

LE BOTULISME

M. R. Popoff

Bactéries anaérobies et Toxines, Institut Pasteur, Paris.

INTRODUCTION

Le botulisme est une affection nerveuse commune à l'homme et aux animaux qui est le plus souvent d'origine alimentaire et qui se caractérise par des paralysies flasques fréquemment mortelles par insuffisance respiratoire. Cette maladie est due à l'action de neurotoxines botuliques (BoNT) produites par des bactéries anaérobies et sporulées, dénommées *Clostridium botulinum*. Les toxines botuliques sont les toxines les plus puissantes connues. Selon leurs propriétés antigéniques, elles se divisent en sept toxinotypes (A, B, C, D, E, F et G). Le botulisme humain est associé aux types A, B et E, et exceptionnellement aux types C et F, alors que les types C et D sont essentiellement responsables du botulisme animal.

AGENTS RESPONSABLES DU BOTULISME

Groupes de *Clostridium botulinum*

Les toxines botuliques sont produites par diverses espèces de *Clostridium* qui sont des bactéries anaérobies strictes et sporulées. L'espèce *Clostridium botulinum* désignait initialement les bactéries productrices d'une toxine induisant une paralysie flasque chez les animaux de laboratoire. Ces bactéries dénommées ainsi *C. botulinum* sont très hétérogènes et sont divisées en quatre groupes sur la base des propriétés physiologiques, biochimiques et génétiques. En fait, ces quatre groupes correspondent à quatre espèces bactériennes distinctes sur un plan taxonomique. D'ailleurs, le groupe IV est considéré comme une espèce à part entière, *Clostridium argentinense*. Il faut noter que chacun des quatre groupes contient des souches non toxigènes indifférenciables des souches toxigènes d'après leurs caractères bactériologiques.

Mais des souches appartenant à d'autres espèces de *Clostridium* sont également capables de produire une toxine botulique. C'est le cas de certaines souches de *Clostridium butyricum* qui

synthétisent une neurotoxine de type E, et de certaines souches de *Clostridium baratii* qui produisent une neurotoxine de type F. Ces souches neurotoxigènes sont phénotypiquement et génétiquement apparentées aux souches types de *C. butyricum* et *C. baratii* respectivement et non à celles de *C. botulinum*.

Habitat

L'habitat principal des *Clostridium* neurotoxigènes, comme des autres espèces de *Clostridium*, est l'environnement. Grâce à leurs spores, qui sont résistantes aux conditions extrêmes (chaleur, sécheresse, privation de nutriment, radiation, oxygène, agents chimiques), ces bactéries sont capables de survivre pendant de très longues périodes. Ainsi, les *Clostridium* sont ubiquistes et largement distribués dans l'environnement. Cependant, la germination des spores et la division bactérienne n'a lieu qu'en conditions anaérobies et en présence suffisante de nutriments. Ceci restreint l'habitat des *Clostridium* à des zones anaérobies ou de faibles tensions en oxygène et contenant des quantités suffisantes de matière organique.

Les différents groupes de *C. botulinum* n'ont pas une répartition géographique identique. L'habitat principal de *C. botulinum* A, B, E, F et G est le sol, et les sédiments marins et d'eau douce. Les toxinotypes A et B sont retrouvés plus volontiers dans les échantillons de sol, mais avec des localisations géographiques différentes. *C. botulinum* A est prédominant dans la partie Ouest des Etats Unis, en Amérique du Sud et en Chine, tandis que *C. botulinum* B est plus fréquent dans la partie Est des Etats Unis et en Europe. *C. botulinum* E qui a la particularité de se multiplier à basse température (2-3°C) est préférentiellement retrouvé dans les sédiments marins et d'eau douce ainsi que dans le contenu intestinal des poissons et autres animaux marins des régions Nord de l'hémisphère Nord (Alaska, Canada, Scandinavie, régions Nord de l'Europe, de l'Asie et du Japon). *C. botulinum* C et D dont la température optimum de croissance se situe autour de 40°C et qui sont exigeants en matière organique, sont localisés essentiellement

dans des zones riches en matière organique des pays chauds (régions tropicales, régions tempérées en saison chaude). Les cadavres d'animaux morts de botulisme ou porteurs de *C. botulinum* dans leur tube digestif, sont les principaux réservoirs de ces micro-organismes (Popoff, 1995; Popoff and Marvaud, 1999).

TOXINES BOTULIQUES ET COMPLEXES BOTULIQUES

Les neurotoxines botuliques (BoNT) sont synthétisées sous forme d'une seule chaîne protéique de 150 kDa environ qui est peu ou non toxique. Ces protéines ne possèdent pas de séquence signal, et leur sécrétion intervient par un processus encore mal défini indépendant de la lyse bactérienne. L'activation des neurotoxines fait intervenir une protéolyse qui clive la protéine précurseur dans son tiers N-terminal en deux fragments dénommés chaîne légère (environ 50 kDa) et chaîne lourde (environ 100 kDa). Les deux chaînes restent réunies par un pont disulfure. Les souches protéolytiques de *C. botulinum* sécrètent une protéase capable d'activer les neurotoxines à l'extérieur de la bactérie. L'activation peut avoir lieu également par des protéases d'origine digestive. La trypsine, par exemple, permet d'activer efficacement les BoNT.

Les BoNT sont associées à d'autres protéines non toxiques pour former des complexes de grande taille. Ces protéines comprennent une protéine appelée non toxique non hémagglutinine (NTNH) qui a une taille proche de celle des neurotoxines (139 kDa) et des protéines qui ont une activité hémagglutinante (HA) dont les tailles sont 34, 17 et 70 kDa chez *C. botulinum* A. La neurotoxine s'associe à NTNH pour former des complexes de taille moyenne (300 kDa) (M), et leur association aux HA est à l'origine des complexes de grande taille (500 kDa) (L). Des complexes de très grande taille (900 kDa) (LL), observés notamment chez *C. botulinum* A, résultent d'une dimérisation des complexes L. Les protéines NTNH sont très conservées au niveau de leur séquence en acides aminés (70-80% d'identité) et elles présentent peu d'homologie avec les BoNT (31-39% d'identité). Toutefois, les 100 premiers acides aminés des protéines NTNH sont les plus apparentés aux acides aminés correspondants des BoNT ce qui pourrait rendre compte de la liaison NTNH-neurotoxine. Le rôle des complexes est encore mal compris. Ils pourraient protéger les BoNT vis à vis des conditions dénaturantes, telles que acidité de l'estomac et protéases digestives.

MODE D'ACTION DES TOXINES BOTULIQUES

Le mode d'action moléculaire des neurotoxines clostridiennes qui ont pour effet le blocage de la libération des neuromédiateurs par les neurones affectés, fait intervenir quatre étapes: liaison à un récepteur sur la terminaison amyélinique de l'axone des neurones, internalisation, translocation à travers la membrane des vésicules d'endocytose et modification enzymatique d'une cible intracellulaire (revues dans (Schiavo *et al.*, 2000; Popoff and Carlier, 2001; Meunier *et al.*, 2002; Poulain *et al.*, 2006)).

Liaison au récepteur

Les toxines botuliques transitent par le tube digestif, traversent la barrière intestinale par un mécanisme encore mal compris, puis diffusent par le sang et/ou la lymphe jusqu'aux motoneurones où elles se fixent sur les extrémités non myélinisées de leur axone. Un modèle de double récepteur comprenant une glycoprotéine et un ganglioside tels que G_{DIB}, G_{TIB} et G_{QIB} a été proposé. Des protéines de la membrane des vésicules synaptiques ont été identifiées comme étant les récepteurs spécifiques, SV2C pour la neurotoxine botulique A et la synaptotagmine 1 et 2 pour les types de toxine botulique B et G (Nishiki *et al.*, 1996; Rummel *et al.*, 2004; Mahrhold *et al.*, 2006).

Internalisation

Les neurotoxines clostridiales ne traversent pas directement la membrane cytoplasmique. Elles sont internalisées par endocytose dans des compartiments intracellulaires acides. Les neurotoxines seraient internalisées dans des vésicules synaptiques, au cours du recyclage exocytose/endocytose. En effet les vésicules synaptiques, après leur phase d'exocytose libérant le neuromédiateur dans la fente synaptique, sont recyclées par endocytose et c'est au cours de cette étape que les protéines membranaires, SV2C et synaptotagmine, sont exposées à l'extérieur et sont capables d'interagir avec les neurotoxines. Cependant, la nature des vésicules permettant l'endocytose des neurotoxines botuliques reste à préciser.

Translocation dans le cytosol

Une fois internalisée dans des vésicules d'endocytose à l'extrémité des motoneurones, la chaîne légère traverse la membrane vésiculaire pour être libérée dans le cytosol. Les chaînes lourdes insérées dans la membrane vésiculaire formeraient un sillon hydrophile. La chaîne légère, partiellement dépliée sous l'effet du pH acide, s'engagerait dans ce sillon, sa partie hydrophile du côté des chaînes lourdes et sa partie hydrophobe faisant face aux lipides membranaires.

Blocage de la libération d'acétylcholine

Les neurotoxines botuliques sont des protéases à zinc qui clivent une des trois protéines formant les complexes SNAREs qui ont un rôle clé dans le processus de fusion membranaire entre les vésicules synaptiques et la membrane présynaptique. Les neurotoxines botuliques B, D, F et G clivent la protéine VAMP, les neurotoxines botuliques A et E clivent SNAP25 et la neurotoxine botulique C1 clive à la fois la syntaxine et SNAP25. Les neurotoxines clivent leurs substrats quand ils sont sous forme monomérique et non quand ils sont associés dans le complexe SNARE. Lorsqu'une des trois protéines VAMP, SNAP25 ou la syntaxine est clivée par une neurotoxine clostridienne, elle peut former des complexes SNAREs, mais ceux-ci ne sont pas fonctionnels. La fusion des vésicules avec la membrane présynaptique n'intervient alors pas et il n'y a pas de libération de neuromédiateur. Comme les protéines SNAREs sont recyclées entre forme monomérique et oligomérique, les neurotoxines clivent progressivement la totalité de leur substrat. Mais, les signes cliniques apparaissent bien avant. Chez l'animal, une inhibition de libération d'acétylcholine de 20% au niveau de la jonction neuromusculaire est suffisante pour empêcher la contraction musculaire. De plus, quand 10-15% des fibres musculaires du diaphragme sont paralysées, des troubles respiratoires avec asphyxie surviennent. Ceci rend compte de l'extrême activité toxique des neurotoxines clostridiennes.

FORMES DE BOTULISME

Le botulisme humain est dû aux neurotoxines de type A, B et E produites par *C. botulinum* et *C. butyricum*, et exceptionnellement aux types C et F. Le tableau clinique est dominé par une paralysie neuro-musculaire sans anomalie du système nerveux sensitif. Selon le mode d'acquisition, on distingue trois principales formes de botulisme: intoxication botulique, toxi-infection botulique, et botulisme par blessure.

L'intoxication botulique survient après consommation d'aliments dans lesquels un *Clostridium* neurotoxigène s'est développé et a produit des quantités suffisantes de toxine. Il s'agit d'aliments conservés, présentant des conditions d'anaérobiose, non acides (pH > 4,5), et ayant une faible teneur en sel ou sucre. L'ingestion de toxine préformée dans l'aliment est responsable de l'ensemble des symptômes. C'est la cause la plus commune de botulisme d'origine alimentaire chez l'adulte. Il survient sous forme de cas isolés ou de foyers plus ou moins étendus (deux à plus d'une centaine de personnes).

L'ingestion de spores ou de formes végétales de *Clostridium*

neurotoxigènes peut dans certaines circonstances, s'accompagner d'une multiplication bactérienne et de production de toxine dans le contenu intestinal. Habituellement, la flore digestive résidente prévient la colonisation de l'intestin par une bactérie étrangère apportée par l'alimentation. Chez les jeunes enfants, une flore digestive incomplètement constituée ou partiellement fonctionnelle, peut permettre l'implantation de *Clostridium* neurotoxigènes dans l'intestin, c'est le botulisme infantile qui s'observe chez des enfants de moins de un an avec 95,6% des cas intervenant entre 6 semaines et 6 mois (Brook, 2007). Selon diverses enquêtes épidémiologiques, une dizaine à une centaine de spores de *C. botulinum* sont suffisantes pour causer la maladie chez un jeune enfant (Arnon, 1986).

La toxi-infection botulique survient aussi chez les adultes. Les facteurs prédisposant tels que chirurgie intestinale, antibiothérapie, inflammation chronique, lésions chroniques de la muqueuse intestinale, ou anomalies anatomiques ou fonctionnelles de l'intestin permettraient la croissance de *Clostridium* neurotoxigènes dans le tube digestif, ainsi que la production de toxine *in situ*. Cette forme de botulisme est suspectée en l'absence de consommation d'aliment à risque ou de blessure. Elle se caractérise par une excrétion prolongée de *C. botulinum* et sa toxine dans les selles.

Les plaies peuvent être colonisées par *C. botulinum* et provoquer l'apparition d'un botulisme. Cependant, l'incidence du botulisme par blessure est beaucoup moins fréquente que celle du tétanos. Ce mode de contamination est analogue à celui du tétanos ou d'une gangrène à *Clostridium*. Le botulisme par blessure était extrêmement rare jusqu'aux années 1990. Depuis, son incidence s'est significativement accrue aux Etats Unis puis en Europe à compter des années 2000, et de façon presque exclusive chez les utilisateurs de drogue par injection. Les personnes à risque sont essentiellement les utilisateurs d'héroïne (black tar heroin) par injection intramusculaire ou sous cutanée et non intraveineuse.

BOTULISME HUMAIN EN FRANCE

L'intoxication alimentaire est de loin la forme de botulisme la plus fréquente en France. Trois cas seulement de botulisme infantile ont été diagnostiqués (un cas de type A et deux de type B entre 2004 et 2006) (Carlier *et al.*, 2007). Aucun cas de botulisme par blessure n'a été répertorié, mais deux formes de botulisme de type B ont été identifiées chez deux jeunes toxicomanes à la suite d'inhalation de cocaïne en 2006 (Roblot *et al.*, 2006).

Dans la période 1956-1970, les analyses réalisées pour le diagnostic du botulisme à l'Institut Pasteur, indiquent une incidence de cette intoxication d'environ 22 cas par an dont 5% s'accompagnaient de mortalité.

Aux cours des années suivantes, de 1971 à 1978, on enregistre un nombre nettement plus élevé des cas de botulisme avec une moyenne annuelle d'environ 70 cas par an. Cette apparente recrudescence de botulisme est liée à une amélioration du diagnostic de cette affection à compter de 1971. En effet, le dépistage de la toxine botulique était réalisé dans le sérum des malades et non plus uniquement dans les aliments suspects, qui souvent n'étaient plus disponibles après survenue d'un foyer de botulisme (Sebald and Saimot, 1973). Au cours de la période 1956-1979, La grande majorité des cas sont de type B, et l'aliment responsable est le plus souvent un jambon de préparation familiale ou artisanale (63,7% des foyers). Dans 30 foyers (7%) représentant plus de 110 cas (plus de 12%) dont 6 décès, le botulisme était dû à un aliment du commerce ou était survenu dans un restaurant ou cantine. Les aliments incriminés étaient: jambon, saucisses, andouillettes, anchois, crabe, crevettes, fromages, asperges, poires, paëlla ...) (Sebald *et al.*, 1980).

A compter de 1979 jusqu'à nos jours, l'incidence des cas confirmés de botulisme reste stable aux alentours de 20-30 cas annuels. Par contre, la mortalité due au botulisme a diminué progressivement et est actuellement exceptionnelle. Le type B est le plus commun, et c'est la forme la plus bénigne de botulisme comparée au type A ou E. Il faut souligner que si cette maladie est rare (environ 5 cas pour 100 000 habitants), elle reste une maladie grave qui peut être rapidement mortelle. Un rapport de 1994 fait état que les cas déclarés de botulisme représenteraient 25 à 50 % des cas réels par suite de méconnaissance et de non diagnostic ou de non déclaration de cette affection (Roblot *et al.*, 1994). Mais les événements récents de bioterrorisme dont la toxine botulique est considérée comme l'une des principales armes potentielles, et l'utilisation thérapeutique de cette toxine de plus en plus répandue ont apporté une plus grande sensibilisation du milieu médical au botulisme. De ce fait, le botulisme est mieux pris en compte dans le diagnostic différentiel des affections nerveuses de type paralysie flasque. Ainsi, l'incidence annuelle du botulisme enregistrée ces dernières années refléterait d'avantage la réalité.

Malgré les changements d'habitudes alimentaires au cours de ces dernières décennies marqués notamment par une diminution progressive des conserves familiales, le botulisme ne tend pas à

disparaître en France. Par contre, les aliments d'origine commerciale sont de plus en plus impliqués ou suspectés. Ainsi, la proportion d'aliments du commerce responsables de botulisme était de 7% dans la période 1956-1979, 10% dans la période 1991-1995, et 24% dans la période 1996-2000 (Sebald *et al.*, 1980; Haeghebaert *et al.*, 2002). Les jambons et autres charcuteries qui restent une des principales cause de botulisme en France sont de plus en plus préparés par des charcutiers artisanaux ou industriels, et commercialisés. Les nouvelles techniques de conservation des aliments, comme produits non traités par la chaleur ou à une température en dessous du seuil sporicide et conservés sous vide, réfrigérés, ou stockés à température ambiante, sont favorables à une croissance de *C. botulinum* du group II. Parmi des foyers récents de botulisme dus à des produits industriels, citons une soupe de poisson commercialisée en tétrapack et contaminée par *C. botulinum* A en 1999, et des saucisses à base de viande de poulet responsables d'un botulisme B chez une dizaine de personnes en 2003. Si des foyers étendus de botulisme ont été observés à l'étranger, les produits commercialisés sont le plus souvent à l'origine de cas isolés en France. En effet, la contamination par *C. botulinum* est généralement très hétérogène. Le plus souvent pas plus de 2 à 8% des unités d'un lot de production sont contaminées rendant compte du faible nombre de personnes atteintes lors de distribution commerciale d'un produit contaminé (Lund and Peck, 2000).

Le botulisme de type E est relativement rare en France. Le vecteur est généralement des marinades de poissons ou des produits de la mer. Un cas de botulisme E survenu en 2002 a été attribué à la consommation d'une confiture de châtaigne faite maison dont l'expertise a révélé la présence de toxine botulique E. Malheureusement, la recherche de *Clostridium* toxigène fut infructueuse. Ce type d'aliment est plus volontiers contaminé par *Clostridium butyricum* dont certaines souches produisent une neurotoxine de type E et sont responsables de botulisme humain, notamment en Chine (Meng *et al.*, 1997).

CONCLUSION

Actuellement, le botulisme est relativement rare chez l'homme, mais plus commun chez les animaux, notamment les animaux d'élevage comme les volailles. Cette affection grave due à des bactéries de l'environnement produisant de puissantes toxines, nécessite une surveillance attentive et renforcée pour une meilleure compréhension de son épidémiologie et mettre en oeuvre des mesures de prévention et de contrôle adaptées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Arnon, S.S. (1986). Infant botulism: anticipating the second decade. *J. Infect. Dis.* 154, 201-206.
- Brook, I. (2007). Infant botulism. *J Perinatol* 27, 175-180.
- Carlier, J.P., Espié, E., and Popoff, M.R. (2007). Le botulisme en France, 2003-2006. *Bull. Epidemiol. Hebdo.* 31-32, 281-284.
- Haeghebaert, S., Popoff, M.R., Carlier, J.P., Pavillon, G., and Delarocque-Astagneau, E. (2002). Caractéristiques épidémiologiques du botulisme humain en France, 1991-2000. *Bul. Epidémiol. Hebdo.* 14, 57-59.
- Lund, B.M., and Peck, M.W. (2000). *Clostridium botulinum*. In: *The Microbiology Safety and Quality of Food*, vol. II, eds. B.M. Lund, T.C. Baird-Parker, and G.W. Gould, Gaithersburg MD: Aspen Publishers, 1057-1109.
- Mahrhold, S., Rummel, A., Bigalke, H., Davletov, B., and Binz, T. (2006). The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves. *FEBS Lett* 580, 2011-2014.
- Meng, X., Karasawa, T., Zou, K., Kuang, X., Wang, X., Lu, C., Wang, C., Yamakawa, K., and Nakamura, S. (1997). Characterization of a neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* strain isolated from the food implicated in an outbreak of food-borne type E botulism. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2160-2162.
- Meunier, F.A., Herreros, J., Schiavo, G., Poulain, B., and Molgo, J. (2002). Molecular mechanism of action of botulinum neurotoxins and the synaptic remodeling they induce in vivo at the skeletal neuromuscular junction. In: *Handbook of Neurotoxicology*, vol. 1, ed. J. Massaro, Totowa, NJ: Humana Press, 305-347.
- Nishiki, T., Tokuyama, Y., Kamata, Y., Nemoto, Y., Yoshida, A., Sato, K., Sekiguchi, M., Taakahashi, M., and Kozaki, S. (1996). The high-affinity of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin to synaptotagmin II associated with gangliosides G_{T1B}/G_{D1a}. *FEBS Lett.* 378, 253-257.
- Popoff, M.R. (1995). Ecology of neurotoxicogenic strains of Clostridia. In: *Clostridial neurotoxins*, vol. 195, ed. C. Montecucco, Heidelberg: Springer-Verlag, 1-29.
- Popoff, M.R., and Carlier, J.P. (2001). Botulisme, épidémiologie, approches thérapeutiques et préventives, utilisation thérapeutique des neurotoxines. *Antibiotiques* 3, 149-162.
- Popoff, M.R., and Marvaud, J.C. (1999). Structural and genomic features of clostridial neurotoxins. In: *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, vol. 2, eds. J.E. Alouf and J.H. Freer, London: Academic Press, 174-201.
- Poulain, B., Stiles, B.G., Popoff, M.R., and Molgo, J. (2006). Attack of the nervous system by clostridial toxins: Physical findings, cellular and molecular actions. In: *The Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, eds. J.E. Alouf and M.R. Popoff, Amsterdam: Elsevier, Academic Press, 348-389.
- Roblot, F., Popoff, M., Carlier, J.P., Godet, C., Abbadie, P., Matthis, S., Eisendorn, A., Le Moal, G., Becq-Giraudon, B., and Roblot, P. (2006). Botulism in patients who inhale cocaine: the first cases in France. *Clin Infect Dis* 43, e51-52.
- Roblot, P., Roblot, J.L., Fauchère, J.L., Devilleger, A., Maréchaud, R., Breux, J.P., Grollier, G., and Becq-Giraudon, B. (1994). Retrospective study of 108 cases of botulism in Poitiers France. *J. Med. Microbiol.* 40, 379-384.
- Rummel, A., Karnath, T., Henke, T., Bigalke, H., and Binz, T. (2004). Synaptotagmins I and II act as nerve cell receptors for botulinum neurotoxin G. *J. Biol. Chem.* 279, 30865-30870.
- Schiavo, G., Matteoli, M., and Montecucco, C. (2000). Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol. Rev.* 80, 717-766.
- Sebald, M., Billon, J., Cassaigne, R., Rosset, R., and Poumeyrol, G. (1980). Le botulisme en France. Incidence, mortalité, aliments responsables avec étude des foyers dus à un aliment qui n'est pas de préparation familiale. *Med. Nut.* 16, 262-268.
- Sebald, M., and Saimot, G. (1973). Le diagnostic biologique du botulisme. *Med. Mal. Inf.* 3, 83-85.