

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur Et de la Recherche
Scientifique

Université Ibn Khaldoun -Tiaret –
Institut de science vétérinaire
Département de santé animal

Projet de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de docteur
vétérinaire

Sous le thème de :

L'étude bibliographique de l'entérototoxicité
chez les petits ruminants

Présentée par :

Encadré par:

Mr : SANA DJALOUL

Mr : SASSI MORAD

Dr : MAHOUZ FATIMA



Sommaire

| | |
|------------------------|----|
| Remerciement | |
| Dédicaces | |
| Liste des tableaux | |
| Liste des abréviations | |
| Introduction..... | 01 |

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

I . ETIOPATHOGENIE DE L'ENTEROTOXEMIE CHEZ LES OVINS ET LES CAPRINS

| | |
|---|----|
| I .1. Les bactéries | 02 |
| I .1.1. Les agents responsables d'entérotoxémie chez les petits ruminants | 02 |
| 1. Clostridium perfringens | 02 |
| 2. Clostridium sordellii | 03 |
| 3. Clostridium septicum..... | 04 |
| I.1.2 Sensibilité et résistance aux antibiotiques et détergent | 05 |
| I .2. Les toxines | 07 |
| I .2.1. Les toxines de Clostridium perfringens | 07 |
| I .2.2. Les toxines de Clostridium sordellii | 14 |
| I .2.3. Les toxines de Clostridium septicum | 15 |

CHAPITRE II

EPIDEMIOLOGIE

| | |
|---|----|
| II.1. Epidémiologie descriptive | 23 |
| II.1.1. Espèces sensibles et répartition géographique | 23 |
| II.1.2 Forme épidémiologique | 26 |
| II.1.3 Catégories d'animaux atteints | 27 |

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| II.2. Epidémiologie analytique | 28 |
| II.2.1. Sources | 28 |
| II.2.2. Contamination | 29 |
| II.2.3. Facteurs de risque | 31 |
| II.2.4. Sensibilité spécifique | 34 |
| ETUDE CLINIQUE | 37 |
| II.3.1 Diagnostic | 37 |
| II.3.2 Prélèvements | 37 |
| II.3.3 Méthodes diagnostiques | 39 |

CHAPITRE III

MOYENS DE LUTTE

| | |
|--|-----------|
| III.1. Traitement | 51 |
| III.1.1. Mesures hygiéniques..... | 51 |
| III .1.2. Mesures médicales | 51 |
| III .1.2.1 traitement symptomatique..... | 51 |
| III .1.2.2 antibiothérapie..... | 52 |
| III .1.2.3 sérothérapie | 52 |
| III .1.2.4 phytothérapie..... | 53 |
| CONCLUSION | 54 |
| LEXIQUE DES ABREVIATIONS | 55 |

Remerciements

Nous remercions tout d'abord DIEU le tout puissant pour nous avoir donné la santé, le courage et la patience durant notre travail.

Nous tenons à remercier notre promotrice: Melle : Mahouz fatima qui a nous guidé pour la réalisation de ce travail.

Il nous est également très agréable de remercier à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce présent mémoire ; docteurs vétérinaires de tous les wilayas d'Algérie, tous les étudiants de l'institut des vétérinaires de TIARET.

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail a mes très chères parents qui m'ont guidé durant les moments les plus pénibles de ce long chemin, ma mère qui a été à mes cotés et ma soutenu durant toute ma vie, et mon père qui a sacrifié toute sa vie a fin de me voir devenir ce que je suis, merci mes parents.

Pour toute ma famille, mes frères et sœurs, en particulier ma soeur petite houda

Pour mon binôme sana djeloull.

Pour tous mes amis, surtout Yassin Mohammed aissa belknadil et salaa salah et bachir et amine et tous ceux qui m'ont aidé dans mon travail.

Un merci spécial poivré avec une profonde gratitude et de respect pour superviser le protocole de ma graduation :**Mme. Mahouz fatima**

mourad

DEDICACES

A tous ceux qui je porte dans mon coeur:

Chers Maman et Papa,

Merci d'avoir été présents dans tous les moments, merci de m'avoir soutenue et surtout d'avoir été patients lorsque ces moments ont été pénibles. Grâce à votre appui et à vos précieux conseils, j'ai pu réaliser ce que je suis.

Merci de l'amour que vous me porter, merci pour votre gentillesse et votre soutien inconditionnel je vous aime!

A tous mes frères mohamed et son fils djilali et son fils a mes oncle

A mon binôme sassi mourad

A tout mes amis belknadil, salaa,bachir,amine,mostapha et tout mes connaissance

djalouy

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| TABLEAU I : Gene, mode d'action et activite biologique des toxines de C [Daube 1992, Latour 2004, Rood 1998] | 08 |
| TABLEAU II: Principales maladies dues a C. perfringens chez les ovins et les caprins : classification toxingenique [Daube 1992, Manteca et Daube 1994, Uzal 2004] | 17 |
| TABLEAU III: Toxinotypes et genotypes associes de Clostridium perfringens | 18 |
| TABLEAU IV : Définition des nouvelles catégories de C. perfringens [Daube 1992]..... | 22 |
| TABLEAU V : Maladies associées aux divers toxinotypes (classification traditionnelle) de C. perfringens, espèces cibles, répartition [Daube 1992]..... | 23 |
| TABLEAU VI : Fréquence relative des agents étiologiques d'entérotoxémie en fonction de l'âge chez les ovins et les caprins [Popoff 1989 et 1994]..... | 27 |
| TABLEAU VII : Présence et valeur diagnostique de Clostridium dans l'intestin des petits ruminants [Latour 2004, Rood 1998, Shoenian 2005, Songer 1998, Uzal 2004] | 41 |

LEXIQUE DES ABREVIATIONS

°C: degre Celsius

ADN: Acide Desoxy-ribo-Nucleique

ADP: Adenosyl di-phosphate

AFSSA: Agence Francaise de Securite Sanitaire et des Aliments

AMM: Autorisation de Mise sur le Marche

AMPc: Adenosyl Mono-Phosphate cyclique

ARNr: Acide Ribo-Nucleique ribosomique

C. : *Clostridium*

cf.: confere

Cl⁻: ion chlorure

DL: Dose Letale

ELISA: Enzym Linked Immunosorbant Assay

H₂S: Sulfure de di-hydrogene

HT: Toxine Hemorragique

K⁺: ion potassium

kb : kilo base

kDa: kilo Dalton

LT: Toxine Letale

MBEC: Mouse Brain endothelial Cell

MDCK: Madin Darby Canine Kidney

mg/dL: milligramme par decilitre

mL: millilitre

mm: millimetre

MNT: Mouse Neutralisation Test

MS: Matiere Seche

Na⁺: ion sodium

PCR: Polymerase Chain Reaction

pH: potentiel Hydrogene

UFC: Unite Formant Colonie

UI: Unite Internationale

INTRODUCTION

-Les entérotoxémies sont des affections des ruminants dues à la pullulation dans l'intestin, de *Clostridium perfringens* avec production d'exotoxines protéiques létales. *Clostridium perfringens* est l'agent bactérien déterminant de la maladie. Cliniquement ces affections se caractérisent par une mort subite parfois précédée pendant quelques heures de troubles diarrhéiques, convulsifs et hémolytiques. L'autopsie révèle des lésions congestivo-hémorragiques disséminées dans l'intestin, des lésions exsudatives avec accumulation de liquide séro-hémorragique dans les grandes cavités séreuses et des lésions dégénératives des parenchymes (foie, rein et muscles) ; la putréfaction des cadavres étant particulièrement rapide. C'est à partir de ces bases épidémiologiques et lésionnelles que s'appuie le diagnostic de suspicion d'entérotoxémie. Les analyses de laboratoire permettent ensuite de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

CHAPITRE I :

Etiopathogenie de l'entérotoxémie chez les ovins et les caprins

I.1. Les bactéries

I.1.1. Les agents responsables d'enterotoxémie chez les petits ruminants

Les enterotoxémies des ruminants sont principalement dues aux bactéries du genre *Clostridium*. D'autres agents étiologiques peuvent être responsables de cette maladie tel que *Escherichia coli*, mais leur prévalence est tellement faible qu'il me semble inutile de les détailler. *Clostridium* est un bacille GRAM positif, anaérobie, tellurique et capable de sporuler.

Chez les petits ruminants, on connaît 3 principaux agents d'entérotaxémies.

1. *Clostridium perfringens*

a. Morphologie

Clostridium perfringens est un bacille immobile, Gram positif, de 4 µm sur 1,5 µm avec des bords parallèles et des extrémités arrondies. L'épaisseur de la capsule est variable en fonction des souches et peut être discernée par coloration à l'encre de Chine de façon aisée sur un prélèvement. Les bacilles sont généralement isolés, parfois groupés en paires. [C. Manteca CEVA SA]

b. Habitat

Clostridium perfringens est une bactérie tellurique et ubiquitaire. Elle est présente le plus souvent en grand nombre dans l'environnement (sols, boues, poussières, litières).

Le dénombrement de la flore du tube digestif d'un animal sain indique la présence de cette bactérie à des concentrations inférieures à 10³ clostridies par millilitre de contenu intestinal. Cette concentration est similaire pour l'intestin grêle, le caecum et le colon.

Une altération de l'équilibre de la flore intestinale se traduit par une prolifération de *C. perfringens* pouvant atteindre des concentrations comprises entre 10⁶ à 10⁹ bactéries par millilitre de prélèvement. [Ann.3 2005, Latour 2004].

c. Formes de résistance : les spores

Les spores de *Clostridium perfringens* sont ovales et thermo-résistantes. La sporulation permet à la bactérie de résister dans le milieu extérieur lorsque les conditions ne sont plus favorables à sa survie c'est à dire lors de modifications de pH et de température [Ann.3 2005].

d. Caractères biochimiques et cultureux

Il s'agit d'une bactérie anaérobie stricte, aérotole'ante, déficiente en catalase et en peroxydase, produisant des endospores thermosensibles. Elle possède un fort potentiel de réduction du milieu. En effet, la production de divers métabolites et en particulier d'hydrogène, au cours de la phase de croissance, a un effet réducteur [Ann.³ 2005].

Sa température habituelle de croissance est comprise entre 34 et 37 °C, avec un optimum à 46°C. Cette température est utilisée lors de l'incubation pour enrichir les cultures. Son développement est possible pour un pH compris entre 5 et 9 [Shoenian 2005].

Toutes les souches réduisent les sulfites en sulfures. Ce critère est utilisé pour dénombrer *C. perfringens* dans l'eau, le sol et les fèces. Elle produit des gaz (dioxyde de carbone, dihydrogène) et des acides (acides acétique et butyrique) lors des fermentations de nombreux glucides, en particulier le glucose [Latour 2004].

2. Clostridium sordellii

Clostridium sordellii est responsable de troubles digestifs pouvant être responsable d'entérotoxémie des ruminants.

a. Morphologie

C. sordellii mesure 1,6 µm de large pour 4,5 µm de long. Cette bactérie est mobile grâce à son flagelle. Elle produit des spores de morphologie ovulaire. responsable d'enterotoxémies, de toxi-infections alimentaires et de gangrènes gazeuses post-traumatiques. Synonyme : *C. welchii*, *enteritis necroticans* [Ann.3 2005, Ferrer *et al.* 2002, Latour 2004].

b. Habitat

Elle est présente dans l'environnement (sol) mais aussi dans l'intestin des animaux et de l'homme de manière commensale.

c. Caractères biochimiques

C'est un bacille anaérobie, positif à la coloration de Gram. Il possède une uréase, fermente le glucose, le lévulose et le maltose. Il produit deux toxines : une toxine létale (LT) et une toxine nécrosante (HT)

3. *Clostridium septicum*:

Responsable d'œdème malin chez de nombreuses espèces et d'un syndrome enterotoxémique

Associant des lésions de la caillette chez les petits ruminants [Songer 1998].

Les principaux agents étiologiques d'enterotoxémie sont les mêmes pour les ovins et les caprins : *C. perfringens*, *C. sordellii* et *C. septicum*.

a. Habitat:

C. perfringens présente un habitat mixte : l'habitat anaérobie est le plus répandu dans l'environnement. La plupart du temps, *C. perfringens* type A est retrouvé dans les sols, l'air, l'eau ou les poussières mais c'est aussi un commensal des flores intestinales, vaginales ou des voies aériennes supérieures de l'Homme et des animaux. Il est occasionnellement rencontré dans le rumen, en faible nombre. Il est détruit dans l'abomasum. Dans les conditions normales, il peut être présent dans l'intestin grêle, le caecum et le colon. Capable de tolérer une semi-anaérobiose, il contamine sous forme sporulée certains aliments (viande, lait, fruits, légumes) et sa présence dans les eaux est un critère de contamination fécale [Ann. 2005, Latour 2004].

Les autres types de *C. perfringens* ont essentiellement un habitat intestinal (ruminants).

C. sordellii et *C. septicum* résident également dans le sol et l'intestin de l'Homme et des animaux [Latour 2004]. Cependant, certains auteurs soulignent la difficulté d'isoler *C. sordellii* dans la plupart des cas de clostridiose ou de mort subite. Cette rareté suggère qu'il n'est pas commensal du tube digestif [Shoenian 2005].

b. Morphologie

Clostridium peut être observé sous la forme d'une cellule végétative, dans l'intestin des ruminants le plus souvent, ou sous la forme sporulée, dans l'environnement.

- b.1- Cellule végétative:

C. perfringens est un bacille épais et court, de 4 à 8 microns de long sur 1 à 1,5 microns de large, GRAM positif, non mobile car dépourvu de flagelle contrairement aux autres clostridies *C. sordellii* et *C. septicum* sont des bacilles plus fins et plus courts. Ils sont mobiles. Les bactéries peuvent être isolées, liées 2 par 2 ou en amas. *In vivo*, *C. septicum* forme de longues chaînes [Ann.3 2005, Ferrer *et al.* 2002, Latour 2004]

Clostridium bénéficie d'un atout majeur pour la colonisation du milieu : la rapidité des générations. Un cycle de réplication ne dure que 10 minutes.

- **b.2- Spore:**

La forme sporulée est une forme de résistance à la chaleur, aux rayons ultra-violet, à la dessiccation et à de nombreux désinfectants. *C. perfringens* peut ainsi subsister de longues périodes dans l'environnement, et 330 jours dans les viandes [Ann³ 2005].

Le déterminisme de la sporulation est environnemental : un arrêt de croissance bactérienne due à un manque de molécules nutritives, à l'exposition à une atmosphère oxygénée, ou à la

deshydratation provoque l'acquisition de cette forme de résistance. La présence de conditions de croissance favorables permet le retour à la forme végétative [Leonhart 2004].

I.1.2 SENSIBILITE ET RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES ET DETERGENTS

Sensibilité et résistance aux antibiotiques [Mainil *et al.* 2005]

Il existe des résistances aux antibiotiques chez les animaux, spécialement pour les macrolides, lincosamide, les tétracyclines et le chloramphénicol. Les connaissances sur le mécanisme et l'aspect génétique de ces résistances sont aujourd'hui assez complètes.

a. LES BETA LACTAMINES

Les pénicillines sont plus efficaces sur *Clostridium perfringens* que les céphalosporines. Les résistances aux pénicillines sont rares et la production de β -lactamase n'a pas été démontrée.

Si une résistance aux pénicillines apparaît, elle traduit une baisse d'affinité de la molécule avec le récepteur PBP1 (Penicillin Binding Protein 1). Certaines souches sont résistantes aux céphalosporines de seconde et de troisième génération.

b. RESISTANCE AUX MACROLIDES, LINCOSAMIDES

Le gène de résistance à l'érythromycine est actuellement nommé *ermB* (Erythromycine Resistance Methylase). Il permet la synthèse d'une méthylase qui provoque la diméthylation de l'ARNr 23S. Ce gène est situé sur un plasmide. Son apparition chez *C. perfringens* serait due au transfert d'un plasmide de conjugaison d'*Enterococcus* ou de *Streptococcus*, suivi de la perte de la capacité de transposition. Un autre gène de résistance décrit chez *Clostridium* est *ermQ*.

c. RESISTANCE AUX TETRACYCLINES

Plusieurs gènes de résistance aux tétracyclines ont été mis en évidence chez *C. perfringens*.

Le plus courant est nommé *tetA(P)*. Pour des raisons non élucidées, il se situe soit sur le chromosome bactérien soit sur le plasmide. Son expression provoque la modification des flux sortants de la cellule. D'autres gènes sont connus, comme *tetB(P)* et *tetM*, qui codent pour des modifications ribosomiques. Toutefois, ces 2 gènes n'ont jamais été mis en évidence

simultanément chez *C. perfringens*.

d. RESISTANCE AU CHLORAMPHENICOL

La résistance au chloramphénicol n'est pas fréquente. Elle est due au gène nommé *catP*, qui code une acétyl transférase. Un autre gène peut être incriminé : *catQ*. Il est encore plus rare que *catP*.

e. SENSIBILITE AUX AUTRES ANTIBIOTIQUES

C. perfringens est sensible à la plupart des autres antibiotiques, parmi lesquels on compte les fluoroquinolones, le métronidazole, le linezolid et les glycopeptides.

Aujourd'hui, les antibiotiques de choix utilisés pour le traitement d'une infection à *C. perfringens* sont les pénicillines et éventuellement les céphalosporines. Les résistances aux tétracyclines, au chloramphénicol et aux antibiotiques du groupe érythromycine-lincosamine limitent leur utilisation.

I.1.6.2 Sensibilité aux antiseptiques et désinfectants

Les organismes sporules sont relativement résistants. *C. perfringens* présente une sensibilité moyenne à l'hypochlorite de sodium à 1 % et est sensible aux désinfectants puissants [Smith et Sherman 2002].

I.2 Les toxines

I.2.1 Les toxines clostridiennes

C. perfringens produit 17 toxines différentes (Tableau I), mais seulement 5 ont un rôle avéré et déterminant dans la pathogénie : les toxines ϵ , β , δ et l'enterotoxine [Daube 1992]. On distingue 3 principaux modes d'action des toxines majeures : la formation de pores membranaires, la destabilisation des membranes cellulaires, qui perturbent la perméabilité membranaire des cellules cibles, ainsi que l'altération du cytosquelette cellulaire. Les toxines mineures ont un rôle secondaire, parfois potentialisant l'action des toxines majeures. On ignore encore le rôle précis dans la pathogénie ou le mode d'action de certaines de ces toxines.

Tableau I : Gene, mode d'action et activite biologique des toxines de *C* [Daube 1992, Latour 2004, Rood 1998].

| Toxine | Gène | Localisation | Activité biologique | Effet pathologique |
|--------------|-------------------|-------------------------|---|--|
| α | <i>plc</i> | chromosome | Phospholipase C-lécithinase, hémolysine, nécrotique, létale (détruite par la trypsine) | Augmentation de la perméabilité des endothéliums, cytolytique, hémolytique, leucocytaire |
| β_1 | <i>cpb1</i> | plasmide | Nécrotique, létale (détruite par la trypsine) | Nécrose hémorragique de la muqueuse intestinale |
| β_2 | <i>cpb2</i> | plasmide | Formation de pores ? Altération des membranes cellulaires ? (détruite par la trypsine) | Nécrose hémorragique de la muqueuse intestinale |
| ϵ | <i>etx</i> | plasmide | Augmentation de la perméabilité capillaire, nécrotique, létale (activée par la trypsine) | Oedèmes, oedèmes périvasculaires, nécrose cérébrale et rénale |
| ι | <i>iap/ibp</i> | plasmide | Actine spécifique-ADP-ribosyltransférase | Nécrose de la muqueuse intestinale |
| Entérotoxine | <i>cpe</i> | Chromosome/ plasmide | Formation de pores membranaires, vérotoxique, entérotoxique (résistante à la trypsine) | Fuite d'ions, deshydratation cellulaire, diarrhée |
| θ | <i>pfoA</i> | chromosome | Hémolysine | Virulence secondaire |
| κ | <i>colA</i> | chromosome | Collagénase, gélatinase | Virulence secondaire |
| λ | <i>lam</i> | chromosome | Protéase : caséinase, gélatinase | Virulence secondaire |
| μ | <i>nagH</i> | chromosome | Endo- β -N-acétyl-glucosaminidase | Virulence secondaire |
| Sialidase | <i>nanI, nanH</i> | chromosome | Sialidase, neuraminidase | Virulence secondaire |

1) Toxine

Cette toxine est synthétisée par tous les types de *C. perfringens*. Elle n'est donc spécifique d'aucun type de *Clostridium*, sa détection n'a pas de valeur diagnostique. Elle est la toxine majeure de *C. perfringens* type A, chez qui elle est produite en plus grande quantité.

▪ CYTOTOXICITE

La toxine a une action phospholipase C. En présence d'ions calcium, elle hydrolyse la phosphatidylcholine et la sphingomyéline, deux composants importants de la membrane phospholipidique cellulaire. L'inactivation des pores membranaires conduit à une forte perturbation des flux ioniques, créant un appel osmotique : la diminution des entrées d'ions provoque une baisse d'hydratation dans la cellule. Chez le rat, l'injection *in vitro* d'une préparation avec la toxine sur anse colique ligaturée, provoque une sécrétion importante d'ions chlorure. La sortie d'ion Cl⁻ est due d'une part aux protéines, médiatrices de l'inflammation, d'autre part aux modifications de la concentration cellulaire en ions calcium. La sortie d'eau qui s'en suit contribue à l'effet cytotoxique de la toxine.

Chez les petits ruminants, aucune mesure des transports d'ions n'a été réalisée pour expliquer le mécanisme précis de cette sortie d'eau. Mais le modèle du rat semble pouvoir être rapporté à ces espèces [Mariano et Uzal 2005].

▪ ACTION DANS L'INTESTIN

Le rôle de la toxine dans la pathogénie intestinale n'est pas clairement défini. L'inoculation de toxine sur anses intestinales ligaturées d'agneaux induit une forte exsudation de liquide.

Expérimentalement, il n'a été observé que l'augmentation de la perméabilité membranaire était biphasique. Ceci suggère la double action de la toxine : morphologique et physiologique. Le mécanisme reste flou, d'autant plus qu'aucune modification morphologique des entérocytes n'a été observée à ce jour. La toxine n'a donc pas de rôle majeur dans l'intestin, elle induit simplement une inflammation aiguë de la paroi intestinale, avec une

exsudation dans la lumière ileale et colique, dans les 4 h qui suivent l'inoculation [Mariano et Uzal 2005].

▪ ACTION DANS L'ORGANISME

Une fois absorbée dans le flux sanguin, la toxine provoque une augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins. De plus, elle agit sur la membrane des hématies et provoque une hémolyse intravasculaire et l'aggrégation plaquettaire. Il s'en suit de nombreuses lésions organiques et un état de choc [Mariano et Uzal 2005, Van Metre *et al.* 2000].

2) Toxine 1

Elle est produite par *C. perfringens* types B et C.

La toxine ₁ est un polypeptide de 309 acides aminés. Elle a une action cytotoxique sur les villosités des cellules épithéliales par formation de pores membranaires. Son action nécrosante entraîne la destruction et la desquamation de la muqueuse. L'extension des lésions est rapide atteignant les cellules des cryptes, la lamina propria puis la musculature. Les pertes cellulaires induisent des hémorragies intra-luminales. L'absorption de la toxine qui s'en suit provoque des signes systémiques. Les organes cibles sont le cœur, les vaisseaux et les ganglions lymphatiques [Leonhart 2004, Niilo 1988, Rood 1998]. Cette molécule est lysée dans l'intestin par la trypsine. Les inhibiteurs de protéases digestives ou un déficit en sécrétion trypsinogénique favorisent l'expression de la virulence de la toxine [Manteca *et al.* 2005]. L'instabilité de cette toxine dans le contenu intestinal peut venir contrecarrer un diagnostic correct et faire suspecter à tort *C. perfringens* type A comme responsable de la maladie.

3) Toxine 2

Long temps confondue avec la toxine ₁, la toxine ₂ a d'abord été isolée sur des porcs présentant une enterite nécro-hémorragique, et plus tard chez d'autres espèces dont l'agneau et le chevreau. Malgré des similitudes biologiques, leur séquence en acides aminés ne présente aucune homologie significative et elles sont différentes d'un point de vue sérologique, sans réaction croisée possible.

La toxine ϵ a une action cytotoxique par formation de pores membranaires, elle est responsable de lésions nécrotiques, hémorragiques graves, d'abord de l'intestin puis après son absorption sur les organes internes [Dray 2004, Manteca *et al.* 2002, Manteca *et al.* 2003].

Cette toxine majeure peut être associée avec la plupart des toxinotypes, mais plus principalement avec *C. perfringens* type A. Les types C et D peuvent aussi produire la toxine ϵ , mais plus rarement [Dray 2004].

Une synergie entre les toxines ϵ et β est suspectée. On considère que 60% des cas d'enterotoxémie du veau sont dus à l'action couplée de ces 2 toxines [Manteca *et al.* 2003]. Chez les petits ruminants, un cas d'enterotoxémie type A a été diagnostiqué chez un chevreau, où certains isolats bactériens portaient le gène de la toxine ϵ , laissant présager un rôle de cette toxine dans l'enterotoxémie caprine [Manteca *et al.* 2003]. De même, des souches de *C. perfringens* type A contenant le gène ϵ ont été isolées chez des ovins, mais aucune étude ne permet de préciser si cette toxine était effectivement produite [Manteca *et al.* 2005].

4) Toxine

Elle est produite par *Cl. perfringens* type B et D.

▪ STRUCTURE

Cette toxine est constituée d'une chaîne polypeptidique de 38 kDa. Le gène correspondant est situé sur un plasmide. Il fut difficile à mettre en évidence jusqu'au moment où la méthode PCR a permis un diagnostic plus aisé. La chaîne polypeptidique est tout d'abord synthétisée sous forme d'une prototoxine atoxique et thermostable. Elle est ensuite activée dans l'intestin, grâce à la trypsine pancréatique et la toxine mineure β , qui catalysent le clivage au niveau du 16^{ème} acide amine [Manteca *et al.* 2005].

▪ CYTOTOXICITE

La croissance de *Clostridium* conduit à l'accumulation de toxine dans l'intestin. À la faveur d'une stase alimentaire, la perméabilité intestinale augmente rapidement et de grandes quantités de toxine sont absorbées. Des sensibilités spécifiques permettent une plus ou moins bonne résistance aux effets locaux de la toxine, et donc une plus ou moins grande résistance à sa pénétration dans l'organisme.

Quelques incertitudes demeurent quant a son role precis dans la pathogenie et son mecanisme d'action. En stimulant l'adenylcyclase membranaire, elle provoque une augmentation de l'AMP_c. Les reactions en chaine qui suivent aboutissent d'une part a la glycogenolyse et d'autre part une augmentation de la permeabilite membranaire. Cette augmentation de l'AMP_c explique donc l'hyperglycemie et la glucosurie observee chez les animaux malades [Popoff 1979.Manteca *et al.* 2005].

De nombreuses cellules de l'organisme possedent des recepteurs membranaires a la toxine . Selon le type de cellule cible, les consequences sont variables[Uzal *et al.* 2003]. Mais les recepteurs de la toxine ne sont pas clairement identifies. De meme, les modalites d'actions demeurent inconnues : la toxine agit-elle seule ou associee, directement ou indirectement ? Quel est le role du micro-organisme lui meme?

Des pistes se dessinent : il a ete demontre *in vitro* que la toxine seule n'avait pas d'action sur les cellules endotheliales. Ceci suppose action couplee avec d'autres toxines ou avec des molecules presentes dans le sang, ou encore en interaction avec la paroi des vaisseaux[Uzalet *al.*¹ 1999]. Pour eclairer ces hypotheses, la toxine purifiee a ete injectee en intraveineuse chez l'agneau. Des symptomes et des lesions identiques a ceux d'une enterotoxemie type D sont reapparus. Le role de la toxine ou des autres toxines ainsi que de *Clostridium* lui-meme serait alors minime dans la pathogenie[Uzal *et al.* 2003]. Les roles des parois vasculaires et des cellules sanguines n'ont pas ete precises.

▪ ACTION SUR L'ENDOTHELIUM DE L'ENCEPHALE

Le modele etudie jusqu'a ce jour est celui des cellules MDCK (Madin Darby Canine Kidney). Ce sont des cellules epitheliales renales, qui servent souvent comme modele d'etude des epitheliums et endotheliums. La toxine s'associe a un recepteur specifique present sur la membrane des cellules MDCK, formant un complexe de 155 kDa. La cytotoxicite apparait simultanement a la formation du complexe. Si ce mecanisme etait valable dans l'encephale, il expliquerait la degenerescence et la necrose specifique des cellules endotheliales *in vivo*[Uzalet *al.*¹ 1999].

L'expérience a été reproduite, sans succès, sur des cellules endothéliales de la crosse aortique. On ne peut pourtant pas conclure qu'un tel résultat serait obtenu avec les cellules endothéliales de l'encéphale car elles sont particulières : jonctions inter cellulaires serrées, faible taux d'endocytose, déficit en collagène périvasculaire, membrane basale épaissie et association intime avec les astrocytes.... Ces spécificités assurent l'efficacité de la barrière hémato-méningée à assurer l'homéostasie du milieu extra cellulaire céphalique [Chen *et al.* 1998] À ce titre, elles ne peuvent être étudiées de la même manière que les cellules endothéliales des vaisseaux.

▪ ACTION SUR LES CELLULES NERVEUSES

La toxine est responsable d'une symptomatologie nerveuse importante dans le cadre des enterotoxémies B et D. Elle provoque la libération d'acétylcholine au niveau des terminaisons nerveuses cholinergiques. À faible dose, elle induit la libération excessive de glutamate, d'où d'importants dommages neuronaux [Manteca *et al.* 2005]. La toxine agirait directement sur les astrocytes en perturbant la dynamique des fluides jusqu'à la mort cellulaire [Uzal *et al.*¹ 1999]. Il est été mis en évidence que la toxine pouvait agir directement sur les neurones chez le rat, induisant leur dégénérescence et leur nécrose. Les lésions cérébrales alors observées n'étaient pas dues à la microangiopathie [Uzal *et al.* 2004]. L'existence d'un récepteur à la toxine sur les astrocytes permettrait d'expliquer les différences lésionnelles observées chez les ovins et les caprins. Alors que les premiers présentent systématiquement des lésions d'encéphalomalacie, l'encéphale des seconds reste le plus souvent intact. Le récepteur serait présent chez les ovins et absent ou non fonctionnel chez les caprins [Uzal *et al.*¹ 1999].

▪ CONSEQUENCES LÉSIONNELLES DANS L'INTESTIN ET DANS L'ORGANISME

L'action sur les endothéliums permet une augmentation de la perméabilité vasculaire, donc la formation d'œdèmes. Il en résulte : œdème et nécrose du système nerveux responsables de troubles nerveux, œdème périvasculaire et intra lobulaire au niveau des poumons, œdème myocardique et péricardique,

petechies sur les sereuses, lésions rénales s'accroissant après la mort par la lyse rapide du parenchyme rénal. L'action sur les hépatocytes provoque la destruction des réserves de glycogène et donc une hyperglycémie, suivie d'une glucosurie. Une action sur les macrophages est également décrite.

La toxine est une des plus puissantes toxines produites par *C. perfringens*. Les lésions cérébrales et vasculaires sont les plus fréquentes et les plus caractéristiques.

Cette toxine quoique résistante, n'est pas retrouvée systématiquement dans le contenu intestinal : soit elle est absorbée dans l'organisme, soit elle est détruite dans l'intestin quelques heures après la mort de l'animal. Son utilisation pour le diagnostic d'enterotoxémie s'en trouve limitée. Pour le typage d'une souche isolée, elle reste très utile [Popoff 1979, Uzal 2004, Uzal *et al.* 2003, Uzal et Kelly¹ 1998].

5) Toxine

Seul *C. perfringens* type E produit la toxine . Elle est constituée de 2 chaînes polypeptidiques. Le composant actif a un poids moléculaire de 47,5 kDa. Il a un rôle ADPribosyltransférase spécifique du groupement Actine. Le second composant fait le poids moléculaire de 71,5 kDa et n'a qu'un rôle liant. Son activité consiste à désorganiser le cytosquelette cellulaire en inhibant la régénération de l'actine [Rood 1998].

6) Toxine

C'est une toxine mineure produite par les souches types B et C. Son pouvoir pathogène s'exprime essentiellement chez les petits ruminants et les porcs. Elle provoque l'hémolyse des globules rouges par augmentation de la perméabilité membranaire [Manteca *et al.* 2005].

7) Enterotoxine

Elle est produite par la plupart des souches en phase de sporulation du *Clostridium* dans l'intestin. Elle est constituée d'une chaîne polypeptidique de 34 kDa. Sa nature biochimique la rend thermolabile : elle perd son pouvoir toxique grâce à un chauffage de 10 minutes à 60°C.

L'enterotoxine agit sur la perméabilité membranaire aux acides aminés, ions, glucose, eau... de manière à inhiber la synthèse protéique, et par conséquent à diminuer la viabilité de la cellule. Son effet est donc principalement

cytotoxique. Dans l'intestin, elle induit une réponse sécrétoire et de sérieuses lésions épithéliales [Lucas *et al.* 1991]. L'injection intraveineuse d'extraits bactériens de *C. perfringens* enterotoxigène sporules chez des ovins induit des lésions de congestion intestinale, congestion du foie, de la rate, des poumons, des reins avec parfois de l'ascite et un hydrothorax. Cette expérience n'est cependant pas suffisante pour démontrer l'implication de *C. perfringens* type A enterotoxigène dans la maladie chez le mouton [Daube 1992].

L'enterotoxine est active sur de nombreux types cellulaires : entérocytes, hépatocytes... grâce à la reconnaissance d'un récepteur protéique membranaire appelé CPE-R.

Une étude révèle de nombreuses ressemblances structurales entre CPE-R et un récepteur membranaire isolé chez la souris, sur culture de cellules endothéliales, par une technique d'hybridation d'ADN. Ce récepteur est appelé MBEC₁ (Mouse Brain Endothelial Cells) et il est présent sur de nombreux endothéliums et épithéliums.

Sa séquence en acides aminés a 71% de similarité avec celle de human CPE-R et aussi de nombreux domaines hydrophobes. Or chez la souris, le récepteur MBEC₁ a été mis en évidence au niveau de nombreux organes : encéphale, endothéliums artériel et veineux, cœur, rate, rein, foie, pancréas, mésentère, épithélium pulmonaire, trachée [Chen *et al.* 1998]... Une voie de recherche reste à explorer pour connaître les modalités d'action de l'enterotoxine sur les organes cibles. Cette toxine n'est plus détectable dans le contenu intestinal 6 heures après son inoculation intra-duodénale chez des ovins. Elle aurait donc une courte persistance dans l'intestin [Daube 1992].

I.2.2. LES TOXINES DE *CLOSTRIDIUM SORDELLII*

C. sordellii produit 2 toxines, une toxine hémorragique (HT) et une toxine létale (LT).

1) Toxine HT

La toxine HT (toxine hémorragique) est produite en phase de sporulation. Elle est de nature protéique et est inactive à pH inférieur à 6,5 ou supérieur à 8,5. Son mode d'action est proche de celui de la toxine A de *Clostridium*

difficile. L'injection intra-dermique sur des cobayes met en évidence une action dermo-necrotique, mais non letale. Sur des anses intestinales ligaturees, elle induit une necrose hemorragique de la muqueuse ileale. *In vivo*, la toxine HT provoque une enterite necro-hemorragique, au niveau de l'intestin grele [Latour 2004].

2) Toxine LT

La toxine LT (toxine letale) est produite pendant la phase de croissance bacterienne, et presente des similitudes antigeniques avec la toxine B de *Clostridium difficile*. La toxine LT est de nature proteique. Le poids moleculaire est estime a 25 kDa. Cette molecule est thermolabile et est denaturee a pH inferieur a 5 ou superieur a 8. L'action des proteases n'altere pas son activite biologique, sauf la -chimotrypsine qui induit une perte d'activite de 50%. En revanche, les traitements oxydants inactivent totalement la toxine. Des experiences de denaturation ont revele l'importance des acides amines tryptophane et methionine dans l'effet letal de la toxine. De plus, les ponts disulfures entre les groupements thiols sont primordiaux pour l'activite biologique [Popoff 1987].

L'effet toxique est multiple. Par injection intra-peritoneale ou intra-veineuse a des souris, la toxine a un effet letal. Par injection intra-dermique a des cobayes, elle provoque un oedeme et un erytheme. L'action sur la paroi digestive a ete etudiee sur des anses intestinales ligaturees, et revele une forte exsudation [Popoff 1987].

La toxine a un effet restreint sur la muqueuse digestive, mais lors d'infection clostridienne, l'augmentation de la permeabilite intestinale favorise le passage de la toxine dans l'organisme, avec des effets similaires a ceux observe par inoculation intra peritoneale ou intra veineuse [Leonhart 2004].

- Role dans la pathogenie :

Les avis divergent quant au role de *C. sordellii* dans la pathogenie des enterotoxemies. Il a ete isole seul ou associe a *Fusobacterium necrophorum*, *Clostridium bifermentis* ou *Clostridium sporogenes* dans la caillette d'ovins morts d'enterotoxemie. Le role pathogene de ces germes anaerobies ayant ete ecarte, *C. sordellii* devient l'unique responsable de la mort des moutons

[Lewis et Naylor 1998]. Un autre argument est en faveur de sa pathogenicite :

C. sordellii n'a ete identifie que chez des animaux atteints d'enterotoxemie et semble absent chez l'animal sain. Pourtant, une etude recente revele que les souches de *C. sordellii* isolees sur des bovins malades etaient negatives avec les sondes HT et LT [Manteca 2003]. Un resultat similaire a ete obtenu sur des souches prelevees sur des ovins morts d'enterotoxemie [Manteca *et al.* 2005]. Il est donc peu probable que les toxines soient produites. De plus, ces souches sont biochimiquement proches de *C. bifermentis*, souche non pathogene.

Bien que *C. sordellii* soit isole dans environ 15% des cas d'enterotoxemie ovine ou caprine, son role dans la pathogenicite est contestable.

1.2.3.LES TOXINES DE *CLOSTRIDIUM SEPTICUM* :

C. septicum produit de nombreuses toxines potentiellement pathogenes : neuraminidase, Dnase, sialidase... Il produit egalement 2 toxines majeures.

La toxine agit principalement dans l'intestin. *C. septicum* synthetise une protoxine, qui, une fois fixee sur son recepteur, est activee par les proteases digestives. Les differents peptides ainsi actives migrent, se regroupent et forment un pore membranaire. Son action est letale, hemolytique et necrotique [Manteca *et al.* 2005]. La toxine agit plutot dans l'abomasum et a une activite desoxyribonuclease [Popoff 1994]. *Clostridium perfringens* produit une grande variete de toxines.

La bibliographie sur l'action des toxines clostridiennes chez les petits ruminants revele de nombreuses etudes sur la toxine et tres peu sur d'autres toxines comme la toxine . Les scientifiques s'interrogent davantage sur l'enterotoxemie type D. D'apres les modes d'action, les phases de la pathogenie sont identiques chez les ovins et les caprins: alteration et permeabilisation de la paroi intestinale, penetration des toxines puis des bacteries dans l'organisme et action sur les organes cibles.

On distingue une variabilite specifique au niveau de la sensibilite aux toxines. Les caprins seraient depourvus de recepteurs a la toxine fonctionnels dans l'encephale. L'absence de recepteurs sur cet organe cible

expliquerait la rareté des encéphalomalacies, contrairement aux ovins qui présentent très souvent des signes nerveux. Par ailleurs, tous les mécanismes ne sont pas encore élucidés. On s'interroge sur l'action synergique des toxines ϵ et δ dans l'enterotoxémie caprine type A, maladie causant des décès chez le chevreau.

• CLASSIFICATION DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* :

1) Classification en toxinotypes

La grande variété de toxines produites par *C. perfringens* a permis dans un premier temps la distinction de types et de sous-types. Une première classification des souches de *C. perfringens* est fondée sur leur capacité à produire les 4 toxines majeures : alpha, beta 1, epsilon et iota. On utilise donc une classification phénotypique. Cinq types de *C. perfringens* sont ainsi définis dans la classification de Wildson, datant de 1933 et encore souvent utilisée aujourd'hui (cf. Tableau II). Les 5 profils sont eux-mêmes subdivisés selon les types de production de toxines dites mineures [Manteca et Daube 1994]. Les toxinotypes A, B et C se divisent respectivement en 2, 2 et 5 sous-types. Mais la classification en sous-types a une utilité restreinte. Alors que certains sous-types, ont une spécificité géographique ou d'hôte, leur intérêt diagnostique est nul, puisque les anticorps neutralisants utilisés pour le diagnostic sont dirigés contre les toxines majeures. Les valences mineures ne sont pas vérifiées [Daube 1992]. Deux autres toxines majeures existent, l'enterotoxine et la toxine δ , chez *C. perfringens* et ne sont donc pas utilisées pour le typage [Manteca et Daube 1994, Latour 2004, Uzal 2004]. Outre l'importance taxonomique de la classification phénotypique, elle permet de comprendre la pathogénie en associant chaque entité pathologique aux toxinotypes correspondants.

Tableau II : Principales maladies dues a *C. perfringens* chez les ovins et les caprins : classification toxingenique [Daube 1992, Manteca et Daube 1994, Uzal 2004]

| <i>C. perfringens</i> type | Toxines majeures produites | | | | Ovins | Caprins |
|----------------------------|----------------------------|---------|------------|---------|--|-----------------------|
| | α | β | ϵ | ι | | |
| A ⁽¹⁾ | ++ | - | - | - | Maladie de l'agneau jaune | Entérotoxémie |
| B ^(1 et 2) | + | ++ | + | - | Dysenterie de l'agneau | Entérite hémorragique |
| C ^(1 et 2) | + | ++ | - | - | Entérite hémorragique (jeune) Struck (adulte) | Entérite hémorragique |
| D | + | - | ++ | - | Maladie du rein pulpeux | |
| E | + | - | - | ++ | Entérotoxémie | Entérotoxémie |

++

Principale toxine produite

+ Toxine secondaire, en general produite en quantite moindre

- Toxine non produite

⁽¹⁾ Sous type

2) Classification genotypique [Rood 1998]

Des souches de meme toxinotype pourraient avoir des genomes differents, avec la mobilite probable de genes de la virulence, notamment des genes plasmidiques . La classification phenotypique, jugee trop restreinte, est progressivement abandonnee au profit d'une classification genotypique (Tableau III).

Tableau III : Toxinotypes et genotypes associes de *Clostridium perfringens*

| TOXINOTYPE | GÉNOTYPES ASSOCIES |
|------------|---|
| A | <i>plc</i> <i>plc, cpe</i> <i>plc, cpb2</i> <i>plc, cpb2, cpe</i> |
| B | <i>plc, cpb1, etx</i> <i>plc, cpb1, etx, cpe</i> |
| C | <i>plc, cpb1</i> <i>plc, cpb2</i> <i>plc, cpb1, cpe</i> <i>plc, cpb2, cpe</i> <i>plc, cpb1, cpb2, cpe</i> |
| D | <i>plc, etx</i> <i>plc, etx, cpe</i> |
| E | <i>plc, iap, ibp</i> <i>plc, iap, ibp, cpe</i> <i>plc, iap</i> |

1) ETUDE GENETIQUE

- Chromosome bacterien

C. perfringens est la premiere bacterie GRAM positif chez qui la carte genetique a pu etre dressee (figure 2).

La souche CPN50, qui sert de modele, possede un chromosome circulaire de 3,6 Mb ou 24 genes ou regions genetiques ont ete decodes. Le site d'origine de la replication est nomme *oriC*. A proximite se trouve la plupart des genes de toxines, soit 250 kb. Les genes toxiques situes sur le chromosome bacterien sont : *plc* le gene de la toxine , *pfoA* le gene de la toxine , *colA* le gene de la toxine , *nagH* gene de la toxine μ , *nanH* et *nanI* genes de la sialidase ...

Le gene de l'enterotoxine, *cpe*, est variablement situe sur le chromosome ou un plasmide. Tous ces loci constituent paradoxalement la region la plus instable, pour des raisons non connues a ce jour. Au contraire, les genes de regulation d'expression des genes toxiques avoisinent le site de terminaison de la replication, a l'oppose de *oriC*.

Les chromosomes de chacun des 5 toxinotypes ont une structure proche. La capacité de produire certaines toxines résulte de l'acquisition ou la perte de gènes de toxines spécifiques, situés sur des éléments extra chromosomiques.

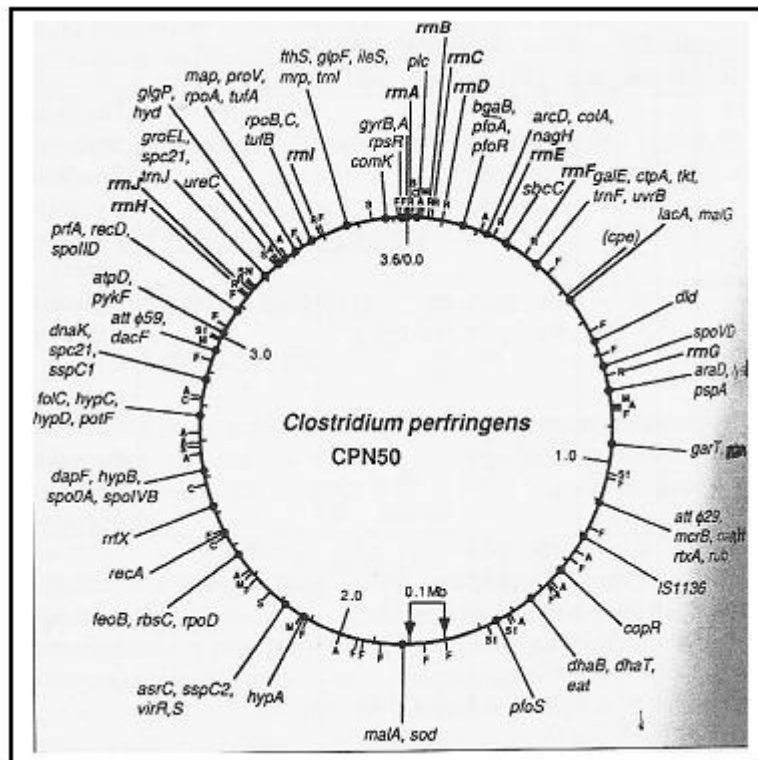


Figure 2: Carte génétique du chromosome de *C. perfringens* CPN₅₀ [Rood 1998]

-Gène *plc* : toxine :

La comparaison des séquences en nucléotides du gène *plc* de chaque toxinotype, révèle une identité phylogénique. La toxine comporte le même enchaînement en acides aminés chez tous les types de *C. perfringens*, avec peu de variantes. La différence entre le toxinotype A et les autres, résulte de la régulation de l'expression de *plc* et non d'une modification de sa séquence et l'aptitude à synthétiser les toxines , et . Gènes *pfoA* , *cola* , *nagH* et *am* : toxines enzymatiques.

Le gène *pfoA* code pour la toxine , perfringolysine O, dont l'action est hémolytique. Une étude sur *Escherichia coli* montre qu'une déletion sur le gène *pfoR* réduit l'activité hémolytique. Le gène *pfoA* semble donc régulé par

pfoR. Cette hypothese reste a confirmer pour *C. perfringens*. La perfringolysine module l'activite hemolytique du bacille, mais son role dans la virulence n'est pas essentiel. Le gene *colA* est separe de *pfoA* par 2 loci. Sa transcription donne une pro-collagenase, qui ne devient active qu'une fois liberee dans le milieu. Le role de la toxine dans la virulence reste a prouver.

De meme, les genes *nagH* et *lam* codent respectivement pour les enzymes - N-Acetylglucosaminidase soit la toxine μ et une caseinase, soit la toxine . Leur role dans la virulence demeure inconnu.

Genes *nanH* et *nanI* : sialidase Comme de nombreux pathogenes, *C. perfringens* produit une sialidase ou une neuraminidase, capables d'hydrolyser l'acide sialique, composant primordial des membranes cellulaires. Le gene *nanH* code pour une petite sialidase , d'un poids moleculaire de 42,8kDa, qui semble provenir des toxines homologues de *C. sordellii* et de *C. septicum*. Le gene *nanI* code pour une grande sialidase , d'un poids moleculaire de 73 kDa, dont la sequence en acides amines presente 26% de similitude avec la petite sialidase . Leur modalite d'action varie : ces 2 enzymes agissent a des temperatures optimales propre sur des substrats differents.

- Plasmides:

Les plasmides sont des elements extra-chromosomiques, instables et capables d'etre transfere d'une bacterie a une autre, permettant ainsi un echange d'information genetique, l'acquisition de resistance ou l'apparition de nouveaux caracteres.

- Gene *c pb1* : toxine 1

Ce locus est situe sur un grand plasmide. De nombreuses ressemblances ont ete identifiees avec le gene de la toxine de *Staphylococcus aureus*. La toxine 1 est constituee de 309 acides amines. Elle est tres instable dans le contenu digestif car sensible a la trypsine intestinale.

- Gene *c pb2* : toxine 2

Ce locus fut decouvert recemment. Il est situe sur un grand plasmide. Longtemps confondue avec la toxine 1, il s'est en fait avere que ces 2 toxines avaient des sequences tres differentes.

- Gene *etx* : toxine :

Il est situe sur un grand plasmide. Le gene *etx* code pour une chaine polypeptidique de 283 acides amines, qui apres clivage par la trypsine digestive, donne la toxine . D'importantes similitudes ont ete revelees, a hauteur de 20 et 27% de sequence identique avec les genes *mtx2* et *mtx3* chez *Bacillus sphaericus*. Cette ressemblance peut etre fortuite ou plus probablement due a une origine commune.

- Genes *iap/iab* : toxine

La production de la toxine caracterise le toxinotype E, particulierement rare. L'expression de ces genes est donc peu frequente. Par ailleurs, il s'agit de la seule toxine, composees de 2 chaines polypeptidiques. L'expression des genes *iap* et *iab* obeit a un promoteur unique. De meme que pour les autres genes de toxines plasmidiques, une ressemblance a ete etablie avec la toxine de *Bacillus anthracis*, avec 33% de sequence identique.

-Regulation de la production de toxines:

Si on met en culture croisee 2 souches mutantes, toutes 2 incapables de produire la toxine on observe tout de meme une hemolyse. Il a ete prouve que le premier mutant produisait une exo proteine, qui activait la synthese de la toxine chez le second mutant. En effet, le premier avait subi une mutation sur la sequence meme du gene de la toxine, et le second avait subit une mutation sur le gene de la proteine activatrice. Tous 2 etaient inaptes a produire la toxine mais la culture croisee a permis une complementation fonctionnelle. Cette experience montre qu'il existe des substances activatrices et que la synthese des toxines est regulee.

La regulation de l'expression des genes toxiques depend de substances activatrices et du systeme *virS/virR*. Ces genes sont chromosomiques. La proteine *virS* est enchassee dans la membrane cytoplasmique.

Suite a son activation par une substance extra-cellulaire, elle subit une autophosphorylation. Une reaction en cascade demarre, *via* la proteine *virR*, qui induit la transcription de genes toxiques. Les loci sensibles a cette

regulation sont *pfoA*, *nanH*, *nanI*, *colA* (et *colR* ?), *plrR*(?) qui a son tour stimule l'expression de *plc*. D'autres modalités de regulation existent, mais demeurent inconnues. [Rood 1998].

➤ Enterotoxine:

C'est la seule toxine synthetisee en phase de sporulation. Elle est codee par le gene *cpe*, localise sur le chromosome bacterien ou sur un plasmide. Seulement 6% des isolats de *C. perfringens* possedent le gene *cpe* et produisent la toxine. Le determinisme de la transcription du gene *cpe* n'est pas connu. L'hypothese de promoteurs communs avec les genes de la sporulation semble plausible [Rood 1998].

- NOUVELLE CLASSIFICATION :

Une simplification de la classification semble s'imposer au vu de l'affection decrite, meme si certains marqueurs epidemiologiques se revelent utiles pour le diagnostic de certaines souches. Cette classification ne repose plus sur le toxinotype mais sur la toxine principalement produite. On definit *C. perfringens* type A non producteur d'enterotoxine comme souche de base. Nous avons donc 5 categories de souches : type A non enterotoxinogene, celles produisant essentiellement les toxines , , ou l'enterotoxine [Daube 1992].

Tableau IV: Definition des nouvelles categories de *C perfringens* [Daube 1992]

| Catégorie | Facteur de virulence principal | Toxinotypes impliqués |
|-----------|--------------------------------|---|
| 1 | Toxine α | Type A non entérotoxigène |
| 2 | Toxine β | Type B non entérotoxigène Type C non entérotoxigène Type C entérotoxigène |
| 3 | Toxine ϵ | Type D non entérotoxigène Type D entérotoxigène |
| 4 | Toxine ι | Type E (le gène <i>cpe</i> n'est pas exprimé) |
| 5 | Entérotoxine | Type A entérotoxigène |

C. perfringens est l'agent principal d'entérotoxémie chez les petits ruminants. Les ovins et les caprins sont sensibles à chacun de ses toxinotypes, avec cependant des spécificités liées à l'espèce et à l'âge, induisant une variabilité au niveau de l'expression clinique. (cf II. Etiopathogénie et III Etude clinique). *C. sordellii* et *C. septicum* sont également responsables d'entérotoxémie chez les ovins et les caprins.

CHAPITRE II :

Epidimiologie

II.1. EPIDÉMIOLOGIE DESCRIPTIVE

II.1.1. ESPÈCES SENSIBLES ET RÉPARTITION GEOGRAPHIQUE

C. perfringens est une espèce bactérienne présente dans le tube digestif de toutes les espèces animales et de l'Homme. Sa répartition est mondiale. Certains toxinotypes ont des spécificités géographiques ou d'hôte (Tableau V).

Tableau V : Maladies associées aux divers toxinotypes (classification traditionnelle) de *C. perfringens*, espèces cibles, répartition [Daube 1992]

| Toxinotype | Symptomatologie associée | Espèces cibles | Distribution |
|----------------|------------------------------|------------------------|--------------------------------|
| A ₁ | Gangrène gazeuse | Homme | Cosmopolite |
| | Mammite | Bovin | G-B, Japon |
| | Entérite nécrotique | Volaille | Cosmopolite |
| | Colite | Equins | Scandinavie |
| | Commensal de l'intestin, sol | Homme, animal | Cosmopolite |
| A ₂ | Intoxication alimentaire | Homme | Cosmopolite |
| B ₁ | Dysenterie de l'agneau | Ovins, bovins, équins | Afrique du Sud, G-B |
| B ₂ | Entérotoxémie | Ovins, caprins | Iran |
| C ₁ | Struck | Ovins | Afrique du Sud, G-B, Australie |
| C ₂ | Entérite nécro-hémorragique | Ovins, bovins, équins | USA, G-B |
| C ₃ | Entérite nécro-hémorragique | Porcelet | USA, G-B, Scandinavie |
| C ₄ | Entérite nécro-hémorragique | Homme, volaille | Allemagne |
| C ₅ | Entérite nécro-hémorragique | Homme | Papouasie nouvelle Guinée |
| D | Entérotoxémie | Ovins, caprins, bovins | Cosmopolite |
| E | Entérotoxémie | Ovins, bovins | G-B, Australie |

Chez les caprins, *C. perfringens* A et D sont les plus souvent incriminés lors d'entérotoxémie. Les autres types ont été cependant signalés : *C. perfringens* B en Iran et *C. perfringens* C en Angleterre et aux Etats-Unis [Chartier et Broqua 1995].

Les ovins sont sensibles à davantage de toxinotypes différents, mais les toxinotypes A et D demeurent les plus fréquents [Songer 1998].

II.1.1.1. Chez les caprins

L'entérotoxémie est la seconde cause de diarrhées (20% des cas) chez la chèvre [Mitchell 1999]. De plus, 30% des autopsies caprines à l'AFSSA site de Niort sont des entérotoxémies. C'est un motif de réforme non négligeable : sur un taux de réforme moyen de 27% en élevage laitier intensif, la moitié des sorties ont une cause digestive : acidose et/ou entérotoxémie (motif de réforme exact parfois non différencié). Ces valeurs sont tributaires du mode d'élevage, puisqu'en Australie où l'élevage caprin est extensif, l'entérotoxémie ne représente que 6,8% des autopsies [Chartier 2002].

L'étude de 78 souches de Clostridium isolées au laboratoire d'étude et de recherche caprine (LERC) de l'AFSSA site de Niort, a révélé que le toxinotype *C. perfringens* A était isolé dans 54% des cas confirmés d'entérotoxémie, suivi de *C. perfringens* D avec 29% des cas, puis de *C. sordellii* avec 16% des cas et de *C. septicum* avec 1% des cas (figure 3) [Chartier et Broqua 1995].

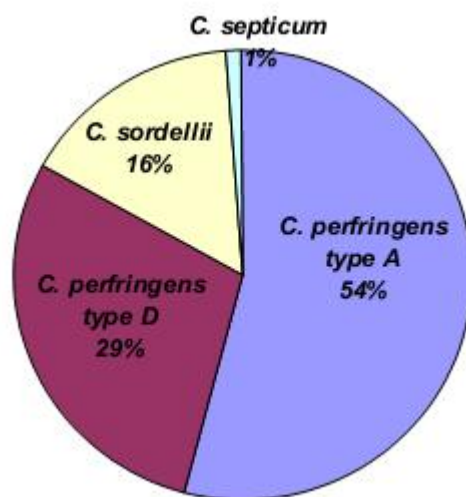


Figure 3 : Proportion des différents toxinotypes de Clostridium dans les entérotoxémies caprines [Chartier et Broqua 1995].

Parmi les entérotoxémies dues à *C. perfringens*, environ 65% sont causées par le type A et 35% par le type D. Malgré la prédominance apparente du toxinotype A, les scientifiques ont longtemps douté de sa réelle pathogénicité. Le toxinotype D est traditionnellement considéré comme le principal agent étiologique d'entérotoxémie caprine. Une étude menée sur des espèces exotiques met effectivement en évidence une prévalence du toxinotype D supérieure à celle du toxinotype A chez les chèvres [Sipos et al. 2003]. De plus, les méthodes modernes de laboratoire ont rapidement permis de reproduire des entérotoxémies de type D et de les modéliser assez efficacement. Les scientifiques ont validé la pathogénicité du type D mais pas celle du type A. Par ailleurs, le toxinotype A a été longtemps jugé inoffensif car ubiquiste et commensal de l'intestin. Les nouvelles méthodes de diagnostic arrivées dans les années 1990, comme la PCR et surtout ELISA ont permis de faire émerger l'hypothèse du toxinotype A. Cette hypothèse n'a pas encore fait ses preuves car l'entérotoxémie de type A est difficilement reproductible expérimentalement [Manteca 2005 communication personnelle].

II.1.1.2. Chez les ovins

Chez les ovins, l'incidence la plus élevée de l'entérotoxémie concerne les jeunes de 1 à 4 mois [Popoff 1979]. Une étude effectuée à l'échelle européenne révèle les résultats suivants pour la France (figure 4) : *C. perfringens* est l'agent majeur d'entérotoxémie ovine. Les toxinotypes impliqués sont d'abord le type A, suivi du type D [Manteca et al. 2005].

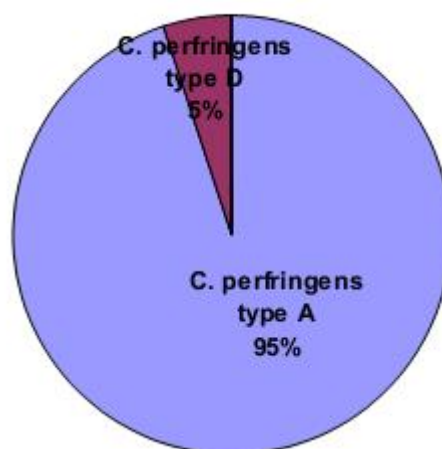


Figure 4 : Proportion des différents toxinotypes de *Clostridium perfringens* dans les entérotoxémies ovines [Manteca et al. 2005].

C. perfringens type A est le principal agent étiologique d'entérotoxémie ovine en France. Le toxinotype D est très minoritaire. Comme chez les caprins, on a longtemps pensé que le toxinotype A était inoffensif chez l'adulte et que la majorité des cas d'entérotoxémie étaient dus au toxinotype D. L'entérotoxémie de type A chez les ovins était traditionnellement décrite uniquement chez le jeune et appelée « maladie de l'agneau jaune ». Aucune autre forme de la maladie n'avait été décrite pendant longtemps. Les nouvelles méthodes diagnostiques comme le test ELISA et la PCR, permettent d'obtenir de mettre en évidence la forte prévalence du toxinotype A et de lui imputer un rôle pathogène.

Ces résultats ont été obtenus sur un échantillon de seulement 24 ovins. Ce faible effectif n'a pas permis la mise en évidence de certains agents étiologiques connus, mais moins fréquents, dans l'espèce ovine tels que *C. perfringens* B et C ou de *C. septicum*.

C. sordellii a été isolé chez 16% des individus, seul ou associé à *C. perfringens* type A. On ne lui impute pourtant pas d'effet pathogène. Les souches isolées n'étaient pas virulentes : les

tests de détection des gènes de toxines majeures étaient négatifs. La situation semblerait différente dans le Sud de l'Europe (Espagne, Portugal). Des études supplémentaires sont nécessaires pour étayer cette hypothèse [Manteca et al. 2005].

II.1.2 FORME ÉPIDÉMIOLOGIQUE

Chez les ovins, les entérotoxémies évoluent sous forme de cas sporadiques (cas isolés dans le temps) ou de flambées épizootiques (nombreux cas sur une courte période), avec un taux de prévalence pouvant varier de 5 à 30% des animaux. Bien qu'il n'y ait pas de transmission directe de la maladie d'un animal à un autre, plusieurs cas simultanés peuvent apparaître dans un élevage du fait que tous les animaux sont soumis aux mêmes facteurs de risque [Popoff 1994].

L'allure des épisodes entérotoxémiques chez les chèvres est identique, mais dans certains élevages caprins, l'entérotoxémie peut perdurer de manière enzootique, avec apparition de nouveaux cas chaque semaine ou chaque mois. De plus, la chèvre présente une forme chronique, individuelle, rare et souvent non diagnostiquée, de la maladie [Smith et Shermann, niveau suite à l'excrétion par de nombreux animaux malades ou porteur, peut générer de nouveau cas spontanément [Chartier 2002].

II.1.3 CATÉGORIES D'ANIMAUX ATTEINTS

Le mode d'élevage intensif semble corrélé aux troubles entérotoxémiques. Les formes ovines et caprines ne sévissent pas dans les mêmes systèmes de production. Chez les ovins, l'entérotoxémie frappe davantage les agneaux à l'engraissement. Pour la chèvre, l'affection est plus fréquente chez l'animal adulte en production. Le toxinotype majeur varie en fonction de l'âge et l'espèce (Tableau VI) [Chartier et Broqua 1995].

Tableau VI : Fréquence relative des agents étiologiques d'entérotoxémie en fonction de l'âge chez les ovins et les caprins [Popoff 1989 et 1994].

| Type de <i>Clostridium</i> | Nouveau né | | Jeune (>3 sem) | | Adulte | |
|----------------------------|------------|--------|----------------|--------|--------|--------|
| | Ovin | Caprin | Ovin | Caprin | Ovin | Caprin |
| <i>C. perfringens</i> A | - | - | ++ | + | ++ | ++ |
| <i>C. perfringens</i> B | + | - | - | - | + | + |
| <i>C. perfringens</i> C | ++ | ++ | + | - | + | - |
| <i>C. perfringens</i> D | + | + | ++ | ++ | ++ | ++ |
| <i>C. perfringens</i> E | + | - | - | - | - | - |
| <i>C. sordellii</i> | + | + | + | + | + | + |
| <i>C. septicum</i> | - | - | + | + | - | - |

- non décrit

+ possible ou rare

++ courant

Les raisons de cette spécificité ne sont pas totalement expliquées. L'âge et le mode d'élevage sont 2 facteurs de risque de forte influence. (cf. partie II.2.3 Facteurs de

risque). L'entérotoxémie due à *C. perfringens* type A sévit davantage chez les adultes, les types B et C apparaissent essentiellement chez les nouveau-nés et le type D concerne tous les âges. *C. sordellii* et *C. septicum* étant rare, ils n'ont été que peu observés. *C. sordellii* apparaît à tout âge [Popoff 1989 et 1994].

II.2. EPIDÉMIOLOGIE ANALYTIQUE

II.2.1. SOURCES

Deux sources de contamination pour les ruminants sont connues : les sols, où *C. perfringens* résiste sous forme sporulée plusieurs mois voire années, et les animaux sains ou malades, qui excrètent les clostridies dans leurs fèces.

II.2.1.1 Les sols

Les sols souillés par les matières fécales peuvent contenir 10^4 UFC/g [Duchesnes et al. 2005].

Cette valeur sous estime probablement la charge réelle en bactérie, car le nombre de spore est souvent supérieur aux UFC.

Les clostridies sporulés survivent de longues périodes dans les sols et l'environnement.

II.2.1.2 Le tractus digestif des animaux

1- CHEZ LES ANIMAUX NOUVEAU NÉS

A la naissance, le tractus digestif stérile est colonisé, chez la plupart des espèces animales, primitivement par *Escherichia coli*, *C. perfringens* type A et *Streptococcus*. Ces bactéries pénètrent par voie orale, lors des tétées (mamelle souillée) ou du léchage

d'objets. Elles constituent la flore intestinale avant d'être remplacées par une microflore à métabolisme lactique (lactobacilles, Bifidobacterium). Une étude chez les jeunes veaux montre que la population de *C. perfringens* est insignifiante dans la caillette, le duodénum et le jéjunum ($<10^3$ UFC/g), elle est sensiblement plus élevée dans l'iléon (10^4 - 10^5 UFC/g) et peut être importante dans le caecum et les segments postérieurs ($>10^8$ UFC/g).

Par la suite, la flore intestinale croît et le nombre de germes anaérobies se stabilise entre 10^{10} et 10^{11} bactéries par gramme de contenu intestinal [Popoff 1989].

2- CHEZ LES ANIMAUX ADULTES

Sur 18 petits ruminants sains, *C. perfringens* et ses toxines ont pu être mis en évidence chez 13 individus, les 5 autres étaient indemnes de clostridies. L'analyse génétique des souches de *C. perfringens* prélevées sur ces 13 ovins et caprins, révèle la présence de la toxine dans 100% des prélèvements et de la toxine dans 15% des prélèvements [Uzal 2004]. Une autre étude sur un effectif plus grand à l'abattoir, révèle que la toxine est détectée chez 46% des ovins et des souches de *C. perfringens* type D ont été isolées [Daube 1992].

C. perfringens est donc une bactérie commensale de l'intestin des animaux, mais elle n'est pas présente chez tous les individus. *C. perfringens* type A semble plus fréquent que le type D. Les types B et C sont plus rares.

- ECOLOGIE DIGESTIVE :

La population digestive des clostridies commensales de l'intestin est faible, estimée à moins de 10^4 UFC/g [Popoff 1994]. Il existe un équilibre entre les populations bactériennes. Cet équilibre dépend des interactions entre alimentation et bactéries d'une part et bactéries entre elles d'autre part. Plusieurs mécanismes assurent l'équilibre de la flore digestive : la compétition pour le substrat, la chaîne trophique, le pH, la production de composés toxiques, les traitements antibiotiques, le péristaltisme et les modifications de la bile [Popoff 1989].

Une rupture de l'équilibre (ou la destruction) de la flore intestinale libère des niches écologiques. Les bactéries à cycle court en profitent davantage, car elles prolifèrent plus vite que les autres et colonisent le milieu. Dix minutes sont nécessaires entre 2

génération de Clostridium. En une heure, la bactérie réalise 7 cycles. La rupture de l'équilibre de la flore digestive provoque donc une véritable explosion bactérienne, en faveur des clostridies [Philippeau et al. 2003].

II.2.2. CONTAMINATION

II.2.2.1 Contamination par C. perfringens

1- CHEZ LE NOUVEAU NÉ

La contamination orale par un Clostridium toxigène dans les premières heures de vie peut permettre une colonisation à un niveau élevé du tube digestif par celui-ci du fait de l'absence totale ou partielle des effets répresseurs de la flore digestive. La bactérie se multiplie jusqu'à 10^9 UFC/g. C. perfringens types B et C se rencontrent dans le cadre d'une entérotoxémie chez les animaux de moins de 3 jours [Niilo 1988, Popoff 1989].

Les facteurs induisant la prolifération de C. perfringens type C et la production de toxine sont encore peu connus. Les clostridies se développent dans l'intestin au cours d'une période de jeûne ou de changement alimentaire chez l'agneau de moins de 10 jours. [Popoff 1994].

2- CHEZ LE JEUNE ET L'ADULTE

L'analyse génétique de souches pathogènes de C. perfringens type A chez des veaux malades a prouvé qu'elles étaient résidentes du tube digestif, et non des souches spécifiques d'entérotoxémie, particulièrement pathogènes et venues de l'extérieur [Manteca et al 2003].

Il a été également prouvé que la simple ingestion de Clostridium ne permettait pas le développement de la maladie car 90% de ces micro-organismes étaient détruits dans le rumen ou la caillette, et ne peuvent atteindre de duodénum .

Ces 2 exemples confortent l'hypothèse que le développement de l'entérotoxémie est dû à la prolifération de clostridies déjà présents dans le tractus digestif et non à la contamination brutale par des germes présents dans l'environnement des animaux. Par

ailleurs il existe une contamination orale, faible et constante des animaux, par les spores de l'environnement. Cette présence de bactéries et de toxines dans l'intestin des animaux sains se traduit par une séroconversion chez le mouton et chez la chèvre.

Cette immunité naturelle n'empêche cependant pas les fortes pertes dues à l'entérotoxémie [Daube 1992].

II.2.2.2 Contamination par *C. sordellii* et *C. septicum*

C. sordellii n'a été isolé que chez l'animal malade. Son absence chez l'animal sain sous entend que la contamination orale est déterminante pour la maladie [Shoenian 2005]. Il en va de même pour *C. septicum*. Des spores peuvent se loger dans le foie des ovins [Songer 1998].

Clostridium perfringens est une bactérie commensale de l'intestin, mais elle n'est pas présente chez tous les individus. Les jeunes animaux se contaminent primitivement par ingestion de bactéries lors des tétées sur des surfaces souillées par les fèces des adultes, ou de spores persistant dans l'environnement. Il existe aussi une contamination orale, faible et constante des adultes. La population clostridienne dans le tractus digestif est insignifiante car inhibée par les autres bactéries digestives. *C. perfringens* type A est plus fréquent que le type D. Les types B et C, ainsi que *C. sordellii* et *C. septicum* semblent absents chez les animaux sains. Une rupture de l'équilibre de la flore digestive est favorable au développement de *Clostridium* car son cycle de replication est très court. On assiste alors à une explosion de la population clostridienne.

II.2.3. FACTEURS DE RISQUE:

Les clostridies prolifèrent dans l'intestin à la faveur d'une rupture de l'équilibre de la flore intestinale. La rapidité du cycle de ces bactéries constitue un atout majeur pour coloniser le milieu.

Les facteurs de risque de rupture de cet équilibre sont proches de ceux de l'acidose.

II.2.3.1 Atonie intestinale

1- PARASITISME

L'infestation parasitaire peut provoquer une modification de la flore intestinale, une diminution du péristaltisme, une augmentation de la perméabilité intestinale et une destruction de la muqueuse. Ces altérations du tractus digestif et le ralentissement du transit favorisent la prolifération des clostridies et la pénétration des toxines dans l'organisme.

Une helminthose intestinale, hépatique ou pulmonaire et une coccidiose sont des facteurs de risque fréquents d'entérotoxémie. D'une manière générale, ils potentialisent le développement et l'action de *Clostridium* [Popoff 1989, Uzal et Kelly 1996].

- ALIMENTATION

Les principaux facteurs de risque alimentaires sont les mêmes que ceux de l'acidose ruminale.

Equilibre de la ration .Une alimentation riche et concentrée constitue un facteur de risque important.

Chez le jeune Les agneaux et les chevreaux nourris avec de grands volumes de lait maternisé ou allaités par une mère hautement productrice sont les candidats typiques à l'entérotoxémie.

Paradoxalement, une forte croissance ou un bon état corporel appellent à la vigilance.

Chez l'adulte Le déséquilibre permanent ou accidentel de la ration des adultes représente un facteur de risque à entérotoxémie. La faible fibrosité de la ration et la forte concentration d'aliments à

fermentation rapide (ration acidogène) modifient la flore intestinale et favorisent le développement de Clostridium. Les alimentations hyper glucidiques pourraient stimuler la toxinogénèse. Par ailleurs, des travaux menés sur la reproduction expérimentale de la maladie ont mis en évidence que son succès était lié à la présence dans l'intestin d'aliments partiellement ou non digérés. Les protéines peu ou pas dégradées favorisent la multiplication des anaérobies qui ont un équipement enzymatique puissant par rapport à la flore acidogène qui préfère les acides aminés et les oligo-peptides [Popoff 1979].

Une ration riche en protéine est donc un facteur de risque important. Un déséquilibre de ration peut provoquer un état de chronicité. Plusieurs cas d'entérotoxémie peuvent apparaître étalés dans le temps.

- Changement alimentaire

Le changement brutal de ration alimentaire est un facteur de risque important. Qu'il s'agisse de la reprise alimentaire après un jeûne ou d'une modification de ration, une transition progressive est indispensable. En effet, le déséquilibre de la flore digestive et la fragilité passagère de la paroi intestinale occasionnés par le changement alimentaire sont des facteurs de prolifération de Clostridium. Un exemple courant est le passage du troupeau sur une nouvelle pâture, plus luxuriante. De même, un apport brusque et important de céréales ou de fourrage de haute qualité est une situation (accidentelle ou non) fréquemment à l'origine d'épisodes de maladie.

Cependant des troupeaux de chèvres peuvent être nourris avec une ration riche ou peuvent supporter des changements alimentaires brutaux sans pour autant développer la maladie. Selon eux, d'autres facteurs sont nécessaires à l'apparition de la maladie [Smith et Sherman 2002].

Aliments contenant des anti-trypsiques

Les rations contenant des inhibiteurs de protéases digestives (soja, luzerne...) risquent de déclencher des entérotoxémies. Ces aliments anti-trypsiques empêchent la dégradation de la toxine par les enzymes digestives. Il a été possible expérimentalement d'induire la maladie chez un mouton adulte, en le nourrissant

avec de la farine de soja et en lui inoculant *C. perfringens* type C [Daube 1992, Niilo 1988].

Aliments contaminés

Les aliments industriels ayant subi un traitement thermique insuffisant ou stockés dans de mauvaises conditions peuvent être vecteurs de *C. perfringens*. La toxine a notamment été isolée à plusieurs reprises (une étude menée par un laboratoire sur 3 ans, recense plusieurs cas chaque année) dans des aliments pour rongeurs ou oiseaux et elle aurait été responsable d'épisodes de mort subite avec entérite. Ces granulés n'induisent pas systématiquement une entérite clostridienne, mais ils constituent un facteur de risque probablement sous estimé [Greenham et al. 1987].

Traitements

Des surdosages de netobimin (Hapadex®) à hauteur de 4 fois la dose normale autorisée pour les chèvres et 7 fois la dose chez le bouc, se sont avérés responsables de cas d'entérotoxémie.

Chez les caprins, le surdosage des anthelminthiques est fréquent pour deux raisons : l'utilisation hors AMM chez les caprins, l'administration parfois volontairement de doses doubles, et le drogage en dose unique pour l'ensemble du troupeau [Uzal et al. 1994]. La phénothiazine et certains traitements antibiotiques seraient responsables de la maladie chez des ovins. Un surdosage détruit la flore intestinale, laissant la place libre aux clostridies.

II.2.3.2 Climat

Des variations brutales du climat sont génératrices de stress et provoquent un affaiblissement de l'animal. Plusieurs cas d'entérotoxémie peuvent apparaître au sein d'un troupeau à la faveur d'une chute importante de température. L'ingestion d'eau glacée a été mentionnée comme facteur prédisposant chez les caprins [Uzal et Kelly 1996].

II.2.3.3 Mode d'élevage

Les systèmes intensifs sont prédisposés au développement d'entérotoxémie. Le rationnement en est la principale raison. Les agneaux à l'engrais et les chèvres

laitières en élevage intensif ou semi intensif sont ainsi particulièrement vulnérables. Au pâturage, quelques cas ont été cependant décrits chez la chèvre angora [Uzal et Kelly 1996].

-Les facteurs de risque d'entérotoxémie sont globalement identiques pour les ovins et les caprins. Tout paramètre susceptible de provoquer un déséquilibre de la flore intestinale peut déclencher un épisode entérotoxémique.

- Une conduite d'élevage intensive avec un rationnement acidogène (agneaux à l'engrais et chèvres laitières), un parasitisme, un stress thermique, des traitements antibiotiques ou anthelminthiques, ... sont autant de facteurs de prédisposition.

Dans la mesure où la plupart de ces paramètres influencent le troupeau entier, il est plus fréquent d'observer des épisodes à allure épizootique.

II.2.4. SENSIBILITÉ SPÉCIFIQUE

La sensibilité se définit comme étant l'aptitude à exprimer cliniquement l'action d'un agent pathogène.

II.2.4.1 Prédisposition raciale :

1- Sensibilité digestive : les hypothèses d'hier et d'aujourd'hui :

L'entérotoxémie caprine se caractérise par une entéro-colite parfois associée à une toxémie. Les ovins présentent au contraire peu de signes digestifs, mais des symptômes généraux et nerveux (cf. III. Etude clinique). Par ailleurs, certaines races caprines (Angora) sont particulièrement vulnérables.

La variabilité d'expression clinique de la maladie chez les ovins et les caprins amène à supposer une différence de sensibilité digestive et systémique de ces deux espèces vis-à-vis de *C. perfringens* et en particulier de la toxine sécrétée par *C. perfringens* type D.

Les facteurs de sensibilité aux toxines ne sont pas encore clairement établis. Plusieurs hypothèses sont émises mais aucune n'a été confirmée à ce jour [Uzal et Kelly 1998].

Chez les ovins, les lésions digestives sont rares et concernent préférentiellement l'intestin grêle. L'abrasion de la muqueuse duodénale et jéjunale permet la pénétration de la toxine dans l'organisme, donc des effets systémiques. Au contraire, chez les caprins, les lésions sont situées en aval, au niveau du caecum et du colon.

On pose alors l'hypothèse que si l'intestin grêle des chèvres était plus résistant aux effets des toxines, alors le risque d'intoxination sanguine diminuerait par défaut pénétration des toxines dans l'organisme. Les effets systémiques seraient moindres. En revanche, les toxines resteraient concentrées dans le tractus intestinal, ce qui augmenterait l'exposition de la muqueuse des segments distaux. La paroi du gros intestin étant de surcroît plus sensible, subirait alors d'importantes lésions de colite et de typhlite. Des expérimentations ont été menées pour étudier les effets de la toxine chez les ovins et les caprins, et de la toxine chez les ovins sur les différentes portions du tractus digestif [Mariano et Uzal 2005]. Les résultats n'ont pas mis en évidence une différence de sensibilité au niveau de la muqueuse intestinale quel que

soit le segment et quelle soit l'espèce étudiés. Aucune étude à ce jour n'a permis de confirmer cette hypothèse, mais elle semble très plausible. L'identification de récepteurs toxiques sur les cellules épithéliales de l'intestin grêle ou la mise en évidence de facteurs d'activation des toxines seraient utiles pour préciser cette piste.

- Durée du transit digestif [Uzal et Kelly 1998]

Chez la chèvre adulte, le bol alimentaire séjourne 3 heures dans l'intestin grêle et 18 heures dans le colon. Le transit digestif est plus rapide chez les ovins, notamment au niveau du gros intestin. La rapidité de prolifération des clostridies dans le colon et une longue exposition à l'action des toxines pourraient expliquer l'ampleur des lésions coliques chez les caprins.

Une expérience infirme cette hypothèse : un chevreau développe une colite hémorragique et nécrotique moins de 5 heures après inoculation intra-duodénale de *C. perfringens* type D. Par ailleurs, le ralentissement du péristaltisme chez le mouton sous l'effet d'opium et Belladonna ne permet pas d'obtenir des lésions coliques similaires à celle des caprins.

La gravité des symptômes ne dépendrait donc pas de la vitesse de transit dans les différentes portions du tractus digestif.

- Action des enzymes digestives sur les toxines

Une autre hypothèse propose que les toxines sont activées par des substances présentes dans le colon des chèvres. En effet, *C. perfringens* type D secrète une prototoxine qui nécessite le clivage du 49^{ème} acide aminé pour être active, mais cette réaction est catalysée par la trypsine pancréatique et entérique au niveau du duodénum. La toxine est alors activée dans l'intestin grêle et non dans le colon.

Cette supposition ne peut donc pas expliquer l'inconstance des lésions digestives chez les ovins et la gravité des lésions coliques chez les caprins [Uzal et Kelly 1998].

- Immunité acquise naturellement

Une infection subclinique permettrait l'absorption de toxine à dose infime mais suffisante pour stimuler le système immunitaire. Des animaux sains et sans antécédent d'entérotoxémie clinique ni de vaccination peuvent alors présenter des anticorps

sériques antitoxine . Dans certains cas, ce titre d'anticorps serait suffisant pour protéger d'une infection (0,1 UI /mL) [Uzal et al. 2004].

Cette immunité naturelle est connue depuis longtemps chez le mouton mais elle est plus récente chez la chèvre [Daube 1992].

- SENSIBILITÉ DES CELLULES CÉPHALIQUES [UZAL ET AL. 1999]

La toxine a un tropisme élevé pour les cellules endothéliales céphaliques ovines. La dégénérescence et la mort rapide de ces cellules ont été mises en évidence in vivo. La toxine provoquerait la nécrose de l'endothélium vasculaire cérébral, aboutissant à une augmentation de perméabilité des parois vasculaires et donc à la formation d'oedèmes. Chez les ovins, les signes nerveux dus à l'oedème cérébral dominant le tableau clinique. Mais chez les caprins, les troubles neurologiques sont beaucoup moins fréquents et les convulsions peuvent être attribuées à l'hypoxie générée par l'oedème pulmonaire. Le rôle de la toxine sur les cellules endothéliales et sur l'encéphale chez les caprins n'est pas établi.

L'hypothèse admise est qu'il existe un récepteur à la toxine sur les cellules endothéliales vasculaires cérébrales ou les cellules nerveuses de l'encéphale chez les ovins mais pas chez les caprins. L'étude comparative entre cellules endothéliales (prélevées sur l'aorte) ovines et

caprines révèle tout d'abord qu'aucune d'entre elle n'est altérée par la toxine , même à forte concentration. La viabilité est estimée à 90%. Au contraire, les cellules MDCK sont détruites progressivement par le même traitement. L'ajout de sérum neutralisant antitoxine permet la survie des cellules MDCK. L'existence d'un récepteur à la toxine est prouvée pour les cellules MDCK. Alors qu'elles pouvaient servir de modèle applicable aux cellules de l'encéphale de mouton, l'expérience montre que les cellules endothéliales étudiées sont dépourvues de récepteur à toxine tant chez les ovins que chez les caprins. L'hypothèse n'a pas été totalement rejetée car l'étude était menée sur des cellules prélevées sur l'aorte et non sur des cellules endothéliales de l'encéphale, qui présentent de nombreuses particularités par rapport aux cellules endothéliales systémiques. Le doute persiste quant à la présence de récepteurs spécifiques à la toxine sur les cellules endothéliales de la barrière hémato-méningée.

L'étude demeure d'autant plus difficile que la toxine seule reste inactive sur les cellules in vitro. L'absence d'éléments du sérum ou d'interaction avec la paroi vasculaire peut être aussi déterminante quant à l'échec de l'expérience.

II.2.4.2 Age

L'entérotoxémie de types B et C atteint surtout les nouveau-nés dans leurs premiers jours de vie. La toxine 1 étant inactivée par la trypsine digestive, elle n'agit que dans l'intestin du jeune, chez qui le pool enzymatique est encore immature donc incomplet. Par ailleurs, le colostrum contient des anti-trypsiques. Il favorise donc l'action de la toxine 1 [Van Metre et al. 2000]. Les jeunes issus d'une mère vaccinée pourraient être protégés. Mais l'insuffisance colostrale ou les portées nombreuses sont des facteurs de risque non négligeables [Dray 2004]. Chez les animaux adultes, les épisodes d'entérotoxémie sont plutôt ponctuels et sont souvent provoqués par un passage brutal d'une ration pauvre en protéines à une ration plus riche [Niilo 1988, Daube 1992].

ETUDE CLINIQUE

II.3.1 DIAGNOSTIC

Le diagnostic de laboratoire est indispensable pour confirmer une suspicion clinique d'entérotoxémie et établir un diagnostic définitif.

II.3.2 PRÉLÈVEMENTS

Les prélèvements doivent permettre la recherche des toxines et/ou la mise en évidence des bactéries. La recherche de toxine s'effectue sur contenu digestif, les liquides d'épanchement, le sang et les organes cibles. La recherche de bactéries se fait préférentiellement sur contenu digestif.

II.3.2.1 Tractus et contenu digestif

Le prélèvement est effectué dans les heures qui suivent la mort, soit 6 heures post mortem pour une recherche de toxine, soit 3 heures post mortem pour un diagnostic bactériologique.

Mais ces délais sont difficilement réalisables en élevage [Daube 1992, Philippeau et al. 2003]. En effet, la labilité des toxines dans le contenu intestinal oblige à effectuer les prélèvements sur cadavre frais, et éventuellement à les réfrigérer en attendant l'analyse. Un prélèvement tardif accroît donc les risques de résultats « faux négatifs » [Philippeau et al. 2003]. Par ailleurs, l'anaérobiose post mortem est une condition favorable à la multiplication et la diffusion des clostridies dans l'organisme, tant chez l'animal mort d'entérotoxémie que chez l'animal sain.

La cinétique de croissance bactérienne dans le contenu intestinal après la mort reste à étudier chez les petits ruminants.

Un prélèvement trop tardif ne permet plus de différencier sur la base du dénombrement bactérien, un animal entérotoxémique d'un animal sain ou mort d'une autre cause [Philippeau et al. 2003].

Le segment digestif à prélever varie selon l'espèce. Chez les ovins il est intéressant de prélever au niveau de l'intestin grêle, tandis que chez les caprins, les segments lésés sont davantage situés en aval : caecum et colon.

Deux techniques sont possibles pour le prélèvement du contenu digestif, mais dans tous les cas l'anaérobiose doit être maintenue. La première technique préconise de remplir des flacons stériles à ras bord avec le simple contenu digestif et de les fermer hermétiquement [Philippeau et al. 2003]. Dans la seconde, des portions de tractus digestif d'environ 15 cm sont prélevées et ligaturées de manière à préserver l'anaérobiose [Van Metre et al. 2000]. Dans ce cas, le dénombrement bactérien risque d'être sous-estimé, donc peu fiable [Latour 2004].

Les prélèvements sont effectués rapidement à cause de la croissance bactérienne et de la labilité des toxines. La concentration de la toxine chute de 90% en 24 heures dans le tractus digestif de l'animal mort [Blackwell et al. 1991]. Les prélèvements sont envoyés au laboratoire d'analyse, avec un délai de conservation maximal de 24 heures à 4°C. La congélation est proscrite car non supportée par les clostridies [Philippeau et al. 2003]. L'addition de conservateurs comme le formol classiquement utilisé pour conserver les prélèvements en vue d'une étude histologique, est susceptible de compliquer l'interprétation des tests.

L'anaérobiose doit être conservée et l'emploi de conservateurs est également déconseillé.

II.3.2.2 Urine

Les urines sont facile à prélever et constituent une précieuse aide diagnostique. Sur un ovin vivant, une courte période d'asphyxie provoque l'émission d'urine. Pour cela, il suffit d'appliquer la main sur la bouche et le nez de l'animal. Cette manœuvre est sans danger, même sur un animal très abattu. Au cours d'une autopsie, le prélèvement d'urine est riche d'enseignement (cf. III.3.2.5.1). Cet acte quasi indispensable chez les ovins n'est pas forcément réalisé chez les caprins. En effet, chez les ovins, la présence de glucose dans les urines est quasi constante, alors que dans l'espèce caprine, l'inconstance de la glucosurie rend ce paramètre peu fiable. [Popoff 1979, Uzal 2004, Uzal et al. 2004].

II.3.2.3 Liquide péricardique

Ce prélèvement est effectué au cours de l'examen nécropsique. Il semble davantage utile chez la chèvre que chez le mouton. La détection de glucose dans le liquide péricardique chez la chèvre morte d'entérotaxémie est relativement constante [Uzal 2004].

II.3.2.4 Tissus et autres sérosités

Ce genre de prélèvement est réalisé plus souvent dans le domaine de la recherche et peu en pratique. L'objectif principal est la mise en évidence des bactéries, des toxines ou des lésions.

Les sérosités sont prélevées sur tube sec ou dans un pot stérile. La toxine *C. botulinum* tolère une conservation longue, évaluée à 48 semaines à 4°C [Uzal 2004]. La congélation des prélèvements est possible (sauf en vue d'un examen bactériologique). Elle évite la labilité de la toxine *C. botulinum*, mais elle mal tolérée par la toxine *C. botulinum*. L'utilisation de conservateurs est déconseillée car elle complique l'interprétation des tests [Van Metre et al. 2000]. Des fragments d'organe peuvent être également destinés à l'examen histologique, on les conserve alors dans une solution de formol à 10% [Mariano et Uzal 2005]. Les organes concernés à la microscopie sont les organes cibles des

toxines : encéphale surtout chez les ovins, paroi digestive surtout chez les caprins, le foie, les reins, la rate, les poumons et des éléments de l'appareil circulatoire.

Les parties lésées sont prélevées pour la recherche et le dénombrement bactériologique

II.3.2.5 Sang

La prise de sang est effectuée sur tube sec pour effectuer une recherche sérologique ou sur tube hépariné pour établir un profil biochimique (cf. III.3.2.5.3). Chez les petits ruminants, ce test est facultatif car pauvre en renseignement ou trop coûteux.

II.3.3 MÉTHODES DIAGNOSTIQUES

II.3.3.1 Étude bactériologique

L'identification et le dénombrement bactérien sont réalisables en routine dans les laboratoires, car faciles et peu coûteux. En règle générale, elle se fait sur contenu digestif, sang ou organes lésés. Elle est la méthode de choix en clientèle. La cinétique de croissance et le dénombrement bactérien, ont été davantage étudiés chez les ovins. En pratique, les caprins sont assimilés aux ovins pour l'interprétation de leurs résultats. La valeur diagnostique de l'identification et du dénombrement est variable selon l'espèce et le type de Clostridium [Uzal 2004, Uzal et Kelly 1996].

1- IDENTIFICATION

Clostridium perfringens est un hôte normal de l'intestin des ruminants avec des populations variables selon le type (A>D>B>C>E) [Uzal 2004].

L'interprétation de l'isolement d'une souche de Clostridium sur contenu digestif, varie selon les publications. Le désaccord entre les différents auteurs repose sur la présence de C. perfringens dans l'intestin des animaux sains. Le simple isolement de la bactérie chez un animal malade n'a donc pas de valeur diagnostique [Uzal 2004]. Cependant, la probabilité d'isoler Clostridium chez l'animal sain change en fonction du type de Clostridium considéré et de son hôte. Pour certains auteurs, C. perfringens type A a une croissance tellement rapide sur culture anaérobie qu'elle peut cacher la présence éventuelle d'autres pathogènes. Une culture positive pour ce germe, peut rendre le diagnostic plus difficile (Tableau IX) [Van Metre et al. 2000].

➤ Chez l'adulte

La plupart des auteurs s'accorde à penser que l'isolement de *Clostridium perfringens* types A et D chez les ovins n'est en aucun cas témoin de clostridiose, puisqu'ils sont naturellement présents dans le tube digestif [Uzal 2004]. Une enquête effectuée chez les caprins, indique que seulement 61% des chèvres saines hébergent des clostridies dans leur intestin et que 3% uniquement hébergent *Clostridium perfringens* type D. L'isolement de cette bactérie sur une chèvre suspecte d'entérotoxémie serait un indicateur très important. Un résultat négatif ne permet pourtant pas d'exclure une infection à *Clostridium perfringens* type D [Uzal 2004]. Bien que *Clostridium perfringens* types B et C aient été isolés récemment sur des moutons sains, certains auteurs croient en la valeur diagnostique de leur isolement. Ils ont également été isolés sur des chèvres saines [Uzal 2004].

➤ Chez le jeune

Chez l'agneau et le chevreau, l'identification de *C. perfringens* types B et C a une valeur diagnostique forte.

D'une manière générale, *C. sordellii* et *C. septicum* sont considérés comme étant absents chez l'animal sain, leur mise en évidence a une valeur diagnostique forte [Shoenian 2005, Songer 1998].

La présence de l'espèce et du type de *Clostridium* dans l'intestin des animaux sains conditionne la valeur diagnostique de l'identification des bactéries dans le tractus digestif.

TableauVII : Présence et valeur diagnostique de Clostridium dans l'intestin des petits ruminants [Latour 2004, Rood 1998, Shoanian 2005, Songer 1998, Uzal 2004].

| Type Type de <i>Clostridium</i> | Presence chez l'animal sain | Valeur diagnostique chez les caprins | Vale Valeur diagnostique chez les ovins |
|--|--------------------------------|---|--|
| C. pe <i>C. perfringens</i> type A | Oui Oui | Auc Aucune | Che Chez l'agneau uniquement |
| <i>C. C. perfringens</i> type B | Rare Rare | Oui Oui | Oui Oui |
| <i>C. C. perfringens</i> type C | Rare Rare | Ou Oui | Oui Oui |
| <i>C. C. perfringens</i> type D | Possi Possible | Oui Oui | No Non |
| C. so <i>C. sordellii</i> | Non Non | Oui Oui | Oui Oui |
| C. se <i>C. septicum</i> | Non Non | Oui Oui | Oui Oui |

L'identification simple de *C. perfringens* dans l'intestin d'animaux morts d'entérotoxémie ne suffit pas. Le dénombrement est nécessaire dans la majorité des cas.

- DÉNOMBREMENT

La cinétique de croissance des bactéries après la mort, serait un indicateur important pour le diagnostic. Mais là encore, l'interprétation du dénombrement dépend du type de *Clostridium* considéré.

Au moment de la mort, les fractions bactériennes augmentent. Il n'y a pas de différence significative d'augmentation relative des coliformes et des entérocoques en fonction de l'origine de la mort (entérotoxémie ou autre). En revanche, l'augmentation des sulfito-réducteurs (principalement les clostridies) permet d'orienter le diagnostic. Avec un cycle de 10 minutes, une bactérie *C. perfringens* type A initiale peut se multiplier pour atteindre la valeur significative de 10^7 UFC/mL dans l'intestin grêle dans les 6 premières heures. [Latour 2004, Philippeau et al. 2003] La concentration de *C. perfringens* augmente lentement dans la caillette et le caecum des ruminants [Philippeau et al. 2003].

Il existe 2 seuils au-delà desquels il y a maladie. Si on dénombre plus de 10^6 UFC/mL sur un prélèvement issu d'un animal cliniquement suspect, on considère que l'animal était atteint d'entérotoxémie. Cette valeur est valable après une culture sur milieu TSN®. De plus, les conditions de prélèvement et de conservation suivantes sont indispensables : prélèvement effectué dans les heures qui suivent la mort et conservation en anaérobiose pendant 24h à 4°C.

Pour une culture sur gélose au sang, avec de la cyclosérine et en chambre anaérobie, la valeur seuil sera 10^8 UFC/mL. De même, hors données épidémiologiques, on considère qu'il y a maladie si on dénombre plus de 10^8 UFC/mL chez les bovins [Latour 2004].

Les populations clostridiennes de types B et C subissent une augmentation moindre, plus ou moins similaire à celle d'animaux sains. Les informations concernant le

nombre normal et les variations post mortem de clostridies chez les moutons et les chèvres sains sont quasi inexistantes [Uzal 2004].

L'identification et le dénombrement des clostridies sont des techniques de diagnostic dont l'interprétation est controversée. D'une manière générale, les résultats sont à étudier en parallèle de la situation épidémiologique, de la clinique et des lésions. Leur interprétation en dehors de tout contexte est impossible. De plus, plusieurs paramètres conditionnent les résultats comme le mode de culture et les conditions de prélèvement et de conservation.

L'identification de *Clostridium* dans l'intestin s'interprète de façon différente selon le type de *Clostridium* et son hôte. Chez le jeune, la mise en évidence de *C. perfringens* types B et C a une valeur diagnostique considérée comme étant fiable. Chez l'adulte, l'identification de *C. perfringens* type A n'a aucun intérêt diagnostique tant chez les ovins que chez les caprins. En revanche, *C. perfringens* type D étant rare chez les chèvres saines, son identification dans le tractus digestif est un bon indicateur d'enterotoxémie.

Des données comparatives concernant la cinétique de croissance bactérienne *post mortem* chez l'animal sain et l'animal mort d'enterotoxémie seraient intéressantes.

Les chiffres actuellement disponibles sur le dénombrement bactérien dans le contenu intestinal sont issus d'études sur les bovins et plus rarement sur les petits ruminants.

Dans ce contexte, une comparaison ovin/caprin est aujourd'hui impossible.

Bien que les avis divergent, cet examen reste fréquemment utilisé en pratique. Les laboratoires fournissent une interprétation basée sur des normes bovines.

II.3.3.2 Le typage

Il existe plusieurs techniques de typage des souches de *Clostridium perfringens* à partir de contenu intestinal ou de sérosités. On recherche les toxines produites. Le typage permet une interprétation plus juste du dénombrement clostridien.

1- MOUSE NEUTRALISATION TEST (MNT)

Le test de neutralisation sur souris est la technique la plus ancienne mais aujourd'hui peu utilisée, sauf dans le cadre de la recherche.

Le principe est d'injecter à une souris des toxines et les anticorps présumés correspondants. La mort de l'animal signifie qu'on lui a injecté une toxine sans son anticorps neutralisant. On peut alors déduire le type de toxine responsable du décès.

Cette méthode est sensible et spécifique. Elle pose cependant un problème éthique [Latour 2004].

-ELISA SUR CONTENU I INTESTINAL OU SUR SÉROSITÉ

-Définition : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Technique de détection ou de dosage immuno-enzymatique où la réaction antigène anticorps est révélée par l'action d'une enzyme (couplée à l'anticorps ou à l'antigène) sur un substrat chromogène [Dart 2005].

L'objectif est de mettre en évidence les antigènes de toxine. La sensibilité et la spécificité du test dépendent de l'anticorps utilisé et de la technique de marquage. De plus il est nécessaire de réaliser l'expérience pour chaque toxine séparément [Latour 2004, Uzal 2004].

-Toxine

Le test ELISA dispose d'une très bonne sensibilité pour la toxine . Il permet donc de détecter des taux très faibles de toxine. Faute de définition d'un seuil approprié, il devient impossible de différencier un animal sain d'un animal malade. Le test MNT serait plus approprié car il est beaucoup moins sensible. Il ne détecte pas les faibles taux de toxine et ne fournit un résultat positif que sur les animaux malades uniquement [Uzal 2004].

-Toxine

Il a été démontré que de faibles taux de toxine existaient chez les animaux sains. Dans ce cas, les tests conventionnels ne détectent a priori pas la toxine . La sensibilité du test ELISA par capture polyclonale est estimée à 91%. Ce test obtient de meilleurs résultats sur contenu digestif que sur sérosités. Un résultat positif sur un animal cliniquement suspect est donc fortement indicateur d'une infection à

Clostridium perfringens type D. En revanche, un résultat positif sur un animal asymptomatique ne peut être interprété, car le test ELISA peut mettre en évidence des taux de toxines insuffisants pour provoquer la maladie. La spécificité du test est évaluée à 100%. Mais si le test est négatif, l'interprétation n'est encore pas évidente car la toxine passe rapidement dans l'organisme en disparaissant du contenu intestinal [Uzal 2004, Uzal et al. 2003].

-Toxine

Cette toxine est rapidement détruite par la trypsine digestive. Elle n'est donc pas souvent recherchée. Un résultat positif sur un animal suspect d'entérotoxémie, permet de conclure au diagnostic de maladie à *C. perfringens* type C, ou à type B si la toxine est également mise en évidence [Uzal 2004].

-AGGLUTINATION SUR BILLES DE LATEX

Cette technique qualitative est très ancienne et aujourd'hui peu utilisée. Les toxines adhèrent sur des anticorps anti-toxine présentés sur les billes de latex. Ce test est réactualisé pour la détection de la toxine . Sa sensibilité et sa spécificité étant inférieures à celles du test ELISA, les faibles taux de toxine (animal sain) ne sont pas détectés, ce qui diminue le risque de faux positifs sur contenu digestif. De plus, il est facile à réaliser et peu coûteux [Leonhart 2004].

-PCR (POLYMERASE CHAIN CHAIN REACTION)

La PCR est un test qualitatif, qui offre une sensibilité élevée. Tous les gènes présents, même les plus instables car localisés sur les plasmides (gène de la toxine), peuvent être détectés. De plus, la sporulation n'interfère pas, ce qui contribue à diminuer le nombre de faux négatifs.

En revanche, la spécificité du test est moins bonne, car il renseigne sur la présence d'un gène et non de la toxine elle-même. La détection d'un gène ne permet pas d'affirmer que la toxine qu'il code est responsable de la mort de l'animal.

Actuellement, cette technique est principalement utilisée avec les gènes *cpa*, *etx* et *cpb* codant respectivement pour les toxines , et [Songer 1998].

| Gène amplifié | Toxines recherchées | Ty type de <i>Clostridium perfringens</i> |
|---------------|---------------------|---|
| Cpa | | A, B A, C, D, E |
| Cpb | | B et B, C |
| EtX | | B et B, D |

Chez les animaux sains, on détecte systématiquement le gène cpa, caractéristique de *C. perfringens*. Chez les animaux suspects d'entérotoxémie, on met le plus souvent en évidence les gènes cpa et etx, dont l'association est caractéristique de *C. perfringens* type D.

Le gène cpb est rarement détecté chez les ovins et les caprins suspects d'entérotoxémie car soit *C. perfringens* type B et C sont peu courants dans ces espèces, soit ce gène est instable de par sa situation sur un plasmide. L'amplification des gènes cpa et etx chez les animaux sains est possible et témoigne d'un portage asymptomatique de *C. perfringens* type D ou d'un épisode d'entérotoxémie passé. Un dénombrement est alors nécessaire pour objectiver un réel cas de maladie [Manteca 2003].

Deux limites s'opposent à l'utilisation de cette technique. La première est son aspect uniquement qualitatif. Elle ne peut donc être pratiquée indépendamment d'un dénombrement de bactéries. La PCR quantitative reste du domaine de la recherche. Cette technique consiste à calculer la concentration initiale d'ADN recherché. Après avoir défini des valeurs seuil de quantité d'ADN en fonction du type recherché, elle permettrait de conclure au diagnostic d'entérotoxémie.

Par ailleurs, la PCR devient un sujet à controverse dans la mesure où la détection d'un gène ne signifie pas qu'il a été exprimé. L'amplification de gène de toxine ne permet donc pas d'affirmer que cette toxine était présente dans le prélèvement. Elle permet seulement de typer les clostridies dans le tractus digestif, sans pour autant confirmer leur rôle dans le processus pathologique [Miserez et al. 1998].

Cette méthode diagnostique est aujourd'hui privilégiée aux autres car la sensibilité et la spécificité sont bonnes, tout en restant relativement peu onéreuse. Sa rapidité de mise en œuvre permet l'analyse d'un plus grand nombre de colonies issues d'un

même prélèvement. La technique PCR trouve davantage d'utilité chez les caprins, chez qui les symptômes et les lésions sont peu caractéristiques [Miserez et al. 1998].

II.3.3.3 L'identification directe par coloration des bactéries in situ

Un calque et une coloration de GRAM de la muqueuse intestinale duodénale et colique révèlent une multitude de bâtonnets fins, courts et aux bords arrondis, souvent non sporulés, colorés GRAM positif. *C. perfringens* type D peut être isolé également au niveau des reins et de l'encéphale. Sans être un diagnostic d'exclusion, la coloration GRAM conduit à conforter une suspicion clinique de clostridiose [Uzal 2004, Uzal et Kelly1 1998]. Le test sur la muqueuse intestinale est rapide, facile à mettre en place sur le terrain et reste un bon indicateur d'entérotoxémie chez les petits ruminants. La mise en évidence des bactéries ne confirme pas le diagnostic, elle renforce une suspicion.

II.3.3.4 Sérologie

Chez les ovins, la majeure partie des signes cliniques et des lésions est attribuée à la toxine ϵ . Chez les caprins, l'importance relative de chacune des toxines n'a pas encore été évaluée. *Clostridium perfringens* type D produit aussi la toxine ϵ et plusieurs toxines mineures. Il est possible que les lésions résultent d'un effet combiné de ces toxines.

En pratique, on recherche uniquement la présence des anticorps anti-toxine ϵ dans le sang, via un test ELISA [Uzal et Kelly1 1998].

II.3.3.5 Etude des modifications due à l'intoxination

1) URINE

Les urines sont analysées avec une bandelette réactive.

➤ pH urinaire

Chez les ovins, le pH urinaire physiologique se situe autour de 7-8. Dans plus de la moitié des cas avérés d'entérotoxémie, les urines sont acides, à condition que le

prélèvement soit précoce après la mort. L'acidose, dont les facteurs de risque et la clinique peuvent être confondus avec ceux de l'entérotoxémie, provoque aussi une acidification des urines. Cette acidification est cependant plus franche et plus précoce que dans les cas d'entérotoxémie. Le pH urinaire est un indicateur important pour différencier une hypocalcémie et une forme comateuse d'entérotoxémie : dans le cas d'une hypocalcémie, les urines sont alcalines [Popoff 1979, Uzal 2004].

➤ Cétonurie:

Elle est rarement présente en cas d'entérotoxémie, elle permet le diagnostic différentiel avec la toxémie de gestation, les cétozes et les maladies nerveuses liées à l'ensilage (listériose).

➤ Protéinurie :

Une augmentation modérée peut être mise en évidence, mais elle n'est systématique ni chez les ovins, ni chez les caprins.

➤ Glucosurie:

Elle renforce une suspicion clinique. Ce paramètre permet une orientation diagnostique sans en être une preuve absolue, car de nombreuses affections provoquent également une glucosurie : l'hypocalcémie, des troubles phosphocalciques, une alcalose consécutive à une alimentation riche en protéines, une insuffisance rénale, une urolithiases, une atteinte hépatique et musculaire, une infection, le stress... Les autres paramètres urinaires et surtout l'étude clinique, nécropsique et de laboratoire sont indispensables pour effectuer le diagnostic différentiel.

L'induction expérimentale d'une entérotoxémie de type D chez l'agneau, induit systématiquement une glucosurie [Blackwell et al. 1991]. La présence de glucose dans les urines est donc un indicateur important de la maladie, mais les avis divergent quant à sa valeur diagnostique. M. Popoff en 1979 a trouvé que parmi 47 cas autopsiés pour entérotoxémie, il y avait 100% de glucosurie positive. Il en a déduit qu'une absence de glucosurie permettait d'exclure avec certitude une suspicion de la

maladie chez les ovins. Selon ce même auteur, une glucosurie massive sans aucun autre symptôme chez un agneau (ovin de moins de 6 mois), serait le signe d'une entérotoxémie à *C. perfringens*. Un ovin adulte présentant des troubles nerveux associés à une glucosurie massive avec un pH urinaire acide ou neutre serait atteint d'entérotoxémie [Popoff 1979]. Au contraire des études plus récentes montrent que ce paramètre est inconstant. FA. Uzal trouve que seulement 50% des ovins chez qui il a induit une entérotoxémie, ont une glucosurie positive. L'absence de glucose dans les urines n'est pas un argument suffisant pour exclure le diagnostic d'entérotoxémie [Uzal 2004].

Chez la chèvre, la glucosurie est un paramètre inconstant. Son absence n'est pas rare et sa mise en évidence doit être associée aux signes cliniques. Une valeur de glucose urinaire comprise entre 50 et 300 mg/dL, est fortement indicatrice d'entérotoxémie [Blackwell et al. 1991, Uzal 2004].

La glucosurie constitue donc une aide diagnostique importante chez les petits ruminants, surtout chez les ovins et de façon moindre chez les caprins. Ce paramètre renforce une suspicion clinique, mais n'est pas suffisant pour confirmer un diagnostic d'entérotoxémie. Une entérotoxémie à *C. sordellii* ne provoque jamais de glucosurie. Si on suspecte cette bactérie comme responsable de la maladie, et qu'une glucosurie est détectée, c'est qu'il y a une affection concomitante. La recherche du glucose dans les urines est un élément important du diagnostic différentiel entre *C. sordellii* et *C. perfringens* [Popoff 1979, Uzal et Kelly1 1998, Uzal 2004].

➤ LIQUIDE PÉRICARDIQUE :

La présence de glucose dans le liquide péricardique est un paramètre apparemment plus fiable, car plus fréquent que la glucosurie chez les chèvres. En pratique, il n'existe pas de test commercialisé pour doser quantitativement ou qualitativement la présence de glucose dans l'épanchement péricardique. En pratique, une bandelette urinaire pourrait servir, mais aucune étude ne permet de valider ce test. Le Reflovet® après filtration et centrifugation du liquide serait le test le plus fiable mais irréalisable en pratique [SCIL 2005, Uzal 2004].

➤ SANG :

Urémie et créatinémie :

Ce sont les témoins d'une insuffisance rénale. Ces paramètres augmentent considérablement chez les chevreaux et agneaux atteints d'une toxémie due à la toxine . La hausse de l'osmolarité sanguine est accentuée par les pertes liquidiennes dues aux diarrhées et aux dommages vasculaires. Mais les signes d'insuffisance rénale sont rares et trop tardifs pour être détectés. La créatinémie et l'urémie ne seraient donc pas fiables [Uzal et Kelly 1996, Uzal 2004].

Glycémie :

Chez les ovins, elle peut atteindre une valeur triple de la valeur normale, soit entre 120 et 250 mg/100 mL [Popoff 1979]. L'induction expérimentale d'une entérotoxémie de type D chez l'agneau et le chevreau provoque une augmentation similaire de la glycémie dans les 2 espèces. Les chevreaux subissent une augmentation moindre, mais la différence n'est a priori pas significative [Blackwell et al. 1991].

Formule sanguine:

Chez les animaux vivants la numération cellulaire augmente rapidement à 16 000 leucocytes/mm³ et peut plafonner à 47 000 leucocytes/mm³. La mesure des taux de leucocytes permettrait une détection précoce des animaux infectés [Uzal 2004].

Ionogramme:

Les ions K⁺, Na⁺ et Cl⁻ semblent conserver une valeur normale [Popoff 1979, Uzal 2004].

En pratique, les examens de laboratoire ne sont pas réalisés systématiquement. Le diagnostic repose sur des éléments épidémiologiques et cliniques de la maladie. Un épisode de mortalité subite des agneaux, avec des troubles nerveux, associés ou non à une diarrhée peu parfois suffire. De même chez la chèvre laitière, la mort brutale de

plusieurs individus, présentant une diarrhée hémorragique est suffisamment caractéristique pour conclure au diagnostic de la maladie.

Compte tenu de la faible valeur économique individuelle des petits ruminants, l'autopsie n'est demandée qu'après la perte de plusieurs individus. Elle reste l'examen de choix. Les ovins présentent peu de lésions caractéristiques, d'où l'intérêt d'effectuer des examens complémentaires. Les caprins présentent des lésions plus typiques, notamment au niveau du tractus digestif, avec une entérite hémorragique.

Les urines et le liquide péricardique sont 2 éléments intéressants à prélever. La glucosurie est un bon indicateur d'entérotoxémie. Ce test est particulièrement important chez les ovins, bien qu'il ne soit pas constant. La présence de glucose dans le liquide péricardique a une valeur diagnostique forte, surtout chez les caprins, mais aucun test rapide et réalisable sur le terrain, n'existe à ce jour. Si des examens complémentaires sont requis, le vétérinaire envoie au laboratoire un prélèvement de contenu digestif et éventuellement un prélèvement sanguin, sur suspicion clinique et nécropsique. Les examens le plus fréquemment effectués sont : l'identification et le dénombrement après culture cellulaire puis éventuellement le typage par test ELISA. Les résultats sont fournis d'après des normes bovines en général. Les autres techniques diagnostiques ne sont utilisées que dans le domaine de la recherche.

Chapitre III :

Moyens de lutte

III.1 Traitement

Etant données la rapidité d'évolution et la sévérité des symptômes, le pronostic est très sombre. Le traitement est souvent illusoire. On considère que si l'animal se rétablit, il y avait erreur sur le diagnostic. Toutefois, le traitement peut être mis en œuvre sur les formes modérées ou en début d'infection.

Les animaux vaccinés demeurent plus réceptifs au traitement et bénéficient d'un meilleur pronostic.

III.1.1. MESURES HYGIÉNIQUES

En cas de présence d'entérotoxémie dans un élevage, la première mesure consiste à diminuer ou à supprimer les rations d'engraissement et de lactation ou à rentrer les animaux des pâturages luxuriants et à les maintenir à un régime pauvre à base de foin. Après 1 à 3 semaines, les quantités d'aliments concentrés pourront être augmentées progressivement, et réparties sur plusieurs repas au cours de la journée.

La distribution de foin grossier ou la mise en pâturage est recommandée pour assurer un apport suffisant en fibres. Lorsque des cas d'entérotoxémie surviennent chez des jeunes à l'allaitement, il est conseillé de diminuer temporairement la ration ou l'herbage des mères de manière à réduire la production lactée [Popoff 1994].

Un traitement anthelminthique est à prévoir si les animaux sont parasités. Des mesures de désinfection des locaux et du matériel des jeunes animaux peuvent être instaurées. Les mères doivent être isolées à la mise bas [Latour 2004].

III.1.2. MESURES MÉDICALES

III.1.2.1 Traitement symptomatique

Le traitement symptomatique consiste à lutter contre l'état de choc lié à l'intoxication et aux pertes hydriques. Une réhydratation avec un soluté salin ou glucosé est de rigueur. Des hépato-protecteurs et des analeptiques cardio-respiratoires peuvent également être administrés [Popoff 1994].

En présence de lésions intestinales nécrotiques et hémorragiques, la résection chirurgicale des segments lésés serait indispensable. Ceci est difficilement envisageable d'un point de vue pratique et économique chez les petits ruminants [Popoff 1989].

III.1.2.2 Antibiothérapie :

L'antibiothérapie vise à réduire la prolifération des clostridies dans l'intestin et dans l'organisme. Ils limitent ou suppriment la production de toxine, mais la toxine secrétée antérieurement n'est pas inactivée : les antibiotiques n'ont donc que peu d'effets sur les stades avancés de la maladie [Ann.3 2005].

L'antibiotique de choix reste la famille des pénicillines. Les antibiotiques à base de céphalosporines, tétracyclines, érythrocyne-lincomycine sont souvent inopérants.

L'antibiothérapie échoue très souvent. Lors d'infection à *C. septicum*, on suppose que la raison de cet échec est encore hypothétique, mais on pense qu'on peut l'attribuer aux protoxines, dont le pouvoir pathogène s'exprime bien après la disparition de *C. septicum*.

L'antibiotique est donc administré souvent trop tard, même lorsqu'une métaphylaxie est tentée [Manteca et al. 2005].

III.1.2.3 Sérothérapie :

La sérothérapie peut être employée pour le traitement des infections diagnostiquées précocement [Ann.1 2005].

L'activité des toxines clostridiennes est inhibée par les anticorps spécifiques (antitoxines). Une chèvre peut être sauvée par l'administration de 25 mL d'un sérum contenant l'antitoxine de *C. perfringens* C et D adjoint d'un traitement antibiotique à base de sulfamides [Blackwell et Butler 1992]. Cependant les antitoxines inhibent uniquement les toxines circulantes et ne peuvent pas agir sur les toxines fixées sur leur récepteur. [Dart 2005] De plus, les doses de sérum sont importantes et donc très coûteuses. La sérothérapie est donc rarement prescrite à titre curatif [Popoff 1989].

En plus de la vaccination, l'antitoxine peut entrer dans un programme de prévention chez les animaux à risque. L'antitoxine fournira à un animal 10 jours à 3 semaines de protection [Ann.1 2005].

III.1.2.4 Phytothérapie :

Au Mexique, certaines plantes traditionnellement utilisées dans le traitement des affections gastro-intestinales, exercent action inhibitrice sur la croissance, la sporulation et la production d'entérotoxine de *C. perfringens* type A. Quant aux autres types de *C. perfringens*, aucune donnée n'a été publiée.

Les extraits de *Psidium guavara*, *Haemotoxylon basiletto* et *Euphobia prostata* ont une activité anti-clostridienne. Il a été démontré que *P. guavara* aurait une activité anti-diarrhéique par ralentissement du péristaltisme intestinal (observé in vitro) Ces plantes peuvent être utilisées à titre curatif mais aussi à titre préventif en les mêlant à l'alimentation [Garcia et al. 2002].

Le choix d'instaurer un traitement d'entérotaxémie est rare pour 2 raisons : la rapidité d'évolution de la maladie et la faible valeur économique des petits ruminants. Sa mise en œuvre est identique chez les ovins et les caprins. Le traitement symptomatique est primordial, il est associé à une antibiothérapie à base de pénicilline. Le pronostic reste cependant très sombre. La sérothérapie donne de bons résultats mais elle est trop coûteuse.

CONCLUSION

-Les agents étiologiques d'enterotoxémie sont les mêmes chez les ovins et les caprins.

Clostridium perfringens type A est le plus fréquent en France, suivi de *Clostridium perfringens* type D. Cette tendance s'inverse dans les autres pays. Les raisons de cette discordance sont encore inconnues, mais le typage et le dénombrement précoces et systématiques des Clostridies permettraient d'objectiver le rôle de chacun des toxinotypes dans la pathogénie. Pour cela, des données comparatives sur la cinétique de croissance bactérienne dans l'intestin chez les petits ruminants sains et malades seraient utiles.

Si effectivement, *C. perfringens* type A est le principal agent d'enterotoxémie ovine et caprine en France, la politique vaccinale devrait être revue dans la plupart des élevages. De plus, *Clostridium sordellii* a une incidence importante chez les petits ruminants, mais son rôle dans la pathogénie est sérieusement discuté. Des études approfondies révéleraient l'utilité de vacciner contre ce germe.

Alors que les ovins et les caprins sont sensibles aux mêmes agents étiologiques d'enterotoxémie, leur spécificité influence l'expression de la maladie sur les plans épidémiologique, clinique et lésionnel.

La forme ovine se déclare préférentiellement chez les agneaux à l'engrais, provoquant des signes systémiques et nerveux. À l'autopsie, peu de lésions apparaissent. La forme caprine touche essentiellement l'animal adulte en production, induisant une diarrhée profuse et hémorragique. L'examen nécropsique est marqué par d'importants dommages intestinaux.

Aucun symptôme, ni aucune lésion n'est pathognomonique de la maladie.

La réponse vaccinale est également variable d'une espèce à l'autre: les caprins nécessitent des doses vaccinales plus fortes et des rappels plus fréquents que les ovins ; l'efficacité de la vaccination des chèvres reste contestable.

Les hypothèses actuelles qui tentent d'expliquer ces différences, sont axées sur la sensibilité et la réceptivité spécifiques des ovins et des caprins.

Aucune recherche à ce jour n'a permis de déterminer les facteurs de sensibilité aux toxines clostridiennes permettant d'expliquer la variabilité entre les formes ovine et caprine.

Grâce à des outils diagnostiques très performants et aux connaissances actuelles en terme de génétique, les hypothèses sont aujourd'hui plus facilement explorables.

REFERENECS

BIBLIOGRAPHIQUES

- Ann1. Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA). Division de la sante des animaux et de l'elevage. Section des produits biologiques veterinaires. *Site de l'agence canadienne d'inspection des aliments*. Mise a jour le 24 novembre 2005. [<http://www.inspection.gc.ca/francais/vetbio/>] (consulte le 28 novembre 2005).
- Ann2. Faculte de Medecine Pitie-Salpetriere. *Site de l'université de médecine Paris VI*. Mise a jour le 13 octobre 2005. [<http://www.chups.jussieu.fr>] (consulte le 20 juillet 2005)
- Ann3. Universite Claude Bernard Lyon 1. *Site de l'université Claude Bernard à Lyon 1*. Mise a jour en 2005. [<http://www.univ-lyon1.fr>] (consulte le 15 mai 2005).
- Bernath S, Fabian K, Kadar I, Szita G, Barna T. (2004) Optimum time interval between the first vaccination and the booster of sheep for *Clostridium perfringens* type D. *Acta Vet Brno*. 73:473-5
- Blackwell TE, Butler DG. (1992). Clinical signs, treatment, and *post mortem* lesions in dairy goats with enterotoxaemia: 13 cases (1979-1982). *J Am Vet Med Assoc*. 200(2):214-7
- Blackwell TE, Butler DG, Bell JA. (1983) Enterotoxaemia in the goat: the humoral response and local tissue reaction following vaccination with two different bacterin-toxoid. *Can J Comp Med*;47:127-132
- Blackwell TE, Butler DG, Prescott JF, Wilcock BP. (1991). Differences in signs and lesions in sheep and goat with enterotoxaemia by intraduodenal infusion of *Clostridium* type D. *Am J Vet Res.*; 52(7):1147-52
- Chartier C. (2002) Enterotoxemie et vaccination chez les caprins. *Point Vet*. (n°special pathologie ovine et caprine). 140-4
- Chartier C, Broqua C. (1995) Maladies nutritionnelles et metaboliques de la chevre adulte. *Point Vet*. 27(numero special):107-118
- Chen Z, Zandonatti M, Jakubowski D, Fox HS. (1998) Brain capillary endothelial cells express MBEC1, a protein that is related to the clostridium perfringens enterotoxin receptor. *L. Investigation*. 78(3):353-362
- Clark S. (2003) Sudden death in periparturient sheep associated with *Clostridium sordellii*. *Vet Rec* 153: 340
- Dart F, *La coprologie sur le web*. Mises a jour janvier 2005 [<http://coproweb.free.fr>] (consulte le 15 mai 2005)
- Daube G. (1992) *Clostridium perfringens* et pathologies digestives. *Ann Med Vet*. 136:5-30
- Dray T. (2004) *Clostridium perfringens* type A and ϵ 2 toxin associated with enterotoxaemia in a 5-week-old goat. *Can Vet J* 45: 251-253
- Duchesnes C, Granum PE, Menozzi MG. Diagnosis and typing *In: Pathology and Ecology*

of the genus *Clostridium* in human, animal and foodstuffs: identification, epidemiology and prophylaxis. [en-ligne] EU fifth framework programme, 2001. Mise a jour le 30 septembre 2005. [<http://www.genusclostridium.net>] (consulte le 15 novembre 2005).

- Ferrer LM, Garcia de Jalon J, De las Heras M. (2002) *Atlas des pathologies ovines*. Ed. Servet. 311p.
- Garcia. S, Araiza M, Gomez M, Heredia N. (2002) Inhibition of growth, enterotoxine production, and spore formation of *Clostridium perfringens* by extracts of medicinal plants. *J. Food Prot.*, 65(10):1667-9
- Green DS, Green MJ, Hillyer MH, Morgan KL. (1987) Injection site reactions and antibody responses in sheep and goat after the use of multivalent clostridial vaccines. *Vet Rec.* 120:435-439
- 108
- Greenham LW, Harber C, Lewis E, Scullion FT. (1987) *Clostridium perfringens* in pelleted feed. *Vet Rec.* 120:557
- Latour P. (2004) Les enterotoxemies chez les bovins: bilan bibliographique et contribution a l'amelioration du diagnostic necropsique et bacteriologique. These Med Vet. Ecole Nationale Veterinaire de Lyon, Lyon.
- Leonhart L. (2004) Les enterotoxemies: actualites bibliographiques. These Med Vet. Ecole Nationale Veterinaire de Lyon, Lyon.
- Lewis CJ, Naylor RD. (1998) Sudden death in sheep associated with *Clostridium sordellii*. *Vet Rec.* 142:417-421
- Lucas F, Popoff M, Corthier G. (1991) Les enterotoxines bacteriennes: structure, mode d'action. *Ann Rech Vet.* 22:147-162
- Mainil J, Duchesnes C, Pelkonen S, Dubreuil L, Menozzi MG. Identification, typing and antibiotic resistance of the genus *Clostridium*. In: *Pathology and Ecology of the genus Clostridium in human, animal and foodstuffs: identification, epidemiology and prophylaxis*. [en-ligne] EU fifth framework programme, 2001. Mise a jour le 30 septembre 2005. [<http://www.genusclostridium.net>] (consulte le 15 novembre 2005).
- Manteca C. (2003) Etude etiologique de l'enterotoxemie bovine. These Med Vet. Universite de Liege, Liege. 115p.
- Manteca C. (18 octobre 2005) *Prévalence de C. perfringens type A* [courrier electronique a Trevennec K.] carlene_trevennec@hotmail.com
- Manteca C, Daube G. (1994) Etude de l'enterotoxemie bovine en Belgique. *Ann Med Vet.* 138:155-164

- Manteca C, Daube G, Jauniaux T, *et al.* (2002) A role of the *Clostridium perfringens* ϵ toxin in enterotoxaemia? *Vet Microbiol.* 86:191-202
- Manteca C, Daube G., Paliargues T. *et al.* (2005) Epidemiological survey of ovine enterotoxaemia in Europe. *In Proceeding of the 6th international sheep veterinary congress* Hersonnissos, Grece. 17-21 juin 2005.
- Manteca C, Jauniau T, Ginter A, Kaeckenbeeck A, Mainil JG. (2003) Premiere evaluation des roles pathogenes des toxines ϵ et β lors d'enterotoxemie bovine. *In. Compte rendu des Journées nationales GTV.* Nantes 14-17 mai 2003; p.745
- Mariano EFP, Uzal FA. (2005) Morphologic and physiologic changes induced by *Clostridium perfringens* type A ϵ toxin in the intestine of sheep. *Am J Vet Res.* 66:251-5
- Miserez R, Frey J, Buogo C, Capaul S, Tontis A, Burnens A, Nicolet J. (1998) Detection of alpha- and epsilon-toxigenic *Clostridium perfringens* type D in sheep and goat using DNA amplification technique (PCR). *Lett Appl Microbiol.* 26(5):382-6
- Mitchell G. (1999) Differential diagnosis of diarrhoea/illthrift in goat at grass. *In practice.* 139-143
- Niilo L. (1988) *Clostridium perfringens* type C enterotoxaemia. *Can Vet J.* 29:658-664
- Petit S. (2005) *Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires (DMV)*, 13eme edition. Point veterinaire. 1765p.
- Philippeau C, Goncalves S, Julliard V. (2003) Diagnostic bacteriologique des enterotoxemies. *Point Vet.* 237 : 12-13
- Phukan A, Dutta GN, Daube G, Das BC. (1997) Characterization of *Clostridium perfringens* isolates from goats. *Indian Vet J.* 74: 11, 915-8
- Popoff M. (1979) Enterotoxemie a *Clostridium perfringens* chez les ovins et glucosurie. *Bull Soc Vet Prat de France,* 63: 6, 431-448
- Popoff. M. (1987) Purification and characterization of *Clostridium sordellii* lethal toxin and cross-reactivity with *Clostridium difficile* cytotoxin. *Infect Immun.* 55:35-43
- Popoff M. (1989) Les enterotoxemies. *Revue Med. Vet.* 140(6):479-491
- Popoff M. (1994) Les affections a *Clostridium* chez les ovins. *Bulletin des GTV.* 3 : 43-49
109
- Rood JI. (1998) Virulence genes of *Clostridium perfringens*. *Annu Rev Microbiol.* 52: 333-60
- Sargisson N. (2004) Differential diagnosis of diarrhoea in lambs. *In practice.* 20-27
- Sauvant D, Meschy F, Mertens D. (1999) Les composants de l'acidose ruminale et les effets acidogenes des rations. *INRA Prod Anim.* 12:49-60

- SCIL: Southampton Center for Indempendant Living, Strasbourg. *Reflovet*®
Communication personnelle, 2005.
- Shoenian S, Vaccines (biologics) used in the sheep and goat industry. *Site de Maryland small ruminant page*. Mise a jour le 11 novembre 2005.
[<http://www.sheepandgoat.com/articles/vaccinestable.html>] (consulte le 15 novembre 2005)
- Sipos W, Fischer L, Schindler M, Schmoll F. (2003) Genotyping of *Clostridium perfringens* isolated from domestic and exotic ruminants and swine. *J. Vet. Med. B.* 50:360-2
- Smith MC, Shermann DM. (2002) *Goat medicine*. Philadelphia: Saunders, 10: 298-302
- Songer JG. (1998) Clostridial diseases of small ruminants. *Vet. Res.* 29:219-232
- Srinivasan EVR, Muzamil SR, Anbu KA, Meignanasundar VS, Krishnamurthy A, Rajendran MP. (2001) Studies on the immunologic efficacy of a toxoid vaccine against enterotoxemia in sheep. *Indian Vet J.* July 78:579-582
- Uzal FA. (2004) Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *Anaerobe* 10. 135-143
- Uzal FA, Boder AV, Kelly WR, Nielsen K. (1998) Variability of serum antibody responses of goat kids to a commercial *Clostridium perfringens* epsilon toxoid vaccine. *Vet Rec.* 143:472-4
- Uzal FA, Glastonbury JRW, Kelly WR, Thomas R. (1997) Caprine enterotoxaemia associated with cerebral microangiopathy. *Vet. Rec.* 141:224-6
- Uzal FA, Kelly WR. (1996) Enterotoxaemia in goats. *Vet Res Commun.* 20(6):481-492.
- Uzal FA, Kelly1 WR. (1998) Experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxaemia in goats. *Vet Pathol.* 35:132-140
- Uzal FA, Kelly2 WR. (1998) Protection of goats against experimental enterotoxaemia by vaccination with *Clostridium perfringens* type D epsilon toxoid. *Vet Rec.* 142(26):722-5
- Uzal FA, Kelly WR, Morris WE, Bermudez J, Baison M. (2004) The pathology of peracute experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia in sheep. *J Vet Diagn Invest* 16:403-411
- Uzal FA, Kelly WR, Thomas R, Hornitzky M, Galea F. (2003) Comparison of four techniques for the detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in intestinal contents and other body fluids of sheep and goats. *J Vet Diagn Invest.* 15(2):94-9
- Uzal FA, Pasini FV, Robles CA, Elizondo A. (1994) An outbreak of enterotoxaemia caused by *Clostridium perfringens* type D in goats in Patagonia. *Vet Rec.* 135:279-280
- Uzal FA, Rolfe BE, Smith NJ, Thomas AC, Kelly WR.1 (1999) Resistance of ovine, caprine and bovine endothelial cells to *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in vitro. *Vet*

Res Commun. 23:275-284

- Uzal FA, Wong JP, Kelly WR, Priest J.2 (1999) Antibody response in goats vaccinated with liposome-adjuvanted *Clostridium perfringens* type D epsilon toxoid. Vet Res Commun.

23:143-149

- Van Metre DC, Tyler JW, Stehmann SM. (2000) Diagnosis of enteric disease in small ruminants. Vet Clin North Am Food Anim pract. 16(1):87-115

- Walker PD. (1992) Bacterial vaccines: old and new, veterinary and medical. Vaccine.

10(14):977-987