de décrire. Cependant, la liste n'est pas exhaustive. Pour être complet, nous aurions pu parler des entérotoxines LT ou ST produites par certaines souches d'*Aeromonas*, de *Yersinia* ou de *Klebsiella*,

bactéries responsables d'infections intestinales notamment chez le jeune enfant. Cependant, nous n'avons présenté que les principales toxines impliquées. Parmi les nombreuses toxines libérées, *Cl. perfringens* produit une entérotoxine, principale responsable des intoxications alimentaires qui est présentée dans le paragraphe suivant.

4 . PRODUCTION DE L'ENTEROTOXINE DE *Clostridium perfringens*

Bien que l'entérotoxine de *Cl. perfringens* (CPE) n'ait été caractérisée que dans les années 1970, elle a suscité un grand nombre de travaux scientifiques. Le fait qu'elle soit impliquée dans un phénomène pathologique atteignant l'homme dans le monde entier n'y est certainement pas étranger.

4.1 ENTEROTOXINE

4.1.1 Etudes préliminaires

L'entérotoxine est principalement produite par les souches de *Cl. perfringens* de type A mais elle a été détectée chez les souches de type C et D et ses propriétés sont proches de celles de l'entérotoxine des souches de type A (Skjelkvale et Duncan, 1975 ; Uemura et Skjelkvale, 1976 ; McDonel et Demers, 1982 ; Stelma *et al.*, 1985 ; Labbé, 1989).

En 1973, Frieben et Duncan pensent que l'entérotoxine correspond à une tunique de la spore de *Cl. perfringens* mais il est vite démontré qu'elle est une toxine à part entière (Ryu et Labbé, 1989). Aussi, les résultats de Frieben et Duncan pourraient s'expliquer par la présence de petites quantités de CPE piégée entre le centre et les tuniques de la spore (McClane, 1992).

4.1.2 Lien entre la production d'entérotoxine et la sporulation

Bien qu'il ait été démontré que les cellules végétatives peuvent produire de faible quantité d'entérotoxine (Duncan *et al.*, 1972b ; Niilo, 1977) et que certaines souches sporulent de façon satisfaisante sans production d'entérotoxine (Skjelkale *et al.*, 1978), le lien entre la formation de spores et la production d'entérotoxine est cependant bien établi. La production d'entérotoxine semble être associée à la fréquence de la sporulation (Wrigley, 1994) : des souches avec une faible fréquence

Tableau 10 : Principales caractéristiques de l'entérotoxine de *Cl. perfringens* (Rood et Cole, 1991).

Propriétés	Caractéristiques de l'entérotoxine
produit du gène	320 acides aminés ; poids moléculaire 35 391 Da
entérotoxine activée	24 à 34 acides aminés éliminés à partir du NH ₂ terminal par la trypsine (<i>in vitro</i>) ; nouveau poids moléculaire 31 472 Da
pI	4,3
stabilité thermique	instable à une température supérieure à 53°C
coefficient de Stokes	2,6 mm
liaison SDS	irrégulier ; 0,39 g/g de protéine
solubilité	faible (3,94 ± 0,22 mg/mL à pH 7,0 et 25°C)
groupement thiol libre	un
domaine de structure	deux domaines, N-terminal (cytotoxique) et C-terminal (récepteur)
activité biologique	formation de pore ; perméabilité altérée, flux d'ion, inhibition de la synthèse de macromolécules ; désintégration du cytosquelette par le Ca ²⁺ ; lyse cellulaire

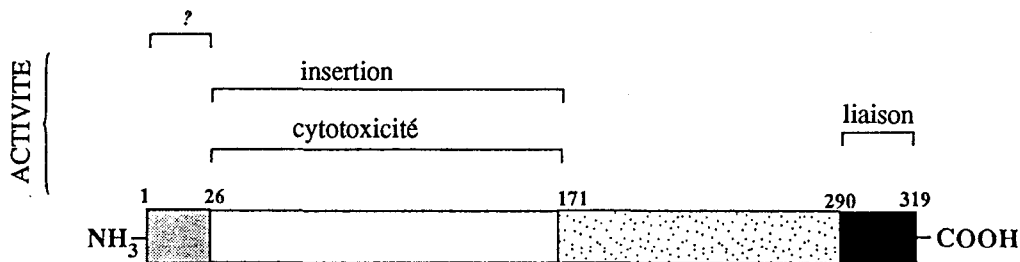


Figure 5 : Carte des régions fonctionnelles de l'entérotoxine de *Cl. perfringens* (McClane, 1994)

de sporulation *in vitro* tendent à produire peu d'entérotoxine. Nous pouvons alors penser que les souches sporulantes entérotoxine⁻ ne sont pas associées aux gastro-entérites. Cependant, une seule souche sporulante considérée négative par des essais biologiques produirait environ 1 ng/mL d'entérotoxine détectée par réaction immunologique et enzymatique. Un ng/mL d'entérotoxine pourrait donc être la concentration nécessaire pour provoquer une gastro-entérite chez l'homme. Toutefois, la fonction de l'entérotoxine dans la sporulation n'est pas connue (Granum *et al.*, 1984).

4.1.3 Caractéristiques biochimiques

L'entérotoxine de *Cl. perfringens* (CPE) est une protéine de 320 acides aminés et d'un poids moléculaire de 35 kDa. Cette toxine peut être activée *in vitro* par la trypsine avec la libération de la partie terminale, un peptide de 24 à 34 acides aminés (4 kDa) (Granum *et al.*, 1981 ; Salinovich *et al.*, 1982 ; Rood et Cole, 1991). Les principales caractéristiques de l'entérotoxine sont regroupées dans le Tableau 10.

La protéine est principalement composée d'aspartate, de sérine, de leucine, de glutamate, d'isoleucine, de glycine, de thréonine et d'un résidu cystéine. Il n'existe pas d'homologie entre la séquence de l'entérotoxine et les autres toxines de séquences connues (Labbé, 1989). L'entérotoxine semble posséder au moins 2 domaines d'activités distincts, l'un (extrémité NH₂-terminale) est responsable de la cytotoxicité, l'autre (extrémité COOH-terminale) est responsable de la fixation à un récepteur (Horiguchi *et al.*, 1987 ; Hanna *et al.*, 1989 ; Rood et Cole, 1991; Mc Clane, 1992). Elle contient un groupement SH libre. La Figure 5 présente la carte des régions fonctionnelles de l'entérotoxine (McClane, 1994).

L'entérotoxine est très hydrophobe et possède 43 % des acides aminés hydrophobes. L'analyse par dichroïsme circulaire suggère que la CPE contient approximativement 80 % de feuillet β et 20 % d'hélice α (McClane, 1994).

La protéine est sensible à la congélation-décongélation. La CPE stockée à 37°C pendant 7 jours ou à -20°C pendant 28 jours perd son activité biologique mais ne perd pas son activité sérologique. Cependant, il n'y a pas de perte d'activité biologique ou sérologique à 4°C pendant plusieurs semaines (Labbé, 1989). Des stockages à des pH extrêmes (pH < 5 ou pH > 10) et l'action des protéases provoquent rapidement une perte de son activité biologique. La pronase et la subtilysine inactivent

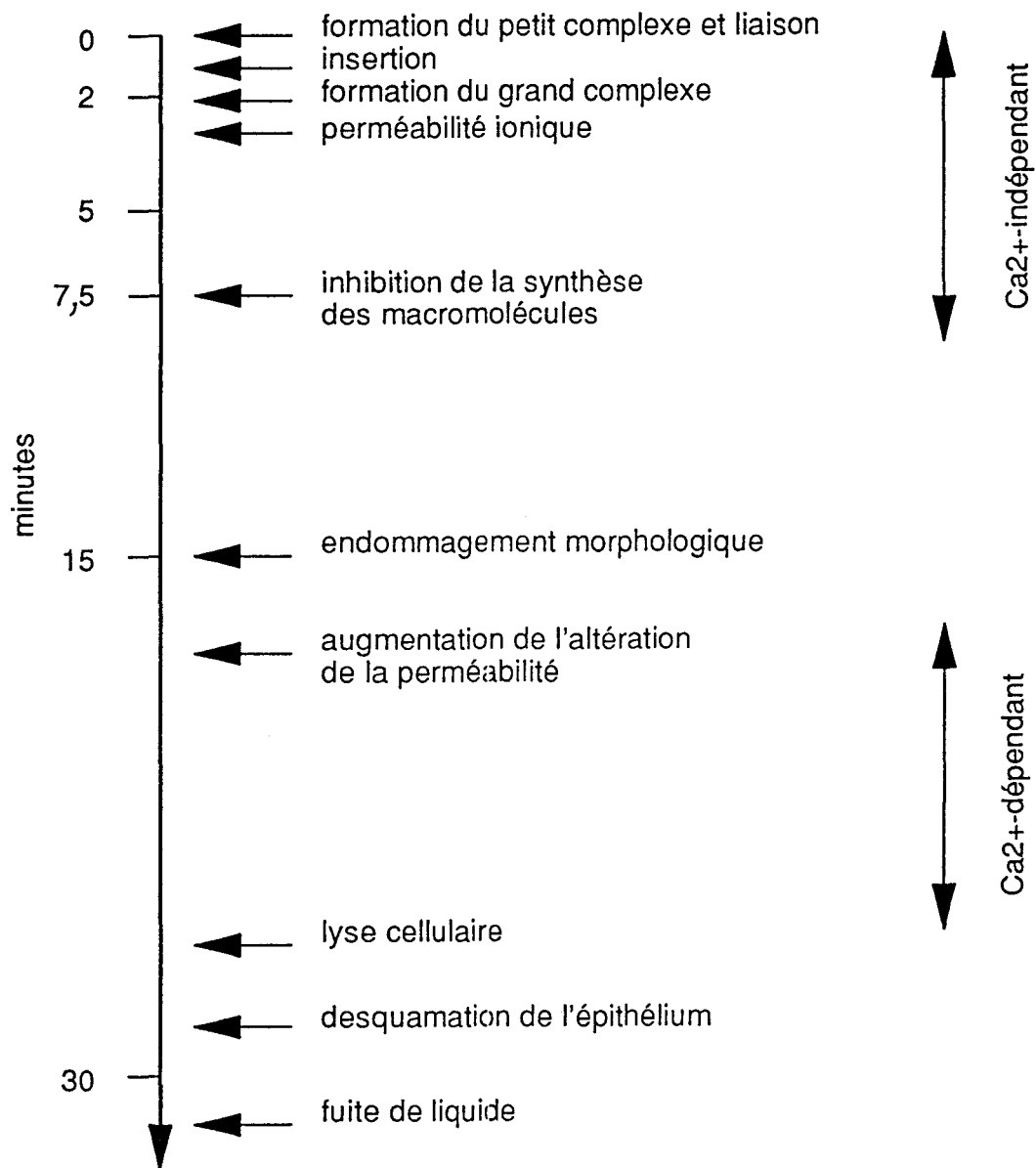


Figure 6 : Action de l'entérotoxine de *Cl. perfringens* (McClane, 1994)

la CPE alors que l'action limitée de la trypsine ou la chymotrypsine intestinale (et les autres protéases) activerait l'entérotoxine dans le côlon au cours de l'intoxication alimentaire (McClane, 1994). La lyophilisation est la meilleure forme de stockage de l'entérotoxine (Labbé, 1989).

4.1.4 Activité biologique

De multiples études tendent à expliquer son activité biologique. L'action de l'entérotoxine reste unique en comparaison avec les autres toxines connues des bactéries précédemment citées et pour plusieurs raisons :

- la CPE n'apparaît pas affecter les quantités de AMPc présentes dans l'intestin ;
- la CPE inhibe l'absorption intestinale de glucose ;
- la CPE provoque des dommages du tissu intestinal apparaissant 15 à 30 min après l'action de la molécule.

La CPE agit différemment par rapport aux autres entérotoxines. En effet, soit ces dernières ne produisent pas de détériorations visibles des tissus (toxine cholérique), soit les endommagements apparaissent après une période de traitement plus ou moins longue (toxine de *Shigella*). L'entérotoxine de *Cl. perfringens* agit rapidement : 30 min uniquement sont nécessaires pour passer de l'état de liaison de la CPE à la formation de cellules endommagées (McClane 1992 et 1994). La Figure 6 présente le mécanisme d'action de l'entérotoxine.

Mode d'action de l'entérotoxine

- la liaison

La liaison de la CPE aux cellules de la bordure en brosse est rapide, saturable, dépendante de la température (la fixation est plus importante à 37°C qu'à 4°C). Elle est essentielle pour l'expression de la cytotoxicité de la CPE (McClane, 1992). Les récepteurs de l'entérotoxine sont de nature protéique et sont abondamment présents à la surface de la bordure en brosse des cellules épithéliales des villosités intestinales. Plus de 10⁶ récepteurs sont estimés par cellule. Leur abondance à la surface de telles cellules suggère que ces récepteurs protéiques jouent un rôle dans la physiologie normale de la cellule. McClane, en 1994, démontre que les récepteurs à la CPE ont une taille de 50 kDa et 70 kDa.

- la formation d'un complexe

La CPE fixée aux membranes des cellules de la bordure en brosse forme un grand complexe de 160 kDa constitué de deux molécules réceptrices, respectivement de 70 kDa et de 50 kDa (Wnek et McClane, 1989). La finalité précise de ce complexe n'est pas élucidée ; cependant deux hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer la participation de ce large complexe dans la cytotoxicité de la CPE. L'ensemble des deux molécules forme un "pore" dans la membrane provoquant directement l'altération de la membrane. Dans un cas, ce phénomène ne se produit pas spontanément. Dans un autre cas, ce complexe renferme quelques protéines de membrane qui modulent les flux des molécules à travers la membrane (McClane, 1994).

- l'insertion membranaire de l'entérotoxine

Les travaux réalisés jusqu'à maintenant ne permettent pas d'affirmer que l'insertion membranaire de la CPE a bien lieu et des études supplémentaires devraient être envisagées. En effet, McClane (1992) émet deux hypothèses sur l'éventualité de l'insertion de la CPE :

- soit la CPE ne s'insère pas dans la membrane à cause du caractère hydrophile de la protéine. Celle-ci reste alors localisée à la surface de la membrane après liaison ;
- soit l'insertion de la CPE requiert la participation de protéines eucaryotes qui restent à l'extérieur.

Bien que le mécanisme d'insertion ne soit pas encore bien établi, la seconde hypothèse semble la plus probable. La CPE s'insère rapidement et spontanément dans les membranes. Dans ce cas, il paraît difficile de séparer l'entérotoxine de la membrane. Toutefois, l'insertion apparaît être un évènement essentiel dans l'expression de la cytotoxicité (McClane, 1994).

- les effets sur la perméabilité de la membrane plasmique

L'entérotoxine sous forme de complexe crée des petits trous dans la membrane plasmique altérant ainsi sa perméabilité, mais ces trous permettent un passage non sélectif des molécules inférieures à 200 daltons (ions et acides aminés) entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Ces premiers effets modifient l'équilibre osmotique. La CPE provoque des troubles de la production d'énergie, de l'entrée du glucose et de la synthèse des macromolécules (Wnek et McClane, 1986 et

1989). Les effets de la CPE sur les membranes n'impliquent pas des messagers intermédiaires ou l'activation de cascades métaboliques. Cette étape est indépendante de la quantité de Ca^{2+} libre. Le Ca^{2+} est nécessaire à la seconde phase du phénomène de cytotoxicité qui se traduit par des dommages morphologiques et des altérations graves de la perméabilité résultant de la perte de solutés (molécules de 3 à 5 kDa) et par une rapide lyse cellulaire. Ces lésions s'accompagnent par un flux de liquide dans l'intestin et de la diarrhée (McClane et Wnek, 1990 ; Daube, 1992 ; McClane, 1994).

4.1.5 Gène *cpe*

Le gène de l'entérotoxine n'a pas été cloné en une seule fois mais il a pu être reconstitué grâce aux fragments chevauchants séquencés par différentes équipes (Hanna *et al.*, 1989 ; Iwanejko *et al.*, 1989 ; van Damme-Jongsten *et al.*, 1989). Nous ne connaissons encore rien sur le mécanisme de contrôle de la transcription de ce gène et sur l'identification du promoteur (Rood et Cole, 1991). Cependant, un aperçu épidémiologique d'un certain nombre de souches de *Cl. perfringens* révèle que le gène *cpe* n'est présent que dans 6 % des isolats étudiés bien qu'au cours d'une étude récente de souches de *Cl. perfringens* impliquées dans les cas d'intoxications alimentaires, 60 % des isolats aient été trouvés positifs à l'hybridation (van Damme-Jongsten *et al.*, 1990). Plusieurs souches peuvent porter le gène *cpe* mais dans certaines souches, celui-ci peut ne pas s'exprimer. Il a été montré que les souches entérotoxine⁻ peuvent devenir entérotoxine⁺ après traitement thermique (75°C pendant 20 min) et après plusieurs sporulations successives (Andersson *et al.*, 1995). Le gène a été localisé sur le chromosome d'une souche de *Cl. perfringens* de type A ou sur un grand plasmide mais la présence de ce facteur dans des souches de plusieurs toxinotypes tendrait à impliquer un apport génétique mobile de ce gène pour ce facteur (Cornillot *et al.*, 1995). Cependant aucune étude n'a pu mettre en évidence le gène de cette toxine sur aucun des plasmides extraits de nombreuses souches entérotoxigènes (Skjelkavale et Duncan, 1975 ; PhilipsJones *et al.*, 1989). Alors qu'il a été localisé sur le chromosome des souches induisant les intoxications alimentaires, le gène *cpe* a été trouvé sur le plasmide de souches d'origine animale. Il est montré que le gène *cpe* peut être perdu à partir du chromosome de souches initialement entérotoxine⁺ (Andersson *et al.*, 1995). Les souches entérotoxine⁻ peuvent aussi produire de l'entérotoxine pendant la sporulation mais en quantité insuffisante pour provoquer l'intoxication alimentaire (Granum, 1990).

De grandes quantités d'entérotoxine sont libérées dans le cytoplasme après activation du gène *cpe* par des facteurs transcriptionnels qui contrôlent les gènes de la sporulation. L'accumulation de l'entérotoxine peut provenir d'aggrégation, de la formation d'un corps d'inclusion et d'un blocage de petites quantités de protéine pendant la biogénèse de la spore (Rood et Cole, 1991). Très récemment, Shih et Labbé (1996) montrent que certaines souches de *Cl. perfringens* possèdent un facteur favorisant la sporulation. Celui-ci est produit à la fois par les souches entérotoxine⁺ et les souches entérotoxine⁻ de *Cl. perfringens* de type A à E. Ce facteur a un poids moléculaire compris entre 1000 et 5000 Da, il est stable à la chaleur et est résistant aux acides. Par conséquent, l'environnement acide de l'intestin de l'homme stimulerait la sporulation des souches entérotoxine⁺ et entérotoxine⁻ puis par la suite activerait la production d'entérotoxine par les souches entérotoxine⁺. Mais il s'agit là des toutes premières informations concernant le mécanisme de sporulation chez *Cl. perfringens*.

4.1.6 Méthodes de dosage

Des tests immunologiques, génétiques (van Damme-Jongsten *et al.*, 1990) ou biologiques très nombreux ont été employés pour mettre en évidence ce facteur de virulence, soit dans les selles, soit dans des extraits de culture où *Cl. perfringens* a sporulé.

Les tests biologiques principalement utilisés sont : la production d'érythème sur la peau de cobaye albinos (Hauschild, 1970 ; Starck et Duncan, 1971 et 1972 ; Niilo, 1975 ; Naik et Misra, 1978), le test de létalité sur souris (après concentration) (Niilo, 1975), l'accumulation de liquide dans l'anse intestinale ligaturée du lapin (McDonel et Duncan, 1975 et 1977 ; Naik et Misra, 1978 ; Duncan *et al.*, 1968 ; Duncan et Strong, 1969) ou de souris (Yamamoto *et al.*, 1979). L'entérotoxine exerce un effet cytotoxique sur les cellules Véro (McClane et McDonel, 1979 et 1980 ; Uemura *et al.*, 1984 ; Lindsay, 1988 ; McClane, 1989). Cet effet est à la base des tests diagnostiques immunologiques les plus utilisés actuellement (Mahony *et al.*, 1989 ; McClane, 1989).

Des tests immunologiques très nombreux ont été mis au point comme l'immuno-diffusion double (Niilo, 1988), l'électro-immunodiffusion (Duncan et Somers, 1972), la contre-immuno-électrophorèse (Naik et Duncan, 1977b), l'hémagglutination passive réverse (Duncan *et al.*, 1973 ; Genigeorgis *et al.*, 1973 ; Uemura *et al.*, 1973 ; Dowell *et al.*, 1975 ; Niilo, 1978) ou

l'immuno-fluorescence (Niilo, 1977). Récemment des tests d'agglutination sur latex et des tests ELISA se sont révélés plus faciles à mettre en oeuvre (Niilo et Cho, 1984 ; Bartholomew *et al.*, 1985 ; Berry *et al.*, 1988). Des anticorps monoclonaux ont été préparés contre cette protéine et sont utilisés dans des tests encore plus spécifiques (Wnek *et al.*, 1985 ; Horigushi *et al.*, 1986). Des sondes oligonucléotidiques ont été préparées pour détecter la présence des gènes dans les souches entérotoxigènes (van Damme-Jongsten *et al.*, 1989 et 1990). L'hybridation s'est révélée plus fiable que les tests ELISA (Olsvik *et al.*, 1982) probablement à cause de l'irrégularité de la synthèse de ce facteur de virulence *in vitro*. Parmi tous les tests possibles, seul le test avec agglutination sur billes de latex est actuellement commercialisé depuis 1989 par Oxoid.

4.2 FACTEURS AFFECTANT LA SPORULATION ET LA PRODUCTION D'ENTEROTOXINE

Comme nous venons de le voir dans les paragraphes précédents, *Cl. perfringens* libère une entérotoxine principale responsable des intoxications alimentaires. Cette protéine est libérée au cours de la sporulation de cette souche. Sa concentration est fonction d'un certain nombre de paramètres qui peuvent la favoriser ou au contraire l'inhiber. En connaissant davantage l'influence de ces paramètres sur la production d'entérotoxine, les industriels peuvent tenter de limiter les cas d'intoxications alimentaires dues à *Cl. perfringens*. Au cours de ce paragraphe, vont être présentés les principaux facteurs pouvant affecter la sporulation et donc la production d'entérotoxine.

4.2.1 Influence du milieu de culture

L'abondance des articles à ce sujet montre qu'il est difficile de faire sporuler *in vitro* une souche de *Cl. perfringens* de façon reproductible. Obtenir un fort pourcentage de sporulation (90 %) est souvent empirique et cela fait appel à de nombreuses variations des milieux employés.

Initialement, le milieu couramment utilisé pour la croissance et la production des toxines de *Cl. perfringens* était le milieu à la viande cuite (Cooked Meat Medium). Ce milieu toujours employé est commercialisé sous forme de granules deshydratés et est d'utilisation facile. Il peut être utilisé pour la sporulation mais aussi pour la préparation de stocks de souches. Celles-ci peuvent être

congelées, sans inconvénient, pendant plusieurs années sans perte de viabilité. Cependant, la pratique montre qu'un tel milieu ne peut être utilisé pour certains mutants à sporulation pour lesquels la lyophilisation est la méthode la plus appropriée (Labbé, 1989).

Parce que *Cl. perfringens* sporule faiblement dans un milieu de culture ordinaire, un certain nombre de milieux différents ont été proposés pour la sporulation de cette espèce (Ellner, 1956 ; Gibbs et Hirsch, 1956 ; Kim *et al.*, 1967 ; Duncan et Strong, 1968 ; Sacks et Thompson, 1978 ; Tortora, 1984 ; Phillips, 1986).

Le milieu Duncan et Strong (DS) est le plus couramment utilisé avec de légères modifications (Duncan et Strong, 1968) : l'addition du raffinose à la place de l'amidon et la présence de di/tri-méthylxanthine (caféine, thréonine, théophylline) favorisent la formation des spores et la production d'entérotoxine (Sacks et Thompson, 1977 et 1978 ; Labbé et Rey, 1979). Pour certaines souches, le taux de sporulation est influencé par la nature du substrat de croissance (Sacks et Thompson, 1977). Par contre, l'addition de sels biliaires fait abaisser le nombre de spores résistantes à la chaleur (Hickey et Johnson, 1981).

En 1978, Sacks et Thompson élaborent un nouveau milieu : le milieu défini D dans lequel glucose et dextrine constituent les seules sources de carbone. Shih et Labbé en 1994 montrent que la présence de concentrations croissantes de glucose dans le milieu D diminue le taux de spores. Cependant, l'addition de petites quantités de glucose avant la phase exponentielle de croissance supprime la sporulation et la présence de glucose après l'initiation de la sporulation n'inhibe pas la formation de spores.

4.2.2 Température

La température de sporulation est proche de celle obtenue pour la croissance. Elle est comprise entre 35 et 40°C : 37-38°C sont les températures couramment utilisées (Labbé, 1989).

4.2.3 pH

Etant donné que le micro-organisme doit traverser l'estomac pour rejoindre l'intestin où la sporulation a lieu, sa capacité à former des spores peut être affectée par l'environnement acide (Wrigley *et al.*, 1995). En effet, des pH bas affectent la survie des cellules et diminuent la production

d'entérotoxine (Wrigley, 1994). Les bactéries dans la phase stationnaire de croissance sont plus résistantes aux acides et peuvent donc facilement sporuler. Wrigley *et al.* (1995) montrent que certaines souches produiraient plus de spores et d'entérotoxine en fonction de la durée du temps de contact avec l'environnement acide. Cette observation a été confirmée par Shih et Labbé en 1996. Les hydrates de carbones rapidement métabolisables ne sont pas utilisés dans les milieux de sporulation : ils répriment le processus de sporulation et sont fortement fermentés par *Cl. perfringens* en produisant ainsi de grande quantité d'acides. Une sporulation satisfaisante a lieu à un pH compris entre 6,0 et 8,0 mais la plupart des milieux de sporulation décrivent un pH spécifique de 7,5 voire plus élevé. Le pH initial du milieu DS est de 7,4 à 7,5 et diminue à 7,0 quand la sporulation a eu lieu. Quand le pH du milieu DS augmente, la croissance cellulaire et le nombre de spores formées diminuent mais le pourcentage de sporulation ne semble pas être affecté (Craven, 1990).

4.2.4 Potentiel d'oxydo-réduction

Aucune étude au cours de laquelle le potentiel d'oxydo-réduction varie et le taux de sporulation est déterminé n'a été réalisée. Cependant, Pearson et Walker en 1976 montrent qu'au cours de la sporulation, le potentiel d'oxydo-réduction diminue jusqu'à -450 mV pendant la phase exponentielle de croissance et augmente légèrement pendant la sporulation.

Naik et Duncan en 1977a rapportent que le nombre maximum de spores comptées dans un milieu contenant du boeuf cuit est obtenu après 12 h d'incubation dans des conditions anaérobies alors qu'il est obtenu après 24 h dans des conditions aérobies. Par conséquent, la sporulation est sensible aux conditions d'anaérobiose.

4.2.5 Activité de l'eau

La plage de valeurs de l' a_w pour lesquelles la sporulation est observée est proche de celle déterminée pour la croissance. Cependant, dans le milieu de Ellner (Ellner, 1956) la plus faible valeur de l' a_w permettant la sporulation est de 0,98. Dans ces conditions, le taux de spores est faible, entre 10^0 et 10^2 /mL approximativement et il est de 10^4 et 10^6 /mL avec une a_w de 0,992 (Labbé, 1989).

4.2.6 Autres facteurs

Les spores de *Cl. perfringens* pré-traitées par du dithiothreitol (DTT) deviennent sensibles à la lyse par H₂O₂ en présence de Cu²⁺. La lyse est provoquée par le radical OH formé par la décomposition catalysée du peroxyde (Ando et Tsuzuki, 1986).

Les spores de la souche NCTC 8798 deviennent sensibles à l'inhibition par le HCl, le nitrite de sodium et à un mélange polymyxine/néomycine quand elles sont activées par une température de 70 à 100°C (Chumney et Adams, 1980). La présence d'antibiotiques tels que la nétrisine ou la distamycine à des concentrations respectives de 1,0 et 0,1 µg/mL stimule faiblement la sporulation de la souche NCTC 8798 (Ryu et Labbé, 1992). Par ailleurs, la souche NCTC 8679 est capable de sporuler sur le milieu défini D en présence de 30 mM d'acides organiques (acétate, lactate ou butyrate) (Shih et Labbé, 1996). De plus, l'addition d'entérotoxine purifiée à une concentration de 640 µg/mL active le processus de sporulation des souches de *Cl. perfringens* (Dillon et Labbé, 1989).

Les nombreuses études sur l'entérotoxine de *Cl. perfringens* sont essentiellement basées sur sa structure, son mode d'action, sur ses caractéristiques biochimiques, sur les méthodes de dosage et sur les facteurs affectant sa production. De plus, la production d'entérotoxine pendant la sporulation de la bactérie et le rôle de cette protéine dans les cas de maladies gastro-intestinales sont bien établis maintenant : 8 à 10 mg d'entérotoxine purifiée provoquent des intoxications alimentaires (Wrigley, 1994). Cependant, les conditions de libération de l'entérotoxine sont peu connues. Par conséquent, il serait intéressant de les déterminer dans le but d'essayer d'abaisser le taux des intoxications alimentaires.

5 . CONCLUSION ET PROGRAMME DE RECHERCHE

Parmi les principaux agents contaminants bactériens, *Clostridium perfringens* est responsable de 3 à 4 % des intoxications alimentaires totales et se situe au troisième rang des intoxications alimentaires en France après les infections à *Salmonella* et *Staphylococcus aureus*. Les infections à *Cl. perfringens* sont cependant rarement mortelles mais une attention particulière doit être portée chez les jeunes enfants et les personnes âgées. La virulence de ce micro-organisme résulte de sa

capacité à libérer des toxines. Parmi les 13 types de toxines produites, une entérotoxine est libérée au cours de la sporulation dans l'intestin de l'homme. Elle induit des modifications morphologiques des cellules épithéliales et est responsable des intoxications alimentaires. Si certains aspects biologiques de ce micro-organisme tels que les toxines produites, la structure de l'entérotoxine et la localisation du gène de cette protéine, les interactions de cette dernière sur les cellules épithéliales, l'organisation génomique de *Cl. perfringens* et le mécanisme de production de spores sont bien décrits, les études du métabolisme et les conditions de libération de l'entérotoxine par cette bactérie ont rarement été approfondies jusqu'à présent. C'est pourquoi, nous allons étudier d'une part, les conditions de sporulation et de production d'entérotoxine par des souches et d'autre part, le métabolisme carboné des cellules en phase végétative et au cours de la sporulation. Pour cela, nous utilisons 3 souches de *Cl. perfringens* : une souche sauvage (NCTC 8798) et 2 souches mutantes (8-6 et R3) issues de la souche sauvage. Nous identifierons les modifications physiologiques intervenant chez ces bactéries au cours de la sporulation et par conséquent au cours de la production d'entérotoxine. Dans un premier temps et à partir des données bibliographiques, nous allons suivre la croissance, la sporulation et dans certains cas, la production d'entérotoxine de ces souches sur différents milieux de croissance ou de sporulation. Nous avons donc fait varier un certain nombre de paramètres portant sur la préculture ou directement sur le milieu de culture de façon à comparer les capacités à sporuler entre souches et à déterminer les facteurs pouvant influencer la production d'entérotoxine par les souches étudiées. Ces résultats permettront de déterminer les conditions optimales de sporulation pour lesquelles un taux important de spores (80 à 100 %) est obtenu *in vitro* au laboratoire. Ensuite, l'étude du métabolisme de ces bactéries sur ces différents milieux nous amènera à comparer leur comportement métabolique en fonction de la nature du substrat de croissance et de l'état physiologique des souches. Ainsi les modifications physiologiques observées pourront être identifiées pendant la sporulation et donc au cours de la production d'entérotoxine par les différentes souches de *Cl. perfringens*.

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

1 . TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES

1.1 SOUCHES

Trois souches de *Clostridium perfringens* de type A ont été étudiées. La souche NCTC 8798 et son mutant 8-6 à germination lysozyme dépendante ont été fournies par le Dr. G. Daube de la Faculté de Médecine Vétérinaire de Liège (Belgique). La souche R3, révertant de la souche 8-6, nous a été donnée par le Dr. M. Sébald de l'Institut Pasteur (Paris).

1.2 METHODES DE CULTURE ANAEROBIE

Cl. perfringens est une bactérie sensible à l'oxygène et exige une anaérobiose stricte. Sa culture nécessite des conditions particulières bien adaptées : nous avons utilisé la technique d'anaérobiose de Hungate modifiée par Miller et Wolin en 1974. Cette méthode permet la culture de bactéries extrêmement sensibles à l'oxygène, ce que nous ne pouvons pas obtenir facilement en boîte de Pétri ou en chambre anaérobie. Elle emploie des tubes et des flacons contenant un milieu de culture liquide spécifique des bactéries. Les tubes sertis sont inoculés sous une atmosphère azotée.

1.3 MILIEUX DE CULTURE

1.3.1 Préparation

De façon à obtenir des milieux exempts d'oxygène, ceux-ci sont d'abord portés à ébullition pour éliminer l'oxygène dissous puis ils sont refroidis sous azote. Ensuite, ils sont répartis sous azote dans des tubes ou des flacons (10 mL à 1,2 L) préalablement gazés et sont fermés par des bouchons butyls imperméables aux gaz. Les flacons sont ensuite stérilisés par autoclavage 30 min à 120°C. Ajouts, ensemencements, prélèvements sont effectués stérilement par pique à l'aide de seringues à travers le bouchon butyl. Cette technique est appliquée pour la fabrication des milieux de culture et les milieux spécifiques à la sporulation.

1.3.2 Conditions de croissance

Le premier milieu de culture utilisé est celui de Zeikus et Wolfe (1972), modifié par Samain *et al.* en 1982. Ce milieu est utilisé à la fois pour la conservation des souches et pour l'étude de la

physiologie de *Cl. perfringens*. C'est un milieu pauvre, semi-synthétique et minéral complété par de l'extrait de levure et de la peptone tryptique de caséine. Il est appelé de façon courante au laboratoire BCYT (Basal Carbonate Yeast Trypticase) (Annexe 1). Avant utilisation du milieu, deux solutions sont ajoutées stérilement à raison de 2 % (v/v) : une solution réductrice (cystéine-HCl-1,25 % - Na₂S-1,25 %) pour abaisser le potentiel d'oxydo-réduction et maintenir ainsi l'anaérobiose et une solution de glucose pour obtenir une concentration de 11 mM dans le milieu. L'ensemencement est réalisé à 2 % (v/v) à partir d'une préculture sur le milieu BCYT + glucose (11 mM).

Le second milieu de culture utilisé est le milieu FTG (Thioglycolate à la résazurine, Difco Laboratories). La composition de ce milieu prêt à l'emploi est détaillée en Annexe 2. C'est un milieu riche contenant 30 mM de glucose et 5 g/L d'extrait de levure. Il est ensemencé à 0,5 % à partir d'une préculture sur le milieu BCYT + glucose (11 mM).

La température d'incubation est de 37°C.

1.3.3 Conditions de sporulation

Les précultures utilisées pour ensemencer les milieux de sporulation sont de 2 natures : le milieu BCYT + glucose (11 mM) et le milieu FTG. Le milieu de préculture est ensemencé respectivement à 2 et 0,5 % d'une culture provenant du milieu BCYT + glucose. Un traitement à la chaleur (75°C pendant 15 min) de la préculture effectuée sur le milieu FTG est nécessaire, en particulier pour les souches 8-6 et R3, pour éliminer les cellules végétatives et sélectionner les cellules résistantes à la chaleur qui sporuleront par la suite. Les précultures sont incubées à 37°C pendant 16 à 18 h (Ryu et Labbé, 1989) pour le milieu FTG et 6 à 8 h pour le milieu BCYT + glucose. Ces milieux de préculture serviront à ensemencer les 2 milieux de sporulation : le milieu DS (Duncan et Strong, 1968) (Annexe 3) et le milieu défini D (Sack et Thompson, 1978) (Annexe 4).

Le milieu DS contient du raffinose (7,93 mM) comme substrat de croissance alors que le milieu D contient du glucose (11 mM) et de la dextrine de maïs (3,50 g/L). L'ensemencement des 2 milieux de sporulation est effectué avec un inoculum de 2 % à partir de l'une ou l'autre des précultures. L'incubation des milieux D et DS s'effectue à 37°C.

1.3.4 Entretien et conservation des souches

Les souches de *Cl. perfringens* peuvent être conservées selon 2 méthodes : par lyophilisation ou par congélation. Pour la conservation par lyophilisation, un culot bactérien obtenu sur le milieu BCYT + glucose est repris dans 2 mL de lait écrémé (100 g/L) cystéiné (0,5 g/L). La suspension est répartie à raison de 200 µL par ampoule. Chaque ampoule est ensuite lyophilisée.

La seconde méthode consiste àensemencer à 2 % un tube contenant du milieu à la viande cuite (Cooked Meat Medium) (Annexe 5) à partir d'une préculture sur le milieu BCYT + glucose. Le tube est incubé 6-7 h à 37°C puis refroidi avant congélation à -20°C. A température ambiante, les souches sont repiquées régulièrement toutes les semaines sur le milieu BCYT additionné de glucose (11 mM) à partir d'un inoculum de 2 %.

1.3.5 Identification et vérification des souches

Régulièrement, les souches de *Cl. perfringens* sont vérifiées soit par galerie d'identification API-RAPID-ID 32 A, soit par étalement en boîte de Petri sur gélose au sang.

Pour la méthode par galerie API, une culture sur le milieu BCYT + glucose est centrifugée. Le culot est repris avec de l'eau Milli-Q stérile de façon à obtenir une valeur d'absorbance à 660 nm d'environ 1,20. Puis nous répartissons 55 µL de cette suspension dans chaque cupule. La galerie API est incubée 4 h à 37°C et nous vérifions la nature de l'espèce à l'aide du logiciel APILAB-Plus (Biomérieux).

La seconde méthode consiste à déposer et étaler quelques gouttes d'une culture à la surface d'une gélose contenant 5 % de sang de mouton. Les boîtes de Pétri sont incubées en jarre d'anaérobiose pendant 24 h à 37°C. Les colonies apparaissent blanches et circulaires et une plage d'hémolyse est caractéristique du développement des souches de *Cl. perfringens*.

1.4 OBSERVATION DES CELLULES

Les cellules végétatives, les endospores et les spores peuvent être observées au microscope optique, soit par coloration (Gram, violet de gentiane, vert malachite), soit à l'état frais par microscopie à contraste de phase.

1.4.1 Observation au microscope optique

1.4.1.1 Coloration

Les cellules végétatives, les endospores et les spores peuvent être observées au microscope optique (Olympus, Villeneuve d'Ascq, France) après coloration de Gram, coloration au violet de gentiane ou au vert malachite (Annexe 6). La coloration de Gram initialement utilisée pour différencier les bactéries Gram⁺ des bactéries Gram⁻ ainsi que la coloration au violet de gentiane permettent de distinguer les cellules végétatives des endospores et des spores. Etant donné que le violet de gentiane ne pénètre pas dans la spore, les spores libres et les endospores apparaissent transparentes alors que le corps bactérien et la cellule végétative sont de couleur violette. Cependant, cette technique de coloration rend l'observation des spores libres difficile au microscope. Par contre, la coloration au vert malachite, spécifique des spores, nous permet de distinguer les deux formes bactériennes par la différence de couleur : les spores apparaissent vertes et le corps bactérien et les endospores sont roses par la safranine. Ces techniques de coloration demandent chacune entre 5 et 15 min de préparation.

1.4.1.2 Microscopie à contraste de phase

Nous pouvons aussi mettre en évidence les différents états cellulaires par observation au microscope optique à contraste de phase (microscope Zeiss, Jenamed 2, Bioblock, Strasbourg). Nous préparons un état frais en déposant 1 à 2 gouttes de culture sur une lame bien propre, nettoyée à l'alcool. La lamelle est ensuite fixée avec du vernis. Le comptage des cellules est effectué sur 4 champs différents, par balayage du champ de gauche à droite. Les spores apparaissent réfringentes et ovales et se différencient ainsi des cellules végétatives. Cependant, l'observation des spores réfringentes au microscope à contraste de phase, bien que rapide, peut être gênée par la présence de cellules végétatives placées perpendiculairement au champ d'observation. Ceci est valable lorsque les spores de petites tailles apparaissent plus rondes. En effet, lorsque les spores sont grosses (comme celles de la souche R3), nous ne pouvons pas les confondre avec les extrémités des cellules végétatives réfringentes.

L'observation optique au microscope à contraste de phase nous permet de compter un certain nombre de cellules végétatives, d'endospores et de spores par champ observé. Un facteur 2×10^6 qui tient compte du volume de la goutte de culture déposée et de l'espace entre lame et lamelle permet d'obtenir un nombre de cellules par millilitre de milieu de culture.

La cinétique de sporulation des souches sur les différents milieux demande une observation microscopique régulière des cellules. Par conséquent, la méthode d'observation au microscope à contraste de phase sera retenue pour compter les différentes cellules car cette technique est plus rapide à mettre en oeuvre.

1.4.2 Observation au microscope électronique à balayage (MEB)

Un millilitre de culture bactérienne obtenue sur le milieu est fixé dans 10 mL de glutaraldéhyde (1,5 %) préparé dans du tampon cacodylate de sodium (0,1 M). Cette suspension est filtrée sur un filtre Anodisc 25 de marque Whatman. Le filtre comportant les bactéries est placé, pendant une nuit, dans un cristallisateur contenant 1 mL de tampon cacodylate et 1 mL de tétraoxyde d'osmium à 1 %. Les bactéries subissent alors des déshydratations successives dans de l'éthanol 50, 70, 95 et 100 %. L'échantillon est séché à 37°C par la méthode du point critique en milieu CO₂ dans l'EMSCOPE CPD 750 avant d'être observé au microscope électronique à balayage (Jeol 35CF, Rueil Malmaison, France) à une tension de 15 kV.

2 . TECHNIQUES ANALYTIQUES

2.1 SPECTROPHOTOMETRIE

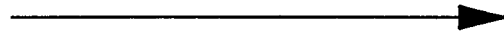
Différents spectrophotomètres ont été utilisés pour suivre la croissance des souches sur les milieux de culture ou de sporulation et pour les dosages de glucose, de dextrine ou des protéines.

2.1.1 Suivi de croissance

La croissance bactérienne a été suivie à 550 nm directement dans les tubes de culture sur le spectrophotomètre 320 RD (Prolabo, Fontenay sous Bois, France). Pour les prélèvements en cuve,

GLUCOSE OXYDASE

Glucose + H₂O + O₂



Gluconate + H₂O₂

PEROXYDASE

H₂O₂ + 4 aminoantipyrine + phydroxybenzènesulfonate



Quinonéimine + H₂O

Figure 7 : Principe de la méthode enzymatique du dosage du glucose

nous avons utilisé le spectrophotomètre UVIKON 810 (Kontron Instruments, Montigny Le Breutonneux, France) pour effectuer des suivis de croissance à 660 nm. Cette longueur d'onde est choisie pour s'affranchir de l'absorption due à la résazurine oxydée de couleur rose.

2.1.2 Dosage du glucose

La concentration en glucose est déterminée suivant la méthode Sigma Diagnostics (Saint Quentin Fallavier, France) dont la composition du réactif est détaillé en Annexe 7. Une gamme-étalon de concentrations comprises entre 0 et 30 mM de glucose est préparée. Le dosage est réalisé avec 10 μ L d'échantillon provenant du surnageant de culture après centrifugation (5 min à 13000 tours/min) ou de gamme-étalon et 1 mL de réactif. Le substrat carboné présent dans l'échantillon est tout d'abord oxydé en gluconate et en eau oxygénée ; cette réaction est catalysée par une glucose oxydase en présence d'oxygène. Puis l'eau oxygénée réagit en présence de peroxydase avec le 4-aminoantipyrine et la p.hydroxybenzène sulfonate pour donner une quinonéimine (Figure 7). La température et la durée de la réaction ont une grande influence sur la vitesse de réaction de ce dosage, aussi le réactif doit être placé à température ambiante avant utilisation. La quinonéimine a une absorbance maximale à 505 nm, l'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration de glucose.

2.1.3 Dosage de la dextrine

La concentration en dextrine présente dans le milieu est déterminée selon la méthode de dosage des sucres totaux établie par Dubois *et al.* en 1956. Le dosage est réalisé sur 200 μ L de surnageant de culture auxquels est ajouté le même volume de phénol à 5 % dans l'eau. La dextrine, polymère de glucose, est ensuite hydrolysée par l'acide sulfurique pur pour libérer les molécules de glucose. L'absorbance du mélange ainsi formé est lue à 492 nm. La concentration en dextrine est exprimée en molécules de glucose à partir d'une gamme de glucose de concentrations comprises entre 0 et 50 μ g/mL. Les résultats de ce dosage ont été comparés à ceux obtenus par la technique utilisant l'acide chlorhydrique et une solution iodée (iode 0,2 % - iodure de potassium 2 %) (Shih et Labbé, 1994).

2.1.4 Dosage des protéines

Le dosage des protéines est effectué selon la technique de Bradford (Bradford, 1976) (Annexe 8) après sonication pendant 3 min d'un culot de cellules bactériennes provenant de 1 mL de milieu de culture. Le culot est repris pour obtenir un volume final de 1 mL. A 100 μ L d'échantillon sont ajoutés 3,9 mL de tampon acéto-acétate pH=4 et 1 mL de réactif de Bradford (BIO-RAD). Le bleu de Coomassie brillant G-250 présent dans le réactif se fixe sur les acides aminés basiques et donne une coloration bleutée mesurable après 30 à 40 minutes à température ambiante. Le complexe protéine-colorant a un fort coefficient d'extinction permettant une grande sensibilité de mesure des concentrations protéiques. Le procédé de fixation du colorant est très rapide (environ 2 min) et le complexe protéine-colorant reste dispersé en solution pendant un temps relativement long (environ 1 h). Ceci rend la procédure très rapide et ne nécessite pas un calendrier strict dans la manipulation. Le dosage est réalisé avec une gamme étalon de serum albumine bovine comprise entre 0 et 0,75 g/L.

2.2 DOSAGES CHROMATOGRAPHIQUES

2.2.1 Dosage des acides gras volatils et des alcools

Les acides gras volatils et les alcools issus de la fermentation des substrats carbonés sont analysés par chromatographie en phase gazeuse ou par chromatographie liquide haute pression.

2.2.1.1 *Chromatographie en phase gazeuse*

L'éthanol, le propanol, l'acétate, le propionate et le butyrate sont analysés par le chromatographe (Shimadzu GC14, Touzard et Matignon, Courtaboeuf, France) à injection manuelle, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire FFAP (Quadrex). Les débits d'hydrogène et de l'air sont respectivement de 40 et 400 mL/min. Le gaz vecteur est l'azote (débit de 0,8 mL/min). La température de l'injecteur est de 200°C et celle du détecteur de 240°C. Les acides gras volatils et les alcools sont dosés en une seule injection, sur un surnageant de culture après centrifugation (13000 tours/min pendant 5 min) et selon la méthode de l'étalon interne. Un volume de 50 μ L d'échantillon est ajouté à 40 μ L d'étalon interne (le pentanol à 22,69 mM préparé dans de

l'eau) et à 10 µL d'oxalate 0,3 M. Une solution étalon composée d'éthanol, propanol, acétate, propionate et butyrate de concentration respective 43,47 ; 33,33 ; 33,33 ; 27,03 et 22,73 mM (soit 2 g/L de chaque produit) est préparée et injectée préalablement pour étalonner l'appareil.

2.2.1.2 Chromatographie liquide haute pression (HPLC)

Le formiate libéré par les souches sur les différents milieux est dosé sur un appareil HPLC (Waters, Saint Quentin en Yveline, France) équipé d'une pompe 510 et d'un injecteur automatique 710 de même marque. Un aliquote de 50 µL d'un surnageant de culture obtenu après centrifugation (13000 tours/min pendant 5 min) est injecté dans une colonne Amylex OA 1000 de marque Alltech. La température du four est de 65°C. L'éluant est l'acide sulfurique à 0,005 N avec un débit de 0,8 mL/min. La détection s'effectue à 210 nm. La solution étalon est du formiate à 43,48 mM soit 2 g/L. La concentration en formiate est déterminée en mM.

2.2.2 Dosage du raffinose

La concentration du raffinose est déterminée par HPLC (Waters, Saint Quentin en Yveline, France) équipé d'un réfractomètre de marque Knauer. Après centrifugation, 600 µL de surnageant du milieu de sporulation DS sont mélangés à 600 µL d'eau Milli-Q. Un volume de 1 mL de ce mélange est appliqué à une colonne échangeuse d'ions de marque Macherey Nagel (Chromobond SB 500 mg) préalablement rincée et activée par du méthanol et de l'eau. L'élution est réalisée sous vide (1 mL/min) à l'aide d'un mélange acétonitrile/eau (70/30) jusqu'à assèchement du gel. Les sucres se retrouvent dans le volume mort. Cette solution est lyophilisée pour concentrer les sucres présents. L'éluat lyophilisé est repris dans 500 µL d'eau puis centrifugé pendant 5 min pour éliminer les protéines. Une fraction aliquote de 20 µL est injectée sur une seconde colonne d'un appareil HPLC de marque Waters : il s'agit d'une colonne Nucléosil (NH₂ 5µm 4x250 mm) (Macherey Nagel). La concentration en raffinose est déterminée en mM (Calull *et al.*, 1992).

2.2.3 Dosage des gaz

2.2.3.1 *CO₂ dissous*

L'analyse du CO₂ issu de la fermentation et dissous dans le milieu de culture est effectuée sur un analyseur de carbone (OIC 700). Cet appareil est équipé d'un détecteur infrarouge. Un volume de 50 µL du milieu de culture prélevés directement dans le flacon de culture à travers le bouchon butyl sont injectés dans l'appareil. Le CO₂ présent est dégagé sous l'effet de la température (60°C) puis est véhiculé par l'azote (type U) (débit de 80 mL/min) dans le réacteur. Le CO₂ est alors fixé sur un tamis moléculaire de marque OIC. Le débit du gaz vecteur, l'azote, est de 375 mL/min. La présence de CO₂ se traduit par un pic après détection par infrarouge. Après intégration des pics, la concentration en CO₂ est exprimée en ppm puis convertie en molarité de gaz dans les études du métabolisme.

2.2.3.2 *Hydrogène et CO₂ gazeux*

L'hydrogène et le CO₂ gazeux libérés au cours de la fermentation sont analysés par chromatographie en phase gazeuse. Le chromatographe IGC 11 (Intersmat, Courtry, France) à injection manuelle est équipé d'un catharomètre et d'une colonne Porapak S. Le gaz vecteur, l'azote, a un débit de 17-18 mL/min. L'appareil est étalonné après 2 injections avec soit 100 % de CO₂, soit 100 % d'hydrogène. L'hydrogène et le CO₂ gazeux sont dosés en une seule injection après prélèvement de 0,5 mL de gaz à travers le bouchon butyl à l'aide d'une seringue étanche aux gaz. Les résultats sont exprimés en pourcentage de CO₂ ou d'H₂ libérés après calcul par l'intégrateur puis convertie en molarité de gaz dans les études du métabolisme.

2.3 DOSAGE IMMUNOLOGIQUE DE L'ENTEROTOXINE

L'entérotoxine produite au cours de la sporulation par les souches est dosée par le kit de détection PET-RPLA commercialisé par Oxoid. Le dosage est basé sur l'agglutination passive réverse de la protéine sur des particules de latex. En effet, des particules de latex de polystyrène sont sensibilisées par un antisérum purifié, prélevé sur des lapins immunisés avec l'entérotoxine de *Cl. perfringens* purifiée. Ces particules de latex sensibilisées agglutineront en présence d'entéro-

toxine de *Cl. perfringens*. Le test est réalisé en plaques de micro-titration en V. Des dilutions du surnageant de culture obtenu après centrifugation (13000 tours/min pendant 5 min) sont réalisées dans deux rangées de puits ; 25 µL de suspension de latex sont ajoutés à chaque puits et le contenu est mélangé. Mais une dilution préalable du surnageant de culture au 1/10 ou 1/20 est souhaitable avant de doser l'entérotoxine sur la plaque. Si l'entérotoxine est présente, il en résulte une agglutination qui forme un trouble diffus au fond du puits (Photo 2). Si l'entérotoxine est absente ou présente à un taux plus bas que la limite de détection, aucun trouble diffus ne sera observé, mais seulement un bouton. La sensibilité du test est approximativement de 2 ng/mL. La lecture des puits est réalisée 24 h après la réaction.

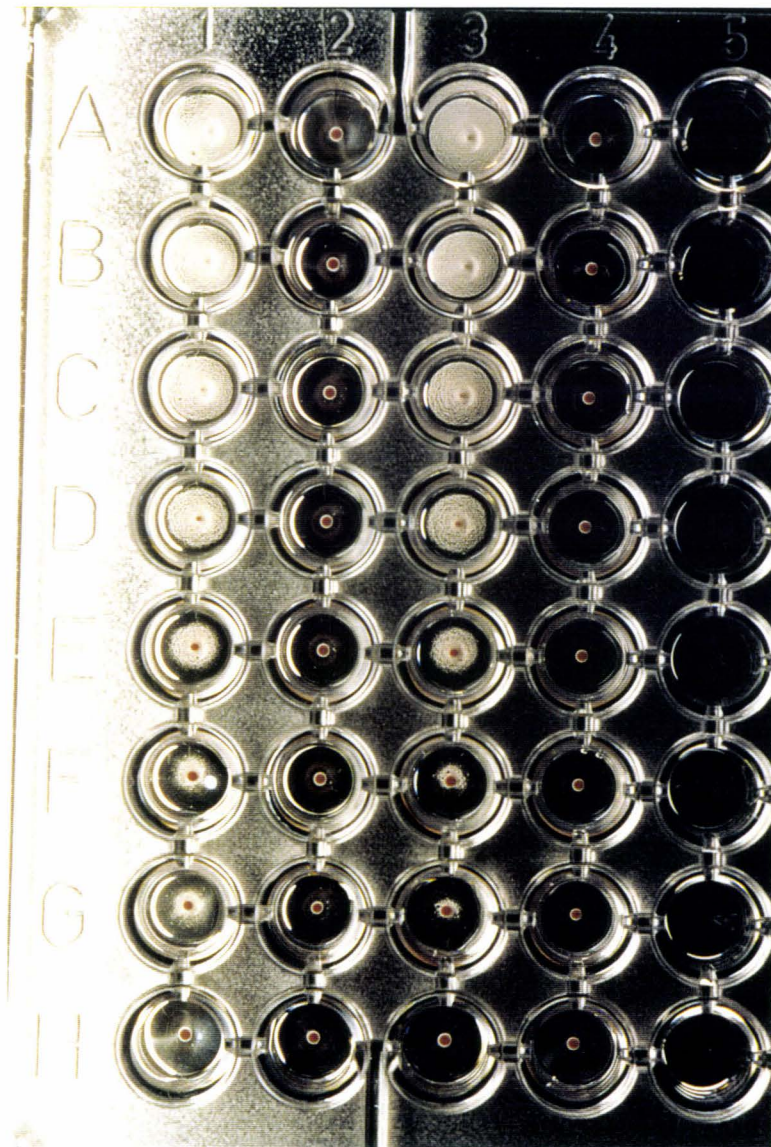


Photo 2 : Degré d'agglutination de l'entérotoxine de *Cl. perfringens* après dosage par le kit

Oxoid

CHAPITRE III

TRAVAUX PERSONNELS

1 . ETUDE DE NOUVEAUX FACTEURS PERMETTANT UNE MEILLEURE REPRODUCTIBILITE *IN VITRO* DE LA CROISSANCE ET DE LA SPORULATION CHEZ *Clostridium perfringens*

Dans le chapitre I, nous avons vu qu'il est relativement difficile de faire sporuler les souches de *Clostridium perfringens in vitro* : c'est pourquoi, il existe un certain nombre de milieux de sporulation déjà bien décrits dans la bibliographie. En effet, la grande variété des souches de cette espèce ne sporule pas toutes sur un même milieu ; c'est pourquoi les milieux spécifiques proposés de sporulation doivent être bien adaptés aux quelques souches testées. Par conséquent, avant d'étudier le métabolisme de ces souches en phase végétative et au cours de la formation des spores, il est nécessaire de faire sporuler les souches *in vitro* de façon reproductible. Nous avons donc étudié à la fois la croissance et la sporulation sur différents milieux plus ou moins spécifiques et déterminé le taux maximum d'entérotoxine synthétisée. Pour les 3 milieux de sporulation choisis, nous avons cherché à optimiser la formation des spores en modifiant les conditions de sporulation. Le travail porte principalement sur les conditions de culture réalisées lors de la préculture et dans le milieu de sporulation lui-même. Le premier milieu de sporulation utilisé est un milieu-type de la sporulation, le milieu DS. Bien que de nombreux essais aient déjà été réalisés sur ce milieu et montrent une sporulation tout à fait satisfaisante pour plusieurs souches déjà testées, nous souhaitons savoir comment les bactéries choisies pour cette étude sporulent sur ce milieu. Puis nous avons étudié la croissance et la sporulation des souches sur un milieu de culture spécifique des bactéries anaérobies strictes, le milieu BCYT + glucose. Ce milieu relativement pauvre présentait toutes les conditions idéales de sporulation. Pour atteindre un pourcentage de sporulation plus élevé par rapport à celui obtenu sur les milieux précédemment décrits, nous avons étudié l'influence d'autres facteurs influençant la sporulation sur le milieu défini D. Mais tout d'abord, nous allons suivre la croissance des souches sur le milieu de préculture, le milieu FTG utilisé pour ensemercer le milieu de sporulation lui-même. Les conditions de croissance et de sporulation ont été testées sur trois souches de *Cl. perfringens*, la souche sauvage NCTC 8798 et les souches mutantes 8-6 et R3.

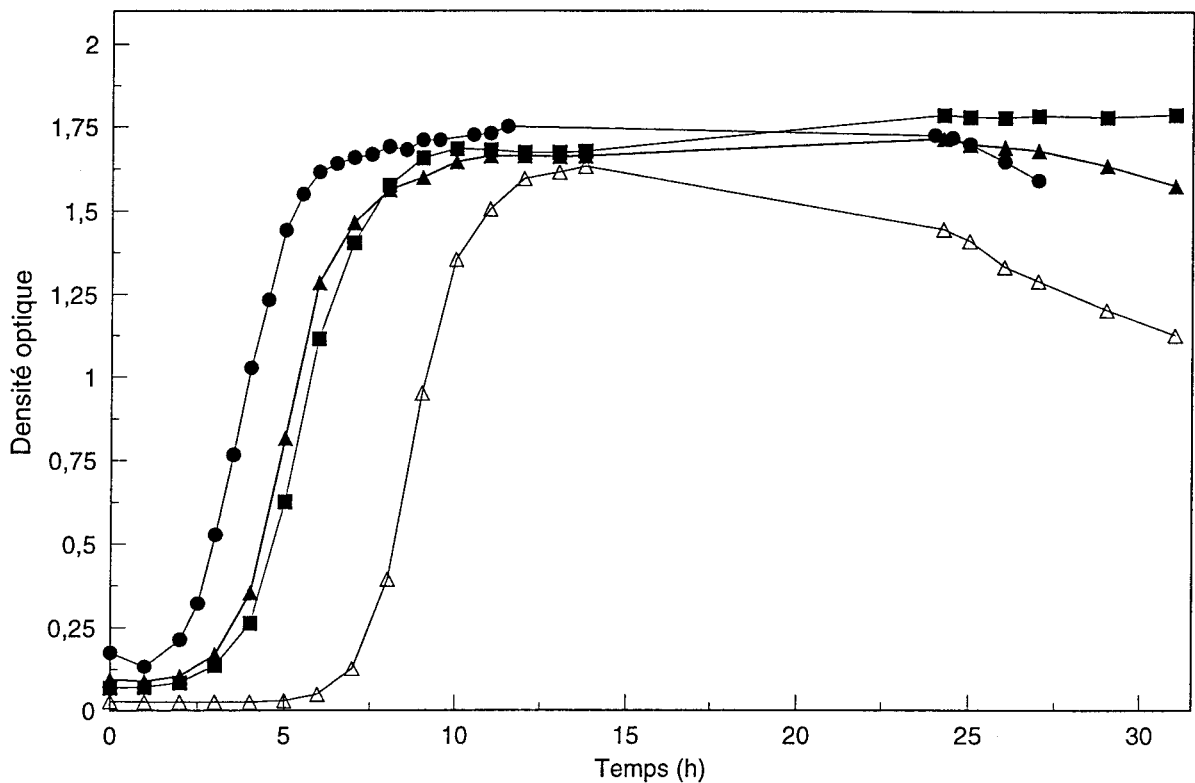


Figure 8 : Croissance des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu FTG et effet de la température sur la croissance de la souche R3. ● : NCTC 8798 ; ■ : 8-6 ; ▲ : R3 ; △ : R3 traité à la chaleur.

Tableau 11 : Croissance des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu FTG ayant été préalablement chauffé (75°C pendant 15 min) ou non avant incubation

Souches	Traitement (75°C 15 min)	Densité optique maximale	Phase de latence (h)	Temps de génération (h)
NCTC 8798	-	1,73	1,59	0,73
8-6	-	1,80	3,50	0,86
R3	+	1,63	7	1,07
	-	1,72	3,50	0,79

Les chiffres représentent les valeurs moyennes de deux expériences.

croissance des souches sur le milieu FTG.

La croissance des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 a été suivie après un choc thermique dans 10 mL de milieu FTG réparti dans des tubes. Chaque tube a été inoculé avec 0,5 % d'une culture sur BCYT + glucose (11 mM) datant de la veille puis il a été incubé à 75°C pendant 15 min avant d'être refroidi et placé à l'étuve.

La souche NCTC 8798 supporte des traitements à 90°C pendant 1 h après 2 à 3 repiquages successifs sur le milieu BCYT + glucose. Pour les repiquages qui suivent, nous observons la disparition de la possibilité de résister à un tel traitement thermique. Pour la souche R3, les 3 paramètres de croissance sont affectés de façon plus ou moins importante par le traitement à la chaleur (Figure 8 et Tableau 11) : celle-ci diminue légèrement (6 %) la valeur de l'optique maximale et ralentit le temps de génération de 25 %. Par contre, la phase de latence augmente de 100 %. Par ailleurs, à partir de 15 h d'incubation, la densité optique maximale diminue plus rapidement par rapport à la cinétique de la souche R3 non traitée. La croissance de la souche 8-6 sur un tube traité à la chaleur a permis de montrer, comme pour la souche R3, que cette bactérie se développe avec une production importante de biomasse sur le milieu FTG après traitement à la chaleur.

Par conséquent, ce traitement n'affecte que la phase de latence et gêne très peu la densité optique maximale et le temps de génération pour la souche R3. L'inoculum utilisé pour les souches 8-6 et R3 possède des cellules végétatives résistantes à la chaleur alors que ce n'est pas le cas pour la souche sauvage. Les cellules résistantes peuvent se développer sans difficulté dans le milieu FTG et produire une biomasse aussi importante qu'en absence de traitement thermique.

1.2 CROISSANCE ET SPORULATION SUR UN MILIEU TYPE DE SPORULATION : LE MILIEU DS

Le milieu DS (Duncan-Strong) fréquemment utilisé pour l'étude de la sporulation des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 représente le milieu-type de sporulation utilisé ici. La composition de ce milieu est optimisée dans la littérature. Par conséquent, le travail sur les paramètres physiologiques pourrait augmenter la sporulation. L'effet de ces paramètres sur la cinétique de croissance et de

Tableau 12 : Effet de la nature de la préculture sur les paramètres de cinétique de croissance des souches 8-6 et R3 sur le milieu DS

Préculture	Souches	Densité optique maximale	Phase de latence (h)	Temps de génération (h)
BCYT + glucose	8-6	1,52	1	1,71
	R3	1,40	< 1	1,37
FTG	8-6	1,41	< 1	1,48
	R3	1,39	< 1	1,60

Les chiffres représentent les valeurs moyennes de deux expériences.

sporulation des souches sur ce milieu va être présenté. Ces facteurs portent sur les conditions de préculture. Nous obtiendrons ainsi la croissance et la sporulation de ces 3 souches sur le milieu DS dans les conditions optimales de sporulation.

1.2.1 Action sur la préculture

La nature de la préculture utilisée et la présence ou non de lysozyme dans le milieu de préculture constituent les 2 éléments qui peuvent influencer la croissance et la sporulation des souches sur le milieu DS. Seules les souches 8-6 et R3 présentent des résultats concluants.

1.2.1.1 Nature

La croissance et la sporulation des souches 8-6 et R3 sur le milieu DS ont été suivies à partir de précultures de natures différentes. La préculture a été réalisée soit sur le milieu BCYT + glucose (11 mM) incubé 24 h, soit sur le milieu FTG activé à la chaleur (75°C pendant 15 min) avant incubation 16 à 18 h à 37°C. La préculture sur le milieu FTG correspond aux conditions standards de culture décrites dans la bibliographie avant d'ensemencer le milieu DS. Un inoculum de 2 % de chaque préculture a été utilisé pour inoculer 10 mL de milieu de sporulation.

L'utilisation de l'une ou de l'autre préculture ne modifie pas la phase de latence des souches ni la valeur de la densité optique maximale de la souche R3 (Tableau 12). Seulement la préculture réalisée sur le milieu BCYT + glucose permet une augmentation (7 %) de la densité optique maximale de la souche 8-6. Le temps de génération est le paramètre le plus influencé par la nature de la préculture : avec une préculture sur BCYT + glucose, il est plus élevé de 13 % pour la souche 8-6 alors qu'il est moins important de 13 % pour la souche R3. Cependant, quelle que soit la nature de la préculture, aucune spore n'a pu être observée dans ces conditions sur ce milieu pour chacune des souches. Par conséquent, il est difficile de conclure d'un éventuel effet de la nature du milieu de préculture sur la sporulation des souches sur le milieu DS.

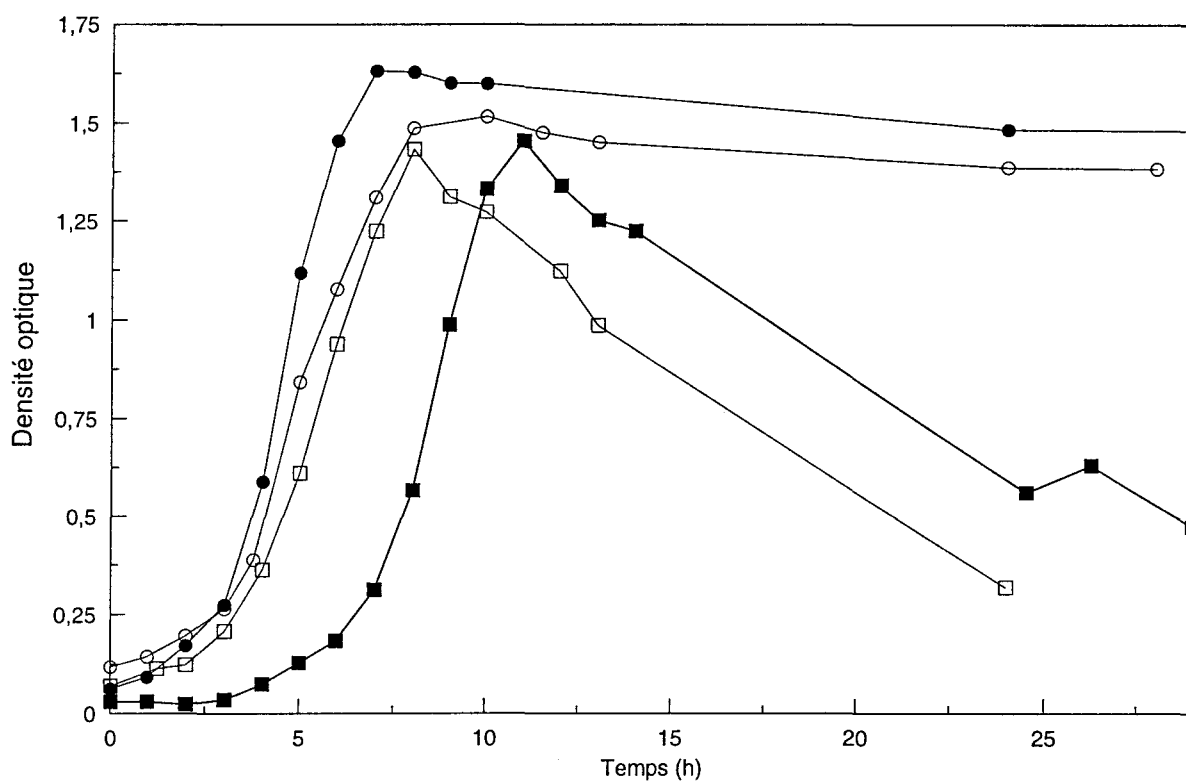


Figure 9 : Effet du lysozyme (250000 UI/L) ajouté à la préculture FTG (après traitement thermique) sur la croissance des souches 8-6 et R3 sur le milieu DS. Souche R3 : □ : avec lysozyme ; ■ : sans lysozyme ; Souche 8-6 : ○ : avec lysozyme ; ● : sans lysozyme.

Tableau 13 : Effet du lysozyme (250000 UI/L) ajouté à la préculture FTG (après traitement thermique) sur les paramètres de cinétique de croissance des souches 8-6 et R3 sur le milieu DS

Souches	Lysozyme	Densité optique maximale	Phase de latence (h)	Temps de génération (h)
8-6	-	1,63	< 1	1,23
	+	1,52	< 1	1,19
R3	-	1,44	5	1,39
	+	1,42	< 1	1,70

Les chiffres représentent les valeurs moyennes de deux expériences.

1.2.1.2 *Présence ou absence de lysozyme*

Alors que l'addition de lysozyme est favorable à la germination des spores, nous cherchons à savoir si cette protéine influence la sporulation des souches sur le milieu DS.

L'effet de la présence ou de l'absence du lysozyme sur la croissance des souches 8-6 et R3 a été étudié sur 10 mL de milieu DS : le lysozyme (Sigma) administré à la concentration finale de 250000 UI/L est ajouté par filtration Millex dans la préculture FTG après ensemencement (0,5 % d'une culture préparée sur le milieu BCYT + glucose) et traitement à la chaleur de celle-ci (75°C pendant 15 min). La préculture est incubée 16 à 18 h avant inoculation à 2 % des tubes de milieu DS.

Les souches 8-6 et R3 se comportent de façon semblable en absence ou en présence de lysozyme dans la préculture FTG (Figure 9). En effet, les cinétiques de croissance de la souche 8-6 sont similaires, la densité optique maximale est atteinte entre 6 et 7 h d'incubation et se maintient à sa valeur maximale au-delà de 24 h d'incubation. Cependant, la présence de lysozyme fait diminuer de 7 % la densité optique maximale obtenue pour cette souche (Tableau 13). Les courbes de croissance de la souche R3 sont de forme semblable mais décalées dans le temps. En effet, la présence de lysozyme diminue la durée de la phase de latence mais ralentit la vitesse de croissance de cette souche avec un temps de génération qui augmente de 18 % en présence de lysozyme. Contrairement à la souche 8-6, la densité optique maximale obtenue avec la souche R3 chute très rapidement après avoir atteint sa valeur maximale : en absence ou en présence de lysozyme, elle diminue de 75 % pendant les 15 h suivantes.

L'addition de lysozyme agit différemment sur la valeur maximale de la densité optique pour les 2 souches et le temps de génération de la souche R3. En effet, le lysozyme augmente de 3,5 % la production de biomasse pour la souche R3 et ralentit sa croissance alors que la présence de lysozyme n'affecte pas la phase de latence pour la souche 8-6 mais limite sa croissance de 7 %. Aucune spore n'a pu être détectée sur ce milieu en absence ou en présence de cette protéine ; par conséquent, l'effet du lysozyme sur la sporulation des souches sur le milieu DS n'a pu être testé.

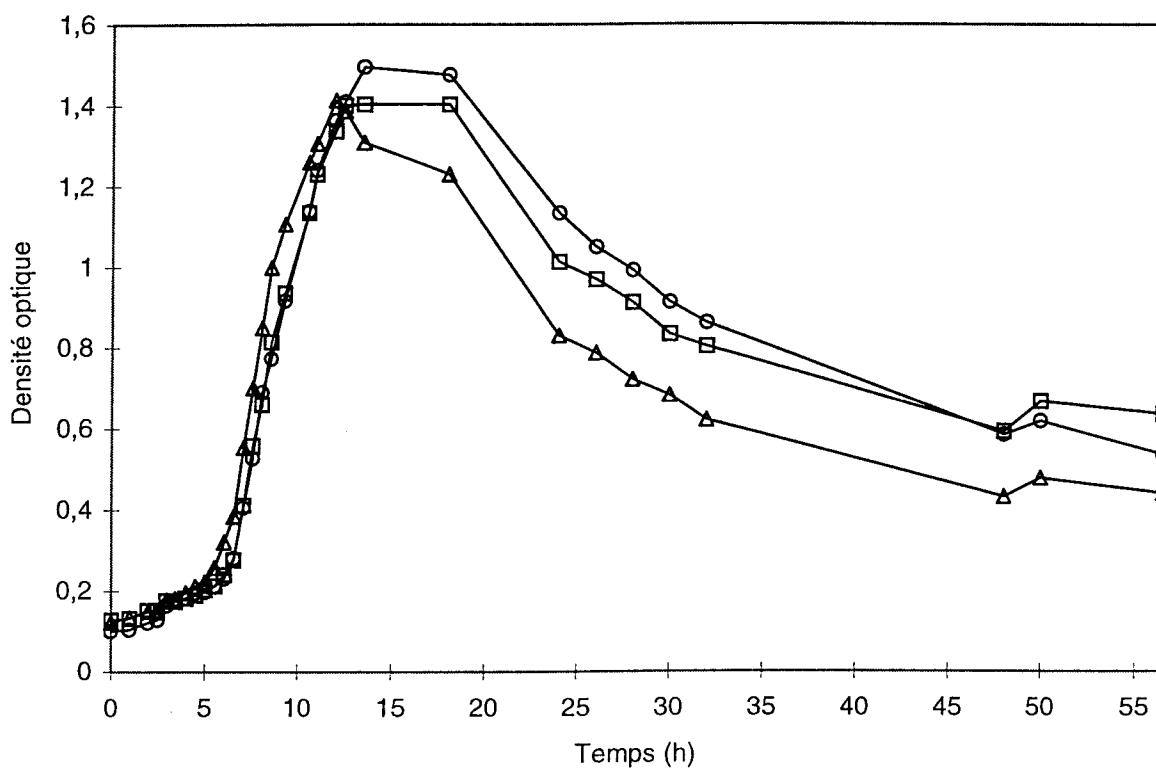


Figure 10 : Croissance des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu DS sans traitement thermique de la préculture. ○ : Souche NCTC 8798 ; □ : Souche 8-6 ; △ : Souche R3. La sporulation est indétectable dans ces conditions sur ce milieu.

Tableau 14 : Paramètres de cinétique de croissance des souches de *Cl. perfringens* dans le milieu DS

Souche	Densité optique maximale	Phase de latence (h)	Temps de génération (h)
NCTC 8798	1,47	< 1	1,69
8-6	1,41	< 1	1,48
R3	1,39	< 1	1,60

Les chiffres représentent les valeurs moyennes de deux expériences.

1.2.2 Croissance, sporulation et production d'entérotoxine

La croissance et la sporulation des 3 souches de *Cl. perfringens* ont été étudiées en tube, sur 10 mL de milieu DS contenant 7,93 mM de raffinose. Les précultures ont été réalisées sur le milieu FTG sans traitement à la chaleur. L'inoculum utilisé est de 2 %. Les tubesensemencés sont ensuite placés à l'étuve à 37°C.

La croissance des souches sur le milieu DS est présentée sur la Figure 10. Les 3 souches se comportent de la même façon sur ce milieu et se chevauchent pendant la phase de latence et la phase exponentielle. La croissance commence très rapidement avec une phase de latence inférieure à 1 h pour chaque souche (Tableau 14). Les valeurs de la densité optique maximale sont très proches et sont atteintes vers 10-12 h d'incubation. Quelles que soient les souches, la densité optique maximale diminue ensuite rapidement de 60 % et reste constante à partir de 50 h d'incubation. Cependant, la durée de la phase stationnaire est variable selon les bactéries : elle est de 4 h pour les souches NCTC 8798 et 8-6 et elle est inexistante pour la souche R3. La croissance de la souche 8-6 est plus rapide que les 2 autres souches et la souche R3 possède la croissance la plus lente.

Ces résultats permettent également de constater que la température appliquée au milieu de préculture FTG baisse la valeur de la densité optique maximale de 0,2 unité d'unité d'optique pour la souche 8-6 alors qu'aucune diminution n'est observée pour la souche R3. Par contre, ce traitement thermique ralentit la vitesse de croissance de la souche R3 mais ne modifie pas le temps de génération de la souche 8-6. De plus, pour chaque souche, la densité optique maximale est atteinte après le même temps d'incubation, que la préculture soit thermiquement traitée ou non. En outre, lorsque la préculture a été traitée à la chaleur, la densité optique de la souche 8-6 reste constante après 24 h d'incubation alors qu'elle diminue régulièrement pour les 3 souches. Par ailleurs, la croissance de la souche 8-6 commence très rapidement après traitement thermique de la préculture. Ce comportement peut être dû à un meilleur état physiologique des cellules.

Aucune spore n'a pu être observée sur le milieu DS, que ce soit par observation au microscope à contraste de phase ou après coloration. Des traces d'entérotoxine (2 à 32 ng/mL) ont toutefois été détectées sur ce milieu ; par conséquent, la très importante quantité de cellules végétatives semble avoir masqué la présence des spores isolées lors de l'observation au microscope à contraste de phase et n'a pas permis la numération des spores existantes sur le milieu DS. Nous reviendrons plus

longuement dans la suite du travail sur la relation liant les comptages de spores et la quantité d'entérotoxine libérée dans le milieu. Nous pouvons toutefois déjà annoncer que les traces d'entérotoxine dosées dans ces conditions expérimentales correspondent vraisemblablement à des comptages de l'ordre de 10^2 spores/mL de milieu de culture.

Cependant, des études préliminaires ont montré que la souche NCTC 8798 sporule à 51 % sur le milieu DS et un taux de sporulation de 3 % est obtenu pour la souche 8-6 (Labbé, 1981). Par ailleurs, la souche R3 sporule fortement sur le milieu DS (Sacks et Thomas, 1979). Par conséquent, les conditions de sporulation utilisées ici ne semblent pas idéales pour obtenir des spores *in vitro* sur ce milieu. La sporulation peut être affectée par un certain nombre de paramètres, notamment la composition en source de carbone. Le milieu DS, initialement décrit avec de l'amidon (Duncan et Strong, 1968) contient du raffinose à la suite des modifications apportées par Labbé et Rey en 1979. Nous avons suivi ces conditions d'étude mais nous n'observons aucune sporulation. Par conséquent, il semble manquer des informations techniques pour faire sporuler les souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu DS. Cette expérience réalisée à plusieurs fois à partir de souches décongelées ou fournies à plusieurs reprises par l'Institut Pasteur n'a pas permis de mettre en évidence des spores sur le milieu DS. La variabilité des lots de produits chimiques entrant dans la composition des milieux de sporulation pouvant très fortement influencer les conditions de production de spores sur ces milieux (Sébald, communication personnelle), nous nous sommes intéressés, dans la suite des travaux, à l'étude de l'influence d'autres facteurs sur 2 milieux permettant d'obtenir des conditions raisonnables de sporulation au laboratoire.

1.3 CROISSANCE ET SPORULATION SUR UN MILIEU CARACTERISTIQUE DES BACTERIES ANAEROBIES STRICTES : LE MILIEU BCYT

Le milieu BCYT est un milieu de culture utilisé couramment au laboratoire pour la croissance des bactéries anaérobies. C'est un milieu relativement pauvre contenant des minéraux, des vitamines auquel 11 mM de glucose sont ajoutés comme source de carbone. De par sa composition, il dispose des conditions idéales pour obtenir des spores. Nous avons donc cherché à connaître le comportement physiologique des 3 souches et leur capacité à sporuler sur ce milieu. Nous avons modifié la nature ou la concentration de facteurs de composition du milieu pouvant influencer la croissance et donc

Tableau 15 : Effet de la nature du milieu de préculture sur la croissance de la souche R3 réalisée sur le milieu BCYT + glucose (11 mM)

Milieu de préculture	Densité optique maximale	Phase de latence (h)	Temps de génération (h)
FTG	0,91	1	0,95
BCYT + glucose	0,75	3	0,81

Les chiffres représentent les valeurs moyennes de deux expériences.

lever la sporulation. En parallèle, nous avons poursuivi les études précédentes sur d'autres facteurs pouvant aider la sporulation de ces souches sur ce milieu. Ces paramètres portent sur la préculture et le milieu de culture.

1.3.1 Action sur la préculture

Comme dans l'étude sur le milieu DS, les actions effectuées sur la préculture concernent la nature de celle-ci et la présence ou non de lysozyme pouvant favoriser ou au contraire inhiber la sporulation des souches. Nous y avons ajouté le volume de l'inoculum utilisé.

1.3.1.1 Nature

La croissance de la souche R3 a été suivie sur le milieu BCYT + glucose (11 mM) réparti en tubes. Le milieu de préculture est de 2 natures : le milieu BCYT + glucose (11 mM) ou le milieu FTG. Chaque tube a étéensemencé à 2 % à partir de l'une ou l'autre préculture. La préculture FTG n'a pas été traitée à la chaleur (75°C pendant 15 min). L'incubation a lieu à 37°C pendant 24 h.

Lorsque le milieu de préculture utilisé est le milieu FTG, la densité optique maximale de la souche R3 augmente de 20 % par rapport à la valeur de la densité optique maximale obtenue sur le milieu BCYT + glucose (Tableau 15). Il en est de même pour le temps de génération. Par contre, la phase de latence est trois fois plus longue lorsque le milieu BCYT + glucose est employé. Or, nous avons vu précédemment que le milieu FTG, milieu riche contenant 30 mM de glucose et 5 g/L d'extrait de levure permet une production importante de biomasse. Nous pouvons donc supposer que l'inoculum issu de ce milieu contient une concentration importante de cellules végétatives, ce qui permet une croissance plus rapide et peut-être également une production de biomasse supérieure à celle obtenue si l'inoculum avait été prélevé du milieu BCYT + glucose.

1.3.1.2 Volume de l'inoculum

L'effet du volume de l'inoculum a été étudié à partir d'une préculture réalisée sur le milieu BCYT + glucose (11 mM). Des quantités d'inoculum de 2 et 4 % sont utilisées pour ensemen- cer des tubes contenant 10 mL de milieu BCYT + glucose (11 mM). L'incubation à 37°C s'effectue

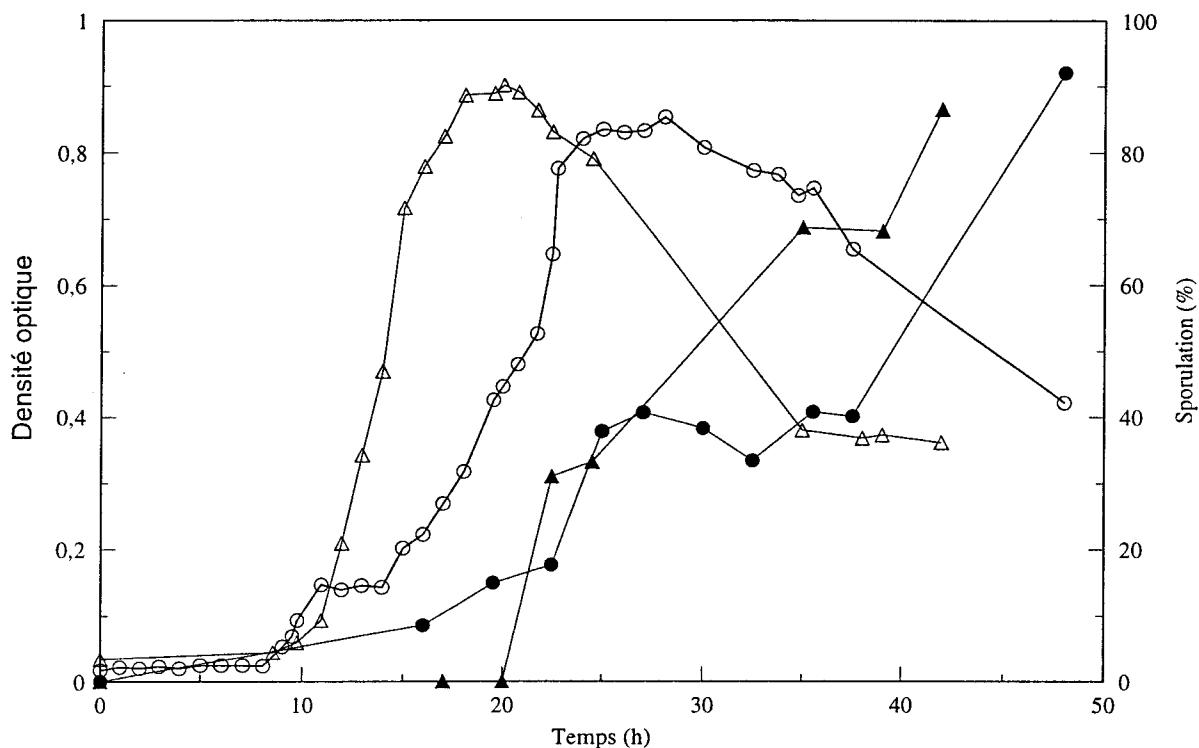


Figure 11 : Effet du volume de l'inoculum sur la croissance et la sporulation de la souche R3 réalisées sur le milieu BCYT + glucose (11 mM). Inoculum de 4 % : ○ : absorbance ; ● : sporulation ; Inoculum de 2 % : △ : absorbance ; ▲ : sporulation.

Tableau 16 : Effet du volume de l'inoculum sur la cinétique de sporulation effectuée sur milieu BCYT + glucose (11 mM)

Souche	Volume de l'inoculum (%)	Densité optique maximale	Phase de latence (h)	Temps de génération (h)
NCTC 8798	4	0,82	0,75	1,00
	2	0,81	ND	1,83
8-6	4	0,83	10,73	0,75
	2	0,80	10,73	0,75
R3	4	0,85	10,48	4,10
	2	0,89	10,73	3,03

ND : non déterminé

pendant 50 h.

La densité optique maximale et la phase de latence ne sont pas significativement modifiées par un inoculum d'un volume double (Figure 11 et Tableau 16). Cependant, le temps de génération semble le plus sensible à la variation du volume de l'inoculum. La vitesse de croissance de la souche NCTC 8798 diminue de 83 % avec un inoculum de 2 % alors que ce phénomène est inversé chez la souche R3 : l'inoculum de 4 % fait augmenter le temps de génération de 35 %. Par contre, la variation de la taille de l'inoculum ne modifie pas la valeur du temps de génération pour la souche 8-6.

Des spores ont pu être observées sur le milieu BCYT + glucose pour la souche R3. Le pourcentage de sporulation est déterminé pour chaque souche en divisant le nombre total de spores libres et d'endospores comptées par le nombre total de cellules (spores, endospores et cellules végétatives). Bien que le taux maximum de sporulation soit identique, il est atteint quelques heures plus tard avec un inoculum de 4 % (Figure 11). En effet, la souche R3 atteint environ 90 % de spores après 42 et 48 h d'incubation avec respectivement 2 et 4 % d'inoculum. Par contre, au cours de cette expérience, aucune sporulation n'a pu être observée pour les souches NCTC 8798 et 8-6.

La croissance et la sporulation des 3 souches ont été suivies à plusieurs reprises sur le milieu BCYT + glucose ensemencé à 2 %. Des spores ont pu être observées dans certains cas mais elles sont difficiles à voir au microscope à contraste de phase pour les souches NCTC 8798 et 8-6. Des taux variables de sporulation ont été obtenus pour la souche R3. En général, ils sont plus faibles que ceux obtenus précédemment ce qui explique la faible quantité d'entérotoxine produite par les souches. Par ailleurs, une croissance de ces souches sur le milieu BCYT + glucose a pu être observée après avoir traité l'inoculum à la chaleur (75°C pendant 15 min). Par conséquent, le milieu BCYT + glucose permet à la fois, la croissance des 3 souches de *Cl. perfringens* et leur sporulation avec des taux variables.

Il apparaît qu'un inoculum de taille double ne modifie pas significativement la production de biomasse des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 et le taux maximum de sporulation de la souche R3. Par contre, l'utilisation d'un inoculum plus important semble ralentir la cinétique de croissance et la cinétique de sporulation de la souche R3. Un inoculum de 2 % semble être une taille raisonnable pour ensemencer un milieu de culture ou de sporulation : il ne modifie pas considérablement la

Tableau 17 : Effet du lysozyme (250000 UI/L) dans le milieu de préculture FTG (après traitement thermique) sur la croissance de la souche R3 sur le milieu BCYT + glucose (11 mM)

Lysozyme	Densité optique maximale	Phase de latence (h)	Temps de génération (h)
+	0,98 ^a	1	1,05 [0,08]
-	0,92 [0,01]	< 1	0,80 [0,01]

Les chiffres représentent les valeurs moyennes de trois expériences. Les valeurs entre crochets correspondent à l'écart-type.

^a écart-type inférieur à 0,01

composition du milieu en apportant des sucres, des acides gras volatils, des alcools ou de l'oxygène présents dans l'inoculum. Par conséquent, la variation de volume du milieu de culture obtenue après addition de l'inoculum est négligeable.

1.3.1.3 *Présence ou absence de lysozyme*

L'effet du lysozyme présent dans la préculture FTG a été étudié sur la croissance et la sporulation de la souche R3 présentant les meilleurs résultats de sporulation. Le milieu de préculture FTGensemencé à 0,5 % à partir d'un milieu BCYT + glucose (11 mM) est traité à la chaleur (75°C pendant 15 min) avant d'ajouter à l'aide d'un filtre Millex, le lysozyme (Sigma) à une concentration finale de 250000 UI/L. Les tubes contenant 10 mL de milieu BCYT + glucose sontensemencés à 2 % à partir de la préculture.

La présence de lysozyme dans la préculture augmente légèrement la densité optique maximale et la phase de latence ainsi que le temps de génération (Tableau 17). En effet, ce dernier est abaissé de 24 % en absence de lysozyme ; ceci montre que la croissance de la souche R3 est plus rapide en présence de lysozyme dans la préculture. Cependant, aucune spore n'a pu être observée dans ces conditions.

1.3.2 Action sur le milieu de culture

Le but de cette étude est d'apprécier si certains constituants du milieu assurant la stabilité de ses caractéristiques physiologiques peuvent augmenter la production de biomasse sur le milieu BCYT + glucose et donc empêcher toute sporulation. Pour cela, nous avons fait varier 2 éléments du milieu, la nature du tampon et la concentration en extrait de levure, et nous avons suivi la croissance des souches.

1.3.2.1 *Nature du tampon*

La croissance des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 a été suivie en tube rempli de 10 mL de milieu BCYT préparé initialement sans glucose mais contenant soit du tampon HEPES, soit du tampon PIPES, soit du tampon MES à une concentration de 50 mM chacun. Le glucose a été ajouté

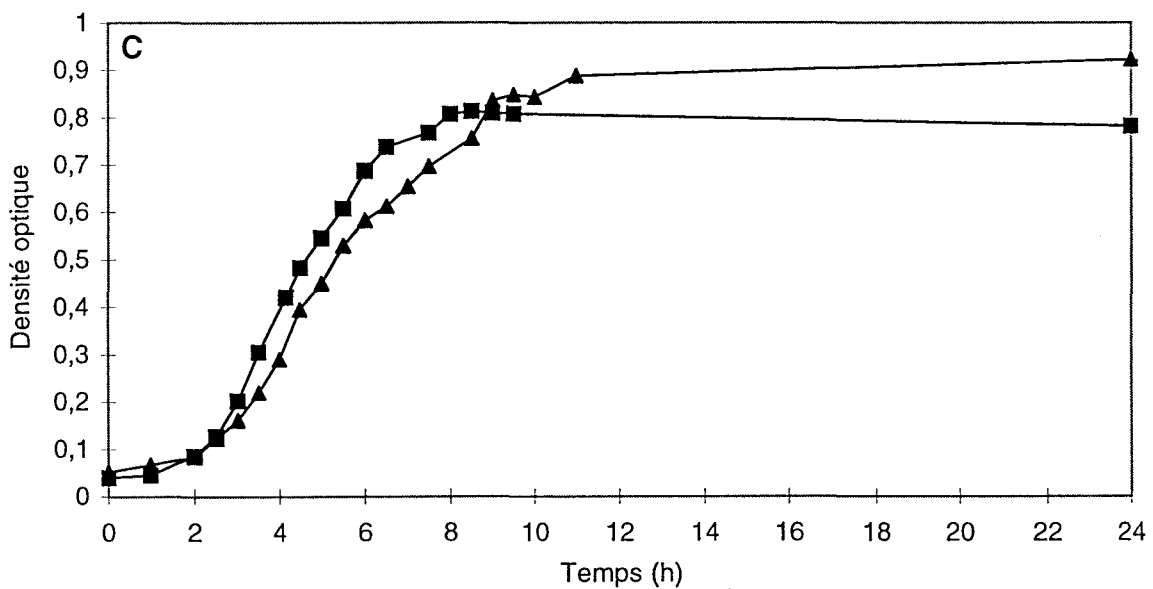
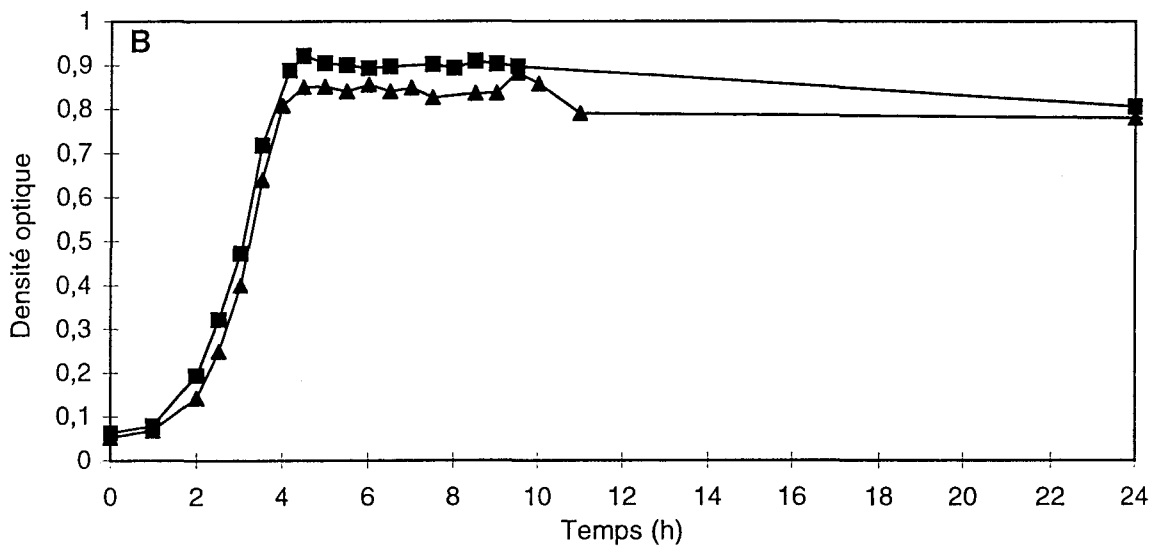
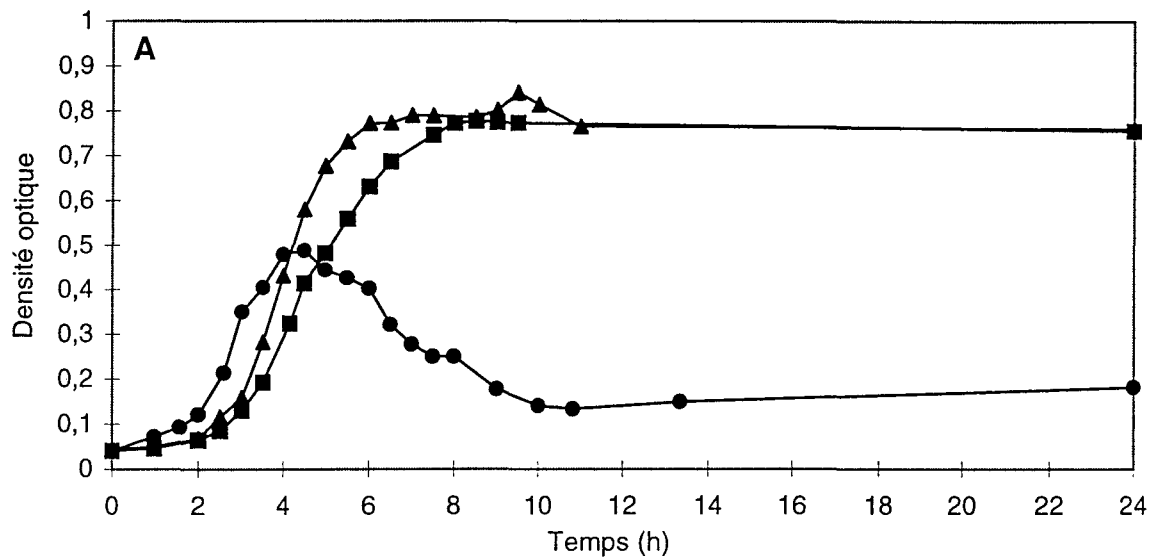


Figure 12 : Effet de la nature des tampons sur la croissance des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu BCYT + glucose (30 mM); A : Souche NCTC 8798; B : Souche 8-6; C : Souche R3. ▲ : Tampon HEPES ; ■ : Tampon MES ; ● : Tampon PIPES.

Tableau 18 : Effet du tampon sur la croissance des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu BCYT + glucose (30 mM) et valeur du pH final

Tampon	Souche	Densité optique maximale	Phase de latence (h)	Temps de génération (h)	pH final
HEPES	NCTC 8798	0,86 [0,04]	< 1	0,72 [0,11]	6,00
	8-6	0,87 [0,03]	< 1	0,74 [0,03]	5,96
	R3	1,02 [0,11]	< 1	1,32 [0,11]	5,61 [0,23]
MES	NCTC 8798	0,77 [0,01]	< 1	0,91 [0,03]	5,58
	8-6	0,90 [0,02]	< 1	0,75 [0,05]	5,54
	R3	0,81 ^a	< 1	0,86 [0,03]	5,54
PIPES	NCTC 8798	0,50 [0,02]	< 1	0,87 [0,18]	6,54 [0,05]

Les chiffres représentent les valeurs moyennes de trois expériences. Les valeurs entre crochets correspondent à l'écart-type.

^a écart-type inférieur à 0,01

Tableau 19 : Effet du tampon sur la croissance des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur milieu BCYT + glucose (30 mM) additionné de 5 g/L d'extrait de levure et valeur du pH final

Tampon	Souche	Densité optique maximale	Phase de latence (h)	Temps de génération (h)	pH final
HEPES	NCTC 8798	1,79 [0,03]	< 1	1,42 [0,03]	6,24 ^a
	8-6	1,81 ^a	< 1	0,93 [0,04]	6,26 [0,01]
	R3	1,88 [0,02]	< 1	0,99 [0,05]	6,21 ^a
MES	NCTC 8798	1,76 [0,02]	4	0,95 [0,16]	5,76 ^a
PIPES	NCTC 8798	1,74 ^a	< 1	1,42 [0,62]	6,11

Les chiffres représentent les valeurs moyennes de trois expériences. Les valeurs entre crochets correspondent à l'écart-type.

^a écart-type inférieur à 0,01

à l'aide d'un filtre Millex après autoclavage pour obtenir une concentration finale de 30 mM. La cinétique a été effectuée en triple. Chaque tube a étéensemencé à 2 % à partir d'une préculture sur BCYT + glucose (11 mM) datant de moins de 24 h. La concentration choisie en glucose nous permet de comparer ces conditions à celles déjà étudiées pour le milieu FTG et de pouvoir réellement cerner l'effet du tampon sur le pH obtenu dans les cultures.

La croissance des 3 souches sur le milieu BCYT + glucose est similaire pour les tampons HEPES et MES (Figure 12) malgré de petites variations détaillées ci-après. D'une part, la phase de latence n'est pas modifiée par le changement de tampon, quelles que soient les souches ; d'autre part, la densité optique maximale et le temps de génération de la souche 8-6 sont identiques en présence de tampon HEPES ou MES (Tableau 18). En outre, le tampon MES diminue les densités optiques maximales obtenues pour les souches NCTC 8798 et R3 mais augmente le temps de génération de la souche sauvage alors qu'il accélère la croissance de la souche R3. Avec les tampons HEPES et MES dans le milieu BCYT + glucose, la densité optique atteint sa valeur maximale rapidement, avant 5 h d'incubation pour la souche 8-6 et vers 8-10 h pour les autres souches. Elle reste ensuite constante bien au-delà de 24 h d'incubation. Par ailleurs, la quantité de biomasse obtenue avec la souche sauvage est 40 % plus faible avec le tampon PIPES ; de plus, l' densité optique de cette souche diminue rapidement après avoir atteint son maximum en présence de tampon PIPES.

Le pH final obtenu pour chaque souche dépend de la nature du tampon employé et pourrait constituer une étape limitante à la croissance (Tableau 18). Bien que la croissance soit plus importante avec le tampon HEPES présent dans le milieu BCYT, le pH final des 3 souches est supérieur à celui obtenu après utilisation du tampon MES. En effet, le pouvoir tampon du tampon MES s'étend jusqu'à un pH de 5,5. Ce pH bas pourrait limiter la croissance des souches NCTC 8798, 8-6 et R3.

Contrairement au tampon HEPES, l'utilisation du tampon MES ne modifie pas significativement les valeurs des paramètres de croissance des 3 souches. Par conséquent, le tampon HEPES présent dans la composition de base du milieu BCYT + glucose sera gardé pour les études ultérieures.

1.3.2.2 Concentration variable en extrait de levure

L'effet de la concentration en extrait de levure a été étudié pour les 3 souches sur le milieu BCYT contenant donc du tampon HEPES et uniquement pour la souche NCTC 8798 sur le

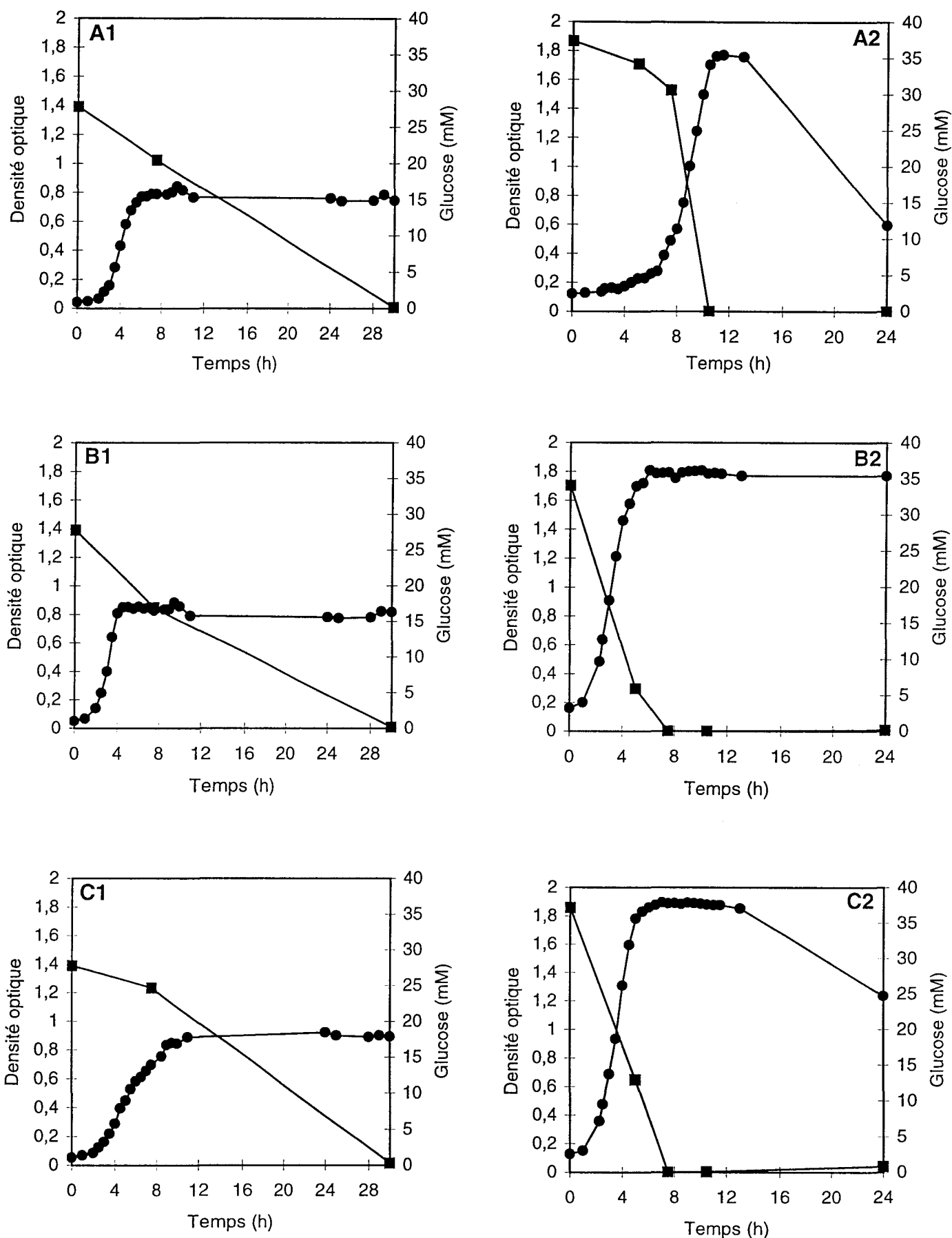


Figure 13 : Effet de la concentration en extrait de levure sur les croissances des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu BCYT + glucose (30 mM) contenant du tampon HEPES et consommation de glucose. Les figures A, B et C représentent respectivement les croissances des souches NCTC 8798, 8-6 et R3. Les figures A1, B1 et C1 correspondent aux cinétiques de croissance des souches en présence de 0,5 g/L d'extrait de levure. Les figures A2, B2 et C2 correspondent aux cinétiques de croissance des souches en présence de 5 g/L d'extrait de levure. ● : croissance ; ■ : concentration en glucose.

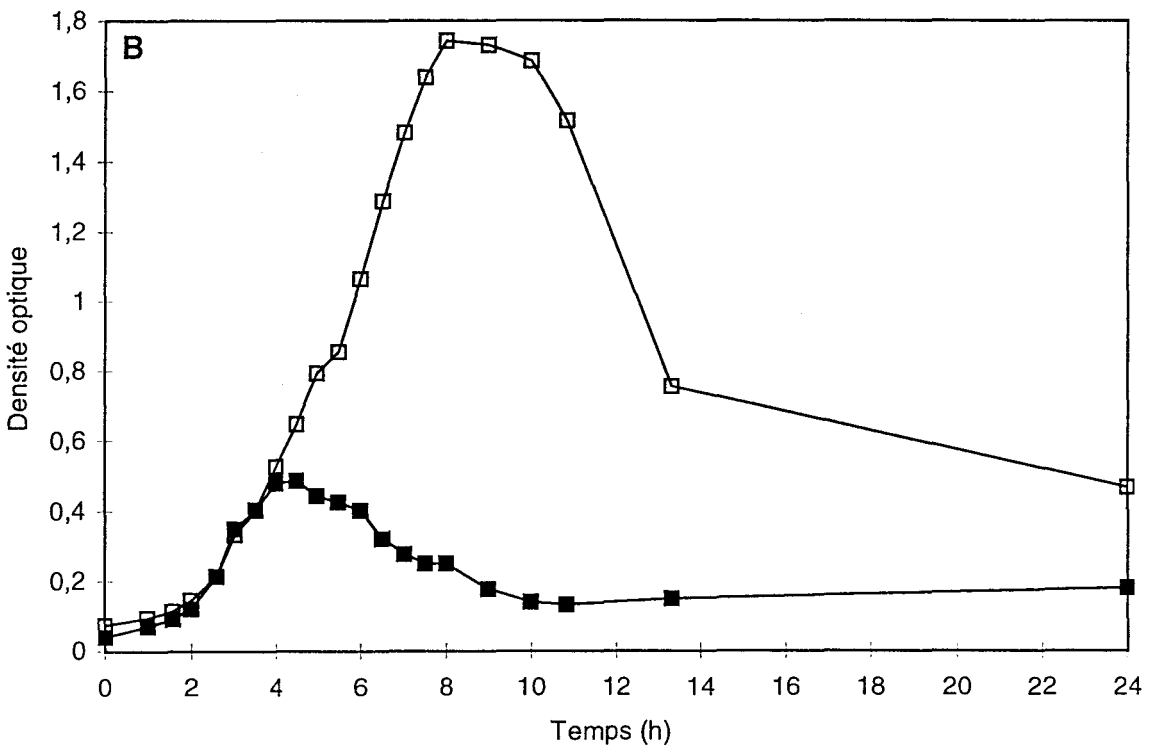
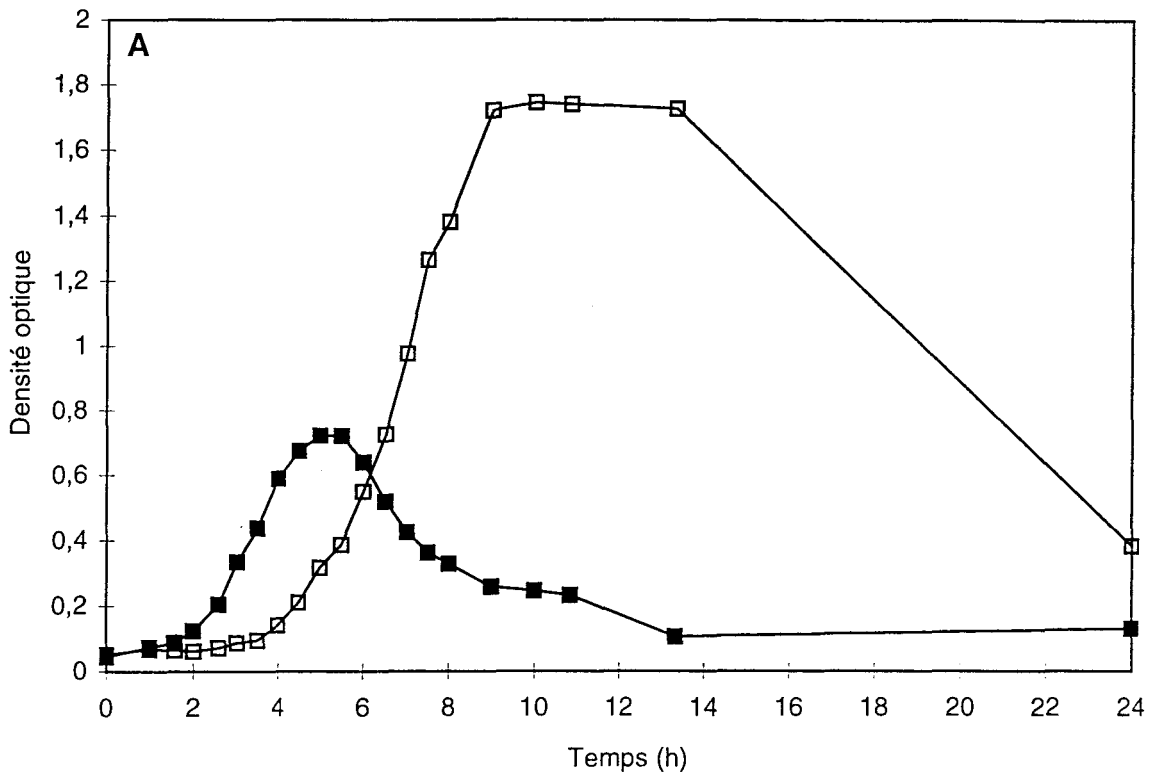


Figure 14 : Effet de concentration en extrait de levure sur la croissance de la souche NCTC 8798 sur le milieu BCYT + glucose (30 mM) selon la nature du tampon. A : Tampon MES ; B : Tampon PIPES. ■ : 0,5 g/L d'extrait de levure ; □ : 5 g/L d'extrait de levure.

milieu BCYT contenant les tampons MES et PIPES. Les caractéristiques globales de croissance étant identiques pour les 3 souches, la souche sauvage a été choisie comme souche modèle pour croiser l'effet de la concentration en extrait de levure et de la nature du tampon. Deux concentrations en extrait de levure ont été testées : 0,5 et 5 g/L. L'extrait de levure est ajouté par filtration Millex à 10 mL de milieu BCYT initialement préparé sans glucose. Le glucose est ajouté à une concentration de 30 mM par filtration Millex.

L'extrait de levure à une concentration de 5 g/L augmente de façon considérable la production de biomasse, quelles que soient les souches et la nature du tampon (Figure 13 et Figure 14). Pour les 2 concentrations en extrait de levure, les densités optiques atteignent leur valeur maximale entre 4 et 10 h d'incubation et restent stables par la suite. Les densités optiques maximales augmentent de 100 % en présence de 5 g/L d'extrait de levure (Tableau 18 et Tableau 19). Le temps de génération est variable selon les souches et les conditions d'étude : en présence d'une forte concentration en extrait de levure et du tampon HEPES, il augmente respectivement de 25 et 97 % pour les souches NCTC 8798 et R3 alors qu'il diminue de 25 % pour la souche 8-6. Pour la souche NCTC 8798, l'extrait de levure augmente le temps de génération de 10 % avec le tampon MES et de 63 % avec le tampon PIPES. Les phases de latence ne sont cependant pas modifiées en présence de 5 g/L d'extrait de levure à l'exception de la souche sauvage sur le tampon MES. Quand le milieu BCYT contient du tampon HEPES ou MES, l'addition de 5 g/L d'extrait de levure augmente de 0,20 à 0,60 unités pH pour les souches 8-6 et R3. Par contre, ce composé diminue le pH de 0,43 unité avec le tampon PIPES pour la souche NCTC 8798.

Le dosage du glucose a été réalisé pour les 3 souches au cours de la cinétique de croissance sur le milieu BCYT + glucose (30 mM) contenant du tampon HEPES et pour chaque concentration en extrait de levure (Figure 13). Le glucose est consommé en totalité en fin de cinétique par les 3 souches quelle que soit la quantité d'extrait de levure. Cependant, la vitesse de consommation du glucose est différente selon la concentration en extrait de levure et la quantité de biomasse présente. En effet, avec 0,5 g/L de ce composé, il reste entre 15 et 20 mM de glucose lorsque la densité optique atteint une valeur stable. Par contre, en présence d'une concentration 10 fois supérieure en extrait de levure, la consommation du glucose est plus rapide : ce substrat est consommé en totalité en même temps que la densité optique maximale est atteinte. Par conséquent, nous pouvons penser que le

Tableau 20 : Paramètres de croissance des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu BCYT + glucose (11 mM) contenant du tampon HEPES

Souches	Densité optique maximale	Temps de latence (h)	Temps de génération (h)
NCTC 8798	0,97 [0,02]	5	0,98 [0,07]
8-6	0,65 [0,15]	6	0,94 [0,10]
R3	0,95	13	2,85

Les chiffres représentent les valeurs moyennes de trois expériences. Les valeurs entre crochets correspondent à l'écart-type.

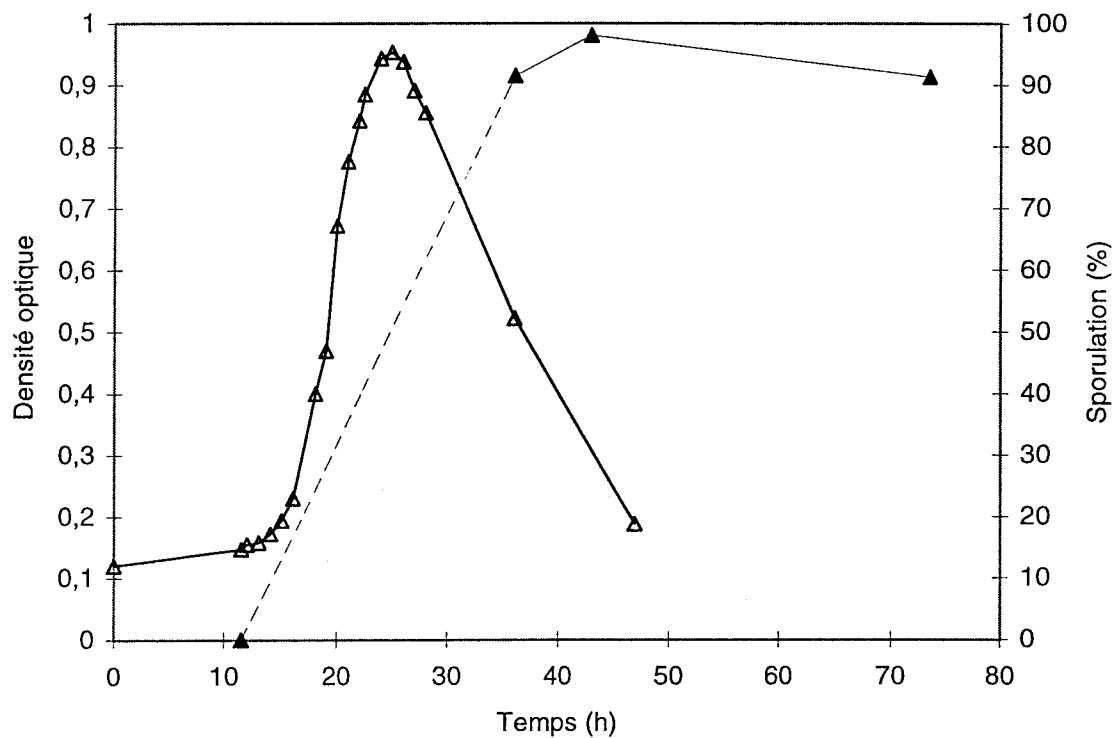


Figure 15 : Croissance et sporulation de la souche R3 sur le milieu BCYT + glucose (11 mM). Δ : croissance ; ▲ : sporulation. Une unité d'absorbance correspond au maximum à 0,24 mg de protéines par mL de milieu BCYT + glucose.

glucose est le facteur limitant principal de la croissance des souches lorsque l'extrait de levure est présent à 5 g/L dans le milieu BCYT + glucose. Pour une faible teneur en extrait de levure, la consommation du glucose résiduel après la densité optique maximale permet de garder les cellules sous forme viable et assure la stabilité de la densité optique observée jusqu'à épuisement du glucose. Ce comportement particulier et les valeurs de pH finaux mesurées au cours de ces expériences seront explicités dans la partie "métabolisme" des résultats. Avec de fortes teneurs en extrait de levure, la densité optique chute immédiatement et parallèlement à l'épuisement du glucose. Nous confirmons toutefois déjà que dans ces conditions, la souche 8-6 a un comportement différent des 2 autres.

1.3.3 Croissance, sporulation et production d'entérotoxine

La croissance et la sporulation des souches de *Cl. perfringens* ont été suivies selon les conditions optimales de sporulation sur le milieu BCYT + glucose (11 mM) déterminées précédemment. Dix millilitres de milieu sont doncensemencés à partir d'une préculture réalisée sur le milieu BCYT + glucose (11 mM) à un taux de 2 % pour obtenir une bonne croissance des cellules végétatives et un fort taux de sporulation le plus rapidement possible. L'incubation a lieu à 37°C.

Alors que les croissances des souches NCTC 8798 et 8-6 sur ce milieu sont très semblables avec des temps de génération et des phases de latence proches (Tableau 20), elles diffèrent par la valeur de la densité optique maximale : celle-ci est 33 % plus faible pour la souche 8-6 par rapport à la valeur obtenue pour la souche sauvage. Par contre, la croissance de la souche R3 est différente des 2 autres : d'une part la bactérie commence sa croissance beaucoup plus tard, et d'autre part son développement est beaucoup plus lent. Le temps de génération des souches NCTC 8798 et 8-6 est plus faible de 66 % par rapport à celui obtenu pour la souche R3. La Figure 15 présente la cinétique de la croissance et de la sporulation de la souche R3 dans les conditions optimales de sporulation sur le milieu BCYT + glucose. Après avoir atteint sa valeur maximale, l' densité optique chute rapidement à raison de 0,4 unité d' densité optique en 10 h.

Les premières spores sont observées à partir de 11 h d'incubation (Tableau 21). Le pourcentage de sporulation augmente régulièrement au cours de la cinétique pour atteindre un taux de 100 % de

Tableau 21 : Taux de sporulation et comptages des cellules végétatives, des endospores et des spores de la souche R3 dans les conditions optimales de sporulation sur le milieu BCYT + glucose (11 mM) contenant du tampon HEPES

Temps (h)	Pourcentage de sporulation	Comptages ($\times 10^7/\text{mL}$)	
		Spores	Cellules végétatives
11	0	0	ND
27	40	5,00 [1,60]	7,60 [2,50]
48	92	4,70 [1,20]	0,40 [0,30]

Les comptages des formes végétatives et des spores sont déterminés au pourcentage maximum de sporulation. Les chiffres représentent les valeurs moyennes de 4 champs. Les valeurs entre crochets correspondent à l'écart-type.

ND : non déterminé

spores après 24 h d'incubation, puis ce taux élevé se maintient au-delà de 3 jours d'incubation. Le comptage des cellules végétatives et des spores au cours de cette cinétique reste inchangé entre 27 et 48 h d'incubation, par contre le taux de cellules végétatives chute considérablement de 95 %.

Cette expérience réalisée pour chaque souche et à plusieurs reprises dans ces conditions d'étude a montré que le taux de sporulation variait de 0 à 100 % sur ce milieu. De plus, le taux de sporulation déterminé à la suite de repiquages successifs des souches sur le milieu BCYT + glucose ne montrait pas de résultats stables et était très variable. Cette variation est confirmée par le dosage de l'entérotoxine en fin de croissance. Pour chaque souche, les concentrations sont très différentes selon le nombre de repiquages effectués. Par conséquent, la sporulation semble très aléatoire sur le milieu BCYT + glucose. De plus, il existe des seuils de concentration en glucose qui lèvent la possibilité de sporuler à des niveaux différents pour les 3 souches utilisées. Cette partie sera développée de façon très détaillée dans le paragraphe "métabolisme" des travaux personnels.

1.4 CROISSANCE ET SPORULATION SUR UN MILIEU PERMETTANT UNE PLUS GRANDE REPRODUCTIBILITE DE LA CROISSANCE ET DE LA SPORULATION *IN VITRO* : LE MILIEU D

Dans le paragraphe précédent, nous avons montré que le milieu BCYT + glucose (11 mM) permettait, à la fois, la croissance et la sporulation de 3 souches de *Cl. perfringens*. Cependant, nous voulons comparer ces résultats avec ceux obtenus sur un milieu de sporulation déjà décrit et sur lequel la sporulation a été bien étudiée. C'est pourquoi sur un éventail assez large de souches de *Cl. perfringens*, nous avons choisi le milieu défini D de sporulation en fonction de sa fréquence d'utilisation pour étudier la sporulation des souches NCTC 8798, 8-6 et R3. Sur ce milieu, nous avons fait varier des paramètres au niveau de la préculture et sur le milieu de sporulation pour obtenir un taux reproductible et satisfaisant de spores. Dans une dernière partie, nous avons présenté la croissance, la sporulation et la production d'entérotoxine des 3 souches selon les conditions optimales de sporulation sur le milieu D et définies à partir de ces résultats.

Tableau 22 : Effet de la nature du milieu de préculture sur la croissance des souches 8-6 et R3 sur le milieu D

Préculture	Souche	Densité optique maximale	Phase de latence (h)	Temps de génération (h)
BCYT + glucose	8-6	0,99	< 1	1,17
	R3	1,22	6,15	1,38
FTG	8-6	0,81	3	1,66
	R3	1,14	3	2,12

Les chiffres représentent les valeurs moyennes de deux expériences.

Tableau 23 : Effet de la nature du milieu de préculture sur la sporulation des souches 8-6 et R3 sur le milieu D

Préculture	Souche	Pourcentage de sporulation	Comptages ($\times 10^7/\text{mL}$)	
			Spores	Cellules végétatives
BCYT + glucose	8-6	0	0,00	ND
	R3	80 [6]	9,20 [2,05]	2,25 [1,02]
FTG	8-6	17 [4]	1,00 [0,43]	5,00 [0,85]
	R3	100	3,40 [0,28]	0,00

Les comptages des formes végétatives et des spores sont déterminés au pourcentage maximum de sporulation. Les chiffres représentent les valeurs moyennes de 4 champs. Les valeurs entre crochets correspondent à l'écart-type.

ND : non déterminé

1.4.1 Effet de la préculture

Différentes actions ont été conduites sur les conditions de préculture pour obtenir des spores sur le milieu D : nous avons étudié la croissance et la sporulation à partir de 2 milieux différents de préculture (BCYT + glucose ou FTG), puis nous avons observé l'influence de l'âge de l'inoculum et la présence de lysozyme sur le taux de sporulation. Ensuite, nous avons fait subir à la préculture un choc thermique et nous avons comparé les cinétiques de sporulation obtenues dans ce cas avec celles réalisées en absence de traitement thermique.

1.4.1.1 Nature

L'effet de la nature du milieu de préculture a été étudié avec les souches 8-6 et R3. Deux types de précultures ont été utilisées : le milieu BCYT + glucose (11 mM) incubé 24 h et le milieu FTG activé à la chaleur et incubé 16 à 18 h à 37°C. Un inoculum de 2 % de chaque préculture a été utilisé pour ensemer 10 mL de milieu D contenant du glucose (6 mM) et de la dextrine (3,50 g/L).

Les densités optiques maximales sont plus importantes pour la souche R3 que pour la souche 8-6 quelle que soit la nature de la préculture (Tableau 22). Cependant, la croissance de la souche R3 est plus lente que celle de la souche 8-6 indépendamment de la nature du milieu de préculture. Toutefois, dans la bibliographie, le milieu FTG favorise la sporulation des souches sur le milieu D (Ryu et Labbé, 1989). Le temps de génération est plus élevé quand la préculture utilisée est le milieu FTG : les souches se développent plus lentement avec la préculture FTG. De plus, les densités optiques maximales sont plus élevées lorsque la préculture est le milieu FTG. Ceci montre que la croissance des souches 8-6 et R3 est plus importante dans ces conditions de culture. Lorsque le milieu BCYT + glucose est employé, la densité optique maximale pour les souches 8-6 et R3 est plus importante de respectivement, 22 et 7 %. La croissance de la souche 8-6 commence rapidement avec une préculture sur BCYT + glucose alors que le phénomène est inversé pour la souche R3 : la phase de latence est 2 fois plus longue avec une préculture sur BCYT + glucose.

En outre, le nombre de spores et de cellules végétatives est variable selon la nature de la préculture et les souches. L'utilisation du milieu BCYT + glucose comme milieu de préculture diminue d'environ 20 % le taux de sporulation des 2 souches (Tableau 23).

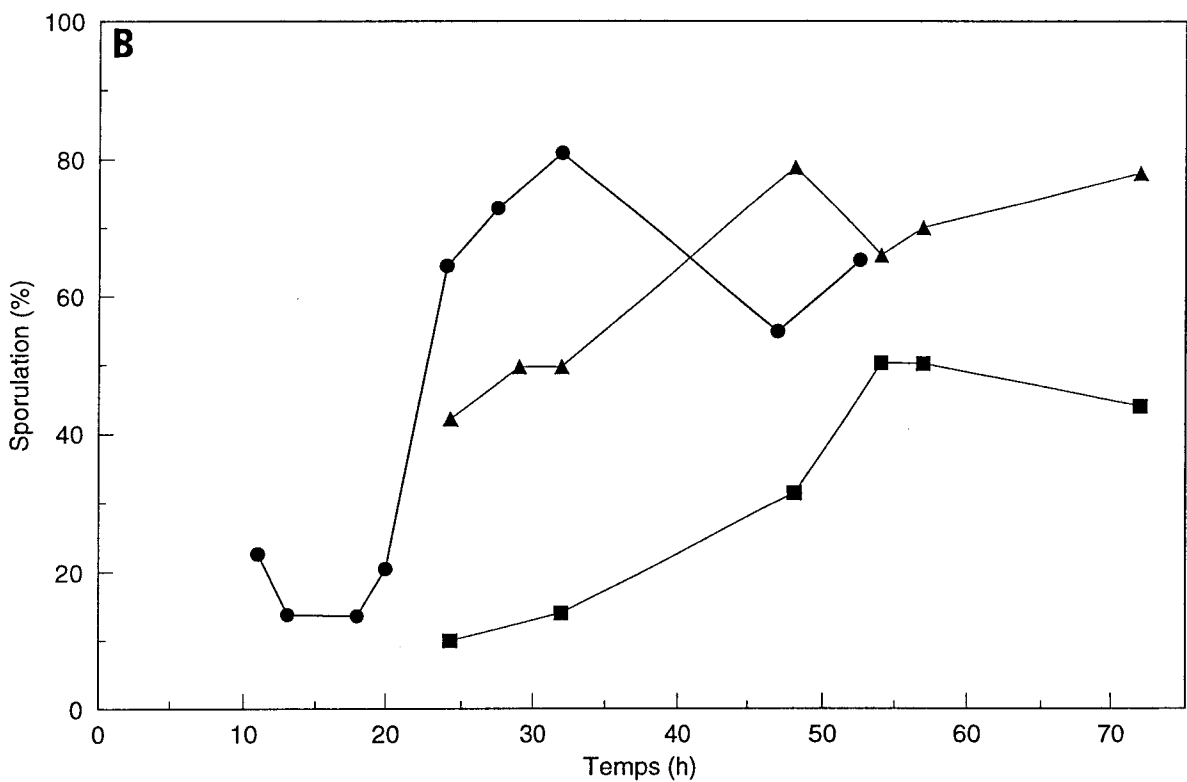
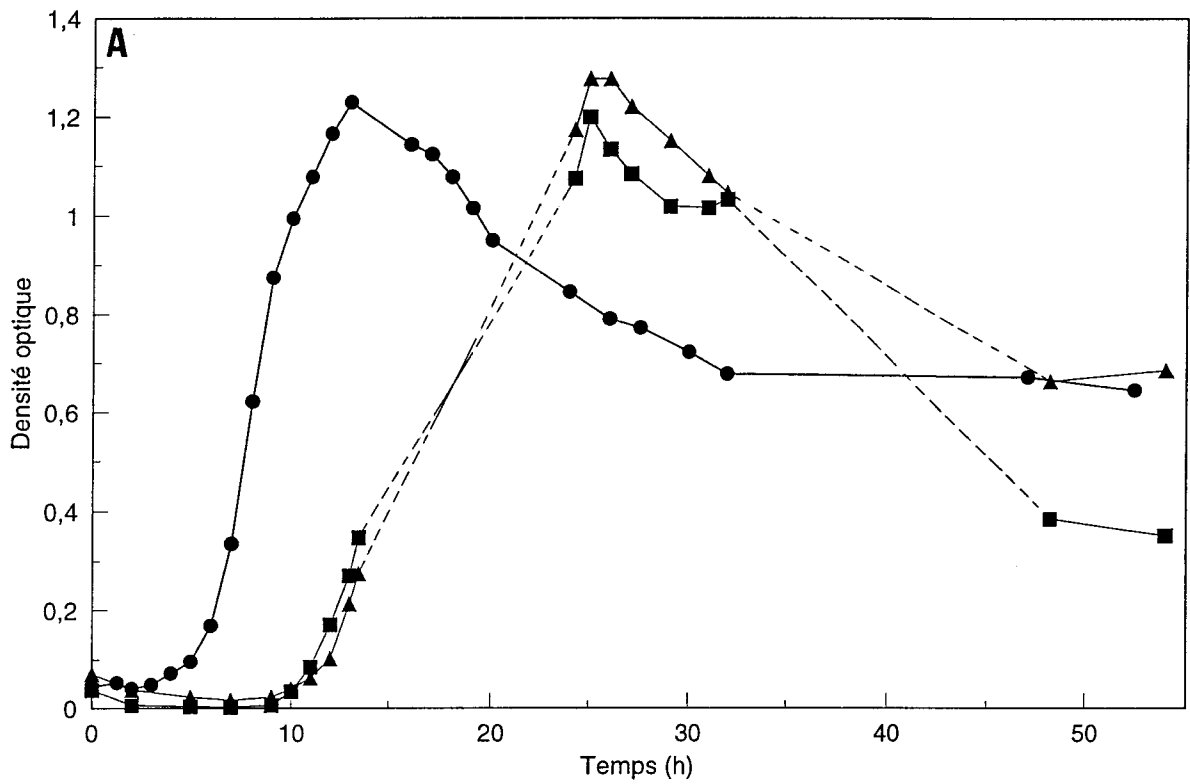


Figure 16 : Influence de l'âge de la préculture sur la croissance et la sporulation de la souche R3 sur le milieu D. A : croissance ; B : sporulation. ● : 24 h ; ▲ : 4 semaines ; ■ : 11 semaines.

Souche	Age de l'inoculum	Densité optique maximale	Phase de latence (h)	Temps de génération (h)
8-6	8 h	1,16	ND	ND
	24 h	0,99	< 1	1,17
	4 semaines	0,65 ^a	10,69	0,94
	6 semaines	0,59	13,25 ^a	1,50 ^a
	8 semaines	0,56	13,42 ^a	2,05
	11 semaines	0,95 ^a	13,80	5,42
R3	7 h	1,13	ND	6,36
	24 h	1,22	6,15	1,38
	4 semaines	1,27	10,55	1,01
	6 semaines	1,30	11,01	1,27
	8 semaines	1,14	13,33	2,49
	11 semaines	1,19	11,29	1,38

Les chiffres représentent les valeurs moyennes de deux expériences.

ND : non déterminé

^a écart-type inférieur à 0,01

Tableau 25 : Influence de l'âge de l'inoculum sur la sporulation des souches 8-6 et R3 sur le milieu D

Souche	Age de l'inoculum	Pourcentage maximal de sporulation	Comptages (x 10 ⁷ /mL)	
			Spores	Cellules végétatives
8-6	8 h	68 [6]	11,80 [5,40]	5,80 [3,30]
	24 h	0	0,00	ND
	4 semaines	0	0,00	ND
	6 semaines	32 [19]	1,40 [0,62]	3,05 [1,86]
	8 semaines	44 [11]	3,80 [1,21]	4,70 [0,84]
	11 semaines	0	0,00	0,14
R3	7 h	42 [5]	5,45 [0,70]	7,50 [1,22]
	24 h	80 [6]	9,20 [2,05]	2,25 [1,02]
	4 semaines	79 [4]	5,95 [1,94]	1,55 [0,34]
	6 semaines	0	0,00	ND
	8 semaines	69 [8]	3,95 [1,15]	1,80 [0,71]
	11 semaines	50 [5]	2,10 [0,58]	2,10 [0,44]

Les comptages des formes végétatives et des spores sont déterminés au pourcentage maximum des sporulation. Les chiffres représentent les valeurs moyennes des 4 champs observés. Les valeurs entre crochets correspondent à l'écart-type.

ND : non déterminé

Par conséquent, même si la production de biomasse est légèrement inférieure et la croissance plus rapide avec la préculture réalisée sur le milieu BCYT + glucose, la sporulation est toutefois plus faible avec ce milieu de préculture.

1.4.1.2 Age

Nous avons étudié l'influence de l'âge de l'inoculum sur la croissance et la sporulation des souches 8-6 et R3 sur le milieu D. Les précultures préparées sur le milieu BCYT + glucose à 11 mM sont stockées à température ambiante pendant une période de 7 heures à 11 semaines avant inoculation à 2 % du milieu de sporulation. Les cinétiques de croissance et de sporulation sont suivies sur des tubes remplis de 10 mL de milieu D contenant 6 mM de glucose et 3,5 g/L de dextrine.

Un inoculum de 11 semaines d'incubation présente les caractéristiques suivantes : pour la souche 8-6, d'une part, aucune spore et $1,40 \times 10^6$ cellules viables/mL et, d'autre part, $2,62 \times 10^7$ spores/mL sont comptées dans le milieu BCYT + glucose ; de plus, aucune cellule viable n'a pu être énumérée après 40 semaines d'incubation dans les mêmes conditions de culture. Pour les 2 souches, les densités optiques maximales obtenues ne semblent pas dépendre de l'âge de la préculture (Figure 16A et Tableau 24). Toutefois, elles sont plus élevées pour la souche R3 que pour la souche 8-6. Les phases de latence s'allongent considérablement avec un inoculum d'au moins 4 semaines, mais sont toujours plus courtes avec la souche R3. Par ailleurs, le temps de génération augmente en fonction du temps de stockage, principalement pour la souche 8-6. Pour les deux souches, le pourcentage de sporulation est variable suivant l'âge de l'inoculum (Tableau 25). En effet, l'augmentation de l'âge de l'inoculum conduit à un pourcentage plus faible pour les 2 souches. Les spores sont formées plus tard avec un inoculum âgé de 11 semaines (Figure 16B).

Par conséquent, le taux de sporulation obtenu dans ces conditions sur le milieu D est variable selon l'âge de la préculture. En effet, il n'existe pas de relation entre l'âge de la préculture et le taux de sporulation obtenu. Par ailleurs, cette expérience faite à plusieurs reprises montre que la sporulation sur le milieu D à partir d'un inoculum d'âge variable n'est pas reproductible. Par conséquent, nous utiliserons pour la suite des travaux un inoculum de moins de 24 h qui permet à la fois une croissance rapide et un taux de sporulation d'au moins 50 %.

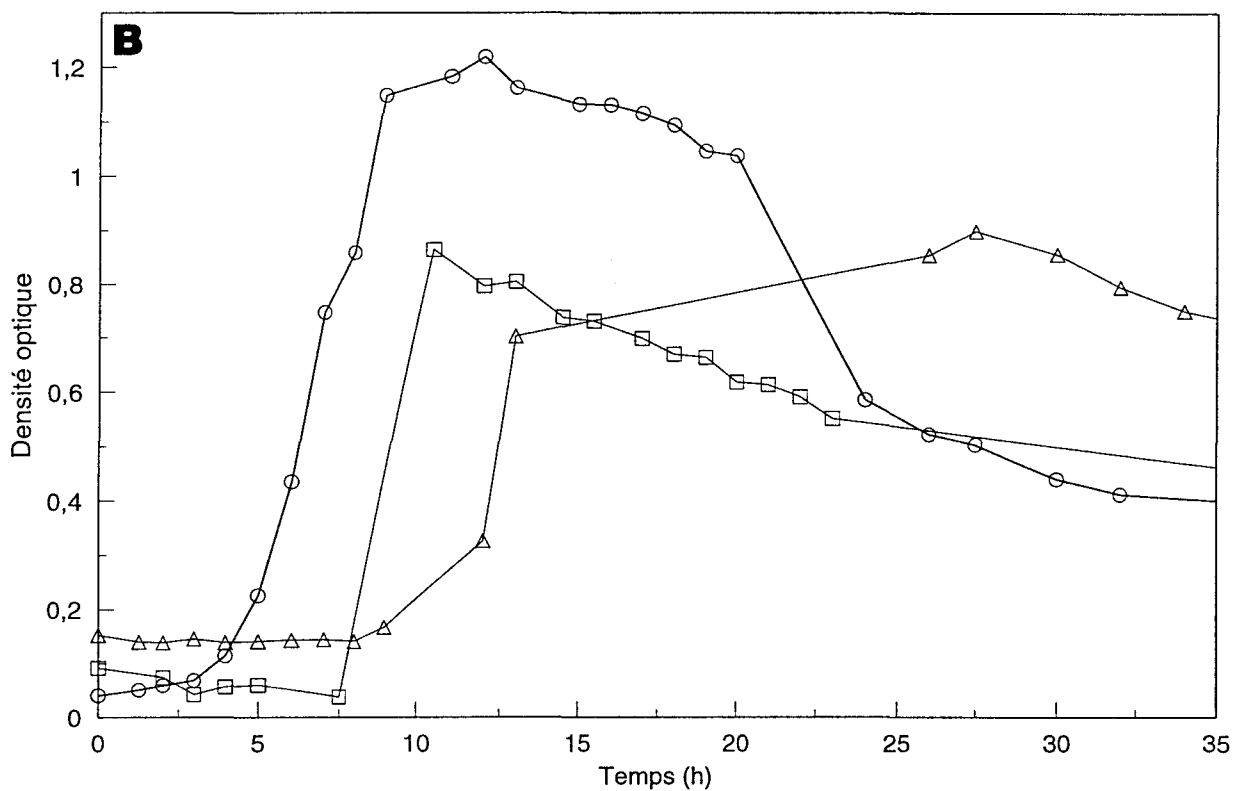
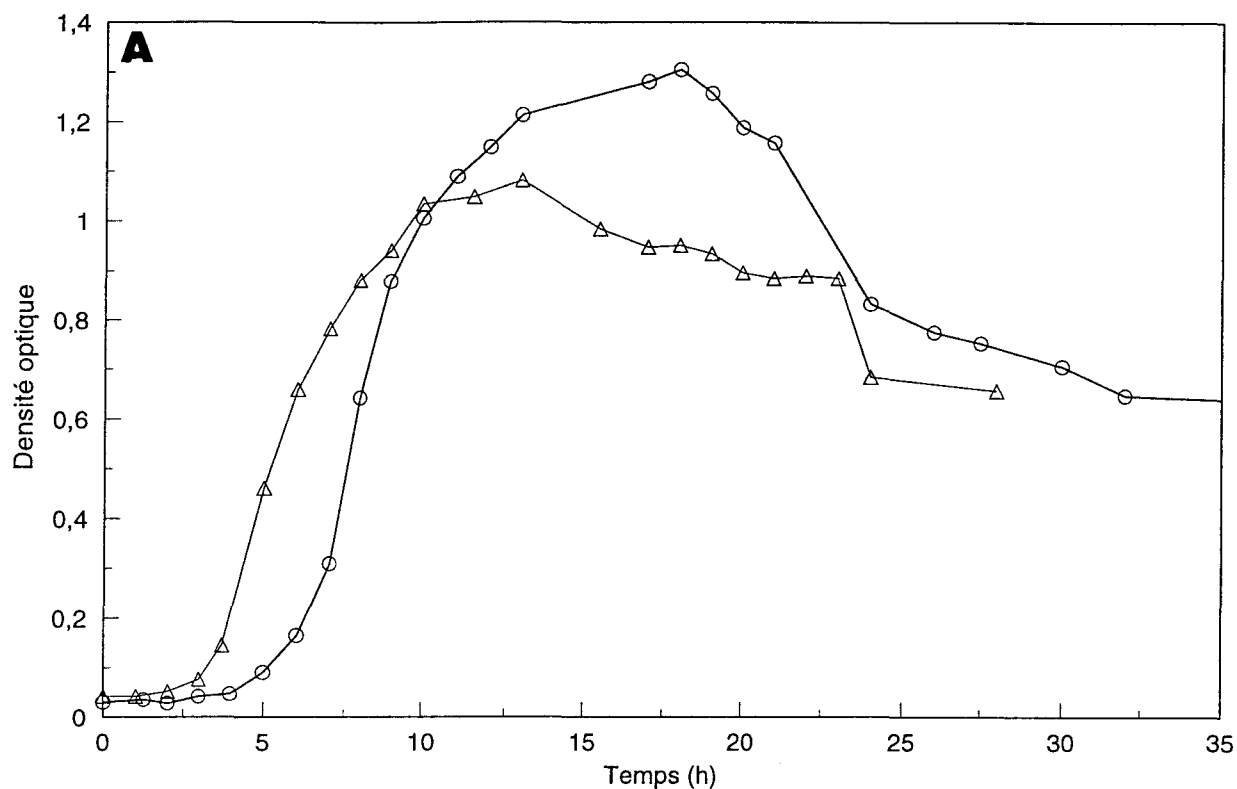


Figure 17 : Influence de l'addition de lysozyme (250000 UI/L) sur la croissance des souches 8-6 et R3 sur le milieu D à partir des précultures sur le milieu BCYT + glucose (11 mM) ou le milieu FTG. A : Croissance de la souche R3 avec une préculture sur le milieu BCYT + glucose avec ou sans lysozyme (○) ; ou sur milieu FTG avec ou sans lysozyme (△). B : Croissance de la souche 8-6 avec une préculture sur le milieu BCYT + glucose avec (△) ou sans lysozyme (□) ; ou sur le milieu FTG avec ou sans lysozyme (○). Les symboles sont plus importants que les barres d'erreur de la densité optique.

Tableau 26 : Effet du lysozyme (250000 UI/L) présent dans la préculture sur la croissance des souches 8-6 et R3 sur le milieu D

Préculture	Souche	Lysozyme	Densité optique	Phase de latence (h)	Temps de génération (h)
			maximale		
BCYT +	8-6	+	0,94	11,67	0,81
		-	1,20	< 1	1,17
glucose	R3	+	1,14	6,55	1,43
		-	1,22	6,15	1,38
FTG	8-6	+	ND	4,00	0,54
		-	0,81	3,00	1,66
	R3	+	1,10	3,44	0,87
		-	1,14	3,00	2,16

Les chiffres représentent les valeurs moyennes de deux expériences.

ND : non déterminé

Tableau 27 : Effet du lysozyme (250000 UI/L) présent dans la préculture sur la sporulation des souches 8-6 et R3 sur le milieu D

Préculture	Souche	Lysozyme	Pourcentage maximal de sporulation	Comptages ($\times 10^7/\text{mL}$)	
				Spores	Cellules végétatives
BCYT +	8-6	+	23 [7]	4,00 [1,73]	13,00 ^a
		-	0	0,00	ND
glucose	R3	+	82 [2]	15,85 [1,86]	3,45 [9,57]
		-	80 [6]	9,20 [2,05]	2,25 [1,02]
FTG	8-6	+	62 [1]	14,10 [0,35]	8,50 [0,42]
		-	30 [4]	2,20 [0,43]	5,00 [0,85]
	R3	+	83 [13]	3,80 [1,76]	0,75 [0,34]
		-	100	3,40 [0,28]	0,00

Les comptages des formes végétatives et des spores sont déterminés au pourcentage maximum de sporulation. Les chiffres représentent les valeurs moyennes des 4 champs observés. Les valeurs entre crochets correspondent à l'écart-type.

ND : non déterminé

^a écart-type inférieur à 0,01

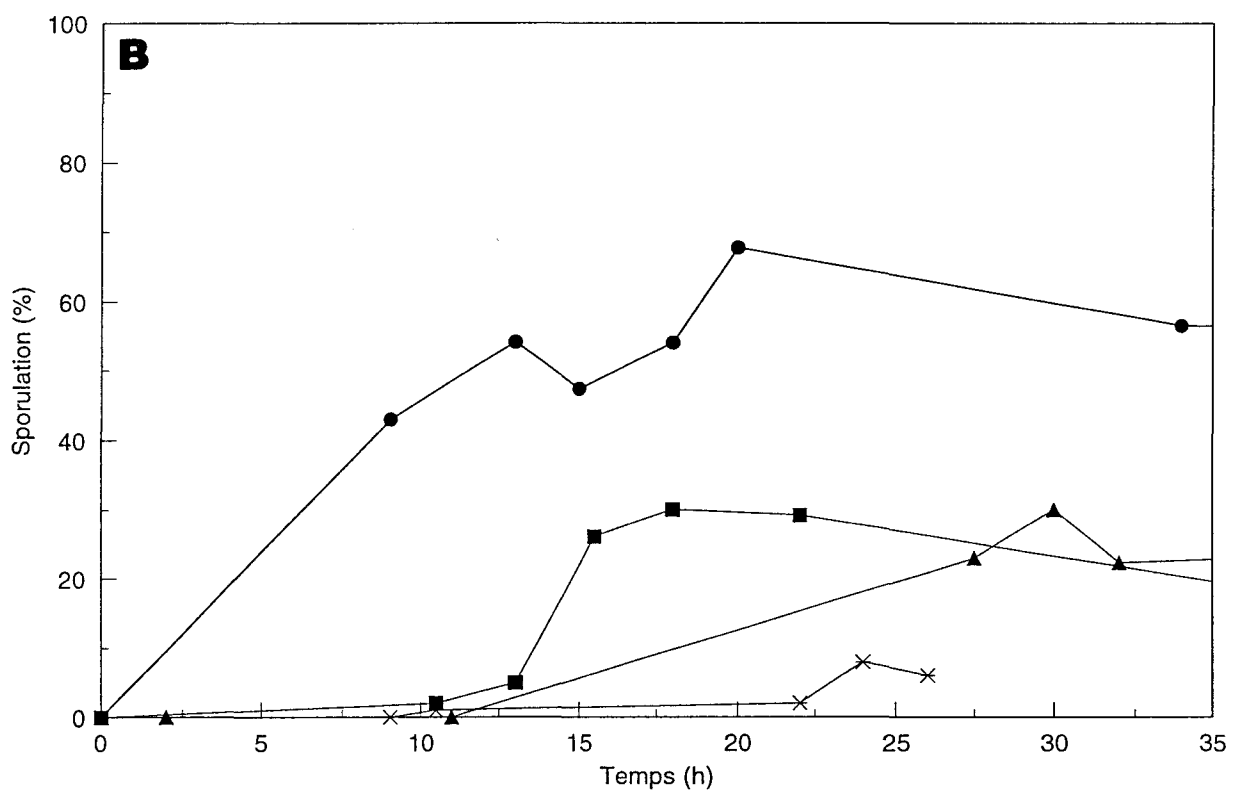
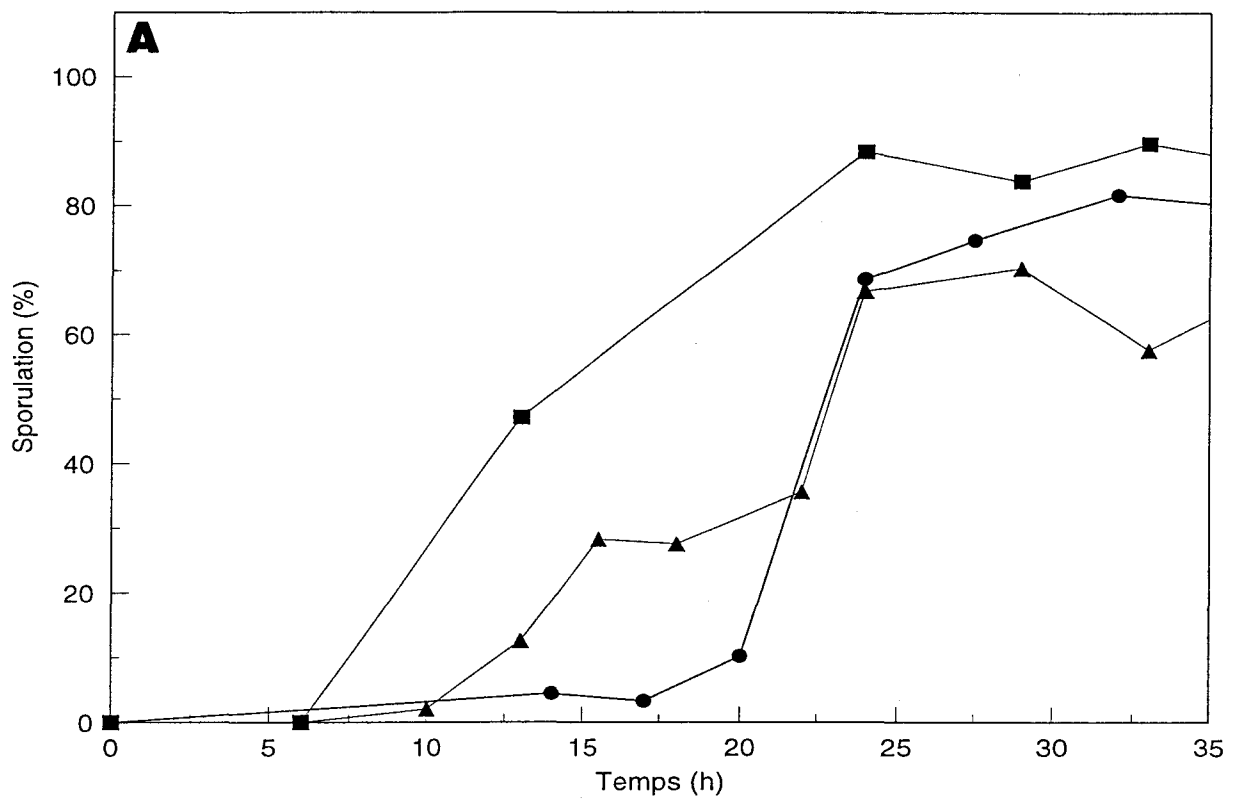


Figure 18 : Influence de l'addition de lysozyme (250000 UI/L) sur la sporulation des souches 8-6 et R3 sur le milieu D à partir des précultures sur le milieu BCYT + glucose (11 mM) ou le milieu FTG. A : Pourcentage de sporulation de la souche R3 avec une préculture sur milieu BCYT + glucose (●) ; ou sur le milieu FTG avec (▲) ou sans lysozyme (■). B : Pourcentage de sporulation de la souche 8-6 avec une préculture sur milieu BCYT + glucose avec (▲) ou sans lysozyme (x) ; ou sur le milieu FTG avec (●) ou sans lysozyme (■). Les valeurs pour les pourcentages de sporulation représentent les valeurs moyennes ± 6 .

1.4.1.3 *Présence ou absence de lysozyme*

L'influence du lysozyme sur la croissance et sur la sporulation a été suivie sur les souches 8-6 et R3. Le lysozyme (Sigma) est ajouté à une concentration finale de 250000 UI/L dans le milieu de préculture. L'expérience a été réalisée en tubes de 10 mL de milieu D contenant 6 mM de glucose et 3,50 g/L de dextrine. La préculture est de 2 natures : le milieu BCYT + glucose (11 mM) et le milieu FTG. Le milieu BCYT + glucose a moins de 24 h d'incubation. Les précultures sur le milieu FTG sont traitées à la chaleur (75°C pendant 15 min) avant d'ajouter le lysozyme et incubées 16 à 18 h. Dans chaque cas, les tubes de milieu D ont étéensemencés à 2 % à partir de la préculture. Des tubes dont la préculture ne contient pas de lysozyme servent de témoin.

Pour la souche R3, la production maximale de biomasse est influencée par l'addition de lysozyme dans la préculture sur BCYT + glucose (Figure 17A et Tableau 26) : cette protéine abaisse de 7 % la valeur de la densité optique maximale. Cependant, la phase de latence et le temps de génération ne sont pas modifiés. Avec une préculture sur le milieu FTG, cette protéine retarde très légèrement le début de la croissance mais ne modifie pas la valeur de la densité optique maximale. Par contre, elle accélère la croissance : le temps de génération est plus faible de 60 % en présence de lysozyme (Figure 17B). Sur le milieu de préculture BCYT + glucose contenant du lysozyme, la densité optique maximale obtenue pour la souche 8-6 est plus faible de 22 % et la phase de latence s'allonge considérablement. Pour la souche 8-6, la présence de lysozyme diminue le temps de génération de respectivement 30 et 67 % avec les précultures BCYT + glucose et FTG.

Quelles que soient les souches et la nature de la préculture, la présence de lysozyme favorise de façon plus ou moins importante la formation des spores et des cellules végétatives. Avec la préculture FTG, le pourcentage de sporulation pour la souche 8-6 double en présence de lysozyme (Figure 18A et 18B) alors que pour la souche R3, il ne semble pas être modifié par la présence de lysozyme quel que soit le milieu de préculture (Tableau 27). Nos résultats suggèrent donc une possible influence du lysozyme pour la souche 8-6 sur les comptages de spores obtenus sur le milieu D. Cependant, l'utilisation de cette enzyme sur la germination des spores est fortement préconisée (Sacks et Thomas, 1979 ; Lund et Peck, 1994). L'effet négatif possible du lysozyme sur les comptages des

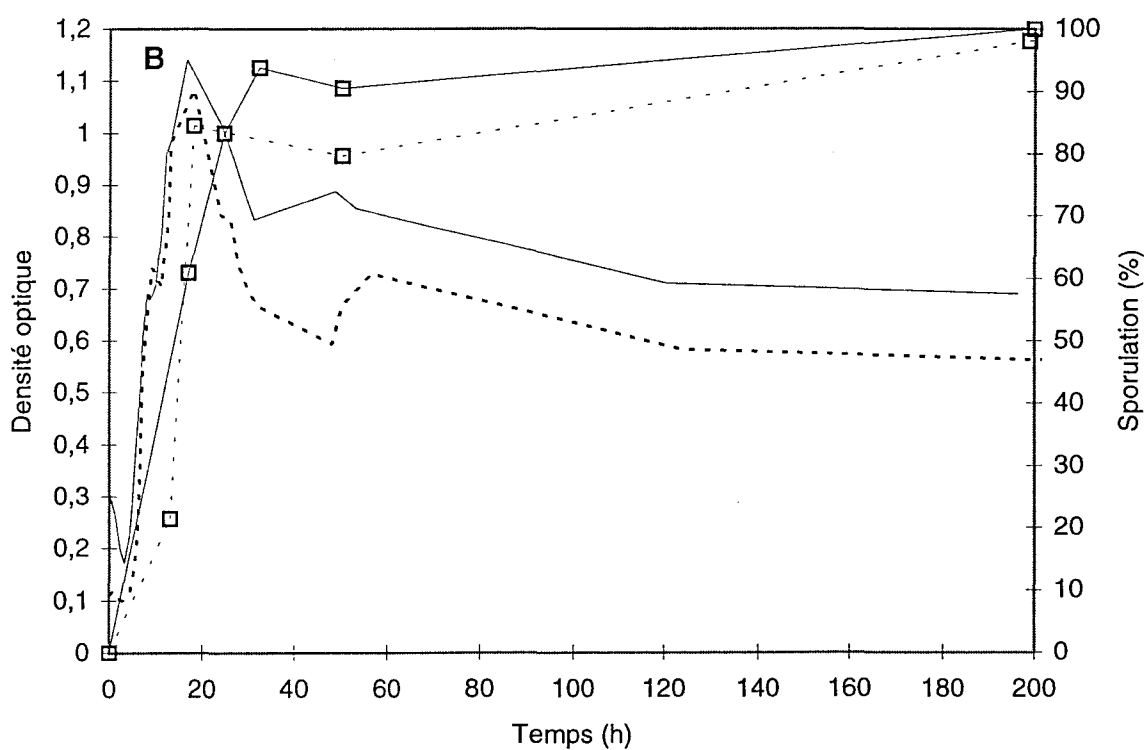
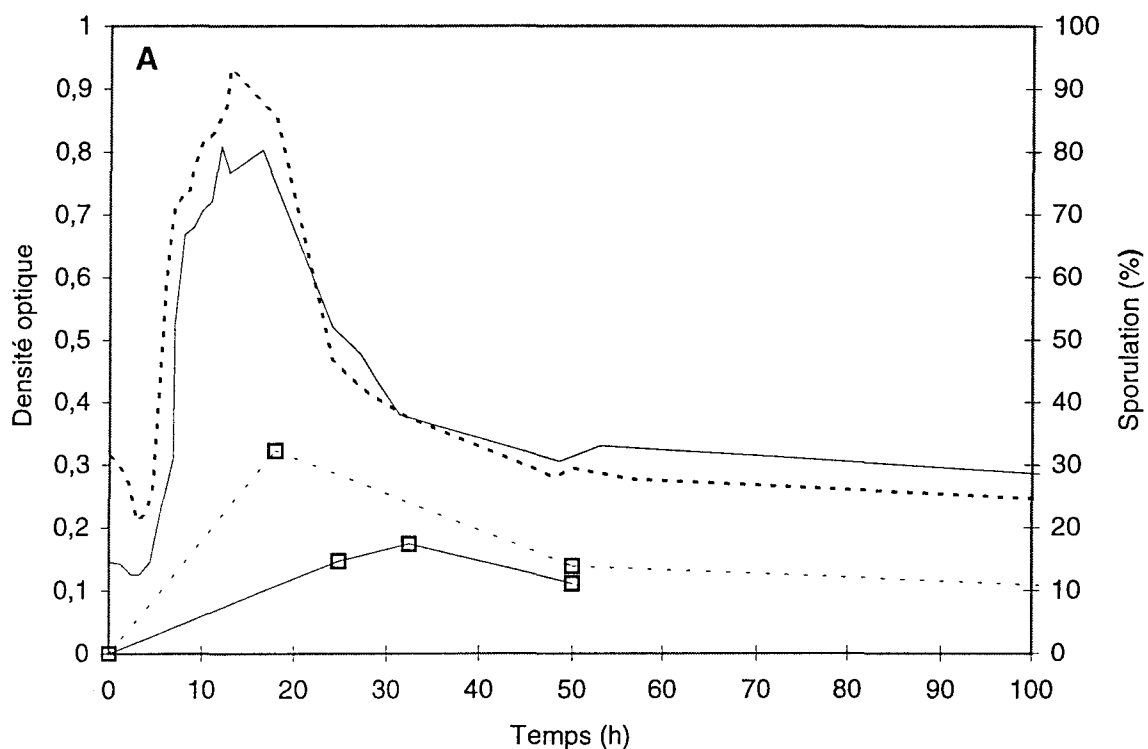


Figure 19 : Influence d'un traitement thermique de la préculture sur la croissance et la sporulation des souches 8-6 et R3 sur le milieu D. A : Souche 8-6 ; B : Souche R3. - : croissance avec choc thermique ; -- : croissance sans choc thermique ; -□- : sporulation avec choc thermique ; --□-- : sporulation sans choc thermique. Les densités optiques ont été enregistrées toutes les 30 min pendant les 30 premières heures et de façon plus espacée pour la fin de la cinétique.

Tableau 28 : Influence d'un traitement thermique de la préculture sur la croissance des souches 8-6 et R3 sur le milieu D

Souche	Traitement (75°C 15 min)	Densité optique maximale	Phase de latence (h)	Temps de génération (h)
8-6	+	0,81	3	1,66
	-	0,94 [0,01]	3,48 [0,50]	1,65 [0,14]
R3	+	1,14	3	2,12
	-	1,14 [0,04]	4,14 [0,40]	1,70 [0,45]

Les chiffres représentent les valeurs moyennes de trois expériences. Les valeurs entre crochets correspondent à l'écart-type.

Tableau 29 : Influence d'un traitement thermique de la préculture sur la sporulation des souches 8-6 et R3 sur le milieu D

Souche	Traitement (75°C 15 min)	Pourcentage maximal de sporulation	Comptages (x 10 ⁷ /mL)	
			Spores	Cellules végétatives
8-6	+	17 [4]	1,00 [0,43]	5,00 [0,85]
	-	30 [8]	4,30 [1,89]	9,85 [2,81]
R3	+	100	3,40 [0,28]	0
	-	100	3,35 [0,50]	0

Les comptages des formes végétatives et des spores sont déterminés au pourcentage maximum de sporulation. Les chiffres représentent les valeurs moyennes de 4 champs. Les valeurs entre crochets correspondent à l'écart-type.

Tableau 30 : Influence d'un traitement thermique de la préculture sur la production maximale d'entérotoxine par les souches 8-6 et R3 sur le milieu D

Souche	Traitement (75°C 15 min)	Taux maximum d' entérotoxine (mg/mL)
8-6	+	3,2 x 10 ⁻⁴
	-	1,6 x 10 ⁻⁴
R3	+	0,02
	-	0,02

spores, obtenu sur ce milieu et avec une préculture sur le milieu BCYT + glucose, résulte de la taille importante de l'inoculum (2 %). Cependant, l'effet positif obtenu avec la préculture sur le milieu FTG reste à être confirmé.

Quelques expériences sur la souche 8-6 ont été réalisées en ajoutant cette protéine directement dans le milieu D de sporulation. Les résultats montrent que l'addition de cette protéine n'a aucune influence sur la croissance et le taux de sporulation de la souche.

Par conséquent, la présence de lysozyme dans le milieu de préculture peut avoir un effet légèrement positif sur la croissance et la sporulation des souches sur le milieu D. Cependant, cette enzyme a une influence plus importante sur la croissance et le taux de sporulation obtenus pour la souche 8-6. Ces informations confirment donc la sensibilité de la souche 8-6 au lysozyme.

1.4.1.4 Choc thermique

Le traitement à la chaleur (75°C pendant 15 min) a été effectué sur le milieu de préculture FTGensemencé à 0,5 % à partir d'une culture réalisée sur le milieu BCYT + glucose. Les tubes de préculture sont incubés 16 à 18 h avant ensemencement (2 %) de 10 mL de milieu D contenant du glucose (11 mM) et de la dextrine (3,5 g/L). L'effet du choc thermique sur la croissance et la sporulation a été étudié sur les souches 8-6 et R3. Des tubes de milieu Densemencés avec des cultures réalisées sur le milieu de préculture FTG non traité à la chaleur servent de témoin.

Que la préculture FTG soit chauffée ou non, les cinétiques de croissance et de sporulation sont similaires (Figure 19). Toutefois, quelques différences existent : la chaleur semble limiter la production de biomasse de 14 % pour la souche 8-6 et semble ralentir la croissance de la souche R3 de 25 % (Tableau 28). De plus, les phases de latence des 2 souches sont légèrement plus courtes quand les précultures sont chauffées. Cependant, le traitement thermique ne gêne ni la sporulation de la souche R3, ni la formation de spores et la production maximale d'entérotoxine (Tableau 29 et Tableau 30). Par contre, il diminue de 50 % le taux de sporulation de la souche 8-6 et double la quantité maximale d'entérotoxine produite.

Aucun article ne fait référence à l'effet d'un choc thermique réalisé sur le milieu de préculture sur les paramètres de croissance et de sporulation des souches sur le milieu D. Cependant, ce traitement est employé par un certain nombre d'auteurs (Labbé et Rey, 1979 ; Labbé, 1981 ; Granum *et al.*, 1984 ;

Craven *et al.*, 1987). D'après nos résultats, il semble nécessaire de le réaliser : il permet ainsi d'éliminer les cellules végétatives et de sélectionner les cellules résistantes à la chaleur qui pourront par la suite sporuler dans le milieu de sporulation. Il en ressort que la croissance, la sporulation et la production d'entérotoxine de la souche R3 ne sont pas influencées par le traitement thermique effectué sur la préculture, alors que la souche 8-6 semble plus sensible à la chaleur.

Etant donné qu'aucune croissance n'est observée pour la souche NCTC 8798 sur le milieu FTG après traitement thermique, nous n'avons pas présenté les cinétiques de croissance et de sporulation de cette souche. Par conséquent, l'obtention de spores sur le milieu D par cette souche ne nécessite pas de traitement thermique sur la préculture.

Ces conditions de traitement des précultures de nos trois souches d'études seront conservées pour la suite des travaux.

1.4.2 Importance du milieu de culture

Après avoir étudié l'effet de quelques paramètres sur le milieu de préculture, nous avons voulu savoir si les modifications des conditions de sporulation portées au niveau du milieu de culture influençaient la croissance et la sporulation des souches sur le milieu D. C'est pourquoi nous avons modifié d'une part le volume du milieu de culture, et d'autre part les concentrations en substrats carbonés (glucose et dextrine) présents dans le milieu de sporulation.

1.4.2.1 Volume du milieu

Deux volumes de milieu de sporulation ont été utilisés : 10 mL en tube et 1,2 L en flacon. Tubes et flacons contiennent du milieu D avec 6 mM de glucose et 3,50 g/L de dextrine. L'effet du volume du milieu D sur la croissance, le taux de sporulation et la production d'entérotoxine a été étudié avec des précultures réalisées sur le milieu FTG traitées à la chaleur pour les souches 8-6 et R3 et non traitées pour la souche NCTC 8798. L'inoculum est de 2 %. Les flacons de 1,2 L sont placés à l'étuve à 37°C la veille.

Tableau 31 : Effet du volume du milieu D sur les paramètres de croissance des souches NCTC 8798, 8-6 et R3

Volume du milieu de culture	Souche	Densité optique maximale	Phase de latence (h)	Temps de génération (h)
1,2 L	NCTC 8798	1,18	< 1	1,10
	8-6	1,39	< 1	1,12
	R3	1,89	< 1	1,37
10 mL	NCTC 8798	0,87	3	1,60
	8-6	0,81	3	1,66
	R3	1,14	3	2,16

Tableau 32 : Effet du volume du milieu D sur la sporulation des souches NCTC 8798, 8-6 et R3

Volume de milieu de culture	Souche	Pourcentage maximal de sporulation	Comptages ($\times 10^7/\text{mL}$)	
			Spores	Cellules végétatives
1,2 L	NCTC 8798	87 [7]	2,13 [0,24]	0,30 [0,19]
	8-6	99 [1]	27,35 [2,65]	0,20 [0,28]
	R3	99 [1]	23,86 [7,22]	0,20 [0,16]
10 mL	NCTC 8798	94 [6]	0,75 [0,47]	0,05 [0,10]
	8-6	17 [4]	1,00 [0,43]	5,00 [0,85]
	R3	100	3,40 [0,28]	0,00

Les comptages des formes végétatives et des spores sont déterminés au pourcentage maximum de sporulation. Les chiffres représentent les valeurs moyennes de 4 champs. Les valeurs entre crochets correspondent à l'écart-type.

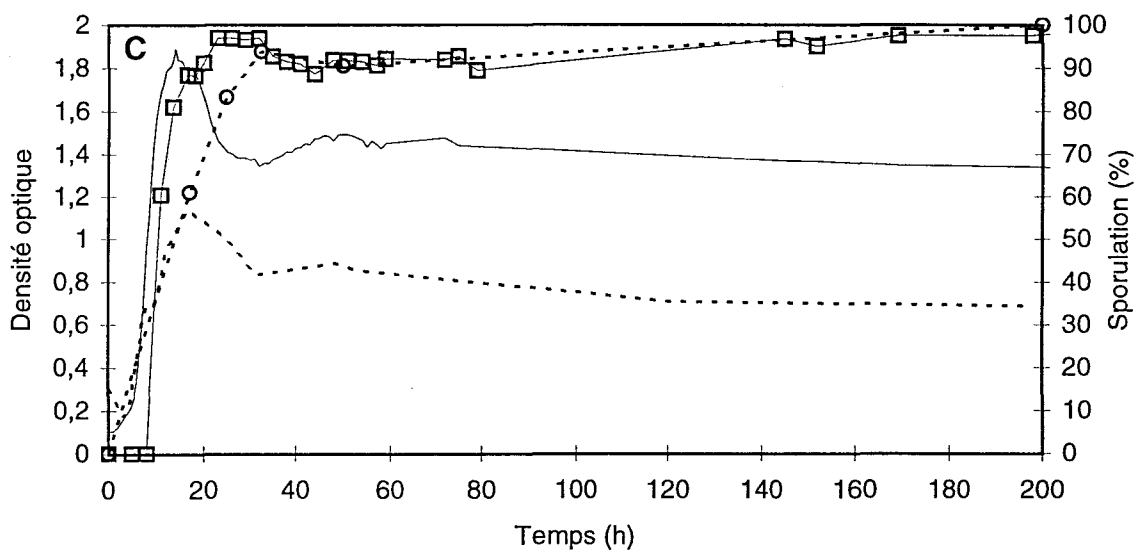
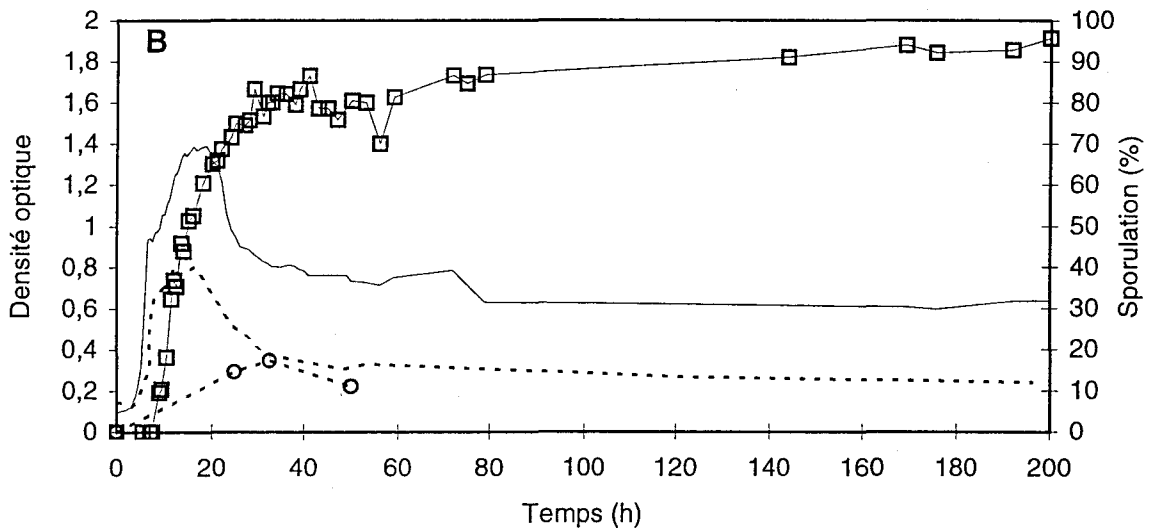
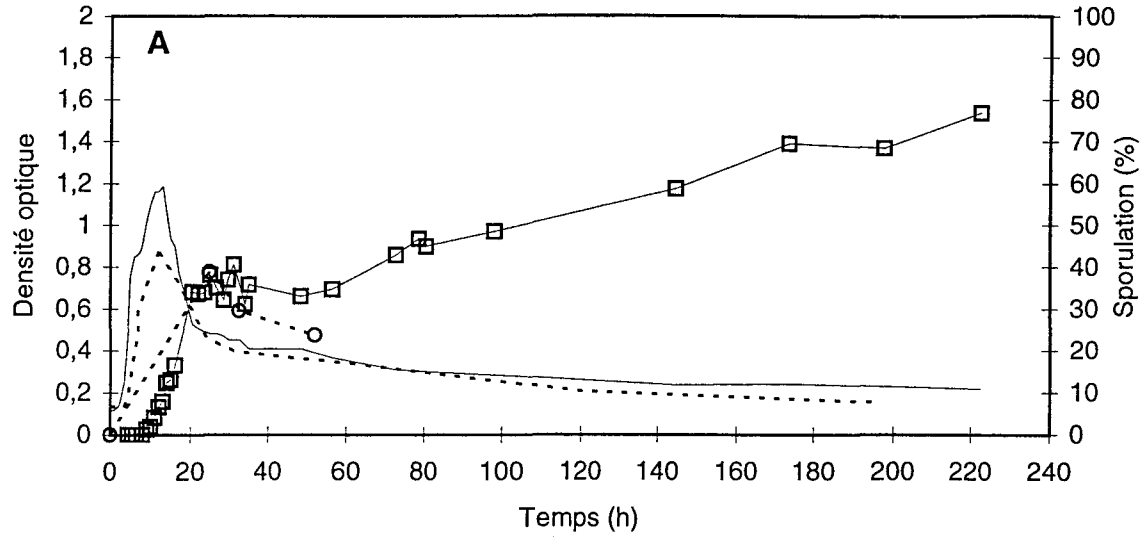


Figure 20 : Effet du volume du milieu de culture sur la croissance et la sporulation des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu D. A : Souche NCTC 8798 ; B : Souche 8-6 ; C : Souche R3. - : croissance sur 1,2 L ; -- : croissance sur 10 mL ; -□- : sporulation sur 1,2 L ; --□-- : sporulation sur 10 mL. Les densités optiques ont été enregistrées toutes les 30 min pendant les 30 premières heures et de façon plus espacée pour la fin de la cinétique.

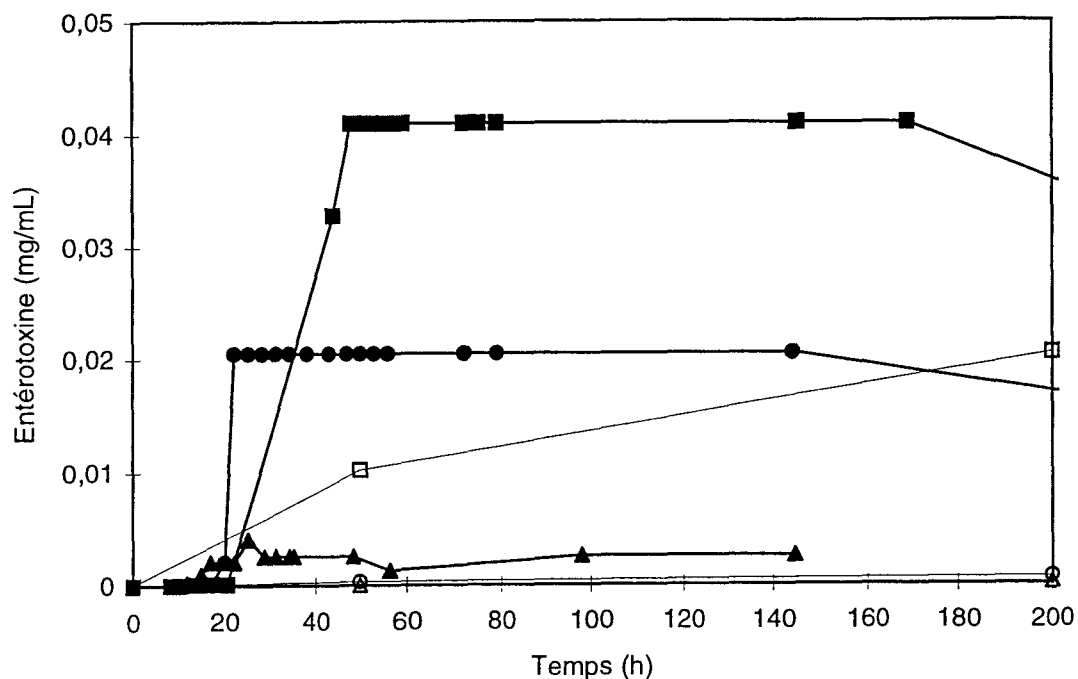


Figure 21 : Effet du volume du milieu de culture D sur la production d'entérotoxine par les souches NCTC 8798, 8-6 et R3. Δ : Souche NCTC 8798 ; \circ : Souche 8-6 ; \square : Souche R3. Les symboles pleins correspondent à la production d'entérotoxine dans des flacons de 1,2 L de milieu D et les symboles vides à la production d'entérotoxine dans des tubes de 10 mL.

Tableau 33 : Effet du volume du milieu D sur la production maximale d'entérotoxine par les souches NCTC 8798, 8-6 et R3

Volume de culture	Souche	Taux maximum d'entérotoxine (mg/mL)
1,2 L	NCTC 8798	0,002
	8-6	0,02
	R3	0,04
10 mL	NCTC 8798	$8,00 \times 10^{-5}$
	8-6	$3,20 \times 10^{-4}$
	R3	0,02

1.4.2.1.1 Croissance et sporulation

Pour les 3 souches de *Cl. perfringens*, le volume de 1,2 L de milieu D permet une production plus importante de biomasse et un taux de sporulation plus élevé (Figure 20) par rapport aux résultats obtenus sur 10 mL de milieu. La croissance commence plus tôt et se poursuit rapidement dans un volume de 1,2 L (Tableau 31). En effet, les temps de latence et les temps de génération obtenus en 1,2 L sont inférieurs (entre 45 à 60 % plus faibles) à ceux obtenus sur des tubes de 10 mL : sur ces derniers, la croissance est plus lente pour les 3 souches étudiées. Les densités optiques maximales sont obtenues vers 15-17 h d'incubation quels que soient les souches et le volume de culture. Cependant, elles augmentent de 30 à 40 % sur un grand volume. La densité optique chute ensuite rapidement après la valeur maximale et se stabilise vers 50 h d'incubation. Cette diminution de la valeur de la densité optique est variable suivant les souches mais elle est observée pour les 2 volumes de culture étudiés : cette chute est de 70, 55 et 30 % respectivement pour les souches NCTC 8798, 8-6 et R3.

Les taux de sporulation maximum diffèrent peu pour les souches NCTC 8798 et R3 entre 10 mL et 1,2 L de milieu D (Figure 20 et Tableau 32), mais le temps mis pour atteindre la valeur maximale est très différent selon les souches. Pour la souche R3, le taux maximum de sporulation obtenu sur 10 mL de milieu de culture est atteint une dizaine d'heures plus tard par rapport au flacon de 1,2 L, alors qu'il est atteint après 200 h d'incubation pour la souche sauvage. Pour la souche 8-6, le taux maximal de sporulation est multiplié par un facteur 6 lorsque la sporulation est suivie sur 1,2 L et est atteint après 40 h d'incubation. De plus, pour les souches 8-6 et R3 essentiellement, le flacon favorise la formation d'un plus grand nombre de spores et de cellules végétatives par unité de volume (Tableau 32). Par conséquent, le volume de 1,2 L de milieu de sporulation augmente le nombre de spores comptées pour les 3 souches et le taux de sporulation de la souche 8-6.

1.4.2.1.2 Production d'entérotoxine

L'entérotoxine a été dosée parallèlement à la cinétique de croissance et de sporulation des souches (Figure 21). Dans les flacons de 1,2L, les souches 8-6 et R3 libèrent des quantités importantes d'entérotoxine, respectivement 0,02 et 0,04 mg/mL alors que la souche NCTC 8798 produit 0,002 mg d'entérotoxine/mL de milieu (Tableau 33). La production d'entérotoxine dans 10 mL de milieu de

sporulation est beaucoup plus faible (50 % plus faible pour la souche R3) et se situe à l'état de traces pour les souches NCTC 8798 et 8-6. En effet, pour chaque souche, le nombre de spores et de cellules végétatives comptées dans 10 mL est faible par rapport aux comptages effectués dans 1,2 L (Tableau 32). Par ailleurs, la très faible quantité de spores produites dans le milieu explique les traces d'entérotoxine pour la souche sauvage. Par conséquent, le taux d'entérotoxine produite semble être relié de près au nombre de spores présentes dans le milieu de sporulation.

La croissance plus rapide, la meilleure sporulation et la production d'entérotoxine plus importante observées dans un grand volume de milieu D peuvent être expliquées par la présence d'une surface d'échange entre le milieu de culture et l'atmosphère gazeuse des flacons de 1,2 L plus importante par rapport à un tube à essai contenant 10 mL de milieu. Ceci favoriserait un meilleur équilibre des gaz entre la phase gazeuse et la phase liquide.

En conclusion, un volume de 1,2 L de milieu D permet une croissance plus rapide avec une production de biomasse plus importante pour chaque souche et un taux de sporulation plus élevé pour la souche 8-6, alors que la sporulation des souches NCTC 8798 et R3 ne semble pas être affectée par la taille du milieu de culture. De plus, le flacon de 1,2 L permet la formation d'un nombre plus important de spores, accompagné d'une plus grande production d'entérotoxine.

1.4.2.2 Concentration variable en substrats de croissance

Le milieu D contient 2 substrats carbonés nécessaires à la croissance et à la sporulation des souches : le glucose et la dextrine. La modification de la concentration de ces sucres peut favoriser ou au contraire lever la sporulation des souches étudiées. Pour vérifier cet effet, nous avons choisi d'étudier la croissance et la sporulation à 8 concentrations différentes de glucose et à 2 concentrations de dextrine.

1.4.2.2.1 Glucose

L'influence du glucose sur la croissance et le taux de sporulation des souches 8-6 et R3 a été étudiée sur des tubes de 10 mL contenant du milieu D, préparé initialement sans glucose mais avec 3,5 g/L de dextrine. Le glucose a été ajouté stérilement après autoclavage à l'aide d'un filtre Millex

Tableau 34 : Influence de la concentration initiale de glucose présent dans le milieu D sur la croissance des souches 8-6 et R3

Souche R3

Concentration en glucose (mM)	Densité optique maximale	Phase de latence (h)	Temps de génération (h)
0	0,84	4,17	3,80
3	1,12	2,25	1,73
6	1,25	2,58	1,10
9	1,35	2,75	1,15
11	1,36	2,58	1,08
28	1,73	2,83	1,13
42	1,77	2,67	1,17
56	1,83	2,92	1,20

Souche 8-6

Concentration en glucose (mM)	Densité optique maximale	Phase de latence (h)	Temps de génération (h)
0	0,59	3,50	4,70
3	1,03	3,83	1,17
6	1,30	3,83	1,38
9	1,41	4,50	1,47
11	1,49	4,00	1,42
28	1,79	4,00	1,75
42	1,79	4,67	1,60
56	1,83	4,50	1,30

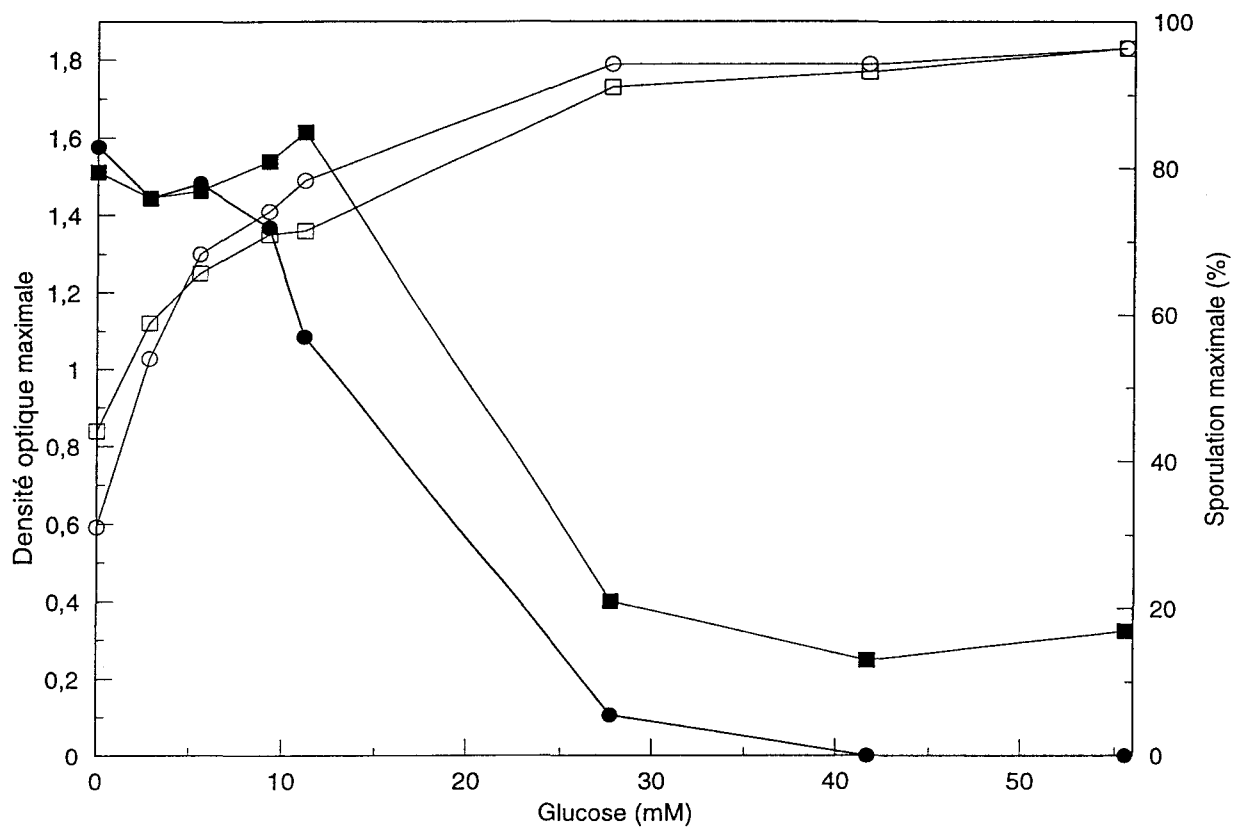


Figure 22 : Effet de la concentration en glucose sur l'absorbance maximale et le taux de sporulation maximum obtenu pour les souches 8-6 et R3 sur le milieu D. Souche 8-6 : ○ : densité optique maximale ; ● : taux maximum de sporulation ; Souche R3 ; □ : densité optique maximale ; ■ : taux maximum de sporulation.

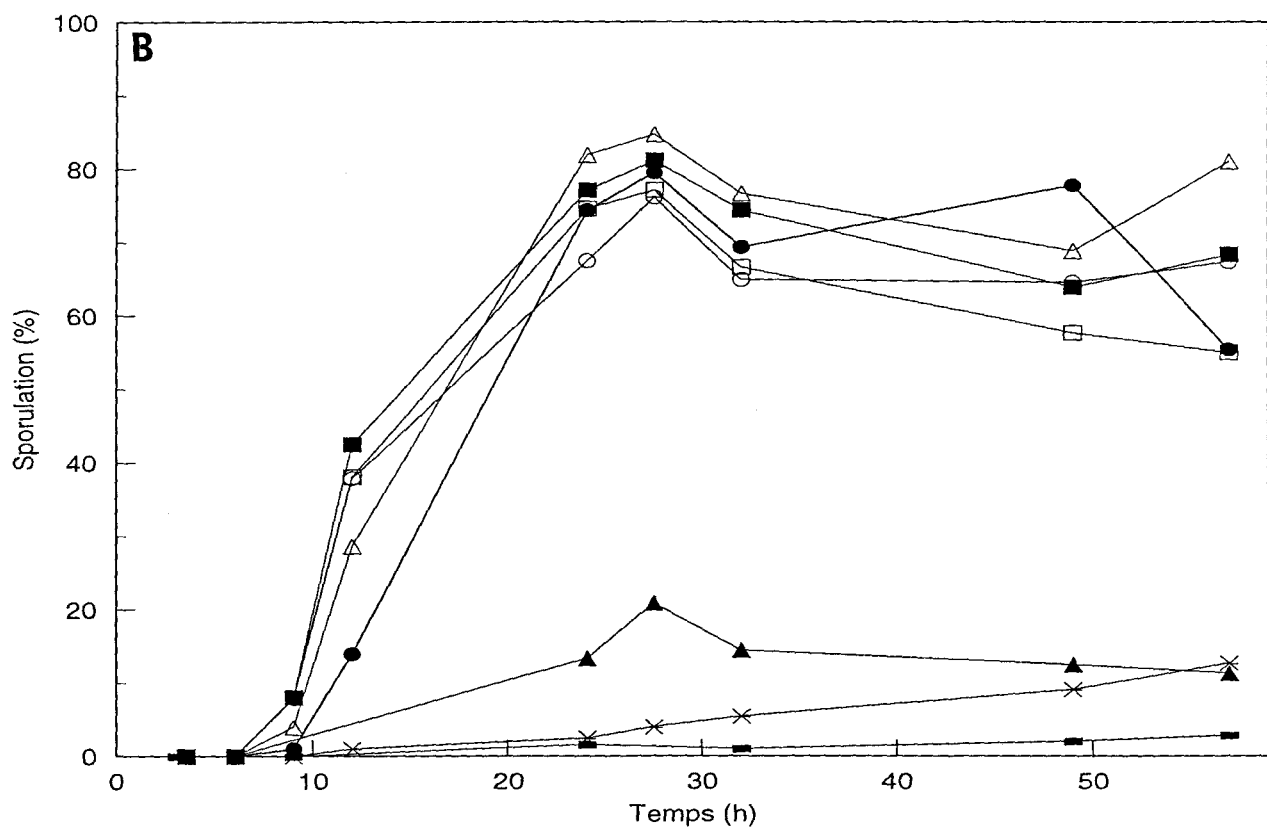
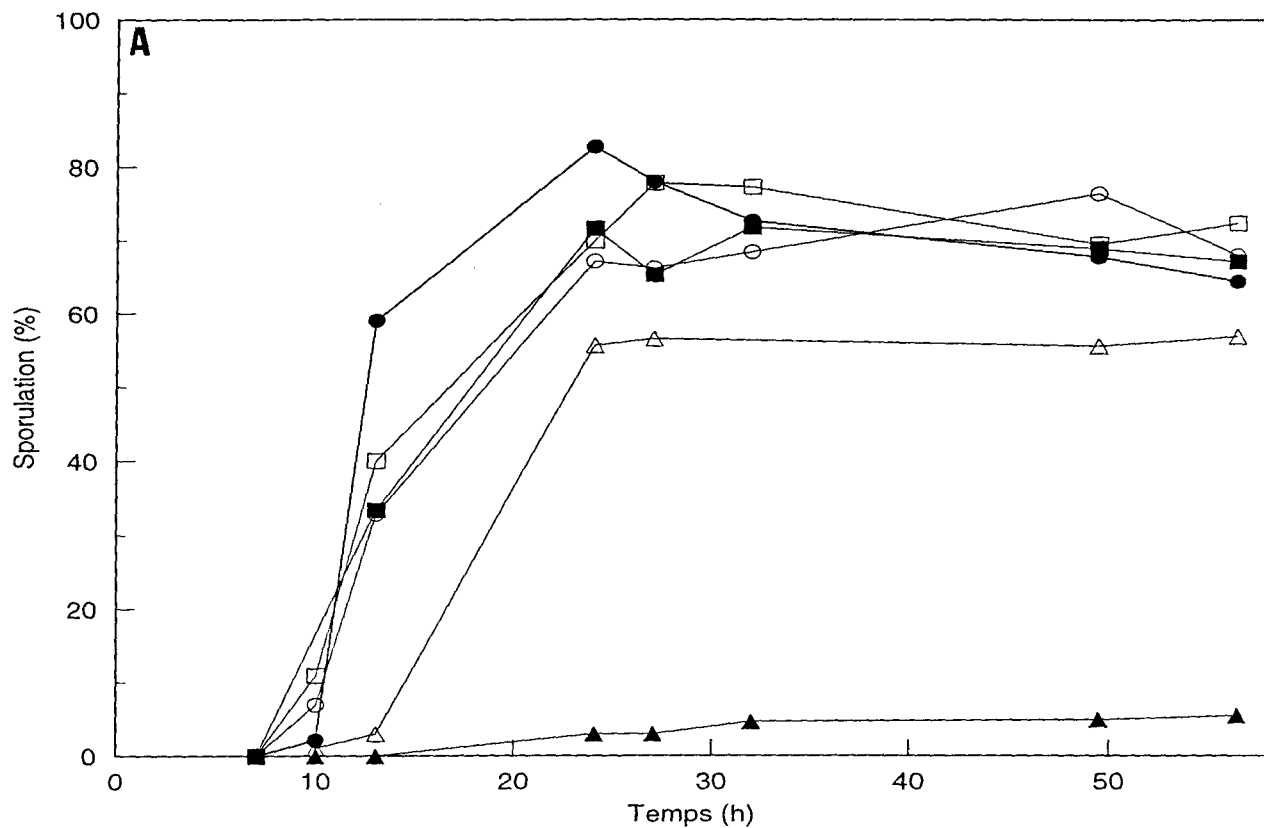


Figure 23 : Effet de la concentration en glucose sur la sporulation des souches 8-6 et R3 sur le milieu D.
 A : Souche 8-6 ; B : Souche R3. ● : 0 mM ; ○ : 3 mM ; □ : 6 mM ; ■ : 9 mM ; △ : 11 mM ; ▲ : 28 mM ; x : 42 mM ; - : 56 mM

Tableau 35 : Influence de la concentration initiale de glucose présent dans le milieu D sur la sporulation des souches 8-6 et R3

Souche	Concentration en glucose (mM)	Pourcentage maximal de sporulation	Comptage (x 10 ⁷ /mL)	
			Spores	Cellules végétatives
8-6	0 - 9	77 [4]	11,70 [3,41]	3,67 [1,73]
	11	57 [4]	9,06 [1,42]	6,80 [0,35]
	28	6 [2]	0,60 [0,20]	9,26 [0,94]
	42	0	0,00	>10 ⁸
	56	0	0,00	>10 ⁸
R3	0 - 11	80 [4]	7,60 [1,74]	1,84 [0,22]
	28	21 [4]	1,87 [0,46]	7,13 [1,30]
	42	13 [5]	1,20 [0,42]	8,00 [1,71]
	56	17 [7]	0,75 [0,19]	3,70 [1,75]

Les comptages des formes végétatives et des spores sont déterminées au taux maximum de sporulation. Les chiffres représentent les valeurs moyennes de 4 champs observés. Les valeurs entre crochets correspondent à l'écart-type.

pour obtenir les concentrations suivantes dans les tubes : 0 ; 3 ; 6 ; 9 ; 11 ; 28 ; 42 et 56 mM. La préculture a été réalisée sur le milieu FTG suivi d'un traitement à la chaleur (75°C pendant 15 min). L'inoculum est de 2 %.

L'optique maximale des 2 souches augmente régulièrement avec la quantité croissante de glucose jusqu'à 28 mM, sans modification du temps de génération (Figure 22 et Tableau 34). Cependant, en absence de glucose, le temps de génération triple pour les 2 souches. Par contre, le temps de latence n'est pas considérablement modifié en présence d'une quantité croissante de glucose. De 0 à 9 mM de glucose, les souches possèdent des cinétiques de sporulation similaires (Figure 23). Pour les 2 souches, la sporulation commence vers 8 h d'incubation ; le taux augmente rapidement pour atteindre la valeur maximale à 24 h d'incubation, puis il se maintient à cette valeur pendant les 30 heures suivantes. Une diminution constante du pourcentage de sporulation (chute de 30 % pour 10 mM de glucose ajouté) est observée à partir de 11 mM lorsque la concentration en glucose augmente (Figure 22). Des tendances similaires ont été observées pour les souches NCTC 8679 et NCTC 8239 par Shih et Labbé (1994) avec une inhibition de la sporulation à une concentration en glucose de 5 mM. En absence de glucose, les comptages de cellules végétatives et de spores sont similaires pour les 2 souches (Tableau 35). De même, de façon générale, le nombre de cellules végétatives augmente avec la concentration en glucose, alors que le nombre de spores diminue. A 28 mM de glucose, le nombre de spores comptées diminue d'un facteur 10. Des concentrations supérieures à 28 mM n'inhibent pas complètement la sporulation de la souche R3 alors que la souche 8-6 ne sporule que très faiblement, et ne sporule plus pour des concentrations en glucose supérieures à 28 mM. Il s'avère que de 3 à 11 mM de glucose, les paramètres de croissance ne sont pas modifiés. En absence de ce substrat et pour des concentrations supérieures à 11 mM, la variation de ces paramètres est plus importante. De plus, le taux de sporulation, le nombre de spores et le nombre de cellules végétatives sont affectés à partir des concentrations supérieures à 11 mM de glucose. Ces expériences nous ont permis de mettre en évidence les effets de deux facteurs.

Généralement, les substances diffusibles et les hydrates de carbone lentement fermentés augmentent le pourcentage de sporulation. Cependant, l'addition de guanosine et de saccharose dans le milieu D supprime généralement la sporulation de certaines souches (Sacks, 1983). L'addition de raffinose dans le milieu Tortora réduit le pourcentage de sporulation, et la thiamine n'augmente pas

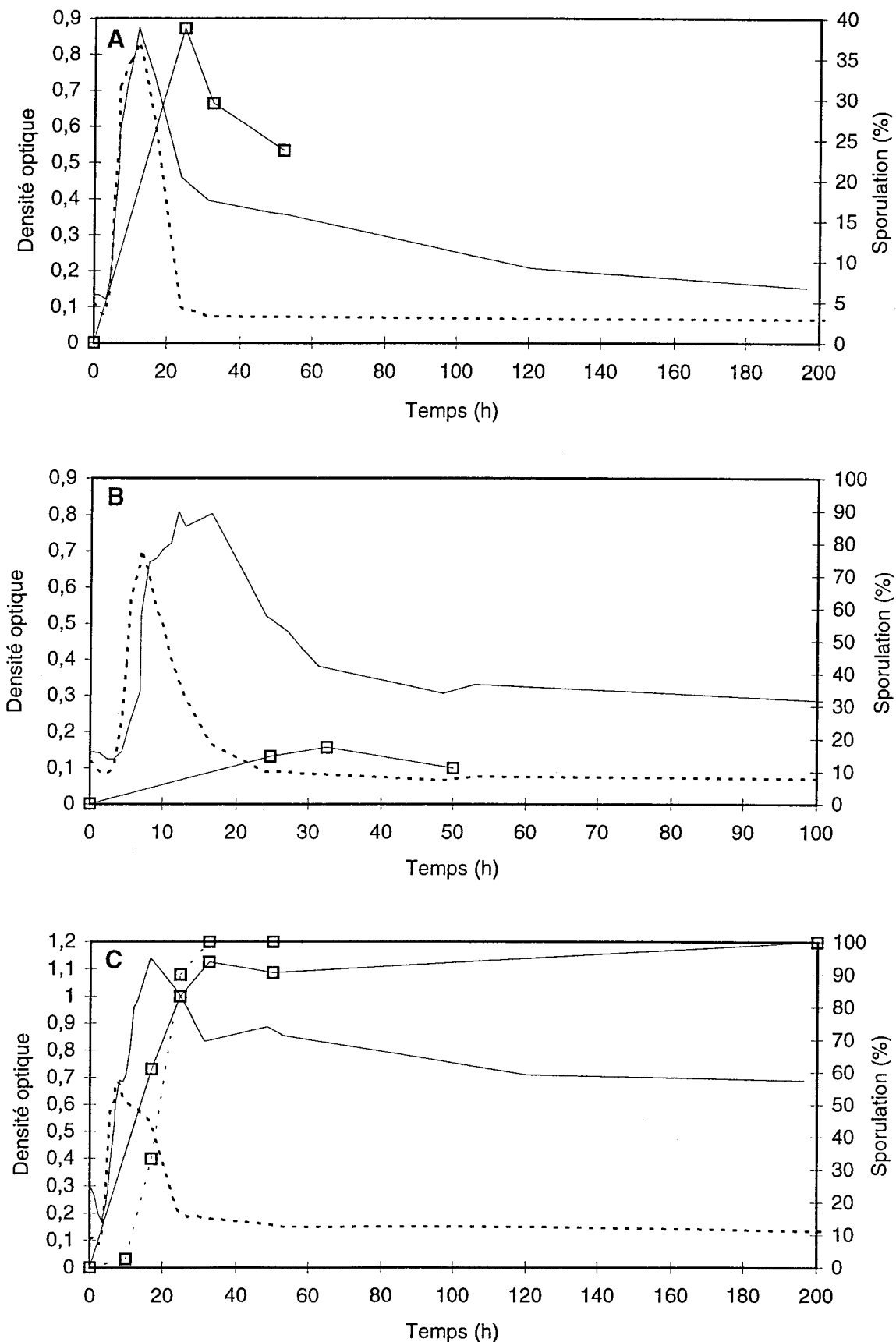


Figure 24 : Effet de la concentration en dextrine sur la croissance et la sporulation des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 dans le milieu D. A : Souche NCTC 8798 ; B : Souche 8-6 ; C : Souche R3. - : croissance en présence de 3,5 g/L de dextrine ; -- : croissance en absence de dextrine ; -□- : sporulation en présence de 3,5 g/L de dextrine ; --□-- : sporulation en absence de dextrine. Les densités optiques ont été enregistrées toutes les 30 min pendant les 30 premières heures et de façon plus espacée pour la fin de la cinétique.

Tableau 36 : Effet de la concentration de dextrine présent dans le milieu D sur la croissance des souches NCTC 8798, 8-6 et R3

Concentration en dextrine (g/L)	Souche	Densité optique maximale	Phase de latence (h)	Temps de génération (h)
0	NCTC 8798	0,83	2	0,80
	8-6	0,70	2	0,92
	R3	0,68	2	0,88
3,5	NCTC 8798	0,87	3	1,60
	8-6	0,81	3	1,66
	R3	1,14	3	2,16

Tableau 37 : Effet de la concentration en dextrine présent dans le milieu D sur la sporulation des souches NCTC 8798, 8-6 et R3

Concentration en dextrine (g/L)	Souche	Pourcentage maximal de sporulation	Comptages ($\times 10^7/\text{mL}$)	
			Spores	Cellules végétatives
0	NCTC 8798	< 5	ND	10^7
	8-6	< 5	ND	10^7
	R3	100	3,35 [0,93]	0,00
3,50	NCTC 8798	94 [6]	0,75 [0,47]	0,05 [0,10]
	8-6	17 [4]	1,00 [0,43]	5,00 [0,85]
	R3	100	3,40 [0,28]	0,00

Les comptages des formes végétatives et des spores sont déterminés au pourcentage maximum de sporulation. Les chiffres représentent les valeurs moyennes de 4 champs. Les valeurs entre crochets correspondent à l'écart-type.

significativement le nombre de spores (Tortora, 1984). Par ailleurs, une production significative d'acides gras volatils et d'alcools résulte de la présence de grandes quantités de glucose ajoutées au milieu D. Ceci conduit à une diminution importante du pH en fin de culture. La valeur du pH final diminue régulièrement avec la concentration croissante en glucose présent dans le milieu. Cependant, le pH du milieu de culture et le taux d'inoculum constituent souvent des facteurs influençant la sporulation. Quand le pH du milieu augmente de 7,0 à 9,0, la croissance cellulaire et le nombre de spores diminuent, mais le pourcentage de sporulation n'est pas affecté (Craven, 1990). De la même façon, l'étude de la souche NCTC 8798 par Labbé et Duncan (1974) montre que le pourcentage de sporulation et le nombre de spores résistantes à la chaleur sont similaires à pH 7,0 et lorsque le pH n'est pas contrôlé. La concentration en entérotoxine, le pourcentage de sporulation et le nombre de spores résistantes à la chaleur diminuent de façon dramatique quand le pH est maintenu à 8,0 ; 8,5 et 6,0. A pH 5,5, la croissance des cellules végétatives est satisfaisante, bien que la sporulation et la production d'entérotoxine ne soient pas détectées (Labbé et Duncan, 1974). Par conséquent, le faible pourcentage de sporulation obtenu à des concentrations en glucose supérieures à 28 mM pourrait provenir du pH final bas obtenu dans les cultures.

1.4.2.2.2 Dextrine

L'effet de la concentration en dextrine sur la croissance et la sporulation des 3 souches a été étudié en tubes de 10 mL de milieu D initialement préparés avec 6 mM de glucose et en absence de dextrine. Deux concentrations sont choisies : 0 et 3,50 g/L. La dextrine est ajoutée à l'aide d'un filtre Millex pour obtenir la concentration finale voulue dans le tube.

L'addition de dextrine dans le milieu D augmente la production de biomasse pour les souches 8-6 et R3 (Figure 24). Elle augmente respectivement de 16 et 68 % la densité optique maximale des souches 8-6 et R3, alors qu'elle ne semble pas avoir d'effet significatif sur la croissance de la souche NCTC 8798 (Tableau 36). Pour les souches 8-6 et R3, la valeur maximale de la densité optique obtenue en présence des 2 substrats est atteinte 5 à 10 h plus tard par rapport à la cinétique obtenue sur le milieu exempt de dextrine. Pour la souche NCTC 8798, la valeur maximale de la densité optique est obtenue après la même durée d'incubation quelle que soit la concentration en dextrine. Pour les 2 concentrations en dextrine, la densité optique diminue rapidement après avoir atteint son

Tableau 38 : Effet de la concentration en dextrine présente dans le milieu D sur la production maximale d'entérotoxine par les souches NCTC 8798, 8-6 et R3

Concentration en dextrine (g/L)	Souche	Taux maximum d'entérotoxine (mg/mL)
0	NCTC 8798	$3,20 \times 10^{-5}$
	8-6	$1,60 \times 10^{-4}$
	R3	$5,12 \times 10^{-3}$
3,50	NCTC 8798	$8,00 \times 10^{-5}$
	8-6	$3,20 \times 10^{-4}$
	R3	0,02

maximum, puis elle s'arrête à une valeur relativement stable à partir de 30 h d'incubation. Cette chute est très variable selon les souches et les conditions d'études. Cependant, cette diminution est plus importante en absence de dextrine dans le milieu D. L'addition de 3,50 g/L de dextrine retarde d'une heure le début de la croissance des souches et augmente de plus du double le temps de génération.

Le taux de sporulation obtenu à ces 2 concentrations est variable selon les souches (Tableau 37) : la présence de dextrine favorise la sporulation des souches NCTC 8798 et 8-6 sur le milieu D. L'effet est plus important pour la souche NCTC 8798 : le taux augmente de quelques pourcents à 94 % lorsque 3,5 g/L de dextrine sont ajoutés au milieu D. Par contre, la dextrine ne gêne ni la sporulation, ni la formation de spores pour la souche R3 : le taux de spores n'est pas modifié par l'addition de dextrine. La cinétique de sporulation de cette souche est similaire quelle que soit la concentration en dextrine (Figure 24). Pour les souches NCTC 8798 et 8-6, il est très difficile d'observer et de compter les spores au microscope à contraste de phase sur le milieu D en absence de dextrine. Toutefois, le dosage de l'entérotoxine a permis de détecter des traces de cette protéine produite par les souches dans ces conditions (Tableau 38). Ceci confirme que les souches NCTC 8798 et 8-6 sporulent très faiblement dans ces conditions. La concentration d'entérotoxine est 2 à 4 fois plus importante en présence de dextrine dans le milieu D qu'en absence de ce substrat. De plus, elle est variable selon les souches : la souche R3, dont le nombre de spores est le plus élevé, libère jusqu'à 0,02 mg d'entérotoxine/mL. La comparaison des Tableaux 37 et 38 confirme que le taux d'entérotoxine est bien dépendant du nombre de spores formées.

Par conséquent, en absence de dextrine, la sporulation a lieu de façon importante pour la souche R3 alors qu'elle est très faible pour les autres souches ; mais la présence de 3,50 g/L de dextrine dans le milieu D améliore nettement le taux de sporulation des souches NCTC 8798 et 8-6, et donc la production d'entérotoxine. Ceci est en accord avec les observations préliminaires de Labbé (1981) qui avait montré qu'une concentration en dextrine trois fois supérieure à celle décrite initialement dans le milieu D double le nombre de spores de la souche NCTC 10239 et augmente de 10 % la concentration d'entérotoxine pour les souches NCTC 8798 et 8-6, alors que le taux de sporulation reste inchangé.

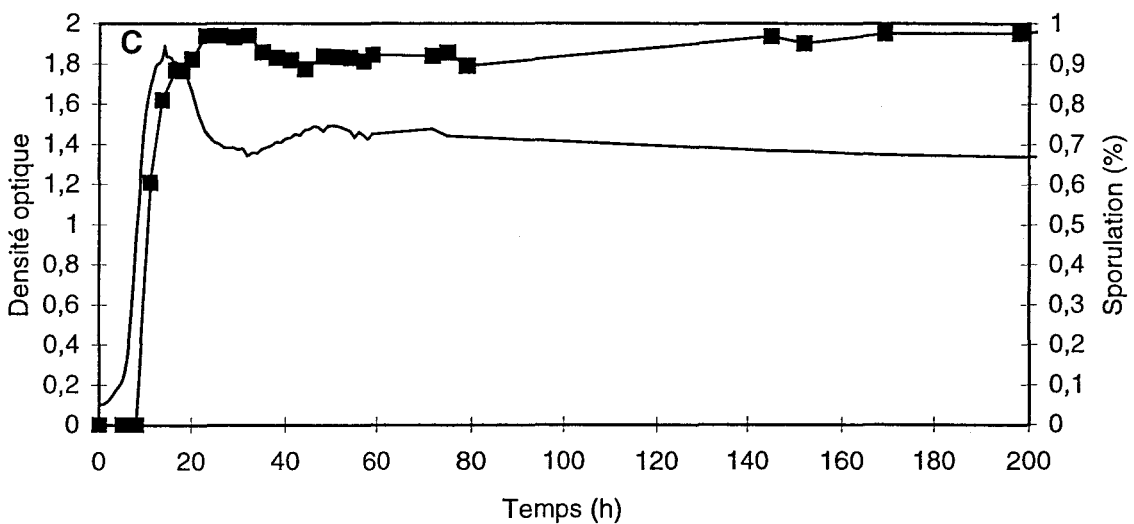
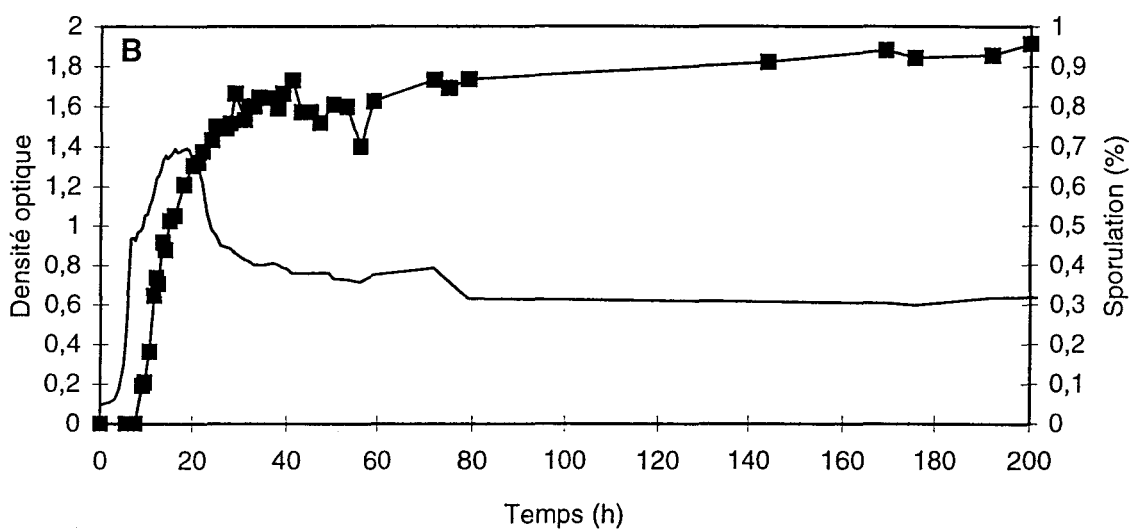
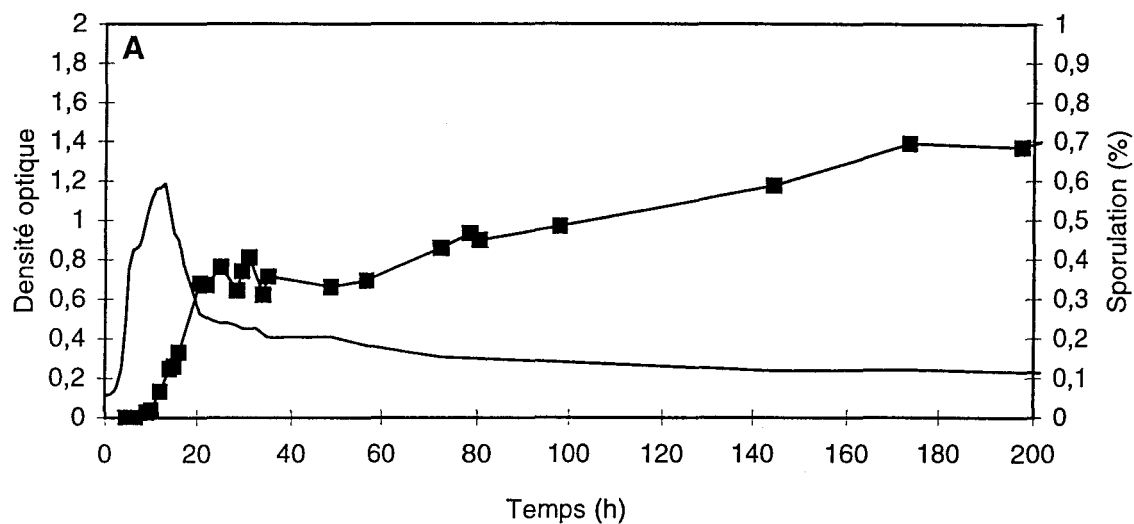


Figure 25 : Croissance et sporulation des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu D. A : Souche NCTC 8798 ; B : Souche 8-6 ; C : Souche R3. - : croissance ; ■ : sporulation. Une unité de densité optique correspond au maximum à 0,26 mg de protéines par mL de milieu.

Tableau 39 : Paramètres de cinétique de croissance des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 dans le milieu D

Souches	Densité optique maximale	Phase de latence (h)	Temps de génération (h)
NCTC 8798	1,18	< 1	1,10
8-6	1,39	< 1	1,12
R3	1,89	< 1	1,37

Tableau 40 : Taux maximal de sporulation et comptages des spores et des cellules végétatives pour les souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu D

Souches	Pourcentage de sporulation	Comptages ($\times 10^7/\text{mL}$)	
		Spores	Cellules végétatives
NCTC 8798	87 [7]	2,13 [0,24]	0,30 [0,19]
8-6	99 [1]	27,35 [2,65]	0,20 [0,28]
R3	99 [7]	23,86 [7,22]	0,20 [0,16]

Les comptages des formes végétatives et des spores sont déterminés au pourcentage maximum de sporulation. Les chiffres représentent les valeurs moyennes de 4 champs observés. Les valeurs entre crochets correspondent à l'écart-type.

1.4.3 Conditions optimales de croissance, sporulation et production d'entérotoxine

La croissance, la sporulation et la production d'entérotoxine des 3 souches de *Cl. perfringens* ont été étudiées selon les conditions optimales de sporulation définies à partir des résultats précédents. Celles-ci demandent que le suivi soit réalisé dans des flacons de 1,2 L de milieu D contenant 6 mM de glucose et 3,50 g/L de dextrine. Les précultures ont été réalisées sur le milieu FTG sans traitement à la chaleur pour la souche NCTC 8798 et avec traitement (75°C pendant 15 min) pour les souches 8-6 et R3. L'inoculum utilisé est de 2 %. Les flacons sont placés la veille à l'étuve à 37°C.

1.4.3.1 Cinétique de croissance

Pour les souches NCTC 8798 et 8-6, les cinétiques de croissance présentent 2 phases (Figure 25) : un décrochement a lieu vers une densité optique de 0,8-0,9 à 5-6 h d'incubation. La première phase correspond à la consommation et à l'épuisement du glucose et la seconde à la consommation du second substrat, la dextrine. Cependant, ces différentes phases ne sont pas perçues pour la souche R3. La dégradation de ces 2 substrats de croissance selon les souches sera détaillée dans la deuxième partie des résultats.

La croissance des bactéries commence très rapidement : la phase de latence est inférieure à 1 h pour chaque souche (Tableau 39). Cependant, la valeur de la densité optique maximale est variable selon les souches. Il y a une augmentation de 60 % entre la valeur la plus faible (pour la souche NCTC 8798) et la valeur la plus forte (pour la souche 8-6). La densité optique maximale diminue rapidement de 30 à 60 % après que celle-ci ait atteint un plateau et reste ensuite constante pendant 3 semaines. Le temps de génération est identique pour les souches NCTC 8798 et 8-6 alors qu'il est plus élevé de 25 % pour la souche R3.

1.4.3.2 Cinétique de sporulation

Au cours de la croissance, des états frais observés au microscope à contraste de phase permettent de suivre la morphologie des cellules. L'observation des lames était suivie d'un comptage des cellules

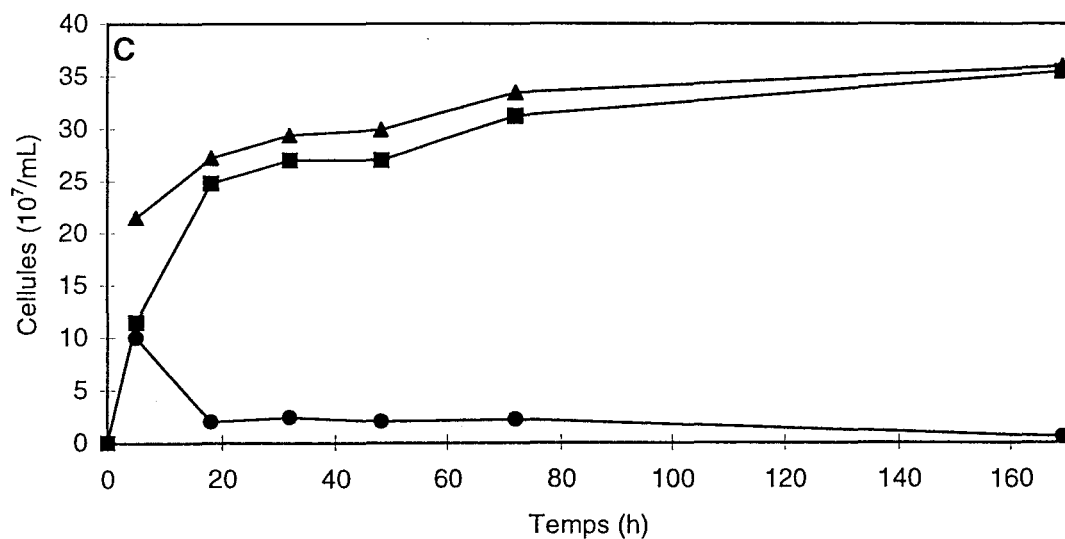
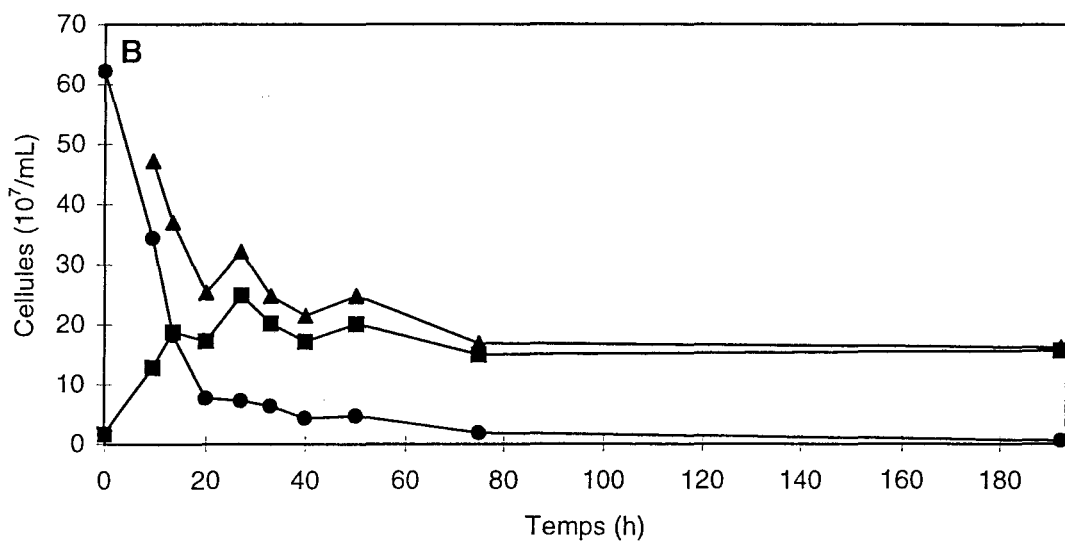
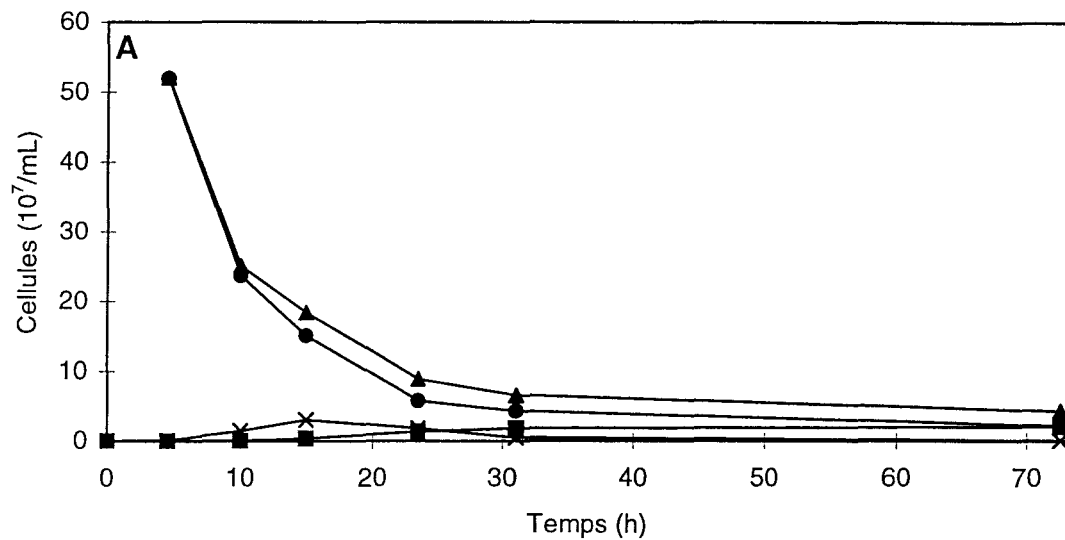


Figure 26 : Dénombrement des cellules totales, des cellules végétatives, des endospores et des spores pour les souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu D. A : Souche NCTC 8798 ; B : Souche 8-6 ; C : Souche R3. ▲ : cellules totales ; ● : cellules végétatives ; x : endospores ; ■ : spores.



Photo 3 : Aspect des cellules végétatives de la souche 8-6 sur le milieu D à 7 h d'incubation après coloration de Gram (x 1600)



Photo 4 : Aspect des endospores de la souche 8-6 sur le milieu D à 15 h d'incubation après coloration de Gram (x 1600)

végétatives, des endospores et des spores libres. Les différentes étapes de la sporulation de la souche 8-6 dans les conditions optimales sur le milieu D sont illustrées sur les photographies prises en microscopie optique et en MEB présentées sur les pages suivantes (Photo 3 à 7) (Tableau 40).

Sur le milieu D, le début de la sporulation se situe vers 7-8 h d'incubation pour toutes les souches (Figure 25). Les cellules apparaissent renflées sur toute leur longueur ou seulement à une extrémité (Photo 3). C'est le début de la formation des endospores, mais celles-ci ne sont pas encore visibles.

Entre 7 et 15 h, les spores sont en cours de formation et apparaissent réfringentes dans certaines cellules par observation au microscope à contraste de phase : il s'agit d'**endospores**. Celles-ci sont en position subterminale ou centrale dans le corps bactérien. Par la coloration de Gram, les spores sont transparentes avec un contour violet dû au violet de gentiane (Photo 4).

Entre 15 et 30 h d'incubation, les spores sont formées. Certaines sont libres ou encore sous forme d'endospores. La Photo 5 présente un mélange de cellules végétatives, d'endospores et de spores libres après coloration de Gram. Après coloration au vert malachite (Photo 6), les cellules végétatives apparaissent roses et les spores de couleur verte.

A partir de 30 h d'incubation et jusqu'à la fin de la cinétique, les observations microscopiques présentent un mélange des 3 états de la spore (Photo 7). Cependant, la proportion de chacun diffère selon les souches. De plus, à partir de 72 heures d'incubation, les cellules végétatives des 3 souches étudiées dans le milieu D s'allongent de façon plus ou moins importante. Une explication possible serait la perte par les souches de leur capacité à se diviser lorsque les cultures vieillissent : le corps bactérien s'allonge pouvant atteindre 60 μm de longueur. La Photo 8 présente des spores libres de la souche 8-6 en MEB après 72 h d'incubation sur le milieu D.

Le taux maximum atteint est compris entre 90 et 100 % de spores pour ces 3 souches (Tableau 40). Seul le temps mis pour atteindre ce taux diffère selon les souches : la souche R3 atteint rapidement 97 % de spores dès 23 h d'incubation alors que 87 % de sporulation pour la souche 8-6 sont obtenus à 72 h d'incubation. Par contre, la souche NCTC 8798 sporule beaucoup plus lentement : le taux maximum est atteint après 20 jours d'incubation et reste constant à 87 %. La cinétique de sporulation de la souche NCTC 8798 comprend 2 phases : une augmentation relativement rapide du taux de spores entre 10 et 20 h d'incubation pour atteindre 33 % de spores. Pendant les 40 h suivantes,

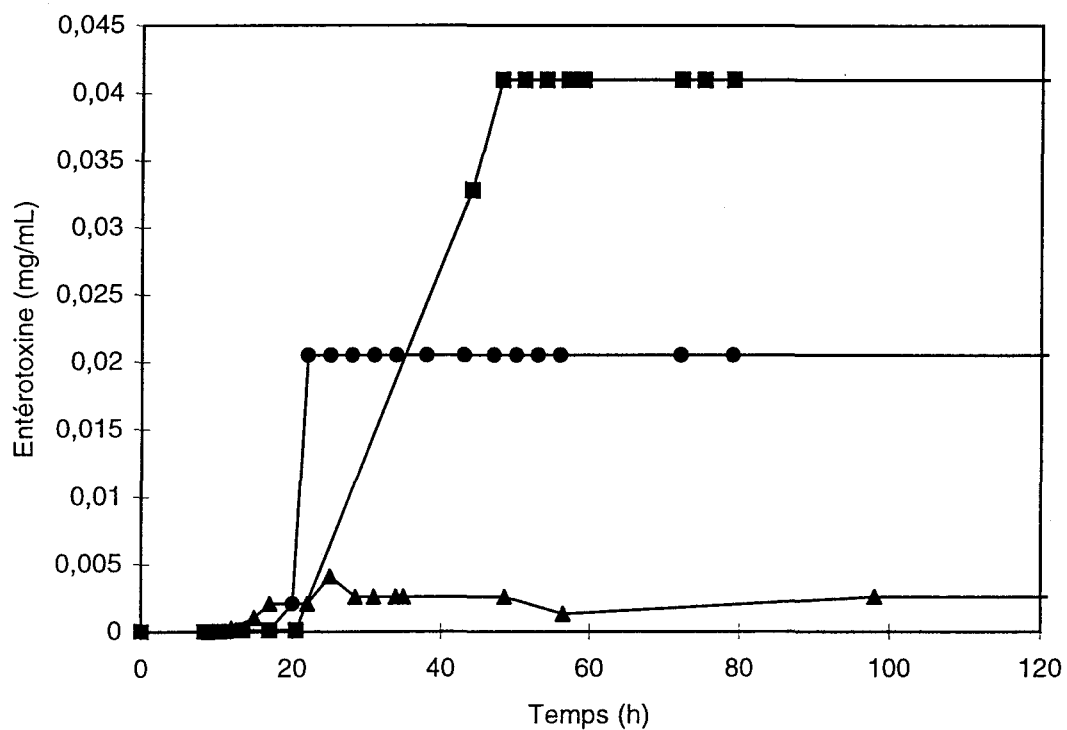


Figure 27 : Production d'entérotoxine par les souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu D.
 ▲ : Souche NCTC ; ● : Souche 8-6 ; ■ : Souche R3.

Tableau 41 : Production maximale d'entérotoxine par les souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu D

Souches	Taux maximum d'entérotoxine (mg/mL)
NCTC 8798	0,002
8-6	0,02
R3	0,04

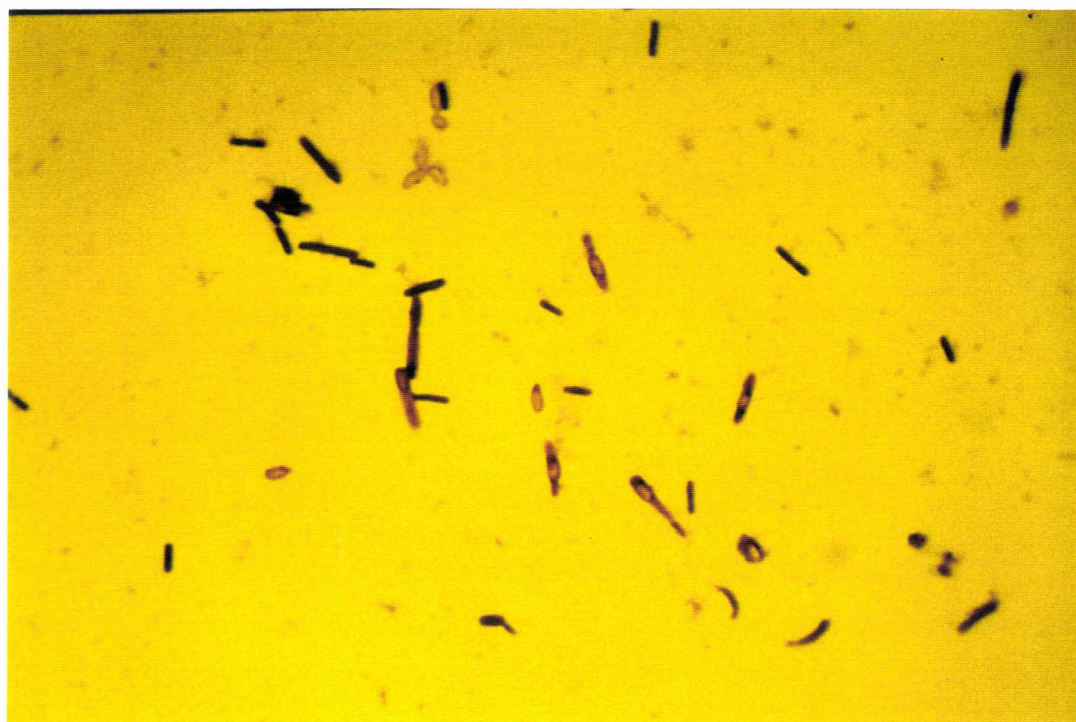


Photo 5 : Aspect des cellules végétatives, des endospores et des spores de la souche 8-6 sur le milieu D à 30 h d'incubation après coloration de Gram (x 1600)

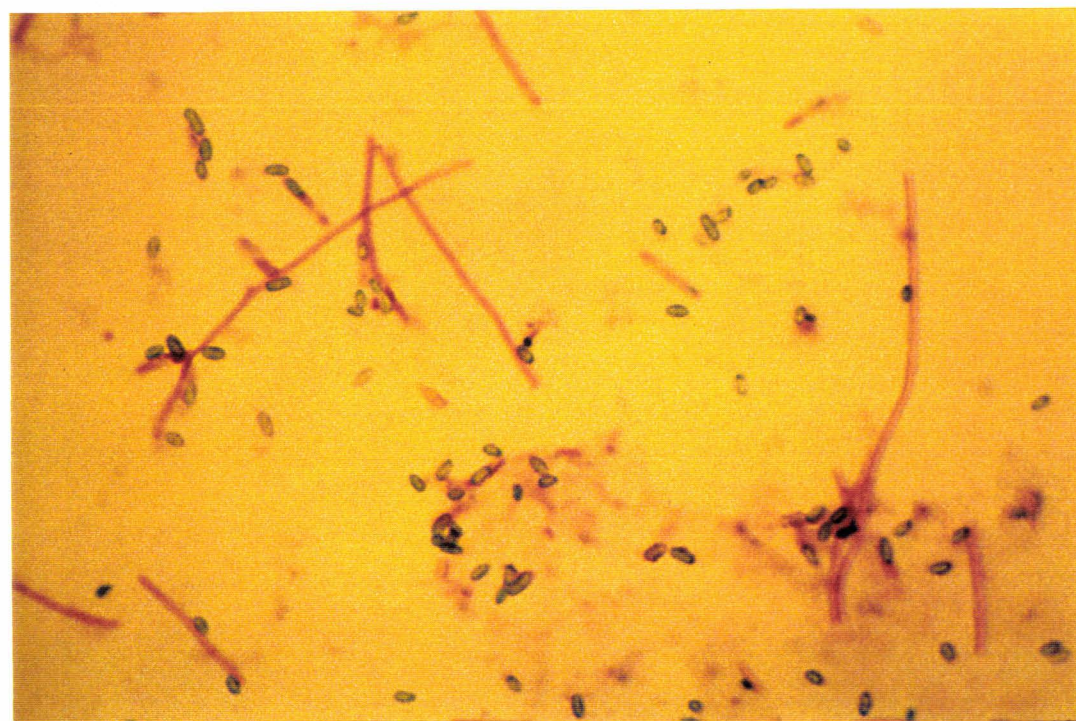


Photo 6 : Aspect des cellules végétatives, des endospores et des spores de la souche 8-6 sur le milieu D à 30 h d'incubation après coloration au vert malachite (x 1600)

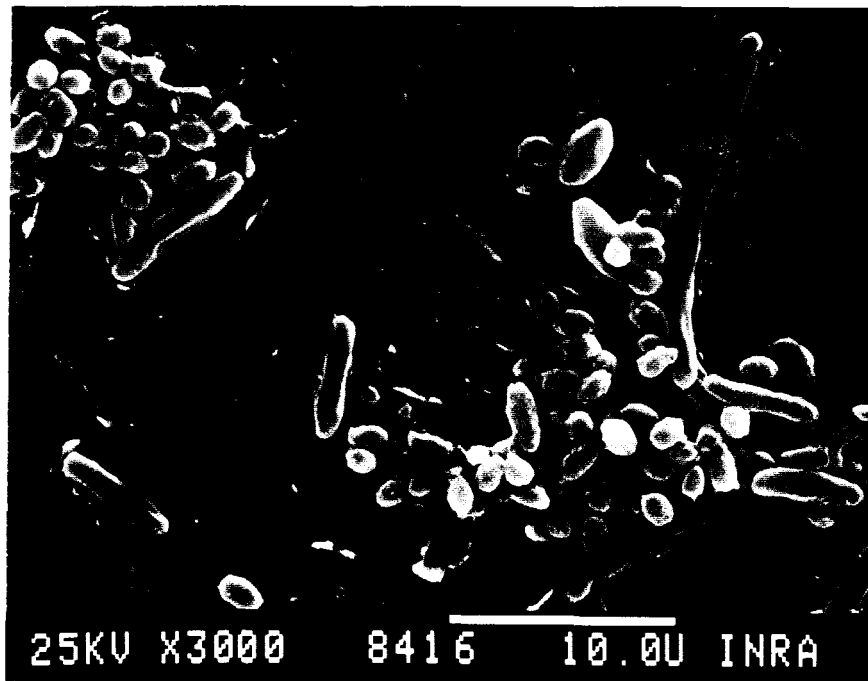


Photo 7 : Aspect au MEB des cellules végétatives, des endospores et des spores de la souche 8-6 sur le milieu D à 72 h d'incubation (x 3000)

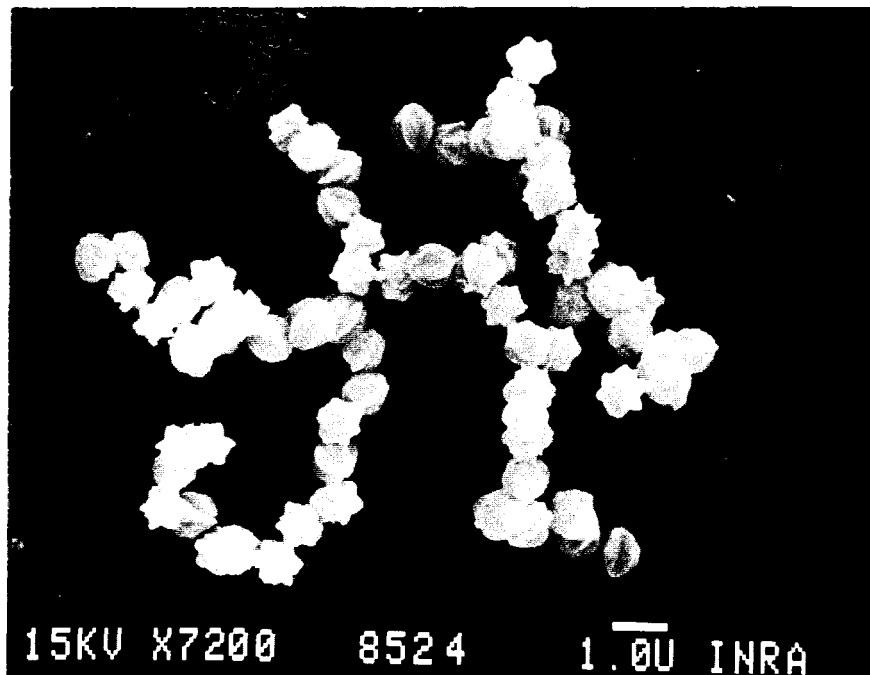


Photo 8 : Aspect au MEB des spores de la souche 8-6 sur le milieu D à 72 h d'incubation (x 7200)

ce taux fluctue entre 30 et 40 % de spores, puis à partir de 60 h d'incubation, le pourcentage de sporulation augmente à nouveau lentement pour atteindre le taux maximum. Ceci peut s'expliquer par le fait que la préculture de la souche sauvage effectuée sur le milieu FTG n'a pas été chauffée à 75°C pendant 15 min. Par conséquent, les cellules végétatives résistantes à la chaleur n'ont pas été sélectionnées puis activées pour obtenir des spores, elles sont restées sous forme de cellules végétatives. Les comptages des cellules végétatives, des endospores et des spores pour les 3 souches au cours de la cinétique sur le milieu D montrent qu'au début de la cinétique, la souche R3 compte 5 à 6 fois moins de cellules végétatives que les souches NCTC 8798 et 8-6, alors que cette souche atteint rapidement son taux maximum de spores (Figure 26). Ensuite, pour toutes les souches, une diminution rapide (en 20 h) du nombre de cellules végétatives et une augmentation du nombre de spores et d'endospores sont observées. Le nombre le plus important de spores est mesuré entre 25 et 35 h d'incubation. La souche R3 présente un nombre légèrement plus important de spores et d'endospores que la souche 8-6, et 10 fois plus important que la souche NCTC 8798. A la fin de la cinétique, le nombre de cellules végétatives reste inchangé pour les 3 souches.

1.4.3.3 Dosage de l'entérotoxine

Pour chaque souche, l'entérotoxine a été dosée régulièrement au cours de la cinétique de croissance et de sporulation sur le milieu D. Elle est produite dans ce milieu par les 3 souches dès que des spores sont observées, c'est à dire dès 15 h d'incubation (Figure 27). Le taux d'entérotoxine augmente rapidement à partir de 20 h d'incubation et reste constante jusqu'à la fin de la cinétique. La souche R3 produit le taux le plus important d'entérotoxine, la souche 8-6 en libère moitié moins, et la souche sauvage produit 20 fois moins d'entérotoxine que la souche R3 (Tableau 41). Cette expérience ainsi que les résultats précédents montrent que la concentration en entérotoxine produite par les souches dépend du nombre de spores observées : la souche R3 fournit un nombre élevé de spores ($35 \times 10^7/\text{mL}$) et produit 0,04 mg d'entérotoxine/mL de milieu et la souche NCTC 8798 fournit 2×10^7 spores/mL pour 0,002 mg d'entérotoxine/mL de milieu. Par conséquent, la production croissante d'entérotoxine est fonction du nombre de spores formées dans le milieu D. Ramenée à un même nombre de spores, les 3 souches libèrent la même quantité d'entérotoxine. Cependant, des traces d'entérotoxine sont détectées sur ce milieu alors que des spores libres ne sont pas encore

Tableau 42 : Tableau récapitulatif des différents paramètres physiologiques pouvant influencer la croissance des souches sur les milieux FTG, DS, BCYT + glucose et D.

+ : influence ; - : pas d'influence ; ± : influence plus ou moins marquée

ND : non déterminé

		NCTC 8798	8-6	R3
MILIEU FTG	Préculture			
	- choc thermique	+	+	+
MILIEU DS	Préculture			
	- nature	ND	+	+
	- lysozyme	ND	±	+
MILIEU BCYT + glucose	Préculture			
	- nature	ND	ND	+
	- volume	+	-	+
	- lysozyme	ND	ND	±
	Milieu de culture			
	- nature du tampon	+	-	+
	- concentration en extrait de levure	+	+	+
MILIEU D	Préculture			
	- nature	ND	+	+
	- âge	ND	+	±
	- lysozyme	ND	+	-
	- choc thermique	+	±	-
	Milieu de culture			
	- volume	+	+	+
	- concentration en glucose	ND	+	+
- concentration en dextrine	±	+	+	

Tableau 43 : Tableau récapitulatif des différents paramètres physiologiques pouvant influencer la sporulation des souches sur les milieux DS, BCYT + glucose et D.

+ : influence ; - : pas d'influence ; ± : influence plus ou moins marquée

ND : non déterminé

		NCTC 8798	8-6	R3
MILIEU DS	Sporulation	non	non	non
MILIEU BCYT + glucose	Sporulation	oui	oui	oui
	Préculture			
	- lysozyme	ND	ND	absence de spores
	- volume	ND	absence de spores	+
MILIEU D	Sporulation	oui	oui	oui
	Préculture			
	- nature	ND	+	+
	- âge	ND	±	±
	- lysozyme	ND	+	±
	- choc thermique	+	+	-
	Milieu de culture			
	- volume	±	+	-
	- concentration en glucose	ND	+	+
	- concentration en dextrine	+	+	-

observées. Les observations et comptages effectués n'ayant pas permis la mise en évidence de spores libres, la grande sensibilité de détection de notre kit de dosage nous permet de penser que les cellules végétatives contenant des endospores puissent libérer de très faibles quantités de protéine, mais que la production maximale d'entérotoxine a lieu lors de l'éclatement des cellules végétatives et au cours de la libération des spores.

Pour des souches identiques à celles de notre étude, les concentrations obtenues ici sont légèrement plus faibles que celles déterminées par d'autres auteurs qui ont utilisé des techniques de dosage différentes. Dans nos conditions d'étude, les concentrations en entérotoxine obtenues pour les souches NCTC 8798, 8-6 et R3 correspondent respectivement à 135, 77 et 8 µg d'entérotoxine par mg de protéine alors que les souches NCTC 8798 et 8-6 sporulant respectivement à 61 et 90 % sur le milieu D produisent 181 et 204 µg d'entérotoxine/mg d'extrait cellulaire protéique après dosage par électro-immuno-diffusion (Labbé, 1981). Utilisant la même technique de dosage, Labbé et Rey détectent, en 1979, entre 3 et 330 µg d'entérotoxine/mg d'extrait cellulaire protéique selon les souches sur le milieu DS ; la souche NCTC 8798 libère 160 µg/mg d'extrait cellulaire protéique et sporule à 86 %. Selon la technique de la contre-immuno-électrophorèse, la souche NCTC 8798 produit 35 µg d'entérotoxine /mL de milieu DS (Craven *et al.*, 1981). Par ailleurs, Granum *et al.* (1981) détectent de 10 à 20 mg/mL d'entérotoxine après un dosage ELISA.

1.5 CONCLUSION SUR LA CROISSANCE ET LA SPORULATION

A partir des résultats obtenus et des données bibliographiques, nous avons optimisé les conditions de croissance et de sporulation *in vitro* des 3 souches de *Cl. perfringens*. Les tableaux récapitulatifs (Tableau 42 et Tableau 43) reprennent les différents paramètres étudiés et indiquent leur influence sur la croissance et la sporulation des 3 souches sur les 4 milieux testés.

La croissance des souches est différemment sensible aux divers paramètres testés selon le milieu étudié (Tableau 42). En effet, la croissance de la souche 8-6 semble être moins affectée lorsque celle-ci est suivie sur le milieu BCYT + glucose. Quelques paramètres modifiés (volume de culture, concentration en substrats) sur ce même milieu influencent le développement de la souche R3. Inversement, les différents paramètres testés sur le milieu D (choc thermique sur la préculture, effet

du lysozyme) gênent moins la croissance de la souche R3 que celle des souches NCTC 8798 et 8-6. Cependant, la croissance de la souche sauvage semble être modifiée sur chaque milieu, bien que tous les paramètres n'aient pas été testés. Une étude exhaustive des paramètres testés nécessiterait toutefois un approfondissement de l'effet de ces facteurs sur la souche NCTC 8798 employée en préculture sur le milieu FTG sans choc thermique.

Un taux satisfaisant de spores est obtenu de façon reproductible pour chaque souche à partir des conditions de sporulation suivantes :

- préculture sur le milieu FTG ensemencé par la souche à 0,5 % à partir d'une culture réalisée sur le milieu BCYT + glucose (11 mM),
- traitement à la chaleur (75°C pendant 15 min) pour les souches 8-6 et R3 et sans traitement pour la souche sauvage. Incubation pendant 16 à 18 h à 37°C,
- ensemencement à 2 % d'un flacon de 1,2 L de milieu défini D contenant 6 mM de glucose et 3,50 g/L de dextrine préalablement placé une nuit à l'étuve. Incubation à 37°C.

Ces conditions permettent d'obtenir de façon reproductible entre 87 et 100 % de spores selon les souches et une production non négligeable d'entérotoxine de 0,002 à 0,04 mg/mL par celles-ci. Ceci est à rapprocher des différentes capacités à sporuler qui ont déjà été démontrées *in vitro* chez *Cl. perfringens* dans des milieux de sporulation précédemment décrits. En 1956, Ellner a trouvé 80 % (parfois plus de 90 %) de sporulation avec 138 souches, et Tortora (1984) a obtenu entre 68 et 97 % de sporulation avec différentes souches. En outre, Kim *et al.* (1967) ont comptabilisé respectivement $2,5 \times 10^5$ et $4,9 \times 10^3$ spores/mL avec les souches NCTC 8238 et NCTC 8239. Des études préliminaires avec la souche NCTC 8798 ont montré plus de $1,9 \times 10^8$ spores/mL dans le milieu de Kim et un pourcentage de sporulation de 61 et 51 %, respectivement, dans les milieux D et DS. Cependant, ces pourcentages varient selon les auteurs utilisant le milieu DS. Par contre, la souche R3 sporule pauvrement sur le milieu D (10^5 spores/mL) mais fortement sur le milieu DS (Sacks et Thomas, 1979). Par ailleurs, la souche 8-6 sporule faiblement sur le milieu DS (3 %) et à 90 % sur le milieu D.

Les résultats présentés dans ce chapitre confirment que la sporulation des souches de *Cl. perfringens* est difficile à obtenir *in vitro*. En effet, l'étude de la formation des spores sur un milieu-type de la sporulation, le milieu DS, n'a pas montré de résultats satisfaisants (Tableau 43). Or, l'entérotoxine a été détectée sous forme de traces sur ce milieu. Par conséquent, et étant donné que cette protéine est libérée au cours de la sporulation, des spores ont dû être formées mais ont été difficiles à observer. Des auteurs ont montré la présence de spores sur ce milieu pour chacune des 3 souches étudiées ici (Sacks et Thomas, 1979 ; Labbé, 1981). Ainsi, les conditions utilisées pour ce milieu ne sont pas actuellement idéales pour mettre en évidence des spores sur le milieu DS. Par ailleurs, l'étude de la sporulation des souches a été suivie sur le milieu BCYT + glucose, milieu spécifique de la croissance des bactéries anaérobies. Elle a montré que ce milieu permet d'obtenir un taux important de sporulation pour chacune des souches. Cependant, ce taux est relativement variable et fournit un nombre de cellules végétatives et un nombre de spores identiques ou plus faibles que sur le milieu D, rendant les pourcentages de sporulation très variables. Le milieu BCYT + glucose représente donc une alternative intéressante au milieu D dans l'étude de la sporulation *in vitro* de *Cl. perfringens*. Ces résultats comparés à ceux obtenus sur un troisième milieu, le milieu défini D, spécifique de la sporulation, montrent que ce dernier permet d'une part une bonne reproductibilité de la sporulation avec des taux satisfaisants, et d'autre part une croissance correcte des 3 souches mais moins favorable que le milieu BCYT.

L'étude de l'influence des différents paramètres sur la sporulation des 3 souches suivies sur les différents milieux de sporulation montre que la sporulation de la souche R3 semble être uniquement sensible à la taille du volume de la préculture BCYT + glucose, alors qu'elle est moins sensible aux différents paramètres sur le milieu D. De même que pour la croissance, la sporulation de la souche sauvage et de la souche 8-6 semble être affectée par les différentes modifications effectuées sur les milieux de sporulation testés. Par conséquent, la grande majorité des paramètres testés influencent à la fois la croissance et la sporulation des souches.

Dans la littérature, le milieu D permet une production plus importante d'entérotoxine pour les souches étudiées (Labbé, 1981). A partir des comptages des cellules et les dosages d'entérotoxine, une relation linéaire peut être établie entre la quantité d'entérotoxine produite et le nombre de spores

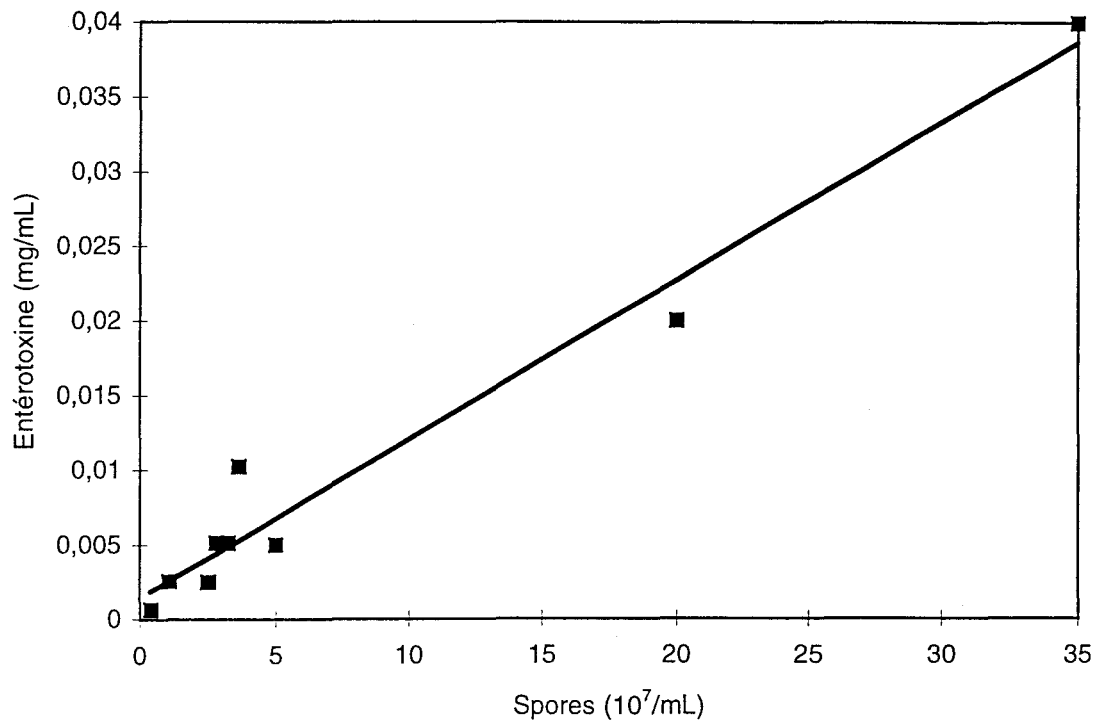


Figure 28 : Relation linéaire entre le nombre de spores comptées et le taux d'entérotoxine produite.

comptées (Figure 28). Cette observation confirme que la production d'entérotoxine a bien lieu pendant la sporulation et que la concentration en entérotoxine est fonction du nombre de spores. Ramenée à un même nombre de spores, la concentration en entérotoxine est identique pour chaque souche. Ces résultats peuvent constituer un outil intéressant lorsque les spores et les endospores sont difficiles à observer au microscope optique à contraste de phase ou après coloration. Le dosage de l'entérotoxine pourrait nous informer sur le nombre de spores présentes dans le milieu mais ne nous informerait pas sur le taux de sporulation obtenu. L'éventuel relargage d'entérotoxine par les cellules végétatives contenant des endospores sur le milieu D reste également un point à étudier plus en détail.

Cette première partie de nos travaux personnels nous a permis de préparer des cellules dans un état physiologique déterminé et reproductible permettant de caractériser soit la physiologie des formes végétatives, soit la phase de sporulation et de production d'entérotoxine. Elle nous a également permis de montrer des comportements suffisamment différents pour nos trois souches d'étude de façon à justifier la poursuite des travaux sur le métabolisme en croissance et pendant la sporulation sur les souches de la première partie.

2 . MODIFICATION DU METABOLISME DE *Clostridium perfringens* EN PHASE DE CROISSANCE ET AU COURS DE LA SPORULATION

Au cours de la première partie de ce chapitre, nous avons déterminé les conditions optimales de croissance et de sporulation à partir des résultats obtenus sur 4 milieux de sporulation ou de croissance pour atteindre un taux satisfaisant et reproductible de spores. Nous allons étudier maintenant le métabolisme issu de la consommation du(des) substrat(s) présent(s) dans les milieux FTG, DS, BCYT + glucose et D. Nous déterminerons le métabolisme ayant lieu au cours de la croissance et celui lors de la sporulation des souches sur le milieu D. Pour chaque condition d'étude, les produits terminaux de fermentation ont été dosés pour déterminer les bilans métaboliques. Les cinétiques de la production d'acides gras volatils et d'alcools ont été également réalisées sur le milieu BCYT + glucose (11 mM) et sur le milieu D.

Tableau 44 : Métabolites terminaux de la fermentation du glucose (30 mM) sur le milieu FTG. Les concentrations sont exprimées en mM.

	8-6	R3
Glucose consommé	19	19
Acétate	17	18
Formiate	0	0
Butyrate	8	3
Ethanol	8	16
Propionate	0	0
Propanol	0	1 ^a
H ₂	1 ^a	1 ^a
CO ₂	21	21
Bilan carbone (%)	94,4	91,7
Bilan hydrogène (%)	82,3	86,6

^a traces inférieures à 1 mM

Tableau 45 : Concentrations théoriques des métabolites issus de la fermentation du glucose (30 mM) sur le milieu FTG. Les résultats sont exprimés en mM/100 mM de glucose consommé.

	8-6	R3
Acétate	91	97
Formiate	0	0
Butyrate	46	17
Ethanol	54	83
Propionate	0	0
Propanol	0	1 ^a
H ₂	108	166
CO ₂	168	189

^a traces inférieures à 1 mM

Tableau 46 : Coefficients affectés aux différentes équations permettant d'établir le bilan théorique du métabolisme du glucose (30 mM) des souches 8-6 et R3 sur le milieu FTG.

	Coefficient			
	Equation 1	Equation 3	Equation 4	Equation 5
8-6	0,87	0,6	0	0,205
R3	3	0,3	0,002	0,105

2.1 MILIEU FTG

L'étude du métabolisme sur le milieu FTG a été réalisée pour les souches 8-6 et R3. Le milieu FTG réparti en 10 mL dans des piluliers contient 30 mM de glucose. Les flacons sontensemencés à 0,5 % à partir d'une préculture réalisée sur le milieu BCYT + glucose (11 mM). Ils sont ensuite traités à la chaleur (75°C pendant 15 min) avant d'être incubés 4 jours à 37°C.

Les différents métabolites produits sont exprimés en mM dans le Tableau 44. Les 2 souches libèrent principalement du CO₂ et de l'acétate mais aussi du butyrate et de l'éthanol en quantité non négligeable. Les concentrations en CO₂ sont identiques pour les 2 souches alors que la souche R3 libère 9 % de plus d'acétate que la souche 8-6. Cependant, les concentrations en acétate pour les souches 8-6 et R3 sont respectivement 22 et 15 % plus faibles que celles obtenues en CO₂. Les proportions des produits minoritairement formés sont variables selon les souches. En effet, la souche 8-6 libère autant de butyrate que d'éthanol alors que la souche R3 libère presque autant d'éthanol que d'acétate. Par contre, cette dernière libère deux fois plus d'éthanol que la souche 8-6. Par ailleurs, les 2 souches produisent de l'hydrogène en faible quantité et des traces de propanol sont détectées chez la souche R3. Toutefois, du formiate et du propionate ne sont pas détectés pour les 2 souches sur ce milieu. Elles consomment la même quantité de glucose au cours de leur croissance sur le milieu FTG. Cependant, le glucose n'est pas consommé en totalité : il reste entre 12 et 13 mM de glucose dans le milieu après fermentation. Le pH final obtenu pour les souches sur ce milieu est de 5,5 et peut empêcher la consommation totale du glucose par les souches.

Les bilans carbone et hydrogène de fermentation ont été élaborés après dosage des produits métaboliques de la fermentation : ils sont tout à fait satisfaisants pour les 2 souches (Tableau 44). Cependant, le bilan carbone est supérieur au bilan hydrogène. Ceci peut s'expliquer par des fuites d'hydrogène à travers le bouchon butyl ou plus probablement par un composé à l'état de traces qui n'a pas été comptabilisé.

Le calcul des bilans théoriques de fermentation à partir des résultats expérimentaux fait intervenir principalement 6 équations décrites ci-dessous. L'inoculation de milieux de culture en absence de polymères n'a pas permis la croissance des bactéries. Par conséquent, ces équations ont été établies à partir uniquement de glucose.

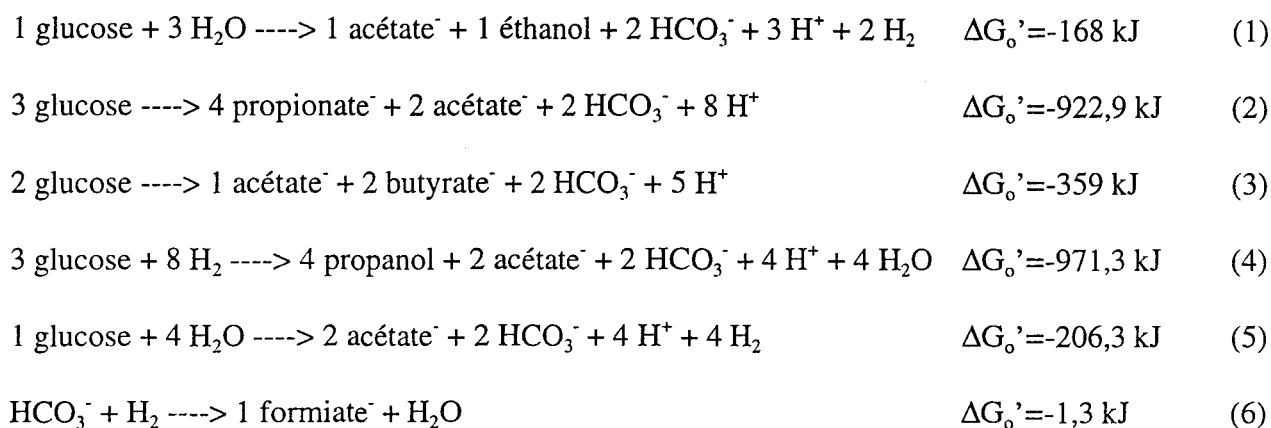


Figure 29 : Equations théoriques métaboliques établies d'après Thauer *et al.* (1977)

L'élaboration du bilan théorique de fermentation sur le milieu FTG fait intervenir les équations (1), (3) et (5) pour la souche 8-6 et les équations (1), (3), (4) et (5) pour la souche R3 (Figure 29). Les coefficients affectés pour chaque équation permettent d'obtenir des concentrations théoriques proches des valeurs expérimentales (Tableau 45 et Tableau 46). Ils sont plus élevés pour l'équation (1) et permettent d'obtenir ainsi des productions d'acétate et d'éthanol plus élevées. Cependant, à partir de ces équations théoriques, la production de CO₂ est 8 à 9 fois plus importante que la production expérimentale et la concentration théorique en hydrogène est légèrement inférieure à celle obtenue pour le CO₂. Les concentrations expérimentales en gaz obtenues sur le milieu FTG sont sous-estimées, surtout pour l'hydrogène très peu produit par les souches étudiées dans nos conditions d'étude. Par conséquent, la concentration théorique en H₂ permettrait de corriger le bilan hydrogène pour les 2 souches et d'obtenir un bilan carbone et hydrogène tout à fait remarquable. Par contre, les productions expérimentales d'acétate, d'éthanol et de butyrate sont proches de celles obtenues en théorie.

Les concentrations des métabolites obtenues sur le milieu FTG et ramenées pour 100 mM de molécules de glucose consommées ont pu être comparées à celles déterminées sur le milieu PYG par Wood en 1961 (Tableau 2). Les voies métaboliques empruntées sur les deux milieux sont similaires. Pour l'un et l'autre milieu, la production en CO₂ est importante. Par contre, sur le milieu PYG, la concentration en hydrogène est identique voire supérieure à celle du CO₂, ce que nous n'obtenons pas sur le milieu FTG. De plus, les souches libèrent des quantités importantes d'acétate sur le milieu FTG alors que la concentration de ce métabolite est faible sur le milieu PYG.

Tableau 47 : Métabolites terminaux de la fermentation du raffinose (7,93 mM) par les souches 8-6 et R3 sur le milieu DS. Les résultats sont exprimés en mM/100 mM d'équivalents glucoses consommés.

	8-6	R3
Acétate	63	41
Formiate	0	0
Butyrate	59	35
Ethanol	38	33
Propionate	5	0
Propanol	0	0
H ₂	3	2
CO ₂	132	122
Bilan carbone (%)	97,9	68,7
Bilan hydrogène (%)	82,3	53,8

Tableau 48 : Concentrations théoriques des métabolites issus de la fermentation du raffinose (7,93 mM) par les souches 8-6 et R3 sur le milieu DS. Les résultats sont exprimés en mM/100 mM d'équivalents glucoses consommés.

	8-6	R3
Acétate	75	75
Formiate	0	0
Butyrate	48	50
Ethanol	48	50
Propionate	5	0
Propanol	0	0
H ₂	96	100
CO ₂	147	150

Cl. perfringens libère également des traces de lactate sur le milieu PYG. Les différents produits métaboliques issus de la fermentation ont été analysés et dosés sur le milieu FTG avec les bilans satisfaisants présentés ci-dessus. Il n'y aurait donc pas de production supplémentaire d'autres composés sur le milieu FTG. En effet, les produits métaboliques tel que le lactate et le succinate n'ont pas été détectés sur le milieu FTG après croissance par les souches étudiées. Bien que la composition des milieux FTG et PYG soit relativement proche, les concentrations des métabolites issus de la fermentation du glucose sont différentes et démontrent un équilibre redox différent des voies métaboliques de *Cl. perfringens* sur ces 2 milieux.

2.2 MILIEU DS

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons montré qu'aucune spore n'a pu être mise en évidence sur ce milieu pour les souches étudiées selon les conditions d'étude que nous avons choisies. Par conséquent, le métabolisme des souches 8-6 et R3 présenté ici correspond à un métabolisme de croissance sur le milieu DS.

Ce milieu de sporulation contient du raffinose à une concentration de 7,93 mM comme substrat de croissance, soit une concentration de 23,79 mM d'équivalents glucoses. Ce composé carboné est ajouté au milieu de sporulation lors de la préparation. La préculture sur le milieu FTG est traitée à la chaleur (75°C pendant 15 min) avant incubation 16 à 18 h à 37°C. Les flacons sont ensemencés à 2 % à partir de cette préculture.

Sur ce milieu, les souches libèrent une quantité importante du CO₂ (Tableau 47). En effet, plus de 100 mM de CO₂ sont produits par chaque souche pour 100 mM d'équivalents glucoses consommés. Acétate, butyrate, éthanol et H₂ sont aussi produits en quantité non négligeable mais leur concentration est variable selon les souches. Il y a 2 fois plus de CO₂ que d'acétate pour la souche 8-6. Le rapport est plus important pour la souche R3 : la concentration en acétate est plus faible de 60 % par rapport à celle de CO₂. Elle libère aussi de l'acétate avec une concentration 15 % plus élevée que celle déterminée pour le butyrate ou l'éthanol synthétisés dans les mêmes proportions alors que la souche 8-6 produit presque autant d'acétate que de butyrate et en quantité plus faible de l'éthanol : en effet, la souche 8-6 libère de l'éthanol à une concentration 37 % plus faible par rapport à la concentration en acétate ou en butyrate. De plus, les 2 souches libèrent de l'hydrogène sous forme

de traces et seulement la souche 8-6 produit du propionate. Du formiate et du propanol ne sont pas détectés pour les 2 souches sur ce milieu. Cependant, la consommation du raffinose par les 2 souches n'est pas totale. En effet, il reste 6,75 mM d'équivalents glucoses après fermentation.

Les bilans matière ont été élaborés après dosage des produits métaboliques de la fermentation du raffinose. Les bilans carbone et hydrogène sont peu différents pour chaque souche (Tableau 47). Cependant, les bilans de la souche 8-6 sont plus élevés que ceux de la souche R3. Ces résultats comparés au bilan théorique établi à partir des équations (1), (2) et (3) pour les souches 8-6 et les équations (1) et (3) pour la souche R3 montrent que la concentration en H_2 produite par les souches devrait être 30 à 50 fois plus importante que ce que nous avons obtenu au cours de l'expérience (Tableau 48). Par conséquent, la concentration en H_2 obtenue expérimentalement est sous-estimée. Des travaux antérieurs réalisés par Pauss *et al.* (1990) sur les estimations de l'hydrogène dans les bilans de fermentation ont montré l'existence de limitations importantes entre la phase liquide et la phase gazeuse dans les fermenteurs. Selon les conditions de mesure, les teneurs déterminées en phase gazeuse étaient 40 à 71 fois inférieures à la valeur théorique. Les mesures réalisées au cours des bilans de fermentation présentent également ce phénomène. Ces principes appliqués à l'établissement des bilans hydrogène des souches 8-6 et R3 permettent d'établir des bilans tout à fait corrects. Ceci permettrait d'améliorer le bilan hydrogène pour les 2 souches. De plus, le calcul théorique de chacun des métabolites libérés par la souche R3 présente des concentrations supérieures à celles obtenues expérimentalement. Par conséquent, la souche R3 libère des produits dont la concentration expérimentale est sous-estimée ce qui justifie les faibles valeurs des bilans carbone et hydrogène pour cette souche.

Une autre explication peut-être plus plausible est l'absence de détection d'un métabolite important dans le bilan de fermentation de la souche R3. Cependant les dosages supplémentaires réalisés n'ont pas détecté la présence de lactate et de succinate. Le décalage entre bilan expérimental et bilan théorique calculé par combinaison des équations théoriques de fermentation n'est donc pas expliqué.

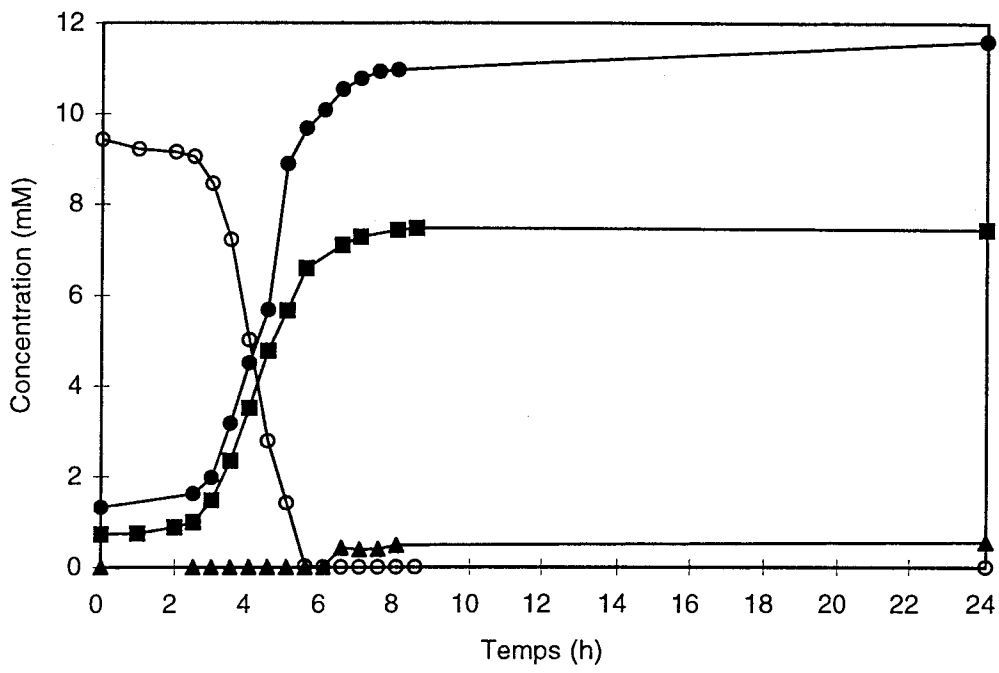


Figure 30 : Production d'acides gras volatils et d'alcools et consommation du glucose par la souche NCTC 8798 sur le milieu BCYT + glucose (11 mM). ● : acétate ; ■ : éthanol ; ▲ : butyrate ; ○ : concentration en glucose. La cinétique de production de formiate n'a pas été réalisée.

2.3 MILIEU BCYT + GLUCOSE

Le milieu BCYT + glucose préparé initialement sans glucose est réparti à raison de 10 mL par pilulier. Le substrat carboné est ajouté par filtration Millex pour obtenir une concentration finale de 11 mM. Les piluliers sontensemencés à 2 % à partir d'une culture réalisée sur le milieu BCYT + glucose (11 mM) âgée de moins de 24 h. Les flacons sont incubés à l'étuve à 37°C et sont ensuite stockés à + 4°C avant analyse.

2.3.1 Production d'acides gras volatils et d'alcools

La Figure 30 présente la cinétique de libération des produits de fermentation du glucose et la consommation du substrat de la souche NCTC 8798 sur le milieu BCYT + glucose (11 mM). La production d'acides gras volatils et d'alcools n'est pas immédiate chez cette souche et débute après 2 h d'incubation. La concentration en acétate et en éthanol augmente rapidement et devient constante vers 7 h d'incubation puis stagne à partir du moment où les bactéries ne disposent plus assez de substrat pour se développer. En effet, la souche NCTC 8798 consomme la totalité du glucose en 5-6 h avec une consommation maximale de 4,50 mM de glucose en 1 heure.

2.3.2 Bilan métabolique

Nous ne présentons que le bilan métabolique des souches NCTC 8798 et R3. En effet, cette expérience ayant été réalisée plusieurs fois pour la souche 8-6 ne présente pas de résultats reproductibles. Par conséquent, les différents produits libérés issus de la fermentation du glucose et les bilans carbone et hydrogène concernant cette souche ne seront pas présentés.

Les bilans de fermentation du glucose sur le milieu BCYT + glucose élaborés après dosage des produits métaboliques de la fermentation permettent d'écrire les équations suivantes :

Souche NCTC 8798

1 glucose -----> 1,23 acétate⁻ + 1,85 formiate⁻ + 0,06 butyrate⁻ + 0,79 éthanol + 0,07 H₂ + 0,70 CO₂

Souche R3

1 glucose -----> 0,81 acétate⁻ + 2,42 formiate⁻ + 0,03 butyrate⁻ + 1,14 éthanol + 0,02 H₂ + 0,46 CO₂

Tableau 49 : Bilan matière des souches NCTC 8798 et R3 sur le milieu BYTC + glucose (11 mM)

	NCTC 8798	R3
Bilan carbone (%)	113,8	115,2
Bilan hydrogène (%)	116,5	126,8

Les souches NCTC 8798 et R3 libèrent de l'acétate, du formiate, de l'éthanol et du CO₂ en quantité importante et du butyrate et de l'hydrogène en plus faible concentration. Toutefois, la concentration des différents métabolites varie selon les souches. Les 2 souches produisent de grandes quantités de formiate ; en effet, la souche NCTC 8798 libère presque 2 molécules de formiate pour une molécule de glucose consommée et pour la souche R3, plus de 2 molécules de formiate sont produites pour une molécule de glucose consommée. De plus, la souche NCTC 8798 produit plus d'une molécule d'acétate pour une molécule de glucose consommée alors que ce phénomène est observé chez la souche R3 pour la production d'éthanol : la souche sauvage libère 56 % de plus d'acétate que d'éthanol ; par contre, pour la souche R3, la concentration en éthanol est plus élevée de 40 % par rapport à celle de l'acétate. Les 2 souches libèrent moins de CO₂ que d'acétate : la concentration en CO₂ est plus faible de 43 % par rapport à celle de l'acétate. Cependant, la souche NCTC 8798 libère presque autant de CO₂ que d'éthanol alors que la souche R3 en produit nettement moins (60 % en moins). La souche R3 produit moins de CO₂, du butyrate et d'hydrogène que la souche NCTC 8798.

Les 2 souches de *Cl. perfringens* étudiées sur le milieu BCYT + glucose présentent un métabolisme différent sur le milieu de référence, le milieu PYG (Wood, 1961). Le milieu BCYT + glucose utilisé permet, d'une façon générale, une production moins importante des différents métabolites par rapport à ceux obtenus sur le milieu PYG. Le butyrate et le lactate ne sont pas détectés sur le milieu BCYT + glucose. Les bilans des souches NCTC 8798 et R3 sont légèrement supérieurs à 100 % ce qui peut également s'expliquer par la sous-estimation de la concentration en glucose (Tableau 49). Cependant, le milieu BCYT + glucose (11 mM) permet une production importante de formiate, d'acétate, d'éthanol et de CO₂ alors que le lactate, le CO₂ et l'H₂ constituent les produits majoritairement formés sur le milieu PYG. En effet, presque 200 mM de CO₂ et plus de 200 mM de H₂ sont libérés pour 100 mM de glucose consommé sur le milieu PYG (Tableau 2). De l'acétate est aussi produit en concentration 2 fois plus importante que les concentrations en butyrate, lactate et éthanol. De plus, lorsque le milieu ne contient pas de fer, la production de gaz, de butyrate, d'acétate et d'éthanol a fortement diminué au profit de la concentration en lactate qui a augmenté d'un facteur 5. Par ailleurs, lorsque la composition du milieu varie, nos souches de *Cl. perfringens* ne libèrent que très peu d'hydrogène par rapport à la concentration en CO₂ sur le milieu BCYT + glucose alors que

les productions en CO₂ et en H₂ sont identiques sur le milieu PYG. Sur le milieu BCYT + glucose, les souches de *Cl. perfringens* semblent avoir un métabolisme particulier de régénération des coenzymes réduits. Le métabolisme ne se rapproche d'aucun métabolisme des autres souches de *Clostridium perfringens* se développant sur le milieu PYG étant donné que le formiate, l'acétate et l'éthanol sont produits de façon majoritaire sur le milieu BCYT + glucose. Cette production abondante d'acétate et de formiate accompagnée d'un faible dégagement d'hydrogène est également à rapprocher du métabolisme de *Cl. formicoaceticum* sur milieu PYG (Andreesen *et al.*, 1970) et pourrait correspondre à un métabolisme particulier de cellules en phase stationnaire.

2.4 MILIEU D

Le but de cette expérience est de décrire le métabolisme carboné obtenu au cours de la sporulation en fonction de la nature du substrat de croissance présent et de le comparer au métabolisme des cellules végétatives. C'est pourquoi, nous allons étudier le métabolisme de fermentation des différents substrats carbonés (dextrine ou glucose) présents dans le milieu D par les souches de *Cl. perfringens* au cours de 2 états physiologiques de la cellule : en phase de croissance et au cours de la sporulation. Ces 2 états sont obtenus en modifiant la concentration des substrats.

Le milieu D est préparé initialement sans glucose ni dextrine. Cependant, la dextrine est présente dans le milieu lors de la préparation de celui-ci lorsque les conditions d'étude le demandent. Le glucose est ajouté, par filtration Millex, aux concentrations voulues au moment de l'emploi du milieu D. Les flacons contenant 10 mL de milieu D sontensemencés à 2 % à partir d'une préculture sur le milieu FTG. Celui-ciensemencé à 0,5 % à partir d'une préculture sur le milieu BCYT + glucose (11 mM) est traité à la chaleur (75°C pendant 15 min) pour les souches 8-6 et R3 alors que le traitement n'est pas réalisé pour la souche NCTC 8798. Les tubesensemencés contenant le milieu D sont incubés pendant 3 semaines à 37°C. Ces conditions d'étude sont identiques pour toutes les expériences présentées dans ce paragraphe ; seules les concentrations en glucose et en dextrine sont modifiées.

2.4.1 Métabolisme du glucose

L'étude du métabolisme du glucose a été réalisée sur le milieu D au cours de la croissance avec 56 mM de glucose et au cours de la sporulation avec 6 mM de ce même substrat. Dans ces

Tableau 50 : Métabolites terminaux de la fermentation du glucose (56 mM) sur le milieu D. Les concentrations sont exprimées en mM.

	NCTC 8798	8-6	R3
Glucose consommé	42	47	42
Acétate	28	37	30
Formiate	18	ND	17
Butyrate	20	22	22
Ethanol	8	7	11
Propionate	1	0	1
Propanol	0	0	0
H ₂	0 ^a	0 ^a	0 ^a
CO ₂	58	74	73
Bilan carbone (%)	91,9	89,5	103,9
Bilan hydrogène (%)	72,3	65,6	79,4

^a traces inférieures à 0,1 mM

ND : non déterminé

conditions, le milieu ne contient pas de dextrine. Nous présentons tout d'abord les produits issus de la fermentation du glucose dans ces 2 conditions d'étude après 3 semaines d'incubation pour en déduire ensuite l'effet de la nature du substrat sur le métabolisme des 3 souches.

2.4.1.1 Au cours de la croissance

La consommation de 56 mM de glucose par les 3 souches est totale dès 10 h d'incubation. Celles-ci produisent principalement du CO₂, de l'acétate, du formiate et du butyrate (Tableau 50) mais aussi du propionate et de l'éthanol. Ces différents produits métaboliques sont synthétisés en proportion variable selon les souches. Les concentrations obtenues en CO₂, en acétate et en butyrate sont plus faibles pour la souche NCTC 8798 que pour les autres bactéries. En effet, les souches 8-6 et R3 libèrent environ 26 % de plus de CO₂ par rapport à la concentration obtenue pour la souche NCTC 8798. La concentration en butyrate produite est identique pour les souches 8-6 et R3 et plus faible de 8 % pour la souche NCTC 8798. Par contre, la production en éthanol est variable selon les souches. La production de formiate est identique pour les souches NCTC 8798 et R3. Les 3 souches libèrent du propionate et de l'H₂ sous forme de traces et le propanol n'est pas détecté. Lorsque les concentrations des différents métabolites sont ramenées à 100 mM d'équivalents glucoses consommés, les souches 8-6 et R3 libèrent le même taux d'acétate alors que le butyrate est produit dans la même proportion pour les souches NCTC 8798 et 8-6.

La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus sur le milieu PYG par Wood en 1961 (Tableau 2) montre de moins grandes variations que celles obtenues sur le milieu BCYT + glucose. En effet, l'absence ou la présence de fer sur le milieu PYG n'influence pas la production de CO₂, de H₂ et du lactate par *Cl. perfringens* ; or, sur le milieu D contenant 56 mM de glucose, des traces d'hydrogène sont produites et le lactate n'est pas détecté. Toutefois, le milieu PYG permet proportionnellement une production plus importante d'acétate que d'éthanol et de butyrate : nous retrouvons ces proportions sur le milieu D.

Les bilans carbone et hydrogène calculés pour les 3 souches sont légèrement faibles (Tableau 50). Il semble que l'hydrogène soit produit en trop faible quantité à partir de 56 mM de glucose sur le milieu D.

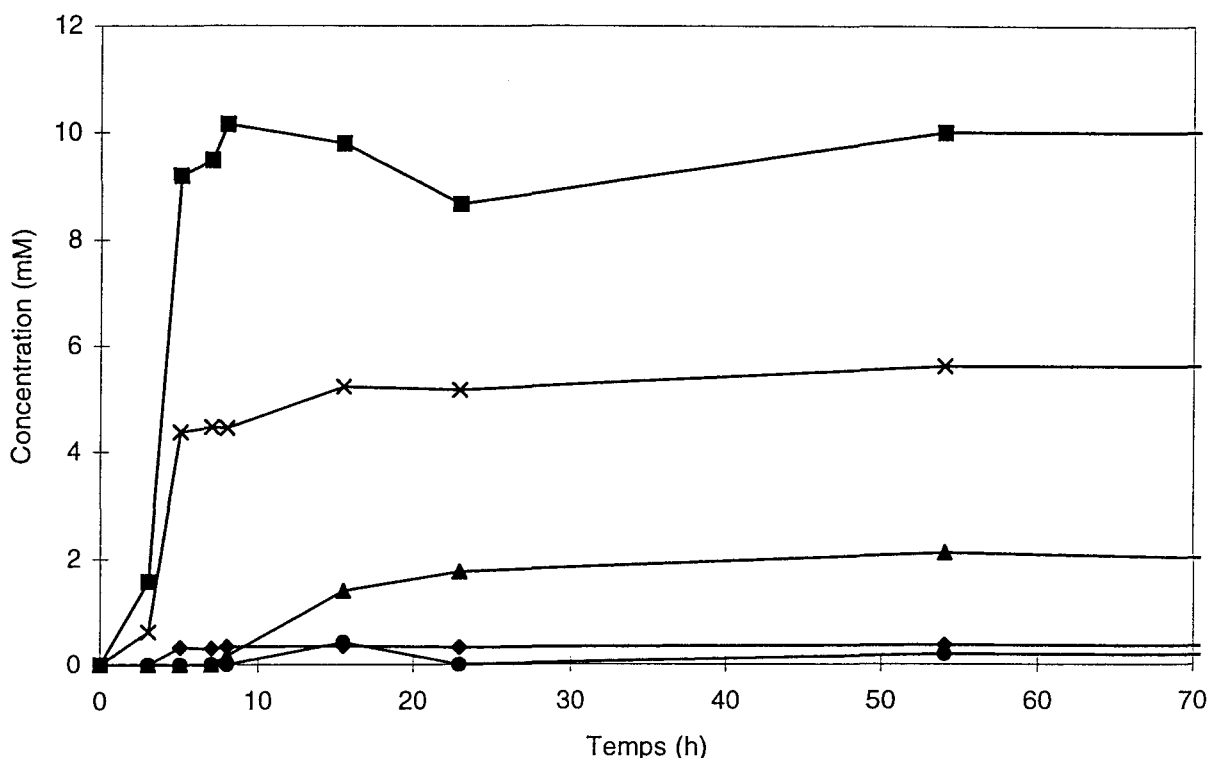


Figure 31 : Production des métabolites terminaux issus de la fermentation du glucose (6 mM) par la souche R3 sur le milieu D. ■ : acétate ; ◆ : butyrate ; ▲ : propionate ; x : éthanol ; ● : propanol. La cinétique de production de formiate n'a pas été réalisée.

Tableau 51 : Métabolites terminaux de la fermentation du glucose (6 mM) sur le milieu D. Les résultats sont exprimés en mM/100 mM d'équivalents glucoses consommés.

	NCTC 8798	8-6	R3
Acétate	84	88	97
Formiate	112	106	90
Butyrate	13	19	4
Ethanol	41	36	48
Propionate	16	34	20
Propanol	7	2	4
H ₂	1 ^a	1 ^a	1 ^a
CO ₂	174	180	201
Bilan carbone (%)	109,9	119,9	111,7
Bilan hydrogène (%)	89,1	96,1	86,8

Les chiffres représentent la valeur moyenne de deux expériences.

^a traces inférieures à 1 mM

2.4.1.2 Au cours de la sporulation

Nous avons étudié le métabolisme du glucose au cours de la sporulation sur le milieu D. Pour cela, la concentration en glucose a été fixée à 6 mM. La cinétique de production d'acides gras volatils et d'alcools est présentée sur la Figure 31 pour la souche R3. Dans ces conditions, le taux de sporulation est très satisfaisant et atteint 100 %.

2.4.1.2.1 Production d'acides gras volatils et d'alcools

La souche R3 consomme le glucose à la vitesse maximale de 6 mM de substrat par heure. Sur le milieu D contenant 6 mM de glucose, l'acétate et l'éthanol sont produits par la souche R3 dès le début de la cinétique et leur production augmente rapidement (Figure 31). Le taux de production maximale d'acétate et d'éthanol est atteint respectivement dès 5 et 15 h d'incubation alors que tout le glucose est consommé. Cette production s'accompagne de l'accumulation de 10,7 mM de formiate. Cependant, le butyrate, le propionate et le propanol sont produits plus tard après respectivement 5, 8 et 15 h d'incubation et en quantité plus faible. Le taux maximal en propionate est atteint vers 50 h d'incubation.

2.4.1.2.2 Bilan métabolique

La fermentation du glucose présent dans le milieu D a été réalisée 2 fois pour les souches NCTC 8798 et 8-6 et 3 fois pour la souche R3. Le bilan métabolique a été établi à partir de la moyenne des concentrations des différents produits libérés.

Les trois souches libèrent principalement du CO₂, du formiate et de l'acétate mais aussi de l'éthanol, du butyrate, du propionate, du propanol et de l'H₂ en quantité variable selon les souches (Tableau 51). Avec une concentration en glucose dix fois moins élevée par rapport à l'expérience précédente, les souches libèrent plus de 200 mM de CO₂ et au moins 100 mM d'acétate pour 100 mM de glucoses consommés. Les souches NCTC 8798 et 8-6 libèrent respectivement 25 et 17 % de moins d'acétate par rapport à la concentration en formiate. Par contre, la tendance est inversée pour la souche R3 : la concentration en formiate est 7 % plus faible par rapport à celle d'acétate. Les souches NCTC 8798, 8-6 et R3 libèrent respectivement 84, 78 et 96 % de moins de butyrate que d'acétate et

produisent de l'éthanol à une concentration respectivement de 67, 47 et 90 % plus élevée que celle de butyrate. La concentration en éthanol est identique pour les 3 souches. Cependant, la souche 8-6 libère autant d'éthanol que de propionate. Par ailleurs, des traces de propanol sont détectées pour chaque souche.

Après 500 h d'incubation, les bilans métaboliques sont satisfaisants pour les souches NCTC 8798 et R3 et sont un peu élevés en carbone pour la souche 8-6. En effet, il semble que la quantité de glucose consommée soit faible et augmenterait par conséquent le bilan carbone obtenu pour cette souche.

Le calcul des bilans théoriques à partir des résultats expérimentaux obtenus dans ces conditions fait intervenir 5 équations décrites précédemment sur la Figure 29. Ces équations permettent de déterminer les concentrations théoriques de chacun des métabolites produits par les souches à partir de 6 mM de glucose dans le milieu D. La comparaison des différents facteurs affectés à chaque équation montre que quelles que soient les souches, les équations (1) ($1 \text{ glucose} \rightarrow 1 \text{ acétate}^- + 1 \text{ éthanol}$) et (6) ($\text{HCO}_3^- + \text{H}_2 \rightarrow 1 \text{ formiate} + \text{H}_2\text{O}$) sont favorisées par rapport aux autres équations. En effet, les coefficients donnés à ces équations sont toujours très importants pour les 3 souches. Par conséquent, la concentration d'acétate, d'éthanol et de CO_2 déterminée par cette équation est plus élevée. Par ailleurs, le coefficient affecté à l'équation (3) ($2 \text{ glucose} \rightarrow 1 \text{ acétate}^- + 2 \text{ butyrate}^-$) pour la souche 8-6 n'est pas négligeable et permet la production de butyrate. Les facteurs donnés aux autres équations sont plus faibles. Il s'avère que pour les 3 souches, la production calculée d'acétate, d'éthanol et de CO_2 est beaucoup plus faible par rapport aux valeurs expérimentales. Par contre, les concentrations en butyrate, en propionate, en propanol et surtout en hydrogène sont plus importantes en théorie. L'hydrogène produit expérimentalement par les 3 souches est en trop faible quantité. Ceci pourrait peut-être s'expliquer par l'absence d'un autre produit métabolique important dans le bilan matière des souches.

2.4.1.3 Comparaison des métabolites issus de la fermentation du glucose présent dans le milieu D

Pour pouvoir comparer le métabolisme du glucose présent à 2 concentrations (6 et 56 mM) sur le milieu D, les produits issus de la fermentation de ce substrat sont exprimés selon les souches comme suit :

- en présence de **56 mM de glucose**

Souche NCTC 8798

1 glucose -----> 0,66 acétate⁻ + 0,48 butyrate⁻ + 0,18 formiate⁻ + 0,19 éthanol + 0,02 propionate⁻ + traces de H₂ + 1,37 CO₂

Souche 8-6

1 glucose -----> 0,79 acétate⁻ + 0,48 butyrate⁻ + 0,14 éthanol + 0,01 propionate⁻ + traces de H₂ + 1,57 CO₂

Souche R3

1 glucose -----> 0,72 acétate⁻ + 0,53 butyrate⁻ + 0,40 formiate⁻ + 0,26 éthanol + 0,01 propionate⁻ + traces de H₂ + 1,73 CO₂

Le formiate n'a pas été dosé pour la souche 8-6 dans ces conditions d'étude.

- en présence de **6 mM de glucose**

Souche NCTC 8798

1 glucose -----> 0,84 acétate⁻ + 0,13 butyrate⁻ + 1,12 formiate⁻ + 0,41 éthanol + 0,16 propionate⁻ + 0,07 propanol + traces de H₂ + 1,74 CO₂

Souche 8-6

1 glucose -----> 0,88 acétate⁻ + 0,19 butyrate⁻ + 1,06 formiate⁻ + 0,36 éthanol + 0,34 propionate⁻ + 0,02 propanol + traces de H₂ + 1,81 CO₂

Souche R3

1 glucose -----> 0,97 acétate⁻ + 0,05 butyrate⁻ + 0,90 formiate⁻ + 0,48 éthanol + 0,20 propionate⁻ + 0,04 propanol + traces de H₂ + 2,00 CO₂

Tableau 52 : pH final obtenu pour les souches 8-6 et R3 selon la concentration en glucose dans le milieu D

Souches	Concentration en glucose (mM)	
	6	56
8-6	7,1	6,4
R3	7,1	6,8

Tableau 53 : Métabolites terminaux de la fermentation de la dextrine (3,5 g/L) sur le milieu D. Les résultats sont exprimés en mM/100 mM d'équivalents glucoses consommés.

	NCTC 8798	8-6	R3
Acétate	88	120 ^b	120 [0,31]
Formiate	113	104	84
Butyrate	6	7 [0,04]	17 [0,16]
Ethanol	35	9 ^b	17 [0,16]
Propionate	28	28 [0,03]	48 [0,11]
Propanol	4	5 ^b	2 [0,02]
H ₂	1 ^a	2	2
CO ₂	214	202	80
Bilan carbone (%)	115,4	115,0	110,0
Bilan hydrogène (%)	86,4	83,8	100,1

Les chiffres donnés pour la souche NCTC 8798 représentent les valeurs moyennes de deux expériences alors que les données des souches 8-6 et R3 correspondent à la valeur moyenne de 3 expériences. Les chiffres entre crochets représentent l'écart-type.

^a traces inférieures à 1 mM

^b écart-type inférieur à 0,01

Bien que la concentration en glucose soit faible, la production d'acétate, de formiate, de propionate et de propanol est plus élevée avec 6 mM de glucose qu'avec une concentration 10 fois supérieure dans le milieu D. En effet, la production d'acétate et de CO₂ par les souches NCTC 8798, 8-6 et R3 est 10 à 37 % moins importante en présence de 56 mM de glucose ce qui indique l'influence limitante de l'homéostasie en pH dans les cultures. De plus, une faible concentration en glucose favorise la production d'éthanol et de propanol pour que la souche métabolise son équilibre redox. Par contre, la concentration en butyrate est proportionnellement plus élevée avec 56 mM de glucose.

Par conséquent, 6 mM de glucose dans le milieu D favorise une production plus importante de CO₂, d'acétate, de formiate, d'éthanol, de propionate et de propanol alors qu'une concentration en glucose 10 fois plus importante induit plutôt une variation des flux de carbone vers la production de butyrate. Cependant, la production d'H₂ n'est pas affectée par la variation de la concentration en glucose. La forte production d'acides gras volatils et d'alcools à partir de 56 mM de glucose fait abaisser le pH final des souches 8-6 et R3 à respectivement 6,4 et 6,8 (Tableau 52). Nous confirmons la relative sensibilité de *Cl. perfringens* à la valeur du pH qui semble limiter la production des métabolites par les souches.

2.4.2 Métabolisme de la dextrine

L'étude du métabolisme de la dextrine a seulement été effectuée à la concentration en dextrine de 3,50 g/L qui permet la sporulation des souches. En effet, les souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sporulent respectivement à 25, 82 et 80 % dans ces conditions d'étude. Le milieu D est exempt de glucose.

Les bilans métaboliques présentés correspondent à un suivi réalisé 2 fois pour la souche sauvage et 3 fois pour chacune des souches 8-6 et R3 : nous présentons la moyenne des concentrations des différents produits obtenus après 50 h d'incubation à 37°C.

La consommation de la dextrine par les 3 souches produit principalement du CO₂, du formiate et de l'acétate mais aussi du butyrate, du propionate en quantité variable ainsi que des traces de propanol et de l'H₂ en proportion variable selon les souches (Tableau 53). En effet, pour les souches NCTC 8798 et 8-6, les concentrations en acétate sont 40 à 60 % plus faibles que celles obtenues pour le CO₂ alors que le phénomène est inversé pour la souche R3 : la concentration en acétate

Tableau 54 : Concentrations théoriques des métabolites issus de la fermentation de la dextrine (3,5 g/L) sur le milieu D. Les résultats sont exprimés en mM/100 mM d'équivalents glucoses consommés.

	NCTC 8798	8-6	R3
Acétate	91	121	118
Formiate	113	103	85
Butyrate	7	7	17
Ethanol	59	14	15
Propionate	29	41	38
Propanol	11	14	2
H ₂	16	103	58
CO ₂	40	34	57

produite par cette souche est 50 % plus élevée que la concentration en CO₂. Le produit majoritaire de fermentation des souches NCTC 8798 et 8-6 est le CO₂ avec plus de 2 molécules de CO₂ produites pour une molécule d'équivalents glucoses consommés alors que plus de 100 mM d'acétate sont produits pour 100 mM d'équivalents glucoses consommés chez les souches R3 et 8-6. Par contre, la souche sauvage libère plus de formiate que d'acétate : la concentration en acétate est 22 % plus faible que celle en formiate. Seule la souche R3 produit une quantité importante de propionate et de butyrate. De plus, les souches 8-6 et R3 produisent l'une et l'autre trois fois plus de propionate que d'éthanol. Par contre, la souche 8-6 produit moins d'éthanol que les autres souches. Parmi les produits de fermentation minoritaires, la concentration en éthanol produite par la souche NCTC 8798 est plus faible de 70 % par rapport à celle du formiate.

Le calcul du bilan théorique de la fermentation de la dextrine (3,5 g/L) présente dans le milieu fait intervenir les équations précédemment citées (Figure 29). En aucun cas, il n'est possible d'obtenir la construction d'un bilan théorique de fermentation de la dextrine qui soit suffisamment représentatif des bilans expérimentaux que nous avons obtenus. En effet, les différentes combinaisons de ces équations, si elles mettent toutes en avant la très forte production d'acétate et de CO₂ pour chacune des souches testées, conduisent à des productions des métabolites minoritaires des bilans de fermentation expérimentaux très éloignés des accumulations réellement observées. Un exemple de résultat de ces simulations est présenté dans le Tableau 54. Nous n'arrivons pas à traduire de façon simple en quelques équations les flux de carbone réels rencontrés lors du métabolisme de la dextrine utilisée comme seul substrat de croissance.

De même, la production expérimentale d'hydrogène semble trop faible pour les trois souches. Il n'est pas non plus exclu que les systèmes de fermeture de nos flacons de culture ne supportent pas une surpression gazeuse sans fuites. Ce décalage avec les conditions réelles pourrait provenir d'une sous-estimation de la concentration en équivalents glucoses de la dextrine. En effet, le dosage de la dextrine n'est pas tout à fait satisfaisant ni reproductible et présente donc une barre d'erreur sur les valeurs annoncées d'environ 20 %.

Les pH finaux sont compris entre 7,45 et 7,81 selon les souches ; ceci montre que la cinétique de consommation très lente pourrait expliquer une utilisation différente des flux de carbone sur ce type de substrat.

Tableau 55 : Métabolites terminaux de la fermentation du glucose (56 mM) et de la dextrine (3,5 g/L) sur le milieu D. Les concentrations sont exprimées en mM.

	NCTC 8798	8-6	R3
Equivalents glucoses consommés	50	45	50
Acétate	28	31	34
Formiate	ND	11	12
Butyrate	17	22	17
Ethanol	15	8	18
Propionate	1	0	0
Propanol	0	0	0
H ₂	0 ^a	0 ^a	0 ^a
CO ₂	58	64	70

Les chiffres correspondent à la valeur moyennes de deux expériences.

^a traces inférieures à 0,1 mM

ND non déterminé

Tableau 56 : Bilan matière des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sur le milieu D contenant 56 mM de glucose et 3,5 g/L de dextrine

	NCTC 8798	8-6	R3
Bilan carbone (%)	71,7	88,9	85,9
Bilan hydrogène (%)	57,2	68,5	69,3

2.4.3 Métabolisme du glucose et de la dextrine

Le métabolisme du glucose et de la dextrine, substrats présents en même temps dans le milieu D, a été étudié au cours de la croissance et lors de la formation des spores des 3 souches. Alors que 3,5 g/L de dextrine sont présents dans le milieu pour l'une ou l'autre condition d'étude, seule la concentration en glucose a été modifiée pour obtenir les 2 états physiologiques : la concentration en glucose est de 56 mM pour l'étude du métabolisme au cours de la croissance et de 6 mM pour l'étude du métabolisme au cours de la sporulation.

2.4.3.1 Au cours de la croissance

L'étude du métabolisme pendant la croissance des souches sur le milieu D est réalisée avec 3,5 g/L de dextrine et 56 mM de glucose. Cette expérience a été réalisée 2 fois dans ces conditions.

Le CO₂ est produit de façon majoritaire par les 3 souches (Tableau 55). Acétate, formiate, butyrate et éthanol sont libérés en quantité non négligeable mais leur concentration varie selon les souches. La production d'acétate est deux fois moins importante que la production de CO₂ pour chaque souche. La concentration en butyrate est respectivement de 40, 30 et 50 % plus faible que la concentration en acétate pour les souches NCTC 8798, 8-6 et R3. Les souches 8-6 et R3 libèrent la même quantité de formiate. Cependant, la production en éthanol et en butyrate est identique pour les souches NCTC 8798 et R3 alors que la concentration en éthanol pour la souche 8-6 est moins importante de 62 % que la concentration en butyrate. De l'hydrogène et du propionate sont libérés en très faible quantité voire sous forme de traces. Il n'y a pas de production de propanol.

Les bilans métaboliques sont établis après 50 h d'incubation alors que le glucose a été consommé depuis 40 h d'incubation (Tableau 56). Les bilans carbone et hydrogène calculés à partir de ces données sont relativement faibles quelles que soient les souches étudiées. Toutefois, les bilans sont plus élevés pour les souches 8-6 et R3 que pour la souche sauvage. En effet, pour cette dernière, les concentrations des produits majoritaires, le CO₂ et l'acétate, sont plus faibles de 16 % par rapport à celles obtenues pour les autres souches. Pourtant, la consommation d'équivalents glucoses est identique pour les 3 souches. Ici également, il semble que la concentration en dextrine consommée devrait être sur-estimée pour les 3 souches mais l'écart serait plus important pour la souche sauvage. Ceci peut aussi provenir des variations obtenues au cours du dosage de la dextrine.

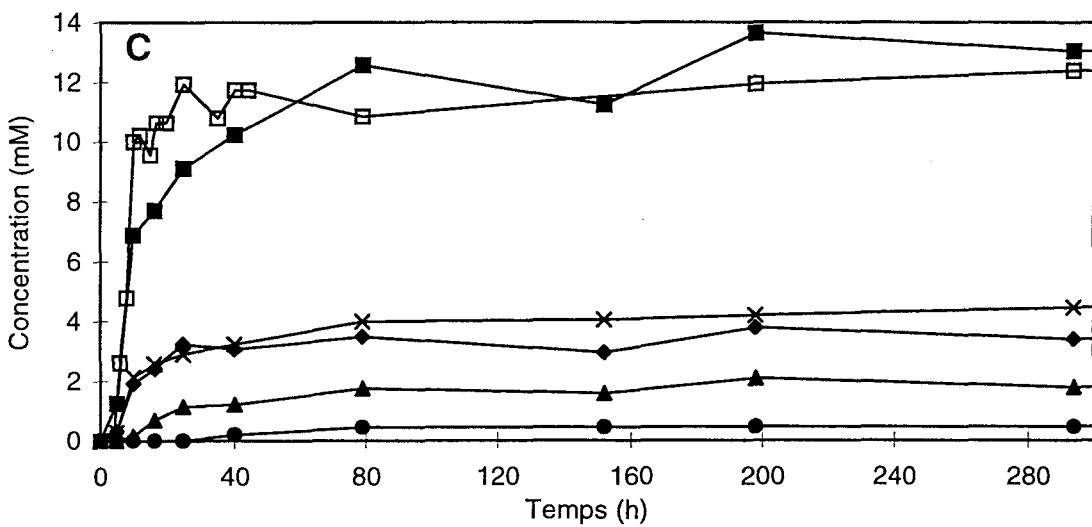
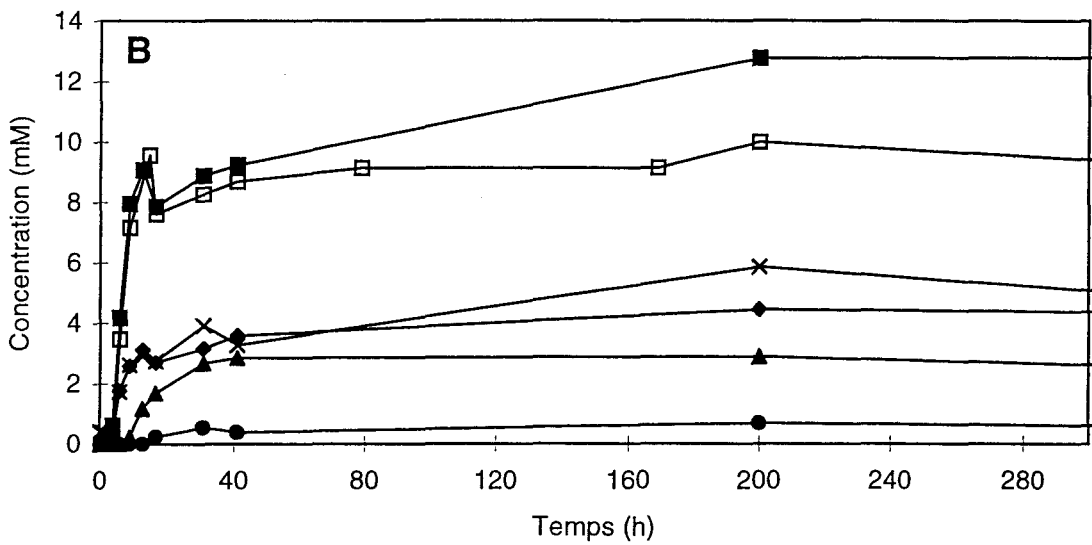
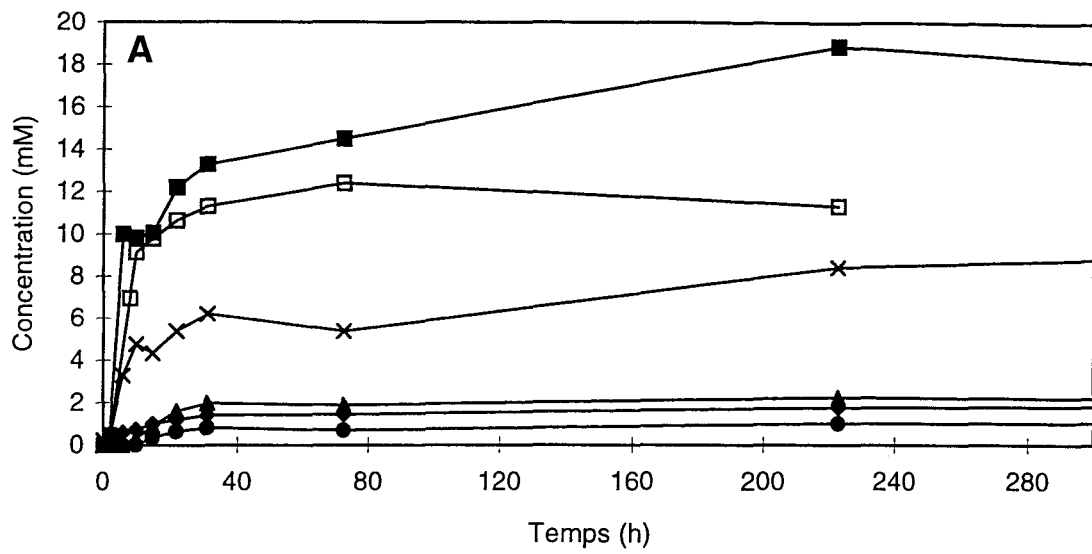


Figure 32 : Production des métabolites issus de la fermentation du glucose (6 mM) et de la dextrine (3,5 g/L) par les souches NCTC 8798, 8-6 et R3 dans le milieu D. A : Souche NCTC 8798 ; B : Souche 8-6 ; C : Souche R3. ■ : acétate ; □ : formiate ; ◆ : butyrate ; ▲ : propionate ; x : éthanol ; ● : propanol.

2.4.3.2 Au cours de la sporulation

Pour l'étude du métabolisme du glucose et de la dextrine dans les conditions de sporulation, l'expérience a été effectuée 4 fois pour la souche sauvage et 6 fois pour les souches 8-6 et R3 sur le milieu D contenant 6 mM de glucose et 3,5 g/L de dextrine. Dans ces conditions, 87 à 100 % de spores sont obtenues selon les souches sur le milieu D.

2.4.3.2.1 Production d'acides gras volatils et d'alcools

Cette étude a été réalisée dans des flacons de 1,2 L pour suivre, pendant 3 semaines, la cinétique de production d'acides gras volatils et d'alcools pour les 3 souches à partir de 6 mM de glucose et 3,5 g/L de dextrine. Pour chaque souche, les cinétiques de production d'acétate, de formiate et d'éthanol présentent 2 phases. Chaque phase correspond à la consommation d'un substrat carboné (Figure 32) : la première pendant laquelle le glucose est dégradé dure 5 à 10 h selon les souches et la seconde qui correspond à la consommation de la dextrine, 200 h. L'acétate, le formiate et l'éthanol sont produits de façon croissante chez les 3 souches dès le début de la croissance et jusqu'à la consommation totale du glucose. Pendant cette première phase, la vitesse maximale de consommation du glucose varie selon la nature des souches : en effet, les souches NCTC 8798, 8-6 et R3 consomment respectivement 5,00 ; 3,60 et 1,80 mM de glucose par heure d'incubation. A la fin de la première phase, apparaissent des traces de propionate, de butyrate et de propanol. Au cours de la seconde phase, les concentrations de chacun de ces produits augmentent pour atteindre des valeurs constantes vers 200 h d'incubation. Cette augmentation de 40 à 50 % selon les souches est moins rapide que dans la première phase. La consommation de dextrine commence dès le début de la croissance mais elle est accentuée à partir du moment où tout le glucose est consommé. Cependant, elle n'est pas totale : en effet, en fin de croissance, il reste entre 1,50 et 2,20 g/L de dextrine selon les souches. Le pH final obtenu dans ces conditions étant de 7,1 pour chaque souche ne constitue pas un facteur limitant la consommation de la dextrine. Pendant la seconde phase, les vitesses horaires maximales de consommation des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 sont respectivement 1,00 ; 0,23 et 1,94 mM d'équivalents glucoses de dextrine pendant 1 h.

Tableau 57 : Métabolites terminaux de la fermentation du glucose (6 mM) et de la dextrine (3,5 g/L) sur le milieu D. Les résultats sont exprimés en mM/100 mM d'équivalents glucoses consommés.

	NCTC 8798	8-6	R3
Acétate	90 [0,04]	78 [0,10]	90 [0,08]
Formiate	86	69	90
Butyrate	9 [0,02]	24 [0,02]	12 ^b
Ethanol	50 [0,02]	28 [0,03]	54 [0,03]
Propionate	9 [0,02]	15 [0,04]	11 [0,01]
Propanol	5 ^b	4 ^b	3 ^b
H ₂	1 ^a	1 ^a	1 ^a
CO ₂	186	160	185
Bilan carbone (%)	105,6	99,4	109,0
Bilan hydrogène (%)	84,4	78,2	87,7

Les chiffres représentent les valeurs moyennes de 4 expériences. Les valeurs entre crochets correspondent à l'écart-type.

^a traces inférieures à 1 mM

^b écart-type inférieur à 0,01

2.4.3.2.2 Bilan métabolique

Les 3 souches libèrent majoritairement du CO₂, de formiate et de l'acétate (Tableau 57) ; les autres composés (butyrate, éthanol, propionate, propanol et H₂) sont produits en quantité variable selon les micro-organismes. Toutes les souches libèrent deux fois plus de CO₂ que d'acétate. Toutefois, la production d'acétate est identique pour la souche NCTC 8798 et la souche R3. Les souches libèrent autant d'acétate que de formiate. Les souches NCTC 8798 et R3 produisent du butyrate et du propionate dans les mêmes proportions alors que la souche 8-6 libère du propionate à une concentration 37 % plus faible que celle du butyrate. La souche sauvage et la souche R3 produisent moins de butyrate que d'éthanol alors que la souche 8-6 libère en quantité égale ces 2 métabolites. Les 3 souches produisent du propanol et de l'hydrogène à l'état de traces.

Les différents produits métaboliques et les substrats présents dans le milieu ont été dosés après 50 et 500 h d'incubation. De 50 à 500 h d'incubation, les souches NCTC 8798, 8-6 et R3 ont consommé respectivement 3,19 ; 2,95 ; 5,27 mM d'équivalents glucoses de dextrine. Ceci montre que la consommation de ce substrat est d'une part très variable selon les souches, et d'autre part lente. Dans ces conditions, la souche R3 consomme plus de dextrine que les autres souches. Pourtant, les produits issus de la fermentation du glucose et de la dextrine par cette souche ne sont pas libérés en plus grande quantité. Le bilan carboné est satisfaisant pour les trois souches (Tableau 57). Ici encore, nous rappelons que la détermination de la concentration en glucose et en dextrine consommée peut être sous-estimée dans ces conditions d'étude à cause des difficultés à doser la dextrine. Les concentrations en CO₂, en éthanol et en propionate obtenues expérimentalement sont plus élevées que les valeurs calculées. En effet, le bilan théorique présenté par les équations ci-dessous montre des concentrations plus faibles pour ces produits quelles que soient les souches malgré un bilan carbone satisfaisant. Par contre, le bilan hydrogène des souches NCTC 8798 et 8-6 est un peu trop faible. En effet, d'après le bilan théorique, la production d'hydrogène devrait être plus importante, au moins pour la souche sauvage ; ici encore, il est possible que la surpression à l'intérieur des flacons ait entraîné des fuites de gaz.

Souche NCTC 8798

1 équivalent glucose ----> 0,91 acétate⁻ + 0,85 formiate⁻ + 0,14 butyrate⁻ + 0,65 éthanol + 0,14 propionate⁻ + 0,07 propanol + 0,31 H₂ + 0,78 CO₂

Souche 8-6

1 équivalent glucose ----> 0,79 acétate⁻ + 0,69 formiate⁻ + 0,36 butyrate⁻ + 0,29 éthanol + 0,16 propionate⁻ + 0,22 propanol + 0,55 H₂ + 0,57 CO₂

Souche R3

1 équivalent glucose ----> 0,90 acétate⁻ + 0,90 formiate⁻ + 0,16 butyrate⁻ + 0,56 éthanol + 0,27 propionate⁻ + 0,03 propanol + 0,18 H₂ + 0,64 CO₂

Pour chacune de ces équations-bilan écrites, les principaux flux de carbone concernent la production d'acétate et de formiate. La bonne concordance entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées nous permet de confirmer les flux de carbone faibles vers les productions d'éthanol, de propionate et de propanol. La reconstitution de ces 3 bilans théoriques à partir des équations métaboliques initiales souligne bien l'importance très largement prépondérante des flux de carbone vers les productions d'acétate et de formiate. L'adéquation moins bonne vers les productions d'éthanol et de propionate montrent que les combinaisons choisies ne dérivent que faiblement les flux métaboliques vers ces produits dont la production est surestimée au détriment de la production de CO₂.

2.4.3.3 Comparaison des métabolites issus de la fermentation du glucose et de la dextrine présents dans le milieu D

La consommation des métabolites produits issus de la fermentation du glucose et de la dextrine présent dans le milieu D est ramenée à une mM d'équivalents glucoses consommés et les équations sont présentées ci-dessous selon la concentration en glucose dans le milieu D :

- en présence de **56 mM de glucose**

Souche NCTC 8798

1 équivalent glucose -----> 0,57 acétate⁻ + 0,34 butyrate⁻ + 0,30 éthanol + traces de propionate + traces de H₂ + 1,17 CO₂

Souche 8-6

1 équivalent glucose -----> 0,68 acétate⁻ + 0,48 butyrate⁻ + 0,24 formiate⁻ + 0,18 éthanol + traces de propionate + traces de H₂ + 1,40 CO₂

Souche R3

1 équivalent glucose -----> 0,68 acétate⁻ + 0,35 butyrate⁻ + 0,24 formiate⁻ + 0,36 éthanol + traces de propionate + traces de H₂ + 1,41 CO₂

La concentration en formiate pour la souche sauvage n'a pas été déterminée dans ces conditions d'étude.

- en présence de **6 mM de glucose**

Souche NCTC 8798

1 équivalent glucose -----> 0,90 acétate⁻ + 0,86 formiate⁻ + 0,09 butyrate⁻ + 0,50 éthanol + 0,09 propionate⁻ + 0,05 propanol + traces de H₂ + 1,86 CO₂

Souche 8-6

1 équivalent glucose -----> 0,78 acétate⁻ + 0,69 formiate⁻ + 0,28 butyrate⁻ + 0,28 éthanol + 0,15 propionate⁻ + 0,04 propanol + traces de H₂ + 1,60 CO₂

Souche R3

1 équivalent glucose -----> 0,90 acétate⁻ + 0,90 formiate⁻ + 0,12 butyrate⁻ + 0,54 éthanol + 0,11 propionate⁻ + 0,03 propanol + traces de H₂ + 1,85 CO₂

Pour une même concentration en dextrine, la présence de 56 mM de glucose dans le milieu D diminue la libération d'éthanol et de propionate mais favorise la production de butyrate. Par ailleurs, le propanol n'est pas détecté avec cette concentration en glucose. Dans ces conditions également, les 3 souches produisent un peu plus de 1 molécule de CO₂ par équivalent glucose consommé alors qu'en présence d'une concentration en glucose 10 fois moins élevée, elles libèrent proportion-

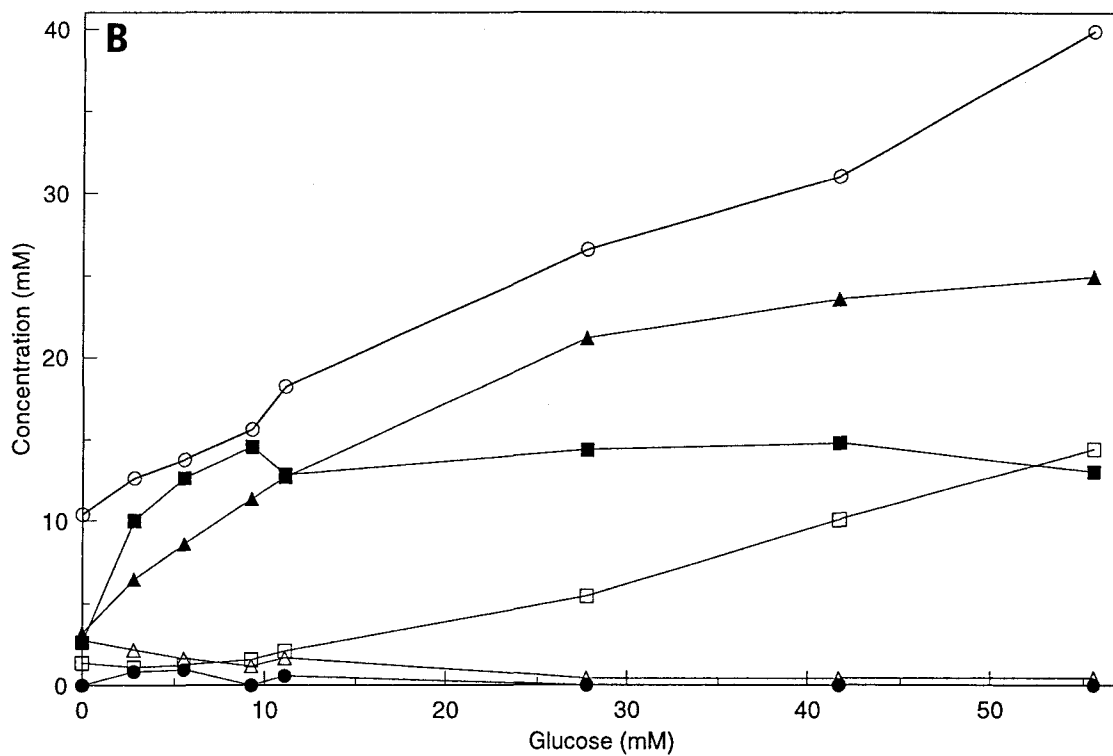
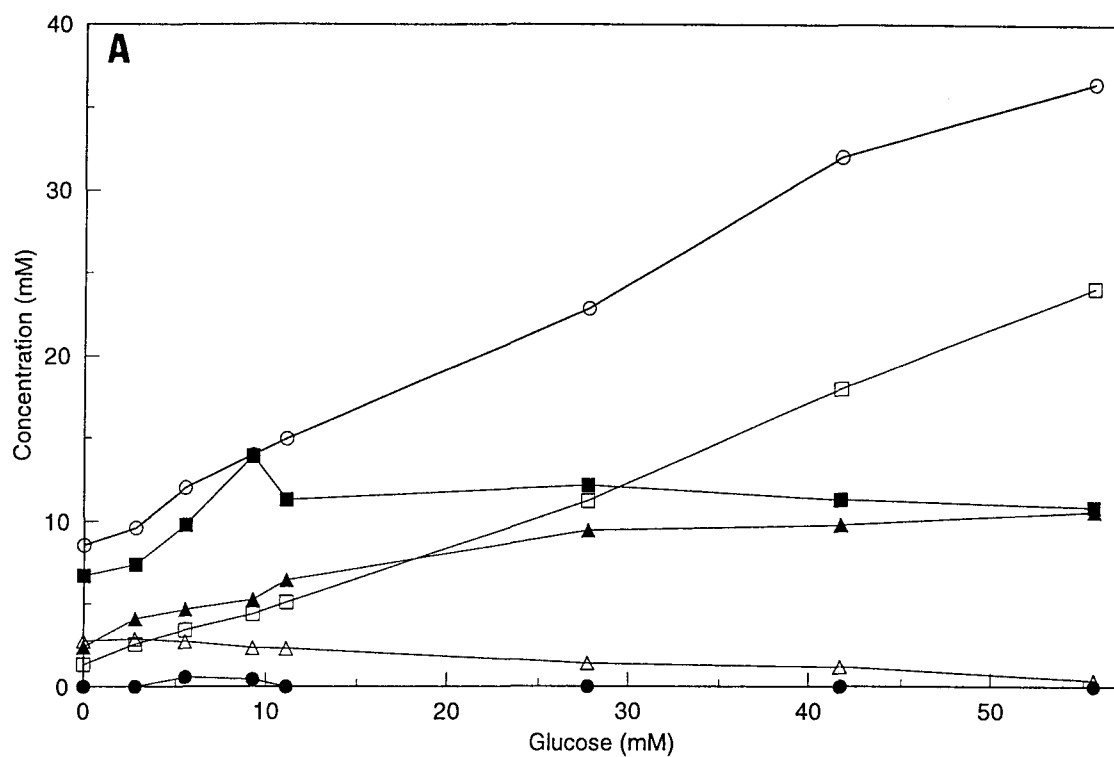


Figure 33 : Effet de la concentration en glucose sur la production d'acides gras volatils et d'alcools par les souches 8-6 et R3 sur le milieu D. A : Souche 8-6 ; B : Souche R3. ○ : acétate ; △ : propionate ; □ : butyrate ; ▲ : éthanol ; ● : propanol ; ■ : formiate.

nellement plus de CO₂ et plus d'acétate. Par conséquent, l'augmentation de la concentration en glucose modifie toutes les concentrations des produits libérés et traduit de profondes réorientations métaboliques de la cellule.

2.4.3.4 Métabolisme des souches en fonction de la concentration en glucose

Une expérience complémentaire consiste à étudier les produits terminaux de fermentation libérés en fonction de la concentration en glucose présent dans le milieu D pour une même concentration en dextrine (3,5 g/L). Pour cela, le glucose est ajouté par filtration Millex à 10 mL de milieu D à des concentrations comprises entre 0 à 56 mM. Les métabolites finaux ont été dosés pour les souches 8-6 et R3 après 50 h d'incubation.

Quelle que soit la concentration en glucose, l'acétate, l'éthanol, le formiate et le butyrate sont produits majoritairement (Figure 33) : la concentration en acétate est plus importante que celle des 2 autres produits. L'acétate est libéré de façon croissante avec la concentration en glucose. Par contre, la libération d'éthanol et de butyrate est variable selon les souches. En effet, quelle que soit la concentration en glucose, la souche R3 libère plus d'éthanol que de butyrate. Par contre, ces 2 composés sont produits dans les mêmes proportions pour la souche 8-6 jusqu'à 11 mM de glucose mais avec une concentration en éthanol légèrement plus élevée que celle de butyrate. Pour des concentrations supérieures en glucose, la production d'éthanol reste constante à 9 mM alors que la concentration en butyrate augmente régulièrement avec la concentration en glucose. Par conséquent, pour cette souche, la production d'éthanol n'est pas liée à la concentration en glucose à partir de 28 mM de substrat. Par ailleurs, la souche R3 produit plus d'éthanol que de butyrate mais libère moins de butyrate que la souche 8-6. La production de butyrate par la souche R3 est constante jusqu'à 11 mM en glucose puis elle augmente rapidement pour des concentrations supérieures. Pour les 2 souches, la production de formiate augmente régulièrement jusqu'à 9 mM de glucose, puis reste constante pour des concentrations supérieures en glucose. Ensuite, la concentration de ce métabolite est identique pour les 2 souches à partir de 9 mM de glucose présent dans le milieu. Les autres composés, le propionate et le propanol, sont libérés en faible quantité jusqu'à 11 mM de glucose et ne sont pas plus détectés pour des concentrations supérieures en glucose. Par conséquent, le métabolisme de ces 2 souches est identique bien que les différents produits métaboliques issus de la

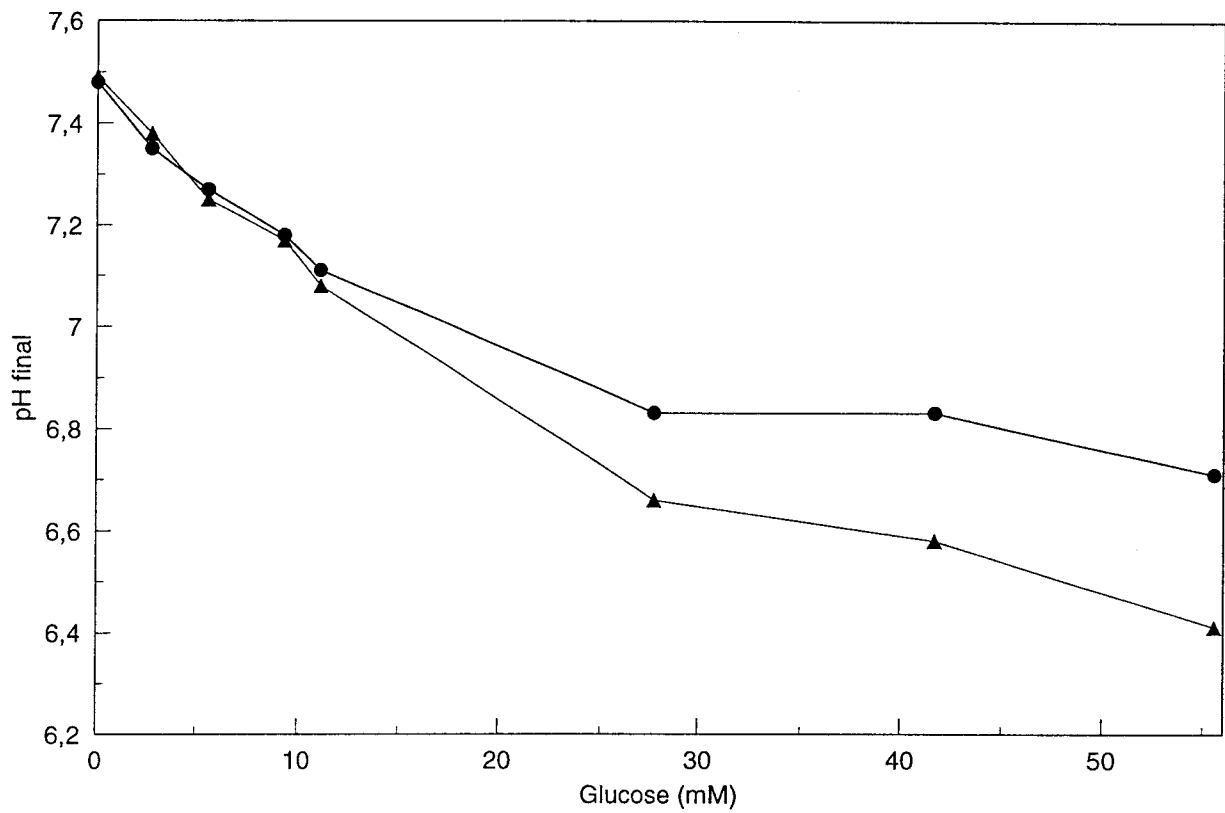


Figure 34 : Effet de la concentration en glucose sur la valeur du pH final obtenu sur le milieu D pour les souches 8-6 et R3. ▲ : Souche 8-6 ; ● : Souche R3.

fermentation du glucose et de la dextrine ne soient pas libérés dans les mêmes proportions. En effet, à l'exception de l'acétate, la concentration des métabolites n'est pas proportionnelle à la concentration en glucose présent dans le milieu. Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment : la concentration croissante de glucose dans le milieu D inhibe de façon régulière la production de propanol et de propionate libérés dans le milieu D ainsi que la libération d'éthanol pour la souche 8-6. La concentration croissante en acides gras volatils produits en fonction de la concentration en glucose abaisse le pH jusqu'à 6,4 pour la souche 8-6 (Figure 34). De 0 à 11 mM de glucose, les pH finaux sont identiques pour les 2 souches et diminuent rapidement à raison de 0,35 unité pH pour 10 mM de glucose ajouté au milieu. A partir de 28 mM de glucose, la chute du pH final est moins rapide. Cependant, pour la souche R3, le pH reste constant à 6,8 entre 28 et 56 mM de glucose alors qu'il est abaissé jusqu'à 6,4 pour la souche 8-6. Le glucose est consommé en totalité par les 2 souches.

2.5 CONCLUSION

Ces résultats constituent les premières données sur le métabolisme carboné de *Cl. perfringens* obtenu d'une part dans les conditions de croissance, et d'autre part dans les conditions de sporulation.

Quels que soient la nature du milieu, la nature du substrat carboné et l'état physiologique de la cellule, les 3 souches possèdent les mêmes voies métaboliques mais avec une utilisation différente de l'énergie. En effet, elles libèrent principalement du CO₂ et de l'acétate en concentration importante mais variable. Cependant, un troisième métabolite est produit en quantité non négligeable mais sa nature dépend de la source de carbone employée. En présence de 6 mM de glucose couplé ou non à la dextrine, les souches libèrent du formiate en concentration élevée alors qu'elles produisent du butyrate dans les mêmes proportions que l'acétate sur le milieu DS dont le raffinose constitue le substrat carboné. Sur le milieu BCYT + glucose (11 mM), le formiate est le produit majoritairement formé. La concentration en CO₂ produit est moins importante que celle en acétate ou en éthanol pour les 3 souches testées. Par contre, des différences sont observées sur les concentrations des produits libérés en plus faible quantité. Sur le milieu FTG, le propionate n'est pas libéré alors que des traces de propanol sont détectées pour la souche R3. Sur les milieux BCYT + glucose et DS, ces 2 méta-

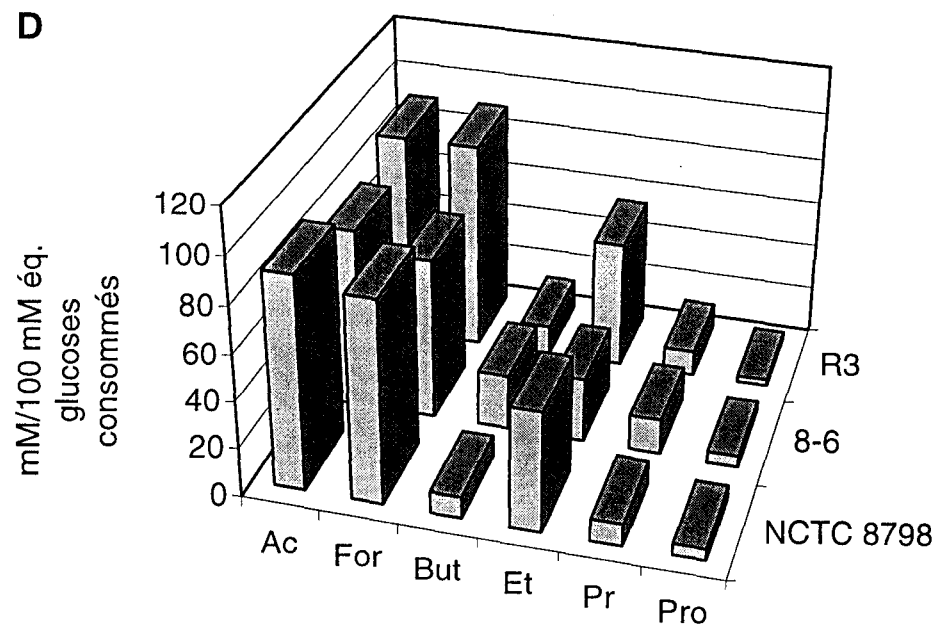
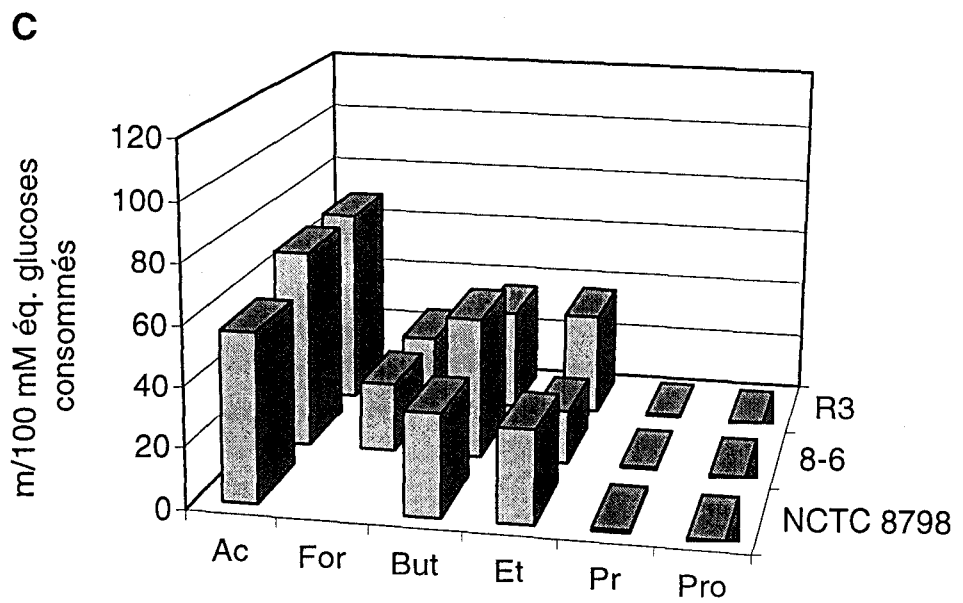
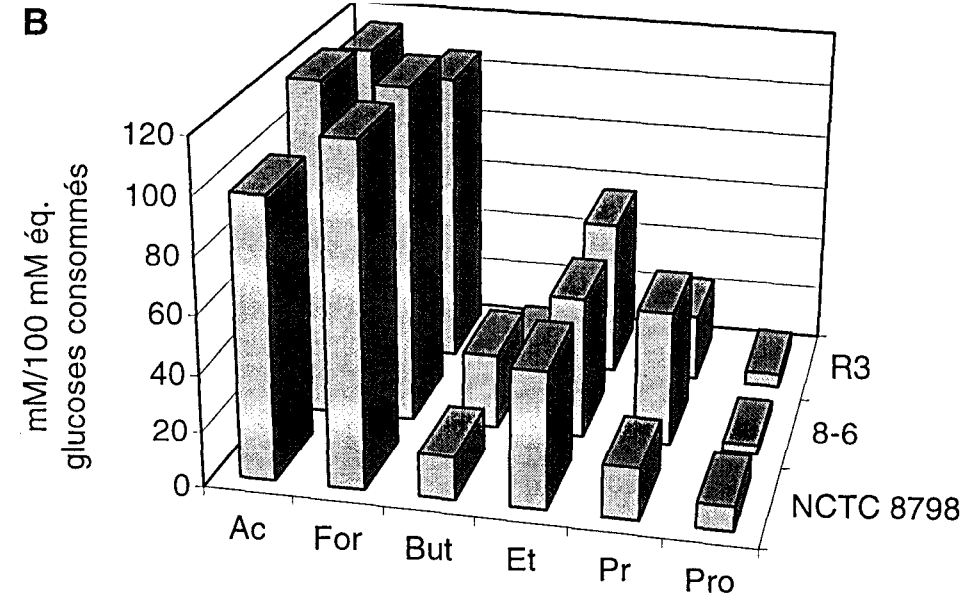
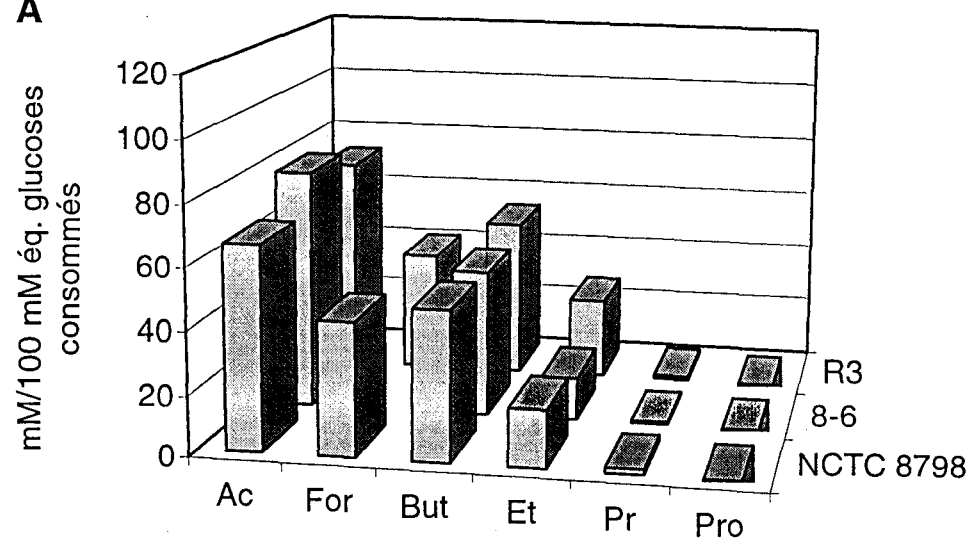


Figure 35 : Produits terminaux de fermentation des souches NCTC 8798, 8-6 et R3 en fonction de la concentration en glucose et en dextrine présents dans le milieu D. A : 56 mM de glucose ; B : 6 mM de glucose ; C : 56 mM de glucose et 3,5 g/L de dextrine ; D : 6 mM de glucose et 3,5 g/L de dextrine. Les concentrations sont exprimées en mM/100 mM d'équivalents glucoses consommés. Ac : acétate ; For : formiate ; Bu : butyrate ; Et : éthanol ; Pr : propionate ; Pro : propanol. Les concentrations en CO₂ et en H₂ ne sont pas inscrites sur cette figure : les variations des concentrations des produits minoritairement formés ne pouvaient pas être observées.

bolites, le propionate et le propanol ne sont pas libérés par les souches étudiées ou très faiblement pour le premier. Toutefois, l'hydrogène est produit sous forme de traces sur chacun des milieux testés. Cependant, les bilans théoriques élaborés pour certaines conditions d'étude montrent une libération importante de ce gaz presque aussi élevée que la production de CO₂. De plus, les bilans hydrogène expérimentaux sont souvent faibles et inférieurs au bilan carbone. Par conséquent, il semble que la concentration en hydrogène est sous-estimée. Cette sous-estimation peut provenir de 3 raisons : soit la technique de dosage des gaz utilisée au laboratoire n'est pas tout à fait satisfaisante et fausse les concentrations en hydrogène libéré, soit les fuites d'hydrogène dues à la surpression ont lieu à travers le bouchon butyl ou lors des prélèvements, soit les calculs réalisés pour déterminer la concentration en hydrogène sont mal élaborés et ne tiennent pas compte des transferts de masse entre la phase liquide et la phase gazeuse. Par ailleurs, Pauss *et al.* (1990) ont montré que la quantité d'hydrogène détectée dans des fermenteurs anaérobies où le milieu présent est non agité et de nature visqueuse est sous-estimée de 40 à 70 fois par rapport aux concentrations déterminées par le bilan théorique. Cependant, en tenant compte des conditions d'études appliquées ici, les concentrations en hydrogène modifiées en faisant intervenir les transferts de masse de ce gaz et le coefficient de correction sont tout à fait satisfaisantes et comparables aux concentrations obtenues selon le bilan théorique.

Ces résultats ont été comparés avec ceux obtenus sur le milieu PYG par Wood en 1961 qui fournit les seules informations connues sur le métabolisme de *Cl. perfringens* (Tableau 2). Les concentrations des différents produits métaboliques obtenues sur ce milieu riche contenant 56 mM de glucose et 10 g/L d'extrait de levure peuvent être rapprochées de celles déterminées sur le milieu FTG ou le milieu BCYT + glucose ou le milieu D en présence uniquement de glucose. La composition des milieux FTG et PYG est très proche ; cependant, les concentrations des métabolites issus de la fermentation du glucose sont différentes à l'exception du CO₂. De plus, les souches de *Cl. perfringens* libèrent du lactate sur le milieu PYG alors qu'elles n'en produisent pas sur le milieu FTG : le bilan métabolique établi pour les souches 8-6 et R3 sur le milieu FTG ne laisse pas soupçonner l'absence d'un métabolite qui n'aurait pas été détecté lors de l'expérience.

L'étude du métabolisme des souches étudié dans des conditions non sporulantes et sporulantes sur le milieu D présente quelques différences (Figure 35). Les variations dépendent de la concentration en substrats et reflètent l'état physiologique des souches. Les Figures 35A et 35C correspondent au métabolisme au cours de la croissance et les Figures 35B et 35D au métabolisme pendant la sporulation des souches. Il s'avère qu'au cours de la sporulation, la production de CO₂, d'acétate, de formiate, d'éthanol, de propionate et le propanol est plus importante que lors de la croissance alors que la concentration en butyrate est plus faible. En effet, la production importante en métabolites oxydés comme l'acétate sert aux souches qui ont besoin d'énergie pour leur croissance et pour la formation de spores. Les molécules d'hydrogène libérées au cours du métabolisme permettent ainsi une production élevée d'ATP par régénération du pool des coenzymes réduits. Ceci se traduit par la production non négligeable de butyrate, d'éthanol et de propanol libérés par les souches. Cependant, l'équilibre redox des réactions est très perturbé dans les conditions sporulantes. En effet, alors que les bilans d'oxydo-réduction sont équilibrés pour chaque souche sur les milieux BCYT + glucose, DS et FTG, l'accumulation des produits montre un déficit en produits réduits sur le milieu D. Une grande partie du pouvoir de réduction a été placée dans les synthèses de constituants cellulaires qui piègent beaucoup plus d'hydrogène quand nous comparons ces bilans à ceux obtenus sur les souches qui ne sporulent pas. Les études précédentes ont montré que *Clostridia* ont la capacité d'hydrolyser des acides aminés présents dans le milieu (Andreesen *et al.*, 1989). Or, un flacon de milieu D exempt de substrats (glucose et dextrine) inoculé avec l'une ou l'autre souche ne présente aucun trouble mettant en évidence la fermentation des acides aminés présents dans le milieu D. Par conséquent, le métabolisme des acides aminés n'interfère dans nos conditions d'étude avec le métabolisme général des souches de *Cl. perfringens* choisies.

L'étude des bilans théoriques de fermentation souligne l'importance prépondérante de l'équation de conversion du glucose en acétate, éthanol et 2 molécules de CO₂ dans tous les bilans obtenus, indifféremment des souches et des milieux de culture utilisés. Ceci explique également que les quantités d'énergie disponibles pour les cellules soient relativement voisines dans les conditions de fermentation testées. L'importance de cette réaction est toutefois contrebalancée dans les bilans de fermentation faisant apparaître du formiate par la réaction de synthèse de ce composé au dépend de l'hydrogène et du CO₂ gazeux. L'étude de l'énergie disponible pour les bactéries, toutes conditions

métaboliques confondues, montre que comparativement, la souche 8-6 établit les conversions énergétiques les plus favorables à son métabolisme ; puis viennent les souches NCTC 8798 et R3. Ceci pourrait peut-être expliquer les taux de sporulation parfois un peu plus élevés enregistrés en conditions sporulantes sur cette dernière souche. Par contre, les rendements énergétiques des bilans de fermentation sur les milieux DS et D en conditions de sporulation sont très voisins : la nature du milieu semble être un facteur de sporulation beaucoup plus important que les conditions énergétiques de la fermentation. Par ailleurs, la dextrine à la concentration de 3,5 g/L n'influencerait pas le métabolisme des souches au cours de leur croissance ou pendant la sporulation.

Cependant, la souche 8-6 ne semble pas avoir le même flux de carbone que les autres souches. En effet, quel que soit son état physiologique, les productions de butyrate, d'éthanol et de propionate par la souche 8-6 diffèrent avec celles des souches NCTC 8798 et R3. Au cours de la sporulation (Figure 35B et 35D), la souche 8-6 libère autant d'éthanol que de propionate alors que les souches NCTC 8798 et R3 produisent plus d'éthanol que de propionate. Par contre, la souche 8-6 libère plus de butyrate que d'éthanol pendant sa croissance sur le milieu D alors que ces 2 métabolites sont produits dans les mêmes proportions pour les 2 autres souches.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Les paramètres physiologiques testés pour chaque souche modifient la croissance et la sporulation des 3 souches étudiées quel que soit le milieu : la nature et l'âge de la préculture utilisée, le volume du milieu de culture et les différentes concentrations des substrats carbonés présents constituent les principaux facteurs qui modifient la croissance et le taux de sporulation. Les résultats obtenus mettent en évidence que le milieu BCYT + glucose, spécifique des bactéries anaérobies et utilisé au laboratoire comme milieu de conservation, permet l'obtention d'un taux important de spores pour chacune des souches. Cependant, la sporulation sur le milieu BCYT est difficilement reproductible malgré une croissance plus importante observée dans ces conditions. En outre, aucune sporulation n'est observée sur le milieu DS alors que ce milieu est décrit comme favorisant la sporulation : les conditions d'études utilisées au laboratoire n'ont pas permis de se rapprocher de celles décrites dans la littérature. Parmi les différents milieux de culture ou de sporulation testés, il s'avère que les 3 souches de *Clostridium perfringens* étudiées sporulent de façon satisfaisante et reproductible uniquement sur le milieu défini D avec des taux de spores élevés et des concentrations maximales en entérotoxine allant jusqu'à 0,04 mg/mL de milieu. Par ailleurs, un taux plus élevé de sporulation a été obtenu pour les 3 souches lorsque les 2 substrats carbonés sont présents ensemble dans le milieu D. Par conséquent, nos travaux confirment d'une part, que la sporulation des souches de *Cl. perfringens* est difficile à obtenir *in vitro* et parfois aléatoire et d'autre part, que la production d'entérotoxine a bien lieu lors de l'éclatement des cellules et de la libération des spores. Nos travaux ont permis de préciser et de compléter les études précédentes sur la sporulation, notamment le fait que la production d'entérotoxine n'est pas associée à la fréquence de la sporulation mais au nombre de spores libres formées. Ramenées à une même concentration en spores, les souches libèrent la même quantité d'entérotoxine.

La seconde partie des résultats présente les premières informations très précises sur le métabolisme carboné des souches de *Cl. perfringens* de type A. Quels que soient les milieux de sporulation employés, il s'avère que les souches utilisent les mêmes voies métaboliques pour leur métabolisme. Le CO₂ et l'acétate constituent toujours les produits majeurs de fermentation des substrats présents. Cependant, selon le type de la source de carbone présente dans le milieu, un troisième métabolite

dont l'identité varie avec la nature du milieu utilisé peut également s'accumuler en forte quantité. La concentration des différents produits de fermentation est également variable selon les souches et leur état physiologique : au cours de la sporulation, les souches libèrent des produits de fermentation en concentration plus importante pour une même quantité de substrat fermenté, à l'exception du butyrate. La comparaison des métabolites de croissance et de sporulation met en évidence une accumulation particulière des produits de fermentation réduits en conditions de croissance : la production d'énergie issue principalement de l'excrétion de l'acétate entraîne une accumulation dans le milieu des produits réduits du métabolisme. Les productions comparées d'acétate en conditions de sporulation sont très largement supérieures. La sporulation est donc une biosynthèse coûtant très cher en énergie. Par contre, l'accumulation des produits réduits du métabolisme est proportionnellement très inférieure à celle mesurée dans les conditions de croissance : il est vraisemblable qu'une partie des équivalents réducteurs est retournée par la cellule au profit de la synthèse des constituants de la spore. Cependant, lors de la sporulation, les variations inter-souches enregistrées dans le métabolisme ne sont pas directement reliées à la quantité d'entérotoxine et au nombre de spores produites. En effet, si les bilans métaboliques et donc les flux de carbone sont différents pour les souches 8-6 et R3, le nombre de spores formées et la quantité d'entérotoxine produite par ces deux souches sont identiques. Ces différences se retrouvent également dans la comparaison des souches R3 et NCTC 8798 : pour un métabolisme carboné et des taux de sporulation identiques, le nombre de spores produites et la quantité d'entérotoxine dosée dans le milieu sont différents.

Ces résultats montrent que la souche 8-6 semble être plus sensible aux différentes variations des conditions de croissance et de sporulation, et semble avoir un comportement différent des souches NCTC 8798 et R3 dans les 2 états physiologiques étudiés.

Les travaux futurs concernant le métabolisme carboné des souches de *Cl. perfringens* de type A et les conditions de libération de l'entérotoxine doivent, à notre avis, être poursuivis de la manière suivante :

- étude du métabolisme carboné en fermenteur avec contrôle de certains paramètres tels que le pH, la concentration en substrats... et comparaison de ces résultats avec ceux obtenus en batch ;

- suivi des voies métaboliques au cours de la croissance et pendant la sporulation par des molécules de glucose ou de dextrine spécifiquement marquées ;
- quantification fine des flux de carbone par l'emploi de traceurs radioactifs ;
- modifications cellulaires engendrées par ces deux états physiologiques sur l'énergie de la cellule et le maintien de son homéostasie ;
- étude de *Cl. perfringens* dans des conditions proches des conditions *in vivo* (pH acide, influence des cocultures, influence de la densité cellulaire).

Ces connaissances physiologiques nous semblent constituer le complément indispensable à l'approche moléculaire de caractérisation des gènes de production de l'entérotoxine pour approfondir d'une part le métabolisme carboné des souches de *Cl. perfringens* de type A, et d'autre part pour aboutir à une meilleure compréhension des conditions de libération de l'entérotoxine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AHMED M., WALKER H.W., 1971. Germination of spores of *Clostridium perfringens*. *J. Milk Food Technol.* **37** : 378-384.
- AIKAT D.K., DIBLE J.H., 1956. The pathology of *Clostridium welchii* infection. I. Experimental observations *in vivo*. *J. Pathol. Bacteriol.* **71** : 461-476.
- ALLEN R.J.L., KAFERSTEIN F.K., 1983. Foodborne disease, food hygiene and consumer education. *Archiv. Lebensmittelhyg.* **34** : 86-89.
- ALOUF J.E., JOLIVET-REYNAUD C., 1981. Purification and characterization of *Clostridium perfringens* delta-toxin. *Infect. Immun.* **31** : 536-546.
- ANDERSSON A., RONNER U., GRANUM P.E., 1995. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *Int. J. Food Microbiol.* **28** : 145-155.
- ANDO Y., 1979. Spore lytic enzyme released from *Clostridium perfringens* spores during germination. *J. Bacteriol.* **140** : 59-64.
- ANDO Y., TSUZUKI T., SUNAGAWA H., OKAS S., 1985. Heat resistance, spore germination and enterotoxigenicity of *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Immunol.* **29** : 317-326.
- ANDO Y., TSUZUKI T., 1986. The effect of hydrogen peroxide on spores of *Clostridium perfringens*. *Lett. Appl. Microbiol.* **2** : 65-68.
- ANDREESSEN J.R., GOTTSCHALK G., SCHELGEL H.G., 1970. *Clostridium formicoaceticum* nov. spec. Isolation, description and distinction from *Clostridium aceticum* et *Clostridium thermoaceticum*. *Arch. Microbiol.* **72** : 154-174.
- ANDREESSEN J.R., BAHL H., GOTTSCHALK G., 1989. Introduction of the physiology and biochemistry of the genus *Clostridium*. *Dans : Clostridia*. Ed. Plenum Press. Minton N.P., Clarke D.J. (ed), New York. pp. 27-62.
- ANONYME, 1980. Critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire certaines denrées animales ou d'origine animale. *Journal Officiel de la République Française*. 19 janvier 1980. pp. 784-789.
- ANONYME, 1995. Food poisoning, an overview. *Int. Poultry Prod.* **3** : 20-21.
- BAEZ L.A., JUNEJA V.K., 1995. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in raw beef by polymerase chain reaction. *J. Food Protect.* **58** : 154-159.
- BAIRD-PARKER A.C., 1994. Foods and microbiological risks. *Microbiol.* **140** : 687-695.
- BANNAM T.L., ROOD J.L., 1991. Relationship between the *Clostridium perfringens* catQ gene product and chloramphenicol acetyltransferases from other bacteria. *Antim. Ag. Chemother.* **35** : 471-476.

- BARTHOLOMEW B.A., STRINGER M.F., WASTSON G.N., GILBERT R.J., 1985. Development and application of an enzyme linked immunosorbent assay for *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *J. Clin. Pathol.* **38** : 222-228.
- BARTSCH A.R., WALKER H.W., 1982. Effect of temperature, solute and pH on the tolerance of *Clostridium perfringens* to reduce water activities. *J. Food Sci.* **47** : 1754-1755.
- BERGDOLL M.S., ROBBINS R.N., 1973. Characterization of types of staphylococcal enterotoxins. *J. Milk Food Technol.* **36** : 610-612.
- BERKELEY R.C.W., ALIN., 1994. Classification and identification of endospore-forming bacteria. *J. Appl. Bact. Symp. Suppl.* **76** : 1S-8S.
- BERRY P.R., RODHOUSE J.C., HUGHES S., BARTHOLOMEW B.A., 1988. Evaluation of ELISA, RPLA and Vero cells assays for detecting *Clostridium perfringens* enterotoxin in faecal specimens. *J. Clin. Pathol.* **41** : 458-461.
- BIN PARK K., LABBE R.G., 1990. Purification and characterization of intracellular proteases of *Clostridium perfringens* type A. *Can. J. Microbiol.* **37** : 19-27.
- BLASCHEK H.P., SOLBERG M., 1981. Isolation of a plasmid responsible for caseinase activity in *Clostridium perfringens* ATCC 3626B. *J. Bacteriol.* **147** : 262-266.
- BORRMANN E., SCHULZE F., 1995. Nachweis von *Clostridium perfringens* Toxinen auf Zellkulturen. *Berl. Munch. Tierarztl. Wschr.* **108** : 466-470.
- BRADFORD M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72** : 248-254.
- BRAZIER J.S., VAL HALL, 1995. A rapid test for the presumptive identification of *Clostridium perfringens*. *Anaerobe.* **1** : 157-159.
- BREFORT G., MAGOT M., IONESCO H., SEBALD M., 1977. Characterization and transferability of *Clostridium perfringens* plasmid. *Plasmid.* **1** : 52-66.
- BUCHANAN R.L., WHITING R.C., 1996. Risk assessment and predictive microbiology. *J. Food Protect. Suppl.* : 31-36.
- CALULL M., MARCE R.M., BORRULL F., 1992. Determination of carboxylic acids, sugars, glycerol and ethanol in wine and grape must by ion exchange high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *J. Chrom.* **590** : 215-222.
- CANARD B., COLE S.T., 1989. Genome organization of the anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86** : 6676-6680.
- CANARD B., GARNIER T., SAINT-JOANIS B., COLE S.T., 1994. Molecular genetic analysis of the *nagH* gene encoding a hyaluronidase of *Clostridium perfringens*. *Mol. Gen. Genet.* **243** : 215-224.

- CARLIN F., NGUYEN THE C., VAROQUAUX P., 1990. La conservation des produits de IV^{me} gamme. *Ind. Alim. et Agric.* pp. 931-944.
- CASSIER M., SEBALD M., 1969. Germination lysozyme-dépendante des spores de *Clostridium perfringens* ATCC 3624 après traitement thermique. *Ann. Inst. Past.* **117** : 312-324.
- CATTEAU M., 1989. Microbiologie des produits végétaux dits de IV^{me} gamme et de V^{me} gamme. Journée d'études de l'Association des diététiciens de langue française. 5-7 octobre 1989. Nantes.
- CATO E.P., GEORGE W.L., FINEGOLDS M., 1986. *Clostridium perfringens*. Dans : (ed) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore. vol. 2 pp. 1179-1182.
- CHOPRA A.K., XU X.J., PETERSON W., 1994. *Salmonella typhimurium* enterotoxin epitopes shared among bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **118** : 237-242.
- CHUMNEY R.K., ADAMS D.M., 1980. Relationship between the increased sensitivity of heat injured *Clostridium perfringens* spores to surface active antibiotics and to sodium chloride and nitrite. *J. Appl. Bacteriol.* **49** : 55-63.
- CORNILLOT E., SAINT-JOANIS B., DAUBE G., KATAYAMA S., GRANUM P.E., CANARD B., COLE S.T., 1995. The enterotoxin gene (*cpe*) of *Clostridium perfringens* can be chromosomal or plasmid-borne. *Molec. Microbiol.* **15** : 639-647.
- CRAVEN S.E., 1990. The effect of the pH of the sporulation environment on the heat resistance of *Clostridium perfringens* spores. *Curr. Microbiol.* **22** : 233-237.
- CRAVEN S.E., BLANKENSHIP L.C., McDONEL J.L., 1981. Relationship of sporulation, enterotoxin formation, and spoilage during growth of *Clostridium perfringens* type A in cooked chicken. *Appl. Environ. Microbiol.* **41** : 1184-1191.
- CRAVEN S.E., BLANKENSHIP L.C., 1985. Activation and injury of *Clostridium perfringens* spores by alcohols. *Appl. Environ. Microbiol.* **50** : 249-256.
- CRAVEN S.E., BLANKENSHIP L.C., 1987. Changes in the hydrophobic characteristics of *Clostridium perfringens* spores and spore coats by heat. *Can. J. Microbiol.* **33** : 773-776.
- DAUBE G., 1992. *Clostridium perfringens* et pathologies digestives. *Ann. Méd. Vét.* **136** : 5-30.
- DAUBE G., 1993. Typage moléculaire de *Clostridium perfringens* : Application à l'étude de l'entérotoxine bovine. Thèse de l'Université de Liège. Faculté de Médecine Vétérinaire. pp. 1-37.
- DIFCO LABORATORIES, 1984. Thioglycollate media. Dans : *Dehydrated culture media for microbiology*. Detroit. MI. Laboratories Inc. pp. 951-956.
- DILLON M.E., LABBE R.G., 1989. Stimulation of growth and sporulation of *Clostridium perfringens* by its homologous enterotoxin. *FEMS Microbiol. Lett.* **59** : 221-224.
- DOELLE H.W., 1975. Fermentation. Dans : *Bacterial metabolism*. 2nd edition. Ed. Academic Press. New York, pp. 559-692.

- DREYFUS L.A., HARVILLE B., HOWARD D.E., SHABAN R., BEATTY D.M., MORRIS S.J., 1993. Calcium influx mediated by *Escherichia coli* heat stable enterotoxin B (ST_B). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90** : 3202-3206.
- DOWELL V.R., TORRES-ANJEL M.J., REIMANN H.P., MERSON V., 1975. A new criterion for implicating *Clostridium perfringens* as cause of food poisoning. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* **17** : 137-142.
- DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A., SMITH F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28** : 350-356.
- DUNCAN C.L., STRONG D.H., 1968. Improved medium for sporulation of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.* **16** : 82-89.
- DUNCAN C.L., STRONG D.H., 1969. Ileal loop fluid accumulation and production of diarrhoea in rabbits by cell-free product of *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* **100** : 86-94.
- DUNCAN C.L., SUGIYAMA H., STRONG D.H., 1968. Rabbit ileal loop response to strains of *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* **95** : 1560-1566.
- DUNCAN C.L., SOMERS E. B., 1972. Quantification of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin by electroimmunodiffusion. *Appl. Microbiol.* **24** : 801-804.
- DUNCAN C.L., LABBE R.G., REICH R.R., 1972a. Germination of heat- and alkali-altered spores of *Clostridium perfringens* type A by lysozyme and an initiation protein. *J. Bacteriol.* **109** : 550-559.
- DUNCAN C.L., STRONG D.H., SEBALD M., 1972b. Sporulation and enterotoxin production by mutants of *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* **110** : 378-391.
- DUNCAN C.L., KING G.J., FRIEBEN W.R., 1973. A paracrystalline inclusion formed during sporulation of enterotoxin-producing strains of *Clostridium perfringens* type A. *J. Bacteriol.* **114** : 845-859.
- DUTTA G.N., DEVRIESE L.A., 1984. Observations on the *in vitro* sensibility and resistance of Gram positive intestinal bacteria of farm animals to growth promoting antimicrobial agents. *J. Appl. Bacteriol.* **56** : 117-123.
- ELLNER P.D., 1956. A medium promoting rapid quantitative sporulation of *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* **71** : 495-496.
- ERRINGTON J., 1993. *Bacillus subtilis* sporulation : regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol. Rev.* **57** : 1-33.
- FACH P., DELBART M.O., SCHLACHTER A., POUMEYROL M., POPOFF M.R., 1993. Apports de la technique d'amplification (PCR) au diagnostic des toxi-infections alimentaires à *Clostridium perfringens*. *Med. Mal. Infect.* **23** : 70-77.
- FARKAS J., 1994. Tolerance of spores to ionizing radiation mechanisms of inactivation, injury and repair. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* **76** : 81S-90S.

- FISHER S.H., SONENSHEIM A.L., 1991. Control of carbon and nitrogen metabolism in *B. subtilis*. *Annu. Rev. Microbiol.* **45** : 107-135.
- FOSTER S.J., 1994. The role and regulation of cell wall structural dynamics during differentiation of endospores-forming bacteria. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* **76** : 25S-39S.
- FRASER A.G., 1978. Neuraminidase production by clostridia. *J. Med. Microbiol.* **11** : 269-280.
- FRAZIER W.C., WESTHOFF D.C., 1978. Foods in relation to disease. *Dans : Food Microbiology*. Ed. McGraw-Hill Book Compagny. New York. pp 417-472.
- FRIEBEN W.R., DUNCAN C.L., 1973. Homology between enterotoxin protein and spore structural protein in *Clostridium perfringens* type A. *Eur. J. Biochem.* **39** : 393-401.
- FUCK A.R., BONDE G.J., 1957. The nutritional requirements of *Clostridium perfringens*. *J. Gen. Microbiol.* **16** : 317-329.
- GARCIA-ALVARADO J.S., LABBE R.G., RODRIGUEZ M.A., 1992. Sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* type A at 37 and 45°C. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** : 1411-1414.
- GENIGEORGIS C., SAKAGUCHI G., RIEMANN H., 1973. Assay methods for *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Appl. Microbiol.* **26** : 111-115.
- GIBBS B.M., HIRSCH A., 1956. Spore formation by *Clostridium perfringens* species in an artificial medium. *J. Appl. Bact.* **19** : 129-141.
- GILL D.M., CLEMENTS J.D., ROBERTSON D.C., FINKELSTEIN R.A., 1981. Subunit number and arrangement in *Escherichia coli* heat labile enterotoxin. *Infect. Immun.* **33** : 677-682.
- GOTTSCHALK G., 1979. Bacterial fermentation. *Dans : Bacterial metabolism*. Ed. Springer. Starr M.P. (ed). Verlag, New York, pp. 167-224.
- GOULD G.W., 1970. Germination and the problem of dormancy. *J. Appl. Bact.* **33** : 34-49.
- GRANUM P.E., 1990. *Clostridium perfringens* toxins involved in food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* **10** : 101-112.
- GRANUM P.E., 1994. *Bacillus cereus* and its toxins. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* **76** : 61S-66S.
- GRANUM P.E., WHITAKER J.R., SKJELKVALE R., 1981. Trypsin activation of enterotoxin from *Clostridium perfringens* type A-fragmentation and some physicochemical properties. *Biochem. Biophys. Acta.* **668** : 355-332.
- GRANUM P.E., TELLE W., OSLOVIK O., STAVN A., 1984. Enterotoxin formation by *Clostridium perfringens* during sporulation and vegetative growth. *J. Food Microbiol.* **1** : 43-49.
- GRANUM P.E., BRYNESTAD S., O'SULLIVAN K., NISSEN H., 1993. Enterotoxin from *Bacillus cereus* : production and biochemical characterization. *Neth. Milk Dairy J.* **47** : 63-70.

- GRANUM P.E., TOMAS J.M., ALOUF J.E., 1995. A survey of bacterial toxins involved in food poisoning : a suggestion for bacterial food poisoning toxin nomenclature. *Int. J. Food Microbiol.* **28** : 129-144.
- HABEEB A.F.S.A., 1975. Studies on epsilon prototoxin of *Clostridium perfringens* type D physicochemical and chemical properties of epsilon prototoxin. *Biochem. Biophys. Acta.* **412** : 62-69.
- HALVORSON H., 1962. Physiology of sporulation. *Dans : The bacteria.* Gunsalus I.C. et Stanier R.Y. (eds) Ed. Academic Press. New York et London. vol 4. pp. 223-264.
- HANNA P.C., WNEK A.P., McCLANE B.A., 1989. Molecular cloning of the 3' half of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene and demonstration that this region encodes receptor-binding activity. *J. Bacteriol.* **171** : 6815-6820.
- HANSEN K.M., FRANDBSEN P.L., MEYLING A., 1992. Monoclonal antibodies against *Clostridium perfringens* type C β -toxin. Production and characterization. *Dans : Bacterial Protein Toxin.* Ed. Witholt et al. *Zbl. Bakt. Suppl.* 23. Gustav Fisher. Stuttgart. Jena. New-York. pp. 75-76.
- HANSON R.S., PETERSON J.A., YOUSSTEN A.A., 1970. Unique biochemical events in bacterial sporulation. *Annu. Rev. Microbiol.* **24** : 53-90.
- HARMON S.M., KAUTER D.A., 1986. Improved media for sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens*. *J. Food Prot.* **49** : 706-711.
- HATHEWAY C.L., 1990. Toxigenic clostridia. *Clin. Microbiol. Rev.* **3** : 66-98.
- HAUSCHILD A.H.W., 1970. Erythematous activity of the cellular enteropathogenic factor of *Clostridium perfringens* type A. *Can. J. Microbiol.* **16** : 651-654.
- HERMIER J., CERF O., 1991. Thermobactériologie. *Dans : La conserve appertisée.* Aspects scientifiques, techniques et économiques. APRIA (ed) Ed. Technologie et Documentation Lavoisier. Paris. pp. 185-206.
- HICKEY C.S., JOHNSON M.G., 1981. Effects of pH shifts, bile salts and glucose on sporulation of *Clostridium perfringens* NCTC 8798. *Appl. Environ. Microbiol.* **41** : 124-129.
- HOBBS B.C., SMITH M.E., OAKLEY C.L., WARRACK G.H., CRUICKSHANK J.C., 1953. *Clostridium welchii*-food poisoning. *J. Hyg.* **51** : 75-101.
- HOCHJ.A., 1993. Regulation of the phosphorelay and the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Microbiol.* **47** : 441-465.
- HOOVER D.G., 1993. Pressure effects on biological systems. *Food Technol.* **47** : 150-155.
- HORIGUCHI Y., UEMURA T., KAMATA Y., KOZAKI S., SAKAGUCHI G., 1986. Production and characterization of monoclonal antibodies to *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infect. Immun.* **52** : 31-35.

- HORIGUCHI Y., AKAI T., SAKAGUCHI G., 1987. Isolation and function of a *Clostridium perfringens* enterotoxin fragment. *Infect. Immun.* **55** : 2912-2915.
- HUI Y.H., 1992. HACCP, principles for food production. Dans : *Encyclopedia of food science and technology*. John Wiley et Sons (eds). Inc. Ed. Interscience Publication. New York. vol 2. pp. 1345-1349.
- IONESCO H., BIETH G., DAUGUET C., BOUANCHAUD D., 1976. Isolement et identification de deux plasmides d'une souche bactériocinogène de *Clostridium perfringens*. *Ann. Microbiol. Inst. Past.* **127B** : 283-293.
- IWANEJKO L.A., ROUTLEDGE M.N., STEWART G.S.A.B., 1989. Cloning in *Escherichia coli* of the enterotoxin gene from *Clostridium perfringens* type A. *J. Gen. Microbiol.* **135** : 903-909.
- JIN F., MATSUSHITA O., KATAYAMA S., JIN S., KATAYAMA C., MINAMI J., AKABE A., 1996. Purification, characterisation, and primary structure of *Clostridium perfringens* lambda-toxin, a thermolysin-like metalloprotease. *Inf. Immun.* **64** : 230-237.
- JOLIVET-REYNAUD C., POPOFF M.R., VINIT M.A., RAVISSE P., MOREAU H., ALOUF J.E., 1986. Enteropathogenicity of *Clostridium perfringens* beta toxin and other clostridial toxins. *Zbl. Bacteriol. Mikrobiol. Hyg. Suppl.* **15** : 145-151.
- JOLIVET-REYNAUD C., MOREAU H., ALOUF J.E., 1988. Purification of alpha-toxin from *Clostridium perfringens* : phospholipase C. *Methods Enzymol.* **165** : 91-94.
- JOUVE J.L., 1991. Le HACCP et l'assurance de la sécurité des denrées alimentaires. *Option Qualité.* **90** : 11-23.
- JOUVE J.L., 1993. Epidémiologie et toxi-infections alimentaires. Dans : *Flash sur les micro-organismes pathogènes dans les aliments*. Ed. Société Française de Microbiologie. Paris. 28-29 avril 1993. pp. 85-93.
- JUNEJA V.K., SNYDER P., CYGNAROWICZ-PROVOST M., 1994. Influence of cooling rate on growth of *Clostridium perfringens* spores in cooked ground beef products. *J. Food Protect.* **57** : 1063-1067.
- JUNEJA V.K., MAJKA W.M., 1995. Outgrowth of *Clostridium perfringens* spores in cook-in-bag beef products. *J. Food Safety.* **15** : 21-34.
- KATAYAMA S., DUPUY B., GARNIER T., COLE S.T., 1995. Rapid expansion of the physical and genetic map of the chromosome of *Clostridium perfringens* CP50. *J. Bacteriol.* **177** : 5680-5685.
- KIM C.H., CHENEY R., WOODBURN M., 1967. Sporulation of *Clostridium perfringens* in a modified medium selected foods. *Appl. Microbiol.* **15** : 871-876.
- KNORR D. 1993. Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality. *Food Technol.* **47** : 156-161.

- LABBE R.G., 1981. Enterotoxin formation by *Clostridium perfringens* type A in a defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **41** : 315-317.
- LABBE R.G., 1989. *Clostridium perfringens*. Dans : *Foodborne Bacterial Pathogen*. Doyle M.P. (ed). Ed. Marcel Dekker. New York. pp. 191-234.
- LABBE R.G., 1991. *Clostridium perfringens*. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **74** : 711-714.
- LABBE R.G., DUNCAN C. L., 1974. Sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* type A under conditions of controlled pH and temperature. *Can. J. Microbiol.* **20** : 1493-1501.
- LABBE R.G., REY D.K., 1979. Raffinose increases sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* type A. *Appl. Environ. Microbiol.* **37** : 1196-1200.
- LABBE R.G., LU H.P., TANG S., 1990. Extraction, purification and characterization of a peptidoglycan hydrolase from vegetative cells of *Clostridium perfringens* type A. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **36** : 333-344.
- LABBE R.G., CHANG C.A., 1995. Recovery of heat-injured spores of *Clostridium perfringens* types B, C, and D by lysozyme and initiation protein. *Lett. Appl. Microbiol.* **21** : 302-306.
- LECLERC H., 1975. Microbiologie générale. Dans : *Microbiologie générale*. Ed. Doin. Paris. pp. 87-97.
- LEHN N., SCHALLER E., WAGNER H., KRONKE M., 1995. Frequency of toxic shock syndrome toxin- and enterotoxin- producing clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14** : 43-46.
- LEISTNER L., 1994. Further developments in the utilization of hurdle technology for food preservation. *J. Food Eng.* **22** : 421-432.
- LEPOUTRE A., SALOMON J., CHARLEY C., LE QUERREC F., 1995. Les toxi-infections alimentaires collectives en 1993. *Bull. Epidémiol. Hebdo. France.* **52** : 245-247.
- LINDSAY J.A., 1988. The effect of a *Clostridium perfringens* 8-6 enterotoxin on viability and macromolecular synthesis in Vero cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **151** : 1371-1377.
- LOFFLER A., LABBE R.G., 1983. Intracellular proteases during sporulation and enterotoxin formation by *Clostridium perfringens* type A. *Curr. Microbiol.* **8** : 187-190.
- LOMBARD I., LEPOUTRE A., CHARLEY C., LE QUERREC F., 1993. Les toxi-infections alimentaires collectives en 1992. *Bull. Epidémiol. Hebdo. France.* **49** : 227-228.
- LUCAS F., POPOFF M.R., CORTIER G., 1991. Les entérotoxines bactériennes : structure, mode d'action. *Ann. Rech. Vet.* **22** : 147-162.
- LUND B.M., 1988. Bacterial contamination of food crops. *Asp. Appl. Biol.* **17** : 71-82.

- LUND B.M., PECK M.W., 1994. Heat resistance and recovery of spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum* in relation to refrigerated processed foods with an extended shelf-life. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* **76** : 115S-128S.
- MAGILL N.G., COWAN A.E., KOPPEL D.E., SETLOW P., 1994. The internal pH of the forespores compartment of *Bacillus megaterium* decreases by about 1 pH unit during sporulation. *J. Bacteriol.* **176** : 2252-2258.
- MAHONY D.E., GILLIAT E., DAWSON S., STOCKDALE E., 1989. Vero cells assay for rapid detection of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Appl. Env. Microbiol.* **55** : 2141-2143.
- MARTIN P.K., NAYLOR R.D., 1994. A latex agglutination test for the qualitative detection of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *Res. Vet. Sci.* **56** : 259-261.
- McCLANE B.A., 1989. Characterization of calcium involvement in the *Clostridium perfringens* type A enterotoxin-induced release of ³H-nucleotides from Vero cells. *Microbial Pathog.* **6** : 17-28.
- McCLANE B.A., 1992. *Clostridium perfringens* enterotoxin : structure, action and detection. *J. Food Saf.* **12** : 237-252.
- McCLANE B.A., 1994. *Clostridium perfringens* enterotoxin acts by producing small molecule permeability alterations in plasma membranes. *Toxicol.* **87** : 43-67.
- McCLANE B.A., McDONEL J.L., 1979. The effects of *Clostridium perfringens* enterotoxin on morphology, viability, and macromolecular synthesis in Vero cells. *J. Cell Physiol.* **99** : 191-200.
- McCLANE B.A., McDONEL J.L., 1980. Characterization of membrane permeability alterations induced in Vero cells by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Bioch. Bioph. Acta.* **600** : 974-985.
- McCLANE B.A., WNEK A.P., 1990. Studies of *Clostridium perfringens* enterotoxin action at different temperatures demonstrate a correlation between complex formation and cytotoxicity. *Infect. Immun.* **58** : 3109-3115.
- McDONEL J.L., 1980. Mechanism of action of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Food Technol.* **34** : 91-95.
- McDONEL J.L., DUNCAN C.L., 1975. Histopathological effect of *Clostridium perfringens* enterotoxin in the rabbit ileum. *Infect. Immun.* **12** : 1214-1218.
- McDONEL J.L., DUNCAN C.L., 1977. Regional localization of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in the rabbit ileum, jejunum and duodenum. *J. Infect. Dis.* **136** : 661-666.
- McDONEL J.L., DEMERS G.W., 1982. *In vivo* effects of enterotoxin from *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in the rabbit colon : binding vs. biologic activity. *J. Infect. Dis.* **145** : 490-494.
- MILLER T.L., WOLIN M.J., 1974. A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Appl. Environ. Microbiol.* **27** : 895-897.

- MIYATA S., MORIYAMA R., SUGIMOTO K., MAKINO S., 1995. Purification and partial characterization of a spore cortex-lytic enzyme of *Clostridium perfringens* S40 spores. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59** : 514-515.
- MOIR A., KEMP E.H., ROBINSON C, CORFE B.M., 1994. The genetic analysis of bacterial spore germination. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* **76** : 9S-16S.
- NAGAHAMA M., KOBAYASHI K., OCHI S., SAKURAI J, 1991. Enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of toxins from *Clostridium perfringens*. *FEMS Microbiol. Lett.* **29** : 41-44.
- NAGAHAMA M., IIDA H., NISHIOKA E., OKAMOTO K., SAKURAI J., 1994. Roles of the carboxy-terminal region of *Clostridium perfringens* alpha toxin. *FEMS Microbiol. Lett.* **120** : 297-302.
- NAGAHAMA M., OKAGAWA Y., NAKAYAMA T., NISHIOKA E., SAKURAI J., 1995. Site directed mutagenesis of histidine residues in *Clostridium perfringens* alpha toxin. *J. Bacteriol.* **177** : 1179-1185.
- NAIK H.S., DUNCAN C.L., 1977a. Enterotoxin formation in foods by *Clostridium perfringens* type A. *J. Food. Saf.* **1** : 7-18.
- NAIK H.S., DUNCAN C.L., 1977b. Rapid detection and quantification of *Clostridium perfringens* enterotoxin by counterimmunoelectrophoresis. *Appl. Microbiol.* **34** : 125-128.
- NAIK H.S., MISRA D.S., 1978. Studies on the pathogenesis of *Clostridium perfringens* type A serotype Hobbs 7 and 9. *Indian J. Anim. Sci.* **48** : 42-47.
- NILO L., 1975. Measurement of biological activities of purified and crude enterotoxin of *Clostridium perfringens*. *Infect. Immun.* **12** : 440-442.
- NILO L., 1977. Enterotoxin formation by *Clostridium perfringens* type A studied by the use of fluorescent antibody. *Can. J. Microbiol.* **23** : 908-915.
- NILO L., 1978. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolated from intestinal contents of cattle, sheep and chickens. *Can. J. Comp. Med.* **42** : 357-363.
- NILO L., 1980. *Clostridium perfringens* in animal disease : a review of current knowledge. *Can. Vet. J.* **21** : 141-148.
- NILO L., 1988. Haemolytic patterns for presumptive identification of *Clostridium perfringens* type C. *Vet. Rec.* **122** : 281.
- NILO L., CHO H.J., 1984. Clinical and antibody responses to *Clostridium perfringens* type A enterotoxin experimental sheep and calves. *Can. J. Comp. Med.* **49** : 145-148.
- OAKLEY C.L., WARRACK G.H., HEYNINGEN W.E., 1946. The collagenase, κ -toxin, of *Clostridium welchii* type A. *J. Pathol. Bacteriol.* **58** : 229-235.

- OAKLEY C.L., WARRACK G.H., 1953. Routine typing of *Clostridium welchii*. *J. Hyg.* **51** : 102-107.
- OLSVICK O., GRANUM P.E., BERDAL B.P., 1982. Detection of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin by ELISA. *Acta Pathol. Microbiol. Immun. Res. Scand. Sect. B.* **90** : 445-447.
- PANDA A.K., GHORPADE A., MUKMOPAHYAY A., TALWAR G.P., GARG L.C., 1995. High cell density fermentation of recombinant *Vibrio cholerae* for the production of B-subunit of *Escherichia coli* enterotoxin. *Biotechnol. Bioeng.* **45** : 245-250.
- PAUSS A., ANDRE G., PERRIER M., GUIOT S.R., 1990. Liquid-to-gas mass transfer in anaerobic processes : inevitable transfer limitations of methane and hydrogen in the biomethanation process. *Appl. Environ. Microbiol.* **56** : 1636-1644.
- PEARSON C.B., WALKER H.W., 1976. Effect of oxidation-reduction potential upon growth and sporulation of *Clostridium perfringens*. *J. Milk Food Technol.* **39** : 421-425.
- PERELLE S., GIBERT M., BOQUET P., POPOFF M.R., 1993. Characterization of *Clostridium perfringens* iota-toxin genes and expression in *Escherichia coli*. *Inf. Immun.* **61** : 5147-5156.
- PHILLIPS K.D., 1986. A sporulation medium for *Clostridium perfringens*. *Lett. Appl. Microbiol.* **3** : 77-79.
- PHILIPSJONES M.K., IWANEJKO L.A., LONGDEN M.S., 1989. Analysis of plasmid profiling as a method for rapid differentiation of food-associated *Clostridium perfringens* strains. *J. Appl. Bacteriol.* **67** : 243-254.
- PIVNICK H., HABEEB A.F.S.A., GORENSTEIN B., STUART P.F., HAUSCHILD A.H.W., 1964. Effect of pH on toxinogenesis by *Clostridium perfringens* type C. *Can. J. Microbiol.* **10** : 329-344.
- PONS J.L., PICARD B., NIEL P., GOULLET P., 1993. Esterase electrophoretic polymorphism of human and animal strains of *Clostridium perfringens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 496-501.
- POPOFF M.R., 1994. Les neurotoxines botuliques et tétaniques : structure, génétique et mode d'action. *Dans : Nouvelles tendances en microbiologie*. Ed. Société Française de Microbiologie. Paris. 17-18 mars 1994. Villeneuve d'Ascq. pp. 187-201.
- RAFII F., CERNIGLIA C.E., 1993. Localization of azoreductase of *Clostridium perfringens* by immuno-electro microscopy. *Curr. Microbiol.* **27** : 143-145.
- REILLY S., 1980. The carbon dioxide requirement of anaerobic bacteria. *J. Med. Microbiol.* **13** : 573-579.
- ROKOS E.A., ROOD J.L., DUNCAN C.L., 1978. Multiple plasmids in different toxigenic types of *Clostridium perfringens*. *FEMS Microbiol. Lett.* **4** : 323-326.
- ROOD J.I., 1983. Transferable tetracycline resistance in *Clostridium perfringens* strains of porcine origin. *Can. J. Microbiol.* **29** : 1241-1246.

- ROOD J.I., MAHER E.A., SOMERS E.B., CAMPOS E., DUNCAN C.L., 1978a. Isolation and characterization of multiply antibiotic-resistant *Clostridium perfringens* strains from porcine feces. *Antimicrob. Agents Chemother.* **13** : 871-880.
- ROOD J.I., SCOTT V.N., DUNCAN C.L., 1978b. Identification of a transferable tetracycline resistance plasmid, pCW3, from *Clostridium perfringens*. *Plasmid* **1** : 563-570.
- ROOD J.I., BUDDLE J.R., WALES A.J., SIDHU R., 1985. The occurrence of antibiotic resistance in *Clostridium perfringens* from pigs. *Aust. Vet. J.* **62** : 276-279.
- ROOD J.I., COLE S.T., 1991. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Rev.* **55** : 621-648.
- ROOD J.I., LIRISTIS M., 1995. Regulation of extracellular toxins production in *Clostridium perfringens*. *Trends Microbiol.* **3** : 192-196.
- RYTER A., 1965. Etude morphologique de la sporulation de *Bacillus subtilis*. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*. **108** : 40-60.
- RYU S., LABBER.G., 1989. Coat and enterotoxin-related strains proteins in *Clostridium perfringens* spores. *J. Gen. Microbiol.* **135** : 3109-3118.
- RYU S., LABBER.G., 1992. Stimulation of the onset of sporulation of *Clostridium perfringens* type A by netropsin and distamycin. *Curr. Microbiol.* **25** : 183-187.
- SACK R.B., 1975. Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* **29** : 333-353.
- SACK R.B., 1983. Influence of carbohydrates on growth and sporulation of *Clostridium perfringens* in a defined medium with or without guanosine. *Appl. Environ. Microbiol.* **46** : 1169-1175.
- SACKS L.E., THOMPSON P.A., 1977. Increased spore yields of *Clostridium perfringens* in the presence of methylxanthines. *Appl. Environ. Microbiol.* **34** : 189-193.
- SACKS L.E., THOMPSON P.A., 1978. Clear, defined medium for the sporulation of *Clostridium perfringens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **35** : 405-410.
- SACKS L.E., THOMAS R.S., 1979. High yields of coatless spores of *Clostridium perfringens* strain 8-6 in a defined medium. *Can. J. Microbiol.* **25** : 642-645.
- SAINT-JOANIS B., GARNIER T., COLE S.T., 1989. Gene cloning shows the alpha-toxin of *Clostridium perfringens* to contain both sphingomyelinase and lecithinase activities. *Mol. Gen. Genet.* **219** : 1179-1185.
- SAKURAI J., FUJII Y., 1987. Purification and characterization of *Clostridium perfringens* β -toxin. *Toxicon.* **25** : 1301-1310.

- SALINOVICH O., MATICCE W.L., BLAKENEY E.W., 1982. Effects of temperature, pH and detergents on the molecular conformation of the enterotoxin of *Clostridium perfringens*. *Bioch. Biophys. Acta.* **707** : 147-153.
- SAMAIN E., ALBAGNAC G., DUBOURGUIER H.C., TOUZEL J.P., 1982. Characterization of a new propionic acid bacterium that ferments ethanol and displays a growth factor-dependent association with a Gram-negative homoacetogen. *FEMS Microbiol. Lett.* **15** : 69-74.
- SAPICO F.L., KWOK Y.Y., SUTTER V.L., FINEGOLD S.M., 1972. Standardized antimicrobial disc susceptibility testing of anaerobic bacteria : in vitro susceptibility of *Clostridium perfringens* to nine antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2** : 320-325.
- SASARMAN A., ANTOHI M., 1963. Présence des bactériocines chez le *Clostridium perfringens*. *Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol.* **22** : 377-381.
- SATO H., CHIBA J., SATO Y., 1989. Monoclonal antibodies against alpha toxin of *Clostridium perfringens*. *FEMS Microbiol. Letters.* **59** : 173-176.
- SCHULTZ F.J., SMITH J.L., 1994. *Bacillus* : Recent advances in *Bacillus cereus*. Dans : *Food Disease Handbook. Disease caused by bacteria*. Hui Y.H., Gorham J.R., Murell H.D. et Cliver D.O. (eds). Marcel Dekker. New York. vol 1. pp. 29-62.
- SCOTT E., 1996. Food-borne disease and other hygiene issues in the home. *J. Appl. Microbiol.* **80** : 5-9.
- SEARS C.L., KAPER J.B., 1996. Enteric bacterial toxins : mechanisms of action linkage to intestinal secretion. *Microbiol. Rev.* **60** : 167-215.
- SEBALD M., CASSIER M., 1970. Toxi-infections alimentaires dues à *Clostridium perfringens*. *Bull. Inst. Pasteur.* 8-24.
- SEBALD M., BREFORT G., 1975. Transfert du plasmide tétracycline-chloramphenicol chez *Clostridium perfringens*. *C. R. Acad. Sci. Paris.* **281** : 317-319.
- SEBALD M., BOUANCHAUD D., BIETH G., 1975. Nature plasmidique de la résistance à plusieurs antibiotiques chez *Clostridium perfringens* type A. *C. R. Acad. Sci. Paris.* **280** : 2401-2404.
- SHIH N.J., LABBE R.G., 1994. Effect of glucose on sporulation and extracellular amylase production by *Clostridium perfringens* type A in a defined medium. *Curr. Microbiol.* **29** : 163-169.
- SHIH N.J., LABBE R.G., 1995. Purification and characterization of an extracellular α -amylase from *Clostridium perfringens* type A. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 1776-1779.
- SHIH N.J., LABBE R.G., 1996. Sporulating-promoting ability of *Clostridium perfringens* culture fluids. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : 1441-1443.
- SIMPSON L.L., BRADLEY G.S., ZEPEDA H.H., WILKINS T.D., 1987. Molecular basis for the pathological actions of *Clostridium perfringens* iota toxin. *Infect. Immun.* **55** : 118-122.

- SKJELKVALE R., DUNCAN C.L., 1975. Enterotoxin formation by different toxigenic types of *Clostridium perfringens*. *Infect. Immun.* **11** : 563-575.
- SKJELKVALE R., STRINGER M.T., SMART J.L., 1978. Enterotoxin production by lecithinase-positive and lecithinase-negative *Clostridium perfringens* isolated from food poisoning breaks and other source. *J. Appl. Bacteriol.* **47** : 329-339.
- SLOAN J., McMURRY L.M., LYRAS D., LEVY B., ROOD J.I., 1994. *Clostridium perfringens* Tet P determinant comprise two overlapping genes : *tetA* (P), which mediates active tetracycline efflux, and *tetB* (P), which is related to the ribosomal protection family of tetracycline resistance determinants. *Mol. Microbiol.* **11** : 403-415.
- SMIBERT R.M., 1986. *Campylobacter*. Dans : Sneath P.H.A. (ed) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore. vol. 1 pp. 111-118.
- SMITH L.D., 1972. Factors involved in the isolation of *Clostridium perfringens*. *J. Milk Food Technol.* **35** : 71-76.
- SMITH L.D., 1975. The pathogenic anaerobic bacteria. Ed. Albert Balows. Atlanta. Georgia, pp. 109-176.
- SOJKA B., LUDWIG H., 1994. Pressure-induced germination and inactivation of *Bacillus subtilis* spores. *Pharm. Ind.* **56** : 660-663.
- STARK R.L., DUNCAN C.L., 1971. Biological characteristics of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Infect. Immun.* **4** : 89-96.
- STARK R.L., DUNCAN C.L., 1972. Transient increase in capillary permeability induced by *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Infect. Immun.* **5** : 147-150.
- STELMA G.N., CRAWFORD R.G., SPAULING P.L., TXEDT R.M., 1985. Evidence that *Clostridium perfringens* produces only one enterotoxin. *J. Food Protect.* **48** : 232-233.
- STERLINI J.M., MANDELSTAM J., 1969. Commitment to sporulation in *Bacillus subtilis* and its relationship to the development of actinomycin resistance. *Biochem. J.* **113** : 29-37.
- STERNE M., 1981. Clostridial infections. *Brit. Vet. J.* **137** : 443-454.
- STEVENS D.L., MAIER K.A., LAINE B.M., MITTEN J.E., 1987. Comparison of clindamycin, rifampin, tetracycline, metronidazole, and penicillin for efficacy in prevention of experimental gas gangrene due to *Clostridium perfringens*. *J. Infect. Dis.* **15** : 220-228.
- TANG S.S., LABBE R.G., 1987. Mode of action of *Clostridium perfringens* initiation protein (spore-lytic enzyme). *Ann. Inst. Past.* **138** : 597-608.
- THAUER R.K., JUNGERMANN K., DECKER S., 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **41** : 100-180.

- TITBALL R.W., LESLIE D.L., HARVEY S., KELLY D., 1991. Hemolytic and sphingomyelinase activities of *Clostridium perfringens* alpha-toxin are dependant on a domain homologous to that of an enzyme from the human arachidonic acid pathway. *Infect. Immun.* **29** : 1872-1874.
- TORTORA J.C.O., 1984. Alternative medium for *Clostridium perfringens* sporulation. *Appl. Environ. Microbiol.* **47** : 1172-1174.
- UEMURA T., SAKAGUCHI G., RIEMANN H.P., 1973. *In vitro* production of *Clostridium perfringens* enterotoxin and its detection by reversed passive hemagglutination. *Appl. Microbiol.* **26** : 381-385.
- UEMURA T., SKJELKVALE R., 1976. An enterotoxin produced by *Clostridium perfringens* type D : Purification by affinity chromatography. *Acta Pathol. Microbiol. Imm. Scand. Sect. B.* **84** : 414-420.
- UEMURA T., MAEKAWA T., SAKAGUCHI G., 1984. Biological assay for *Clostridium perfringens* with Vero cells. *Jap. J. Vet. Sci.* **46** : 715-720.
- VAN DAMME-JONGSTON M., WERNARS K., NOTERMANS S., 1989. Cloning and sequencing of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene. *Antonie Leeuwenhoek.* **56** : 181-190.
- VAN DAMME-JONGSTON M., RODHOUSE J., GILBERT R.J., NOTERMANS S., 1990. Synthetic DNA probes for detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains isolated from outbreaks of food poisoning. *J. Clin. Microbiol.* **28** : 131-133.
- VEILLON A., ZUBER S.T., 1898. Recherche sur quelques microbes strictement anaérobies et leur rôle en pathologie. *Arch. Méd. Anat. Pathol.* **10** : 517-545.
- WARRACK G.H., BIDWELL E., OAKLEY C.L., 1951. The β -toxin, deoxyribonuclease, of *Clostridium septicum*. *J. Pathol. Bacteriol.* **63** : 293-302.
- WATIER D., 1994. Etude de la croissance et de la résistance de *Pectinatus* et de *Megasphaera*, bactéries anaérobies strictes, contaminants de la bière. Thèse de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, pp. 35-47.
- WNEK A.P., STROUSER J., McCLANE B.A., 1985. Production and characterisation of monoclonal antibodies against *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Infect. Immun.* **50** : 442-448.
- WNEK A.P., McCLANE B.A., 1986. Comparison of receptors for *Clostridium* type A and cholera enterotoxins in isolated rabbit intestinal brush border membranes. *Microbial. Pathog.* **1** : 89-100.
- WNEK A.P., McCLANE B.A., 1989. Preliminary evidence that *Clostridium perfringens* type A enterotoxin is present in a 160,000-Mr complex in mammalian membranes. *Infect. Immun.* **57** : 574-581.
- WOOD W.A., 1961. Fermentation of carbohydrates and related compounds. *Dans : The bacteria.* Gunsalus I.C. et Stanier R.Y. (eds). Ed. Academic Press. New York. vol 2. pp. 59-93.

WRIGLEY D.M., 1994. *Clostridium perfringens*. Dans : *Food Disease Handbook. Disease caused by bacteria*. Hui Y.H., Gorham J.R., Murell H.D. et Cliver D.O. (eds). Marcel Dekker. New York. vol 1. pp. 133-167.

WRIGLEY D.M., HANWELLA H.D.S.H., THON B.L., 1995. Acid exposure enhances sporulation of certain strains of *Clostridium perfringens*. *Anaerobe*. **1** : 263-267.

YAMAKAWA Y., ITO A., SATO H., 1977. Theta-toxin of *Clostridium perfringens*. *Biochem Biophys. Acta*. **494** : 301-313.

YAMAMOTO K., OHISHII., SAKAGUCHI G., 1979. Fluid accumulation in mouse ligated intestine inoculated with *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Appl. Env. Microbiol.* **37** : 181-186.

ZEIKUS J.G., WOLFE R.S., 1972. *Methanobacterium thermoautotrophicum* sp. nov., an anaerobic, extreme thermophile. *J. Bacteriol.* **109** : 707-715.

ANNEXES

ANNEXE 1

MILIEU BCYT : MILIEU DE CULTURE DE ZEIKUS ET WOLFE (1972) MODIFIE PAR SAMAIN *ET AL.* (1982) :

Composition pour 1 litre de milieu

KH ₂ PO ₄	0,3 g
MgSO ₄	0,12 g
NaCl	0,6 g
CaCl ₂	0,08 g
NH ₄ Cl	1,0 g
Extrait de levure	0,5 g
Bio-trypticase	0,5 g
Tampon HEPES	11,9 g
Solution de vitamines	10 mL
Traces minérales	10 mL
Résazurine	1 mL (0,2 %)
Eau Milli-Q	Q.S.P 1 L

Porter à ébullition. Faire refroidir le milieu sous courant d'azote.

Ajouter le KH₂CO₃ (3,5 g) à 30-35°C tout en maintenant le gazage. Ajuster le pH à 7,2 avec NaOH (10 N).

Composition de la solution de vitamines

Biotine	2 mg
Acide folique	2 mg
Pyridoxine-HCl	10 mg
Thiamine-HCl	5 mg
Riboflavine	5 mg
Acide nicotinique	5 mg
Pantothénate de calcium	5 mg
Vitamines B12	0,1 mg
Acide para-aminobenzoïque	5 mg
Acide lipoïque	5 mg
Eau Milli-Q	Q.S.P 1 L

Stocker à + 4°C à l'abri de la lumière.

Composition de la solution de traces minérales

NTA (titriplex I)	12,8 g
FeCl ₃ , 6H ₂ O	1,35 g
MnCl ₂ , 4H ₂ O	0,1 g
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,024 g
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,1 g
ZnCl ₂ , anhydre	0,1 g
CuCl ₂ , 2H ₂ O	0,025 g
H ₃ BO ₃	0,01 g
Molybdate de Na, 2H ₂ O	0,024 g
NaCl	1 g
Na ₂ SeO ₃ , 5H ₂ O	0,026 g
NiCl ₂ , 6H ₂ O	0,12 g
eau Milli-Q	Q.S.P 1 L

Ajouter le NTA dans 200 mL d'eau et ajuster le pH à 6,5 avec KOH (10 N). Verser cette solution dans 600 mL d'eau environ. Dissoudre les composants dans l'ordre et ajuster à 1 L. Stocker sous azote à l'abri de la lumière et à + 4°C.

ANNEXE 2

MILIEU AU THIOGLYCOLATE A LA RESAZURINE (milieu FTG)

Bio-trypticase	15 g
L-cystine	0,5 g
Glucose	5 g
Extrait de levure	5 g
Chlorure de sodium	2,5 g
Thioglycolate de sodium	0,5 g
Résazurine	1 mg
Agar	0,75 mg
Eau Milli-Q	Q.S.P 1 L

Le pH du milieu commercialisé prêt à l'emploi à 25°C est de $7,1 \pm 0,2$.

Porter à ébullition 29,7 g de milieu dans 1 L d'eau distillée. Répartir 10 mL de milieu par tube sous courant d'azote.

ANNEXE 3

MILIEU DS (DUNCAN et STRONG, 1968)

Extrait de levure	4 g
Protéose peptone	15 g
Raffinose	4 g
Thioglycolate de sodium	1 g
Na ₂ HPO ₄ , 7H ₂ O	10 g
Eau Milli-Q	Q.S.P 1 L

Après ébullition, refroidir sous azote. Ajuster à pH 7,3-7,8 par addition de carbonate de sodium 0,66 M.

ANNEXE 4

MILIEU DEFINI D (SACKS et THOMPSON, 1978)

A. PREPARATION DES SOLUTIONS INITIALES

1-Solution d'acides aminés (4 L de solution : 2 fois concentrée)

L.alanine	4 g
L.arginine	40 g
L.asparagine	4 g
L.acide glutamique	40 g
DL.glutamine	4 g
glycine	4 g
DL.histidine	4 g
DL.isoleucine	4 g
L.leucine	3 g
L.lysine	4 g
DL.méthionine	4 g
L.proline	2 g
L.hydroxyproline	1 g

11-Solution saline	1 L d'eau 12,2 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 1,15 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 2,94 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (conserver à la température du laboratoire)
12-Solution de thiamine HCl	100 mg dans 100 mL d'eau
13-Solution de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	5 mg dans 100 mL d'eau

B. PREPARATION DES SOLUTIONS I A III

Solution I

résazurine	1 mL
Fe_3EDTA (EDTA ferrique)	94 mg
eau distillée	340 mL
n°1 solution d'acides aminés	500 mL
n°3 solution d'adénine-uracile	12,5 mL
n°4 solution de riboflavine-pentothénate	10 mL
n°5 solution de pyridoxamine	2,5 mL
n°7 solution de biotine	1 mL
n°8 solution d'acide nicotinique	10 mL
n°6 solution d'acide folique	10 mL
n°9 solution d'acide p-aminobenzoïque	10 mL
n°2 solution de cystine	1,25 mL
méthylxanthine	100 mg

Ajuster le pH à 6,8-7.

Solution II

MOPS	12 g
K ₂ HPO ₄ (phosphate dipotassique)	2,4 g
eau distillée	57 mL

Ajuster le pH à 7,4 avec de la soude

NaHCO ₃	600 mg
--------------------	--------

Compléter à 60 mL

Solution III

dextrine	3,6 g
glucose	1,8 g
eau	40 mL

Chauffer pour dissoudre puis ajouter:

n°12 solution de thiamine	0,6 mL
n°13 solution de CuSO ₄	6 mL
n°11 solution saline	12 mL
n°10 solution d'EDTA Mn	1,2 mL

C. PREPARATION DU MELANGE

60 mL de la solution II
+ 60 mL de la solution III
puis ajouter 1080 mL de la solution I.

ANNEXE 5

MILIEU A LA VIANDE CUITE

Base

Peptone trypsique	10 g
Chlorure de sodium	5 g
Extrait de viande	2 g
Extrait de levure	5 g
Chlorhydrate de cystéine	0,3 g
Eau Milli-Q	Q.S.P 1 L

Ajuster le pH à 7,4-7,5. En parallèle, faire cuire dans de l'eau distillée 130 g de viande pour 500 mL de milieu de base. Répartir ce milieu à raison de 10 mL par tube et ajouter 1 à 2 g de viande hachée cuite. Autoclaver 30 min à 120°C. Stocker les tubes à - 20°C.

ANNEXE 6

COLORATION AU VERT MALACHITE

Déposer la lame avec un frottis fixé par la chaleur et par addition d'éthanol (96 %) sur une plaque chauffée à 60-70°C.

La recouvrir d'une solution de vert malachite à 5 % pendant 5 à 10 min.

Rincer à l'eau distillée et faire sécher.

Ajouter la solution de safranine à 0,25 % pendant 30 sec, rincer à l'eau et faire sécher.

ANNEXE 7

DOSAGE DU GLUCOSE PAR LA METHODE SIGMA DIAGNOSTICS

Gamme-étalon

Réalisation d'une gamme de glucose de concentration comprise entre 0 et 30 mM.

Protocole

- 1 mL de réactif
- 10 µL d'échantillon ou de gamme (l'échantillon provient du surnageant de culture après centrifugation 5 min à 13000 tours/min).

Les tubes sont laissés à température ambiante pendant exactement 18 min. L'absorbance est lue à 505 nm.

Composition du réactif

4-aminoantipyrine	0,5 mM
P-Hydroxybenzène sulfonate	20 mM
Glucose oxydase (<i>Aspergillus niger</i>)	15 000 UI
Péroxydase (Raifort)	10 000 UI
Eau distillée	100 mL
Tampon pH=7 (0,1 près)	
Stabilisants et adjuvants	

ANNEXE 8

DOSAGE DES PROTEINES SELON LA METHODE DE BRADFORD (Bradford, 1976)

Gamme étalon

Réalisation d'une gamme étalon de 0 à 0,75 g/L à partir d'une solution de Serum Albumine Bovine à 1 mg/mL.

Préparation des échantillons

- Centrifuger 1 mL pendant 5 min à 13000 tours/min,
- Eliminer le surnageant,
- Ajouter de l'eau Milli-Q pour obtenir un volume final de 1 mL,
- Les échantillons sont passés aux ultra-sons pendant 3 min.

Protocole

- Transférer 100 µL de la gamme ou d'échantillon dans un tube en verre
- Ajouter 3,9 mL de tampon à pH=4
- Ajouter 1 mL de réactif de Bradford
- Agiter à l'aide d'un parafilm.

Laisser agir 30 à 40 min puis lire l'absorbance à 595 nm.

Composition du réactif de Bradford

55 % d'acide phosphorique

15 % de méthanol

colorant: bleu de Coomassie brillant G-250

Composition de la solution tampon

Solution A: solution d'acide acétique 0,2 M

Solution B: solution d'acétate de sodium 0,2 M

Mélanger 41 mL de A avec 9 mL de B et compléter à 100 mL avec de l'eau distillée pour obtenir un pH final de 4,0.

