

# DETECTION ET CARACTÉRISATION DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS ISOLÉ A PARTIR DE POULET DE CHAIR PRESENTANT DES SIGNES D'ENTÉRITE NÉCROTIQUE AU NIVEAU DE LA REGION DE TIARET

Merati Rachid <sup>1,2</sup>. Temim Soraya <sup>2</sup> et Mohamed A.A.Abd El-Fattah<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Laboratoire d'hygiène et de pathologie animale, université Ibn Khaldoun ,14000 Tiaret, Algérie.

<sup>2</sup>Laboratoire de recherche « santé et production animales»,  
Ecole nationale supérieure vétérinaire d'Alger, 16000 Alger, Algérie.

<sup>3</sup> Veterinary Serum and Vaccine Research Institute, Cairo, Egypt.

[drmerachi@yahoo.fr](mailto:drmerachi@yahoo.fr)

## RESUMÉ

L'objectif de cette étude est de détecter la présence du *Clostridium perfringens* (*Cl.perfringens*) agent causal de l'entérite nécrotique (EN) chez le poulet de chair dans différentes régions au niveau de la wilaya de Tiaret et de caractériser les souches isolées pour la présence des gènes *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA* et *netB*. Un total de 180 échantillons de contenu intestinal prélevés à partir de 70 élevages de poulet de chair (2 à 3 prélèvements par élevage) présentant des signes cliniques et des lésions évoquant une atteinte par l'EN, sur une période de 12 mois (aout 2015 à juillet 2016), ont été analysés par des méthodes classiques d'isolement bactériologique et par PCR. *Cl.perfringens* a été isolé avec un taux de 34,44% (62/180) et confirmé par les caractères morphologiques, culturels et biochimiques. Sur les 62 souches de *Cl.perfringens*, 83,87% (52/62) étaient toxigènes et 16,13% (10/62) étaient non toxigènes. La PCR multiplex a été utilisée sur les 52 souches toxigènes afin de détecter les types de toxines sécrétées. Toutes les souches étaient positives pour le gène *cpa* et négatives pour les gènes *cpb*, *etx* et *iA*, indiquant ainsi que toutes les souches toxigènes correspondaient au *Cl.perfringens* de type A à 100% (52/52). Comme certaines études récentes ont mis en évidence un nouveau gène de virulence codant pour la toxine NetB, la PCR a été réalisée sur une sélection de 22 souches de type A afin de détecter ce dernier. Aucune souche n'a été positive pour le gène *netB*. Nos résultats indiquent que *Cl.perfringens*, agent causal de l'EN est détecté chez le poulet de chair au niveau de la région de Tiaret, et que toutes les souches toxigènes sont de type A avec une absence du gène *NetB* sur les souches sélectionnées. Ces résultats méritent d'être confirmés par d'autres investigations sur un plus grand nombre d'échantillons.

## ABSTRACT

### Detection and characterization of *Clostridium perfringens* isolated from necrotic enteritis in broiler chickens in Tiaret

The present study was carried out to investigate the presence of *Clostridium perfringens* (*Cl.perfringens*) in broiler chickens at different locations in Tiaret province, western Algeria, and characterization of *Cl.perfringens* isolates for the presence of *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA* and *netB* gene. A total of 180 samples collected from 70 broiler chicken flocks (2 to 3 samples by flock) in a period of 12 months from august 2015 to July 2016 representing intestinal contents of broiler chickens showing clinical signs and lesions suspected to be NE were analyzed by conventional methods and PCR. *C.perfringens* was isolated at the rate of 34.44 % (62/180) confirmed by cultural and biochemical characterization, out of 62 *C.perfringens* isolates, 83.87% (52/62) isolates were toxigenic and 16.13 % (10/62) were non toxigenic. Multiplex polymerase chain reaction was performed for toxinotyping of the 52 toxigenic isolates, all isolates were positives for the gene *cpa* and negatives for *cpb*, *etx* and *iA*, indicating that all the toxigenic isolates were *C.perfringens* type A 100% (52/52). Recent studies have shown the involvement of NetB toxin in the pathogenesis of the disease, therefore, PCR was carried out on 22 types A isolates, and which showed that none of the isolates were positive for the gene *netB*. This result indicates that the *C.perfringens* causative agent of NE is detected in broiler chickens in Tiaret province and characterized by type A positive *netB* negative genotype. These results should be confirmed by further investigations on an important number of samples.

## INTRODUCTION

*Clostridium perfringens* (*Cl.perfringens*) est une bactérie anaérobique gram positif ayant un rôle primordial dans l'étiologie de l'entérite nécrotique (EN) qui cause de grandes pertes économiques dans l'industrie des volailles (Van Immerseel *et al.*, 2004). *Cl.perfringens* est responsable de la synthèse et la sécrétion de plus de 17 différentes toxines. Les souches de *Cl.perfringens* sont habituellement classées en 5 toxinotypes A, B, C, D et E en fonction de leurs capacités à produire des toxines possédant une activité létale majeure alpha ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), epsilon ( $\epsilon$ ) et iota ( $i$ ) (Uzal *et al.*, 2014). L'EN est causée principalement par le type A produisant la toxine alpha et parfois le type C produisant la toxine alpha et la toxine beta (Enstrom *et al.*, 2003), la toxine alpha a longtemps été considérée comme la principale cause de l'EN, alors qu'une nouvelle toxine NetB a été démontrée dans des souches de *Cl.perfringens* isolées d'animaux atteints d'entérite nécrotique (Keyburn *et al.*, 2008).

L'EN peut se présenter sous deux formes cliniques : elle peut se manifester comme une maladie aigüe caractérisée par une augmentation soudaine du taux de mortalité allant jusqu'à 50% du cheptel avec une nécrose intestinale sévère (McDevitt *et al.*, 2006 ; Lee *et al.*, 2011), ou bien comme une infection sub-clinique associée à des lésions chroniques de la muqueuse intestinale conduisant à des problèmes tel qu'une diminution des performances et une réduction du gain de poids (Skinner *et al.*, 2010).

Autrefois, l'utilisation des antibiotiques promoteurs de croissance a permis le contrôle de cette maladie dans les élevages de volaille (Williams, 2005). Cependant, depuis l'interdiction de ces suppléments, une recrudescence de l'EN au sein des élevages a été observée (Cooper and Songer, 2009).

En Algérie, peu d'informations sur le *Cl.perfringens* agent causale de l'EN sont disponibles, en dépit de l'importance de cette pathologie dans les élevages avicoles. La présente étude a pour objectif de détecter la présence du *Cl.perfringens* agent causal de EN chez le poulet de chair dans différentes régions de la wilaya de Tiaret et de caractériser les souches isolées pour la présence des gènes *cpa*, *cpb*, *etx*, *iA* et *netB* par la technique PCR.

### 1.1. Echantillonnage

Un total de 180 échantillons de contenu intestinal ont été prélevés de façon aseptique chez des poulets de chair (2-8 semaines) présentant des signes cliniques et des lésions évoquant une atteinte par l'EN, provenant de 70 élevages de poulet de chair (2 à 3 prélèvements par élevage d'un effectif moyen de 2500 poulets) localisés à différentes régions au niveau de la wilaya de Tiaret, sur une période de 12 mois (août 2015 juillet 2016).

### 1.2. Isolement et identification du *Cl.perfringens*

les contenus intestinaux ont été inoculés dans des tubes contenant du milieu viande cuite (Oxoid, UK) et incubés en anaérobiose à 37 °C pendant 24 heures pour enrichissement, ensuite la culture a été ensemencée sur gélose TSC (Tryptone Sulphate Cycloserine) (Oxoid, UK) et incubée en anaérobiose à 37°C pendant 24-48 heures pour isolement du *Cl.perfringens* (Harmon, 1984).

Les colonies suspectées d'être *Cl. Perfringens* ont été identifiées par les caractères morphologiques et biochimiques comme recommandé précédemment (Koneman *et al.*, 1992 ; Macfaddin, 2000).

### 1.3. Détermination des souches toxigènes de *Cl.perfringens*

- Test de létalité sur souris effectué selon la méthode de Mariano *et al* 2007.
- Test de la réaction de nagler par l'utilisation d'antitoxine spécifique, réalisé selon la méthode de Smith et Holdman 1968.

### 1.4. Extraction d'ADN

L'ADN a été extrait des souches toxigènes de *Cl.perfringens* en utilisant le kit de purification d'ADN (QIAamp DNA mini kit, QIAGEN, USA) comme recommandé par les instructions du fabricant.

### 1.5. La PCR multiplex pour la détection des toxines alpha, beta, epsilon et iota

Les amorces oligonucleotidiques spécifiques utilisées pour la détection des toxines alpha ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), epsilon ( $\epsilon$ ) et iota ( $i$ ) (Yoo *et al.*, 1996) sont illustrées dans le tableau 1. La réaction de PCR a été réalisée dans un cycleur thermique (TRIO thermal cycler, Biometric, Germany) sur un volume de réaction totale de 50  $\mu$ l contenant : 8  $\mu$ l d'extrait d'ADN, 25  $\mu$ l EmeraldAmp GT PCR master mix (TAKARA, USA), 2  $\mu$ l de chaque paire d'amorces spécifiques

pour les toxines alpha, beta, epsilon et iota (20 pmol  $\mu\text{l}^{-1}$ ), 9  $\mu\text{l}$  de PCR grade water. L'amplification pour la détection des toxines des gènes toxiques a été obtenue par une dénaturation initiale à 94 C° pendant 5 min suivie par 35 cycles .Chaque cycle comprend une étape de dénaturation à 94C° pendant 30 sec , une étape d'hybridation à 55 C° pendant 45 sec ,et une étape d'élongation à 72C° pendant 45 sec et pour finir une étape d'élongation de 10 min à 72 C°.

**Tableau 1.** Les séquences des amorces oligonucleotidiques utilisées dans cette étude

Gènes	amorces	Séquences	Taille du produit (bp)
<i>cpa</i> ( $\alpha$ toxin)	F	GTTGATAGCGCAGGACATGTTAAG	402
	R	CATGTAGTCATCTGTTCCAGCATC	
<i>cpb</i> ( $\beta$ toxin)	F	ACTATACAGACAGATCATTCAACC	236
	R	TTAGGAGCAGTTAGAACTACAGAC	
<i>etr</i> ( $\epsilon$ toxin)	F	ACTGCACTACTACTCATACTGTG	541
	R	CTGGTGCCTTAATAGAAAGACTCC	
<i>it</i> ( $\iota$ toxin)	F	GCGATGAAAAGCCTACACCACTAC	317
	R	GGTATATCCTCCAGCATATAGTC	
<i>NetB</i> (NetB toxin)	F	GCTGGTCTGGAATAAATGC	560
	R	TCGCCATTGAGTAGTTCCC	

## 1.6. La PCR uniplex pour la détection de la toxine NetB

Les amorces oligonucleotidiques spécifiques utilisées pour la détection de la toxine NetB ( Datta *et al.*, 2014) sont illustrées dans le tableau 1. La PCR a été réalisée sur un volume de réaction totale de 25  $\mu\text{l}$  contenant : 6  $\mu\text{l}$  d'extrait d'ADN, 12.5  $\mu\text{l}$  EmeraldAmp GT PCR master mix (TAKARA, USA), 2  $\mu\text{l}$  de la paire d'amorces spécifiques pour la toxine NetB (20 pmol  $\mu\text{l}^{-1}$ ), et la réaction a été complétée par 4.5 de PCR grade water. L'amplification pour la détection du gène toxique de la toxine a été obtenue par 35 cycles suivant une dénaturation initiale de 5 min à 94 C°. Chaque cycle comprend une dénaturation à 94C° pendant 30 sec , hybridation à 58 C° pendant 45 sec, élongation à 72C° pendant 45 sec et pour finir une élongation de 10 min à 72 C°.

Par la suite, 30  $\mu\text{l}$  du produit d'amplification pour les gènes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  et  $\iota$ ) et 20  $\mu\text{l}$  de produit d'amplification pour le gène *netB* ont été soumis à l'électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5% suivi d'une coloration au bromure d'éthidium . Les bandes amplifiées ont été visualisées et photographiées sous une lumière ultra violette.

## 2.1. Détection de *Cl.perfringens*

La présence de *Cl.perfringens* dans les élevages avicoles a été rapportée dans la plupart des régions du monde. Cette bactérie est considérée comme l'une des causes les plus fréquentes des infections gastro-intestinales et d'entérites nécrotiques chez la volaille (Van Immerseel *et al.* , 2004 ;McDevitt *et al.*, 2006). Dans la présente étude *Cl.perfringens* a été isolé à partir de 62 échantillons sur 180 analysés avec un taux de 34,44 %. Ces résultats sont en partie similaires à ceux rapportés par Bjerrum *et al.* (2006) qui ont mentionné que *Cl.perfringens* a été isolé avec un taux de 30%. Alors que, le groupe de Svobodova *et al.* (2007) ont isolé *Cl.perfringens* avec un taux de 18 ,39%, Schocken- iturrino *et al.* (2013) ont analysé 560 contenus intestinaux et ont démontré que *Cl.perfringens* a été trouvé dans 94 échantillons avec un taux de 16,78%.

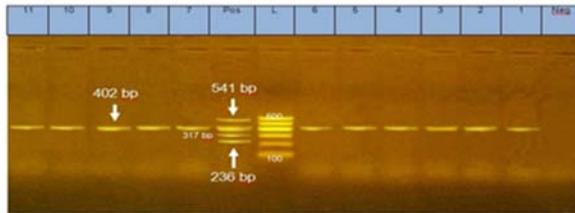
Contrairement à nos résultats, Miwa *et al.* (1997) ont isolé *Cl.perfringens* dans 40 sur 50 contenus intestinaux de poulet de chair avec un taux de 80%. Ces variations constatées peuvent être expliquées par les différentes méthodologies utilisées pour l'isolement de la bactérie , la sélection des échantillons à analyser et les différences de gestion des exploitations de volaille .La faible proportion déterminée dans notre étude peut être expliquée par le fait que , en Algérie et particulièrement dans la région de Tiaret , l'utilisation incontrôlée des antibiotiques à titre préventif et curatif sans pour autant avoir déterminé la sensibilité à ces derniers , peut conduire à une destruction et un dysfonctionnement de la population bactérienne dans le tractus intestinal, *Cl.perfringens* est considéré comme étant un organisme commensal de l'intestin (Petit *et al.*, 1997), pour cette raison, on doit différencier entre les souches toxigènes de celles qui sont non toxigènes. Nos résultats ont révélé que sur les 62 souches de *Cl.perfringens* isolées, 52 souches (83,87%) étaient toxigènes et 10 souches non toxigènes prouvés par le test de létalité sur souris et le test de la réaction de nagler par l'utilisation d'antitoxine spécifique. Les résultats obtenus sont en partie en accord à ceux démontrés par El Jakee *et al.* (2013) qui ont enregistré une incidence des souches toxigènes de *Cl.perfringens* de 69,8%, tandis que, ceux non toxigènes était 30,2%.

## 2.2. La caractérisation moléculaire des souches toxigènes de *CL.perfringens*

*Cl.perfringens* est associé à sa capacité à sécréter des toxines majeures et mineures qui jouent un rôle important dans la pathogénie et l'induction de la maladie. Le typage

moléculaire de *Cl.perfringens* par la PCR multiplex est une méthode rapide et efficace. Dans notre étude le typage de 52 souches toxigènes de *Cl.perfringens* par la PCR multiplex a révélé que toutes les souches étaient *Cl.perfringens* type A (figure1). Ceci est en accord avec les études précédentes menées aux Etats-unis (Trinh *et al.*, 2010), en Europe (Svobodova *et al.*, 2007) et en Australie (Keyburn *et al.*, 2006).

**Figure 2.** la multiplex PCR pour le typage de *Cl.perfringens*

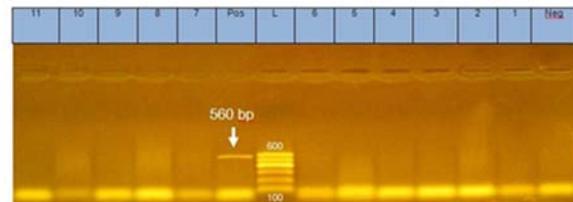


Pos : contrôle positif; Neg : contrôle négatif; L :échelle de marqueurs de poids moléculaires nucléotidiques (100-bp) ; lignes 1-11 : les souches de *Cl.perfringens* positifs pour le gène *cpa*.

Plusieurs études récentes ont démontrées l'implication d'autres toxines dans l'induction de l'EN .La plus intéressante d'entre elles est l'entérite nécrotique toxine B (NetB) , une toxine capable de causer des lésions typiques d'EN dans des modèles expérimentaux (Keyburn *et al.*, 2008).Selon notre étude, sur une sélection de 22 souches toxigènes de *Cl.perfringens* type A analysées par PCR uniplex , aucune des souches étaient positives pour la toxine NetB (figure 2).Ces résultats sont similaires aux résultats des travaux de Datta *et al.* (2014) qui ont enquêté sur la présence du gène *netB* dans 26 souches de *Cl.perfringens* type A et ont démontré qu'aucune des souches n'étaient positives pour ce gène. Les mêmes résultats ont été rapportés par Thomas *et al.* (2014) qui ont enregistré que les souches de *Cl.perfringens* testées pour la présence du gène *netB*

étaient négatives .A l'inverse, plusieurs études ont démontrées la présence du gène *netB* parmi une grande variété de souches de *Cl.perfringens*. Johansson *et al.* (2009) ont étudié la prévalence du gène *NetB* et ont rapporté que plus de 90 % des souches isolées à partir d'organes présentant des lésions spécifiques d'EN portaient le gène *NetB* .De plus, la présence de ce gène a été étudiée sur 36 souches de *CL.perfringens* provenant d'élevages infectés par Talooe *et al.*(2011) et a été détecté sur 19 souches avec un taux de 52.8% . L'absence de ce gène dans notre étude peut être expliquée par le nombre insuffisant d'échantillons analysés, ou l'origine des échantillons selon l'expression de la maladie.

**Figure 3.**Uniplex PCR pour la détection du gène *netB*



Pos : contrôle positif; Neg : contrôle négatif; L :échelle de marqueurs de poids moléculaires nucléotidiques (100-bp) ; lignes 1-11 : les souches de *Cl.perfringens* négatifs pour le gène *netB*.

### 3. CONCLUSION

La présente étude a démontré que *Cl.perfringens*, agent causal de l'EN est détecté chez le poulet de chair au niveau de la région de Tiaret, et que toutes les souches toxigènes sont de type A avec une absence du gène *netB* sur les souches sélectionnées. Ces résultats méritent d'être confirmés par d'autres investigations sur un plus grand nombre d'échantillons, et sur d'autres régions au niveau de l'Algérie.

### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Bjerrum L., Engberg R.M., Leser T.D., Jensen B.B., Finster K et Pedersen K .2006. Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. *Poultry Sci.*, (85), 1151-1164.
2. Datta S., Rakha N.K ., Narang G ., Arora D et Mahajan N.K .2014. Prevalence of  $\alpha$ ,  $\beta$  and Netb toxin producing strains of *Clostridium perfringens* in broiler chickens in Haryana. *Haryana Vet.*, 53 (1), 39-42.
3. Drigo I., Agnoletti F ., Bacchin C ., Bettini F ., Cocchi M ., Ferro T ., Marcon B et Bano L .2008. Toxin genotyping of *Clostridium perfringens* field strains isolated from healthy and diseased chickens. *Ital J anim Sci.*,(7), 397-400.

4. EI-Jakee J., Nagwa S.A., Mona A.E., Azza S.M.A.,Riham H. H., Shawky N.M et Shawky H.M .2013 . Characterization of *Clostridium perfringens* isolated from poultry. *Global Vet.*, 11 (1), 88-94.
5. Enstrom B.E., Fermer C., Lindberg A., Saarinen .,Baverud A et Gunnarsson A .2003. Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. *Vet Microbiol .*,(94), 225-235.
6. Harmon S .1984. *Clostridium perfringens*: enumeration and identification . In : FDA bacteriological Analytical manual. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA; 1984 pp. 1701–1710.
7. Johansson A., Aspan A., Kaldhusdal M., et Engstrom B.E. 2009. Genetic diversity and prevalence of netB in *Clostridium perfringens* isolated from a broiler flock affected by mild necrotic enteritis. *Vet Microbiol.*, (144), 87-
8. Keyburn A. L., Boyce J.D., Vaz P., Bannam T. L., Ford M.E., Parker D., Di Rubbo A., Rood J et Moore R.J.2008.NetB a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLOS Pathog .*,(4), e26-e26.
9. Keyburn A. L., Sheedy S. A., Ford M. E., Williamson M.M., Awad M.M., Rood J.I et Moore R.J. 2006. Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. *Infect Immun .*, (74), 6496-6500.
10. Koneman E. W., Allen S. D., Janda W. M., Schreckenberger P.C et Winn W.C.1992.In : Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia, USA: J.B. Lippincott Company.
11. Lee K.W.,Lillehoj H.S., Jeong W., Jeoung H.Y and et D . J. 2011. Avian necrotic enteritis: experimental models host immunity pathogenesis riskfactors and vaccine development.*Poultry Sci.*, (90), 1381–1390.
12. Macfaddin J.F. 2000 . Biochemical test for identification of medical bacteria 3<sup>rd</sup> Ed. Washington, Philadelphia, USA: Lippincott Williams and Wilkins.
13. McDevitt R. M., Brooker J.D., Acamovic T et Sparks N.H.C. 2006. Necrotic enteritis: a continuing challenge for the poultry industry. *World Poultry Sci J.*, (62), 221–247. 26.
14. Mariano E.F., Derek J.F., Rachael P., Sameera S., Vicki A., Julian I.R., Bruce A.M et Francisco A.U. 2007. Both epsilon-toxin and beta-toxin are important for the lethal properties of *Clostridium perfringens* Type B isolates in the mouse intravenous injection model. *Infect Immun.*, 75 (3):1443-1452.
15. Miwa N ., Nishina T., Kubo S et Honda H.1997. Most probable numbers of enterotoxigenic *clostridium perfringens* in intestinal contents of domestic livestock detected by nested PCR. *J Vet Med Sci .*,(59),557 -560.
16. Petit L., Gilbert M et Popoff MR . 1997. *Clostridium perfringens*: Toxinotype and genotype. *Trends Microbiol.*,(7),104-110.
17. Schocken-Iturrino R.P., Vittori J., Massoli M.C.B et Meirelles Gama L.F.S.A. 2013 . Presence of *Clostridium perfringens* in broiler from chicken farms in ribeirão preto-sp. *ARS Vet.*, 29 (1),37-41.
18. Skinner J.T., Bauer S.,Young V.,Pauling G et Wilson J. 2010. An economic analysis of the impact of subclinical (mild) necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Dis.*, (54), 1237-1240.
19. Smith L.D et Holdeman L.V. 1968. The Pathogenic Anaerobic Bacteria .1<sup>st</sup> Ed., Charles C- Thomas Publisher, U.S.A. pp: 201 - 205.
20. Talooe A., Shojadoost B., Peighambar S .M, Tamaddon Y.2011. Prevalence of netB gene among *Clostridium perfringens* isolates obtained from healthy and diseased chicks. *J Anim Vet Adv*, (10) , 106–110 .
21. Thomas P, Arun T.R ., Arthik K. K., Berin P.V ., Kumar M.A., Usharani M.P., Gupta S.K., Dhama K et Viswas K. N. 2014. Molecular characterization and toxinotyping of a *Clostridium perfringens* isolate from a case of necrotic enteritis in Indian kadaknath fowl. *Asian J Anim. Vet Adv .*, (9), 385-394.
22. Uzal F.A., Freedman J. C.,Shrestha A.,Theoret . R., Garcia J., Awad M.M ., Adam S.V., Moore R.J,

- Rood J et McClane B.2014.Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. *Future Microbiol.*, ( 9), 361-377.
23. Van Immerseel F.J.D., Buck F., Pasmans G., Huyghebaert F., Haesebrouck et Ducatelle R.2004. *Clostridium perfringens* in poultry: An emerging threat for animal and public health. *Avian Pathol.*,(33)537-549.
24. Williams R.B. 2005.Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens : Rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. *Avian Pathol.* (34),159–180.
25. Yoo H.S., Lee S.U., Park K.Y et Park Y.H. 1996. Molecular Typing and Epidemiological Survey of Prevalence of *Clostridium perfringens* Types by Multiplex PCR. *J Med Microbiol.*, (35), 228-232.