

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE IBN KHALDOUN – TIARET
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES
DEPARTEMENT DE SANTE ANIMALE

PROJET DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU
DIPLOME DE
DOCTEUR VETERINAIRE

SOUS LE THEME

Etude Epidémiologique de
L'entérotoxicité chez les ovins

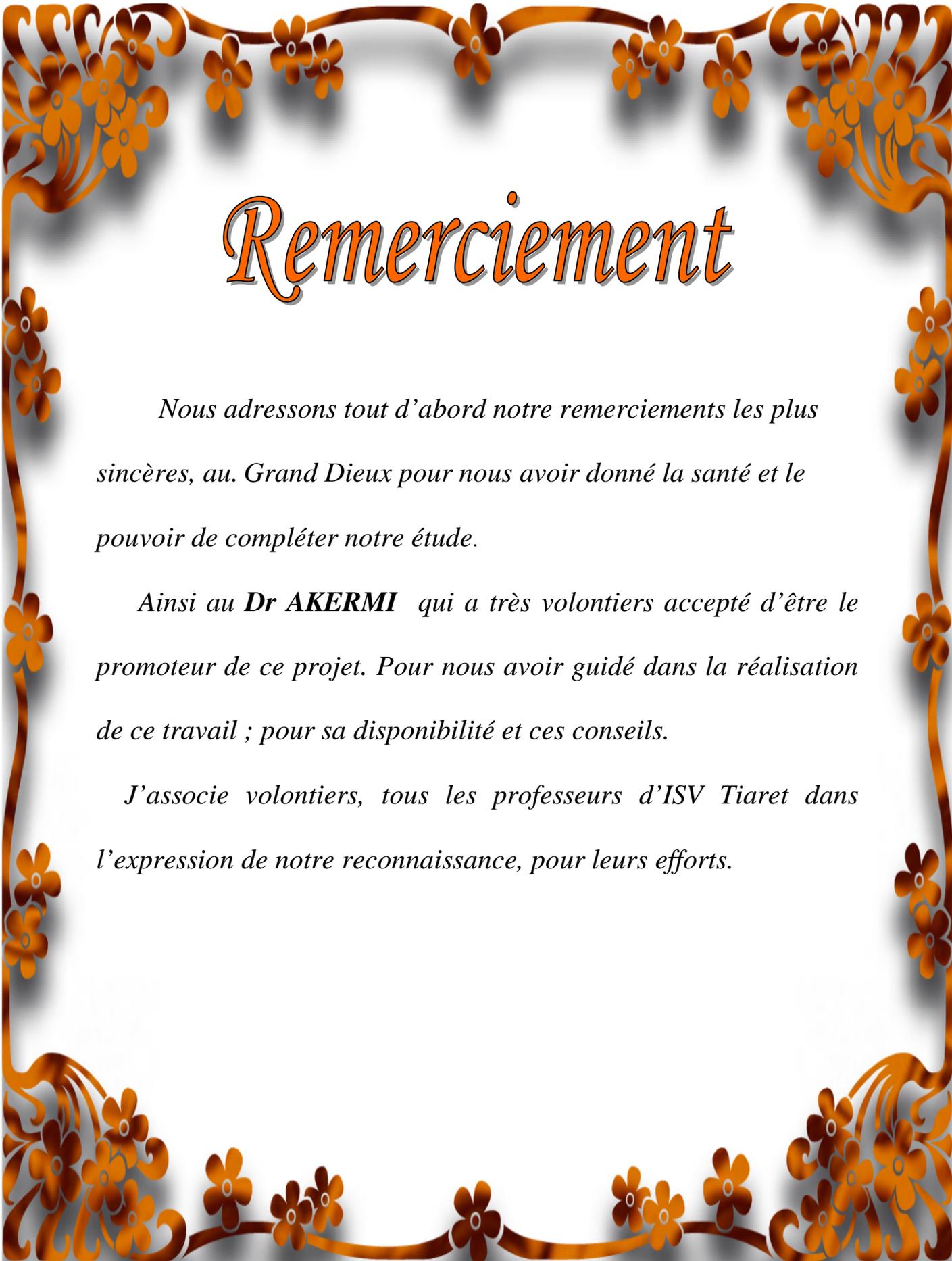
PRESENTEES PAR:

- ❖ Benmaiza Hassina
- ❖ Sahraoui Salima

ENCADREES PAR :

Dr . AKERMIA

ANNEE UNIVERSITAIRE
2015-2016

A decorative border in a golden-orange color, featuring stylized flowers and swirling patterns that frame the central text.

Remerciement

Nous adressons tout d'abord notre remerciements les plus sincères, au. Grand Dieux pour nous avoir donné la santé et le pouvoir de compléter notre étude.

*Ainsi au **Dr AKERMI** qui a très volontiers accepté d'être le promoteur de ce projet. Pour nous avoir guidé dans la réalisation de ce travail ; pour sa disponibilité et ces conseils.*

J'associe volontiers, tous les professeurs d'ISV Tiaret dans l'expression de notre reconnaissance, pour leurs efforts.

Dédicace

*J'ai l'honneur de dédier mon modeste travail qui représente un long parcours d'efforts et de progrès pour :
Mes chers parents qui m'ont donné l'espoir et l'effort pour aboutir
à la fin de mon rêve.*

*Mes sœurs : Chahinez ; Lila ; Latifa ; Samira ; Khadidja ; Amel et
Romaïssa.*

Mes frères : Houcine et A.Kader

Leurs congénits : Didi Mustapha ; Didi

*Dahman ; Djamel ; Fathallah ; Ali et Toufik, Nabila et Souraya
leurs enfants : Abdou et Missino ; Fifi et Hiba ; Maria et Ines et
Chouchou ; A.El hadi et Djamel el dine ; Dhiaa el dine ;
Ishak ; Allaa et Amine ; Hadile et Med firas et Batoule*

*Sans oublier mon très chère époux WALID qui m'a soutenue
durant mes études ; qui je lui souhaite un grand succès dans son
projet et horizon surtout tous le bonheur du monde.*

Mes amies Saly et Houria

*J'offre mes remerciements à tous ce qui m'ont encouragée ; encourager
et soutenue pendant mes études*

Je souhaite à tout le monde une vie heureuse et paisible.

HASSINA

Dédicace

*J'ai l'honneur de dédier mon modeste travail qui
représente un long parcours d'efforts et de progrès :
On mémoire de mon désunt père qui je lui souhaite le
paradis et la paix dans sa tombe.*

*A ma très chère mère qui m'a soutenue durant toute cette
période*

Mes sœurs : Fatima Zahra et Amel

Mes frères : Nadir et Salim ; Youcef

*Leurs congeoints et leurs enfants : Khawla ; Yasser ; Arwa
et Youness*

Mon futur mari Mustapha

Mes amies : Hassina et Houria

*J'offre mes remerciements à toux ce qui m'ont connue ;
encourager ; et soutenue pendant mes études.*

*Je souhaite à tout le monde une vie heureuse et paisible et
un grand succès dans leur projets et horizons.*

SALIMA

SOMMAIRE

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	01
CHAPITRE I : ETIO-PATHOGENIE DE L'ENTEROTOXIMIE CHEZ LES OVINS	
I. Etio-pathogénie	03
I.1. Bactéries	03
I.1.1. <i>Clostridium perfringens</i>	03
I.1.1.A. Morphologie.....	03
I.1.1.B. Habitat.....	04
I.1.1.C. Formes de résistance : les spores	04
I.1.1.D. Caractères biochimiques et culturaux	04
I.1.2 <i>Clostridium sordellii</i>	05
I.1.2.A. Morphologie.....	05
I.1.2.B. Habitat.....	05
I.1.2.C. Caractères biochimiques	06
I.2. Les toxines clostridiennes.....	06
I.2.1 La toxine α	06
I.2.1.A. Structure	07
I.2.1.B. Gène codant.....	07
I.2.1.C Activité biologique.....	07
I.2.2. La toxine β 1	08
I.2.2.A. Structure	08
I.2.2.B. Gène codant.....	08
I.2.2.C. Activité biologique.....	08
I.2.3. La toxine β 2.....	09
I.2.3.A. Structure	09
I.2.3.B. Gène codant.....	09
I.2.3.C. Action biologique.....	09
I.2.4. La toxine ϵ	09
I.2.4.A. Structure	10
I.2.4.B. Gène codant.....	10
I.2.4.C. Activité biologique.....	10
I.2.5. La toxine ι	10
I.2.5.A. Structure	11
I.2.5.B. Gène codant.....	11
I.2.5.C Activité biologique.....	11
I.3. Mode d'action	11
I.4.Etude génétique	14
I.5. Sensibilité et résistance.....	15
I.5. 1.Sensibilité et résistance aux antibiotiques	15

SOMMAIRE

I.5.1.A. les BETALACTAMIINES	15
I.5.1.B. résistance aux macrolides et lincosamides.....	15
I.5.1.C. résistance aux TETRACYCLINES	15
I.5.1.D. résistance aux chloramphénicols	15
I.5.1.E. sensibilité aux autres antibiotiques	15
I.5.2. Sensibilité aux antiseptiques et désinfectants.....	16
I.6. Classification de <i>Clostridium perfringens</i>	16
I.6.1. Classification en toxinotypes	17
I.6.1.A. Entérotoxémie due à <i>Clostridium perfringens</i> de type A non entérotoxinogène.....	17
I.6.1.B. Entérotoxémie due à <i>Clostridium perfringens</i> de type B	18
I.6.1.C. Entérotoxémie due à <i>Clostridium perfringens</i> de type C	18
I.6.1.D. Entérotoxémie due à <i>Clostridium perfringens</i> de type D.....	19
I.6.1.E. Entérotoxémie due à <i>Clostridium perfringens</i> de type E.....	19
I.6.1.F. Entérotoxémie due à <i>Clostridium perfringens</i> de type A entérotoxinogène.....	19
I.6.1.G. Entérotoxémie à <i>Clostridium sordellii</i>	20
I.6.2. La classification génotypique	20
CHAPITRE II : EPIDEMIOLOGIE	
II.1. Epidémiologie descriptive	23
II.1.1. Espèces sensibles et répartition géographique	23
II.1.2 .Importance et prévalence en France	24
II.1.3.Forme épidémiologique	25
II.1.4. Catégories d'animaux atteints	25
II.2.Epidémiologie analytique	27
II.2.1.Sources	27
II.2.2.Contamination	28
II.2.3.Les causes favorisante	29
II.3. Pathogénie des entérotoxémies	34
Chapitre III : DIAGNOSTIC	
III. 1. Les bases épidémiologiques	37
III. 2. Les bases cliniques	37
III.2. 1. La forme clinique suraiguë	37
III.2. 2. La forme clinique aiguë	38
III.3. Les bases lésionnelles	41
III.3. 1. Aspect général.....	42
III.3 .1.A. Aspect extérieur	42
III.3 .1.B. Aspect interne	42
III.3 .2. Les organes internes.....	42
III.3 .2. A. L'appareil cardio-respiratoire.....	43
III.3 .2. B. L'appareil digestif	43
III.3 .2. C. L'appareil urinaire	47

SOMMAIRE

III.3 .2. D. Système lymphatique	48
III.3 .2. E. Système nerveux.....	49
III.4. Diagnostic différentiel.....	53
III.5. Diagnostic de laboratoire	57
2III.5. 1 .Prélèvement.....	57
III.5. 2. Méthode de diagnostic	59
III.5. 2. A. Etude de bactériologie.....	59
III.5. 2. B. Le Typage.....	61
III.5. 2.C. Identification direct par coloration des bactéries in situ.....	63
III.5. 2. D . Sérologie	64
III.5. 2. E. Etude des modifications du a l'intoxication	64

CHAPITRE IV : PROPHYLAXIE

IV.1. Prophylaxie sanitaire.....	68
IV.2. Prophylaxie médicale	68
IV.2.1. L'antibiothérapie	68
IV.2.2. La sérothérapie.....	68
IV.3. La vaccination.....	69
IV.3.1. Préparation des vaccins.....	69
IV.3.2. Spécialités et protocoles.....	71
Conclusion	75
Références Bibliographiques	77

Liste des figures

Figure 1 : Photographie de *Clostridium perfringens* observée au microscope optique (800X462-dirlabsn.org)

Figure 2 : Photographie de *C. sordellii* observée au microscope optique (200x200)flickr.com

Figure 3 : Mécanismes d'action de la toxine ϵ de *C. perfringens* [POPOFF M.R. Entérotoxines bactériennes: structure, mode d'action et approche vaccinale. Revue Med. Vet., 1996, 147(6):425-438]

Figure 4: Carte génétique du chromosome CPN50 [Rood 1998]

Figure 5 : Proportion des différents toxinotypes de *Clostridium* dans les enterotoxémies ovines en France [Manteca et al. 2005].

Figure 6 : mort subite suite à une Entérotoxémie(CEVA SANTE ANIMAL)

Figure 07 :symptôme digestif(diarrhée typique d'entérotoxémie)[CEVA SANTE ANIMAL]

Figure 08 :mort subite suite à des symptômes nerveux (CEVA SANTE ANIMAL)

Figure 09 : Péricardite exsudative (CEVA SANTE ANIMAL)

Figure10 :Surcharge ruminale [Le contenu abondant et la sécheresse du rumen indiquent un iléus paralytique.] (CEVA SANTE ANIMAL)

Figure11 :Abomasite hémorragique [Sang digéré de couleur noire dans la lumière de la caillette.] (CEVA SANTE ANIMAL)

Figure12 :Entérite hémorragique[Cette lésion est due à l'action de la toxine epsilon sur la muqueuse] (CEVA SANTE ANIMAL)

Figure 13 : Entérotoxémie - tassement du contenu caecal.

favorise la prolifération des Clostridies. Ici, on peut remarquer la jéjunite et l'hyperhémie des vaisseaux mésentériques. (CEVA SANTE ANIMAL)

Figure 14:rein pulpeux.[L'autolyse accélérée du parenchyme rénal est une lésion caractéristique de l'entérotoxémie.] (CEVA SANTE ANIMAL)

Figure15 :Entérotoxémie ictérique .[Les reins présentent une couleur noirâtre due à la néphrose hémoglobinurique et le foie est orangé à cause de la stase intestinale] (CEVA SANTE ANIMAL)

Figure16 :Entérotoxémie ictérique.[Encéphale avec anémie, probablement due à l'action de la toxine hémolytique de *Clostridium perfringens* de type A.] (CEVA SANTE ANIMAL)

Liste des tableaux

Tableau I : Synthèse des propriétés biologiques des toxines de *Clostridium perfringens* [18, 69].

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

Tableau III : Toxinotypes et genotypes associes de *Clostridium perfringens* [Latour 2004].

Tableau IV : Maladies associees aux divers toxinotypes (classification traditionnelle) de *C. perfringens*, especes cibles, répartition [Daube 1992].

Tableau V : Frequence relative des agents etiologiques d'enterotoxemie en fonction de l'age chez les ovins et les caprins [Popoff 1989 et 1994].

Tableau VI : Etude clinique de l'enterotoxemie type D chez les ovins et les caprins. Frequence relative des symptomes decrits dans la bibliographie [Blackwell et al. 1991, Chartier 2002, Clark 2003, Popoff1994, Uzal 2004, Van Mètre et al. 2000].

Tableau VII : Synthèse des lésions caractéristiques observées à l'autopsie sur les ruminants morts d'entérotaxémie [LATOUR P., Les entérotaxémies chez les bovins : bilan bibliographique et contribution à l'amélioration du diagnostic nécropsique et bactériologique, Thèse de doctorat vétérinaire, Lyon, 2004, 174] .

Tableau VIII : Grille des lésions necropsiques d'enterotoxemie type D [Blackwell et al. 1991, Ferrer et al.2002, Popoff 1994, Uzal et Kelly1 1998, Uzal 2004] .

Tableau IX : Diagnostic différentiel des différentes causes de mort subite chez les ruminants [84, 21, 45, 48, 57].

Tableau X (bis): Diagnostic différentiel des différentes causes de mort subite chez les ruminants [84, 21, 45, 48, 57].

Tableau XI : Presence et valeur diagnostique de *Clostridium* dans l'intestin des petits ruminants [Latour 2004, Rood 1998, Shoenian 2005, Songer 1998, Uzal 2004].

Tableau XII : PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) [Songer 1998].

Tableau XIII : Vaccin Adjuvants huileux [Uzal et Kelly2 1998].

Tableau VX : Vaccins contre les infections clostridiennes disponibles en France pour les petits ruminants en 2005 [Petit 2005].

INTRODUCTION

L'entérotoxémie des ruminants est une affection grave qui se traduit par une mort subite. Cette intoxication aiguë résulte de la résorption par voie sanguine de toxines produites dans l'intestin lors de la multiplication de bactéries commensales du genre *Clostridium*.

Le syndrome débute à la faveur d'une rupture de l'équilibre de la flore intestinale.

La prolifération des clostridies qui en résulte, s'accompagne d'un accroissement de la concentration en toxines dans l'intestin. La dégradation et l'augmentation de la perméabilité de la paroi digestive par ces toxines se solde par une diarrhée profuse et la toxi-infection du sujet.

Le diagnostic sur le terrain est simplement de suspicion sur la base des circonstances d'apparition et des lésions observées à l'autopsie.

La confirmation diagnostique de laboratoire repose soit sur des techniques bactériologiques simples, soit sur des systèmes plus complexes recourant à la mise en évidence : des toxines des germes responsables de la maladie ou plus récemment des gènes exprimant ces toxines.

Les besoins de diagnostic, sur le terrain, dans les conditions techniques et économiques de la production animale nécessitent de pouvoir recourir à des tests simples, peu coûteux susceptibles de fournir des résultats rapidement.

A noter que l'un des tests simples de pratique courante de laboratoire consiste à effectuer un dénombrement de certaines fractions de la flore intestinale dont *Clostridium perfringens* agent de l'entérotoxémie. Le résultat permet de conclure à l'évolution ou à l'absence d'affection. Ce système est critiqué sur la base de sa sensibilité et de sa spécificité notamment sur l'écart de l'intervalle entre la mort du ruminant et l'examen bactériologique.

L'objectif de ce travail est de vérifier l'utilité de cette méthode en vue d'établir un diagnostic d'entérotoxémie. Pour cela il sera nécessaire de rechercher l'influence des variables susceptibles d'intervenir sur le résultat notamment l'intervalle séparant la mort et l'analyse du dénombrement de *Clostridium perfringens* mais également les écarts susceptibles de résulter des lieux de prélèvements de l'intestin et enfin des conditions de stockage et d'acheminement du prélèvement.

CHAPITRE I

ETIO-PATHOGENIE

L'entérotoxémie chez les petits ruminants constitue l'une des principales entités pathologiques en élevage intensif, tant sur le plan médical qu'économique. Etant donnée la faible valeur individuelle des animaux et le sombre pronostic des entérotoxémies, la maladie est abordée à l'échelle du troupeau.

Les entérotoxémies sont des affections 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.

I-ETIO- PATHOGENIE :

Clostridium perfringens est classiquement considéré comme l'agent étiologique des entérotoxémies, même si d'autres clostridies (*sordellii*, *septicum*) sont anecdotiquement impliquées [60]. D'autres agents étiologiques peuvent être responsables de cette maladie telle que *Escherichia coli*, mais leur prévalence est tellement faible qu'il me semble inutile de les détailler.

I.1.Bactéries :

Les bactéries responsables des Entérotoxémie appartiennent majoritairement au genre *Clostridium* : *C. perfringens* est isolé le plus fréquemment [2,74]. Il a été identifié comme l'agent étiologique principal dans 83% des cas d'entérotoxémies [10]. Toutefois, bien que *Clostridium perfringens* soit majoritairement décrit, des cas faisant intervenir d'autres clostridies sont relatés comme *Clostridium sordelli* responsable de mort brutale chez les ovins [16,78, 24].

I.1.1.Clostridium perfringens

I.1.1.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 [18, 58,103]. 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 [100]. Les bacilles sont généralement isolés, parfois groupés en paires [103].

Figure 1 : Photographie de *Clostridium perfringens* observée au microscope optique (800X462-dirlabsn.orq)



I.1.1.B.Habitat

Clostridium perfringens est une bactérie tellurique et ubiquitaire [46, 74,100]. Elle est présente le plus souvent en grand nombre dans l'environnement (sols, boues, poussières, litières)[46]. *Clostridium perfringens* est commensale du tube digestif de l'homme et des animaux [46, 74, 18,56]. 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 [74].

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 [74].

I.1.1.C.Formes de résistance : les spores

Les spores de *Clostridium perfringens* sont ovales et thermorésistantes. 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 [24, 100,103].

La formation de spores mûres thermorésistantes sur des milieux de croissance usuels est généralement bloquée au stade II (formation de septum). Le déterminisme de la production de l'entérotoxine est codé par le même gène que celui de la sporulation. Ainsi, l'augmentation du taux d'entérotoxine est proportionnelle aux nombres de spores thermorésistantes formées [100].

I.1.1.D.Caractères biochimiques et culturaux

Il s'agit d'une bactérie anaérobie stricte, aérotolérante (sa croissance est possible en surface avec 5% d'oxygène en présence d'un catalyseur activé par H₂), déficiente en catalase et en peroxydase, produisant des endospores thermosensibles [18,58,103].

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 [100].

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 [100,103].

Elle est saccharolytique et protéolytique, c'est-à-dire qu'elle détruit les carbohydrates et les protéines en différents composants dont quelques uns sont toxiques [24, 100,103].

Toutes les souches réduisent les sulfites en sulfures. Ce critère est utilisé pour dénombrer *C. perfringens* dans l'eau, le sol et les fèces (nous détaillerons l'importance de cette propriété dans le choix des milieux de cultures utilisés dans la partie expérimentale). 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 [100 ,103].

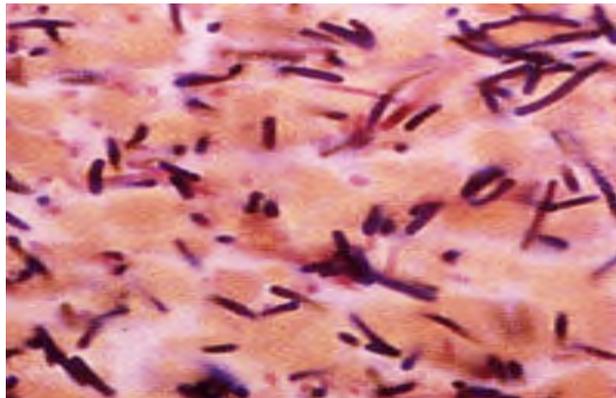
I.1.2.Clostridium sordellii

Clostridium sordellii est responsable de troubles digestifs pouvant être responsable d'entérotoxémie des ruminants [16, 24,74].

I.1.2.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 ovale.

Figure 2 : Photographie de *C. sordellii* observée au microscope optique (200x200) flickr.com



I.1.2.B.Habitat

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

I.1.2.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) [100,103].

I.2. Les toxines clostridiennes :

Selon la littérature, 17 toxines produites par *C. perfringens* ont été décrites mais quelques unes seulement ont un rôle pathogène [90].

Sur le terrain, les entérotoxémies sont liées à la prolifération d'un mélange de différentes toxines lors de la pullulation de *C. perfringens* dans l'intestin.

Parmi ces toxines, quatre exotoxines protéiques et une endotoxine ont une activité létale faisant d'elles

les toxines majeures pour le typage des bactéries.

Les différentes souches de *C. perfringens* sont réparties en cinq types, classées en fonction des différentes productions de toxines : type A, B, C, D et E [46,103].

Actuellement, on s'oriente vers une classification génotypique qui prend en considération toutes les toxines produites par la souche lors de la maladie observée parmi ces six toxines létales majeures (α , β_1 , β_2 , ϵ , ι et CPE).

L'activité biologique des toxines protéiques élaborées est à l'origine de lésions découvertes à l'autopsie. Néanmoins, nous n'observons pas de tableaux lésionnels spécifiques en fonction de la production de toxines et du type de *C. perfringens* identifié [18].

Il existe des toxines mineures qui potentialisent l'action des toxines majeures ; ce sont en général des enzymes hydrolytiques (protéases, hémolysines) qui jouent un rôle mineur dans la pathologie [74].

Elles sont désignées par des lettres grecques : êta, kappa, thêta, gamma, lambda, nu, delta et mu (η , κ , θ , γ , λ , ν , δ , μ) [34, 100,103].

Clostridium sordelli, identifié dans des cas suspects d'entérotoxémie, produit deux toxines, une entérotoxine (HT) et une toxine létale (LT) [99, 100,103].

Chaque toxine est élaborée à partir d'un gène porté par le chromosome ou un plasmide. La découverte des différents gènes codants est utile aux nouvelles techniques de laboratoire basées sur l'identification des toxines produites en fonction des gènes identifiés.

I.2.1. La toxine α :

Ce fut la première toxine bactérienne dont l'activité enzymatique fut découverte en 1940 [98].

Il s'agit d'une lécithinase (ou phospholipase de type C) et d'une sphingomyélinase hydrolysant la phosphatidyl-choline, la lécithine, les phospholipides et la sphingomyéline [7, 46, 88, 98,103].

Elle possède une activité hémolytique, nécrosante et létale [98,103]. La toxine α est sécrétée par tous les types de *Clostridium perfringens* et synthétisée en phase de 25 croissances exponentielles [88, 90,98].

I.2.1.A. Structure

Cette protéine possède un poids moléculaire de 50 kDa (Dalton). Sa fabrication est établit à partir d'un peptide signal. Elle se compose de 370 acides aminés et possède deux domaines ; l'un est constitué d'une hélice α en partie N-terminale, portion active de la toxine, l'autre est formée d'un feuillet β , en partie C-terminale, impliquée dans la fixation membranaire. Il s'agit d'une métallo enzyme constituée d'ions Zn^{2+} et Ca^{2+} . Ces ions sont indispensables pour son activité biologique, le zinc intervenant dans l'activité enzymatique et le calcium dans la fixation membranaire [98].

I.2.1.B. Gène codant : Le gène *cpa* (encore appelé *plc*) :

Est à l'origine de cette toxine. Il est situé sur le chromosome près de l'origine de réplication et d'initiation [19 ,90]. Sa séquence, constante dans toutes les souches identifiées, permet par conséquent de l'utiliser comme marqueur génétique de l'espèce [69].

I.2.1.C. Activité biologique :

Son rôle consiste en une déstabilisation des membranes cellulaires. Le diacylglycérol, produit de l'hydrolyse de la lécithine par la toxine α , active la protéine kinase conduisant à l'activation des phospholipases C et D des cellules eucaryotes et à une cascade de réactions dues à l'acide arachidonique. Elles engendrent la synthèse et l'attraction des molécules de l'inflammation comme les leucotriènes, les thromboxanes et les facteurs d'activation des plaquettes. Ces réactions entraînent la contraction des vaisseaux sanguins, une augmentation de la perméabilité, l'agrégation plaquettaire et un dysfonctionnement des muscles (myocarde). Son activité biologique se traduit par la lyse membranaire des cellules cibles comme les leucocytes ou les entérocytes [46, 69, 88,100].

Des expérimentations ont permis de mettre en évidence ces effets pathogènes par injection intraveineuse ou intra péritonéale de cette toxine [11,98].

La toxine α possède une action hémolytique. Ceci la différencie des phospholipases A dont l'action hémolytique s'effectue à partir de produits hémolytiques [100]. Néanmoins ces produits interviennent dans l'activation de multiples réactions altérant le métabolisme cellulaire conduisant à la déstabilisation des cellules [11]. Elle modifie la perméabilité des endothéliums et provoque la nécrose des villosités intestinales [88]. Des études menées par SONGER tendent à montrer que l'infime différence de la séquence en acides aminés de la toxine α , entre les toxi-infections gangréneuse et les entérotoxémies, confère à cette dernière une résistance particulière vis-à-vis de la chymotrypsine permettant son accumulation dans l'intestin [90] .

Son rôle pathogène est discuté dans les entérotoxémies même si sa présence est presque systématique dans les prélèvements du tractus gastro-intestinal, en particulier chez les bovins (90 à 95% des prélèvements) [46,57]. Différentes études par GKIOURTZIDIS ont montré que l'action de la toxine α est incertaine voire inexistante chez l'espèce ovine [32]. In vivo, l'action de la toxine α a été mise en évidence exclusivement sur des volailles [74].

I.2.2.La toxine β 1

Cette toxine, anciennement appelée toxine β , a été renommée depuis la découverte récente de la toxine β 2 [69].

La toxine β 1 est une toxine nécrosante, létale, thermolabile et sensible à l'action des enzymes protéolytiques. Elle est sécrétée en phase de croissance exponentielle des bactéries dans l'intestin et entraîne la nécrose de la muqueuse intestinale surtout chez les nouveau-nées [32,46].

I.2.2.A. Structure

Cette protéine est constituée de 336 acides aminés, de poids moléculaire de 38 kDa. Elle possède de nombreuses similitudes avec la toxine α de *Staphylococcus aureus*, la toxine γ et la leucocidine [31,90].

I.2.2.B. Gène codant : Le gène *cpb1*

à l'origine de l'élaboration de cette toxine, réside sur un élément extra chromosomique, un plasmide instable lors de culture de bactéries sur gélose au sang à 37°C sous anaérobiose [31, 90,103]. Les raisons de cette instabilité ne sont pas encore élucidées [12].

I.2.2.C. Activité biologique

La toxine élabore des pores transmembranaires, provoquant des dommages sur les cellules cibles (cellules de l'épithélium intestinal, de l'endothélium). La toxine β 1 atteint préférentiellement l'intestin, le cœur, les vaisseaux sanguins et les ganglions lymphatiques. Elle affecte les tissus nerveux en modifiant les transports ioniques à travers la membrane des cellules et provoque une fuite de potassium avec passage intracellulaire de Cl^- , Na^+ et de Ca^{2+} modifiant la polarisation membranaire [103].

Elle possède une activité dermonécrosante. En effet, une quantité de 2 ng de la toxine est suffisante pour provoquer des lésions dermonécrosantes, alors que la dose létale à 50% sur des souris est de 500 ng/kg [90].

La toxine β 1 est rapidement inactivée par la trypsine dans l'intestin expliquant l'atteinte préférentiel de cette toxine pour les nouveau-nées. Elle est due à une diminution de l'activité des enzymes protéolytiques liée à la diminution des sécrétions pancréatiques durant une courte période post natale ou suite à l'ingestion d'inhibiteur des protéases (trypsine) contenues dans le colostrum [18,90].

I.2.3. La toxine β 2

La toxine β 2 a été récemment décrite mais son rôle pathogène n'est pas encore clairement identifié. Elle a été isolée sur une souche provoquant une entérite nécrotique mortelle chez le porcelet.

Des études récentes ont permis de classer cette toxine dans les différents toxinotypes décrits dans la littérature [34, 31,103].

I.2.3.A. Structure

Il s'agit d'une protéine de 27,4 kDa avec un peptide signal de 30 acides aminés en position N-terminale. La séquence de la toxine β 2 n'a pas beaucoup d'homologie avec celle de la toxine β 1 (15%) et un très faible niveau de similitude immunologique [31].

I.2.3.B. Gène codant Le gène *cpb2*

Codant pour la toxine β 2, est porté par un plasmide instable, sans aucune relation avec le gène de la toxine β 1. Cette instabilité est liée à une faible tolérance à l'oxygène ambiant et à une sensibilité aux températures extrêmes, conduisant à sa perte au bout d'une heure en aérobiose. La particularité de l'identification de ce gène *cpb2*, difficile à isoler, explique sa découverte tardive [31, 27,103].

I.2.3.C. Action biologique

Son pouvoir pathogène est identique à la toxine β 1. Des pores transmembranaires sont formés dont le mécanisme d'action reste encore indéterminé. La toxine β 2 a souvent été isolée sur des contenus intestinaux d'entérite nécrotique chez le porc, des entérocolites chez le cheval et des diarrhées chez le chien [103].

Les lésions observées sont une nécrose et des hémorragies de l'intestin grêle. D'autres organes sont affectés par cette toxine : le cœur, les vaisseaux, la vésicule biliaire et les muscles lisses [31,62].

Elle est isolée sur des animaux sains ou malades, souvent en association avec la toxine α [83,103]. Des auteurs présumant qu'une synergie s'élabore entre la toxine β 2 et la toxine α ou la toxine ϵ [34,62].

La toxine β 2 est désactivée par la trypsine, elle est clivée en fragments de 13 et de 15 kDa entraînant ainsi une perte totale de son activité cytotoxique. Du fait de cette sensibilité à cette enzyme, on retrouve la même prédisposition pour les nouveau-nés que la toxine β 1 [31].

I.2.4. La toxine ϵ

La toxine ϵ est produite par *Clostridium perfringens* en particulier dans les toxinotypes B et D décrits dans la littérature [100,103]. Elle est dermonécrosante, oedématisante et létale mais non hémolytique [90,46]. Elle est souvent présente lors d'entérotoxémies des petits ruminants et plus rarement chez les bovins [18].

I.2.4.A. Structure

La toxine ϵ est constituée de 331 acides aminés avec un poids moléculaire de 32,7 kDa [67]. Elle est produite sous une forme inactive, protoxine thermostable, et devient active suite à l'action d'enzymes protéolytiques (la trypsine, chymotrypsine et zinc métalloprotéase) qui clivent un peptide de 13 acides aminés en portion N-terminale [27, 32, 46,67].

I.2.4.B. Gène codant Le gène *etx*

codant pour la toxine ϵ , est porté par un plasmide transférable horizontalement d'une souche à une autre et différent de celui des toxines β_1 et β_2 [27, 90,103].

I.2.4.C. Activité biologique

Il s'agit d'une perméase affectant les cellules du cytosquelette ce qui implique une augmentation de la perméabilité des cellules épithéliales et endothéliales (particulièrement au niveau du cerveau)[103].

Le pouvoir toxique de la protoxine ϵ se multiplie par 100 voire 1000 suite à sa fragmentation enzymatique [43]. Elle agit en augmentant la perméabilité de la paroi intestinale altérant sa fonction d'absorption [46,67]. La toxine augmente la perméabilité et produit des dommages sur l'endothélium vasculaire, amenant à une perte de fluide et l'apparition d'œdème notamment du poumon, cœur, reins et cerveau [46,103].

L'action de la toxine ϵ , sur l'intestin, est moins importante que la toxine β , mais suffisante pour permettre sa diffusion par voie générale. Cette dissémination dans l'organisme facilite sa fixation aux récepteurs des endothéliums vasculaires (surtout dans le cerveau), des cellules de l'anse de Henlé et des sinusoides hépatiques [18].

Des études, menées par MIYAKAWA et UZAL, ont permis d'élucider le mécanisme d'action de la toxine ϵ , grâce à des injections de toxine dans des anses ligaturées d'intestins d'ovins et de caprins, évoluant en quelques heures vers une accumulation de liquide intraluminal.

En effet, elle agit en altérant les mécanismes de transports des ions et de l'eau de la paroi de l'intestin, contribuant à une modification des échanges permis avec les cellules endothéliales. La rétention d'ions et d'eau dans l'intestin est plus rapide et importante chez les caprins que chez les ovins [67,68]. La meilleure absorption de la toxine ϵ chez les ovins par rapport aux caprins explique les sites différents d'activité entre les espèces [67,26].

La production post-mortem et la destruction intestinale de la toxine diminue la sensibilité et la spécificité des méthodes de détection de laboratoire de cette toxine en vue d'un diagnostic d'entérotoxémie [101].

I.2.5. La toxine ι

La toxine ι est produite sous forme inactive par *Clostridium perfringens* souvent décrite dans le toxinotype E. Son implication dans les entérotoxémies est faible. Chez la souris, elle est reconnue pour son activité nécrosante et létale [74,103].

I.2.5.A. Structure

Il s'agit d'une toxine binaire, sécrétée sous forme inactive et activée par des enzymes protéolytiques [74,103]. La modification des onze derniers acides aminés du coté N-terminal active la toxine. Elle est constituée de deux facteurs protéiques distincts (deux chaînes polypeptidiques), identifiés sous le nom de Ia et Ib, non reliés ni par liaison covalente ni par pont disulfure. Le composant Ib, de 98 kDa, est le composant permettant la reconnaissance d'une protéine membranaire par sa portion C-terminale. Le composant Ia, de 45 kDa, est porteur de l'activité enzymatique de la toxine par sa portion N-terminale. L'association des deux composants est nécessaire pour assurer l'activité biologique de la toxine [74, 90,46].

I.2.5.B. Gène codant Les gènes *iap* et *ibp*

sont organisés en un opéron sur un plasmide [31,83]. Les deux molécules sont produites sous l'action d'un peptide signal [27].

I.2.5.C. Activité biologique

Son activité enzymatique, celui d'une ADP-ribosyltransférase conférée par sa partie Ia résulte dans la fixation d'une molécule de NADPH ou de NADH qui permet la réaction d'ADP-ribosylation des monomères d'actines, aboutissant à la dépolymérisation des filaments d'actine [18,103].

Ib reconnaît les récepteurs cellulaires et permet l'entrée d'Ia dans le cytoplasme suite à la formation de pores transmembranaires [46, 69,103].

Cette activité enzymatique s'exprime de différentes façons : destruction des membranes cellulaires (lécithinase), arrêt de la physiologie cellulaire de façon irréversible (synthèse protéique) et perturbation de la physiologie cellulaire par interaction avec les systèmes régulateurs (AMP cyclique) [27].

La dépolarisation du cytosquelette d'actine entraîne une désorganisation des jonctions serrées des cellules, conduisant à une augmentation de la perméabilité des cellules de la muqueuse intestinale.

Cette modification de la perméabilité est à l'origine d'œdèmes et de suffusions.

I.3. MODE D'ACTION**I.3.1. Lys e des tissus**

Clostridium secrète une exotoxine protéique, une phospholipase (lécithinase) qui désorganise les membranes cellulaires. Cette toxine antigénique a aussi une action hémolytique. *C. perfringens* secrète aussi une hyaluronidase, une collagénase et une désoxyribonucléase dont l'action cellulaire favorise l'extension de l'infection. Ce pool enzymatique participe à la destruction des tissus, notamment de la muqueuse intestinale [Ann.2 2005]. Mais aucun facteur d'adhésion n'a été mis en évidence [Leonhart 2004].

I.3.2. Augmentation de la perméabilité intestinale

Certaines souches de *Clostridium*, dont celles responsables d'entérotoxémie, sécrètent une entérotoxine, thermolabile [Ann.2 2005]. Libérée dans la lumière intestinale, elle agit en augmentant la perméabilité intestinale, favorisant ainsi l'entrée des bactéries et des toxines dans l'organisme.

I.3.3. Intoxication

Suite aux destructions cellulaires et à l'augmentation de la perméabilité de la paroi intestinale, les toxines clostridiennes (puis les bactéries) sont à même de pénétrer dans l'organisme. Elles vont agir à un site cellulaire précis, différent pour chaque bactérie toxinogène [Dart 2005]. Les toxines étant les principaux facteurs de virulence, leur concentration est étroitement corrélée à l'intensité du syndrome entérotoxémique et à la sévérité des lésions. La quantité de toxine libérée est proportionnelle à la multiplication bactérienne

Figure 3 : Mécanismes d'action de la toxine ι de *C. perfringens* [POPOFF M.R. Entérotoxines bactériennes: structure, mode d'action et approche vaccinale. Revue Med. Vet., 1996, 147(6):425-438]

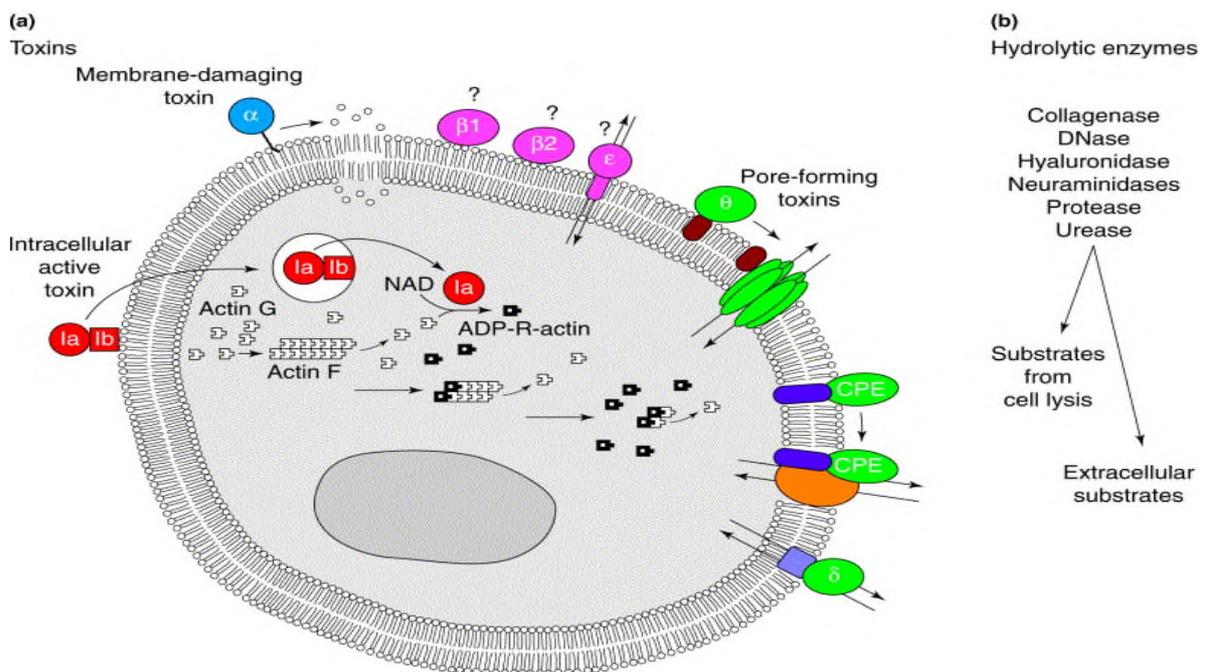


Tableau I : Synthèse des propriétés biologiques des toxines de *Clostridium perfringens* .

[18,69]

Toxine	Gène	Localisation génétique	Mode d'action	Effet pathogène	Organes cibles
A	<i>cpa</i> ou <i>plc</i>	Chromosome	Phospholipase C, sphingomyelinase, dégradation membranaire (détruite par trypsine)	Cytolytique, hémolytique, dermonécrosante et létale	Tous les organes
β 1	<i>cpb 1</i>	Plasmide	Formation de pores, altération des membranes cellulaires (détruite par trypsine)	Cytolytique, dermonécrosante, létale et nécrose hémorragique de la muqueuse intestinale	Intestins, cœur, vaisseaux, ganglions lymphatiques
β 2	<i>cpb 2</i>	Plasmide	Formation de pores, altération des membranes cellulaires	Cytolytique, létale et nécrose hémorragique de la muqueuse intestinale	Intestins, cœur, vaisseaux, muscles lisses, vésicule biliaire
E	<i>Etx</i>	Plasmide	Formation de pores, altération de la perméabilité des membranes cellulaires (activée par trypsine)	Œdème, dermonécrosante et létale	Intestins, poumons, cerveaux, cœur, foie, reins et vaisseaux sanguins
ι (Ia)	<i>Iap</i>	Plasmide	ADP-ribosylation de l'actine (activée par trypsine)	Désorganisation du cytosquelette de l'intégrité des barrières cellulaires, dermonécrosante et létale	Intestins, cerveau et vaisseaux sanguins
ι (Ib)	<i>Ibp</i>	Plasmide	Composant de fixation		

I.5.Sensibilité et résistance

I.5.1.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.

I.5.1.A.LES BÉTA 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.

I.5.1.B.RÉSISTANCE AUX MACROLIDES, LINCOSAMIDES

Le gène de résistance à l'érythromycine est actuellement dénommé *ermB* (Erythromycine Resistance Méthylase). 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*.

I.5.1.C.RÉSISTANCE AUX TÉTRACYCLINES

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*.

I.5.1.D.RÉSISTANCE AU CHLORAMPHÉNICOL

La résistance au chloramphénicol n'est pas fréquente. Elle est due au gène dénommé *catP*, qui code une acetyl-transferase. Un autre gène peut être incriminé : *catQ*. Il est encore plus rare que *cat P*. 12

I.5.1.E.SENSIBILITÉ AUX AUTRES ANTIBIOTIQUES

C. perfringens est sensible à la plupart des autres antibiotiques, parmi lesquels on compte fluoroquinolones, metronidazole, linezolide et 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 érythromycinelincomycine limitent leur utilisation.

I.5.2.Sensibilité aux antiseptiques et désinfectants

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

I.6.CLASSIFICATION DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS***I.6.1.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, bêta 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 même 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'entérotoxine et la toxine β_2 , 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 à *C. perfringens* chez les ovins et les caprins : classification toxingénique [Daube 1992, Manteca et Daube 1994, Uzal 2004

C. perfringens 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 général produite en quantité moindre

- Toxine non produite

(1) Sous type

I.6.1.A. Entérotoxémie due à *Clostridium perfringens* de type A non entérotoxigène

Le toxinotype A de *C. perfringens* avec la toxine α (toxine majeure) est le plus décrit dans la littérature [40, 90, 19,66]. Sa prévalence peut atteindre 84% des cas d'entérotoxémie [34,103]. On peut l'isoler dans l'environnement et dans les intestins des animaux et des hommes sains [46,88]. Son rôle pathogène est essentiellement à l'origine de la gangrène gazeuse alors qu'il reste très controversé dans le déclenchement des entérotoxémies [46]. Il est soupçonné d'intervenir dans l'ulcère perforant et l'inflammation de la caillette chez le veau [2].

La toxine α est la toxine majeure. Des injections intraveineuses de toxines de type A provoquent chez le veau des troubles digestifs évoluant vers la mort [55]. L'action de la toxine α seule reste contestée. En effet, les lésions dues à la destruction des

membranes sont essentiellement liées à l'action de la toxine α mais pour certains auteurs, le pouvoir pathogène de ce toxinotype est du essentiellement à l'entérotoxine [83,103].

Ce toxinotype est désigné sous le nom de la maladie de « l'agneau jaune » chez les ovins (Yellow Lamb Disease) et des cas similaires ont été répertoriés chez les bovins et caprins. L'action hémolytique des toxines dans la circulation sanguine est à l'origine des symptômes, provoquant une hémolyse intra vasculaire et des lésions des capillaires, une inflammation, une agrégation des plaquettes, un état de choc entraînant la mort de l'individu [24, 80, 88,90].

I.6.1.B. Entérotoxémie due à *Clostridium perfringens* de type B

Le toxinotype B produit la toxine α , la toxine β et la toxine ϵ . La toxine β est considérée comme l'agent principal des lésions observées lors de cas d'entérotoxémies décrites de type B [103].

Le toxinotype B est décrit comme responsable de la dysenterie de l'agneau (lamb dysenterie). Il entraîne aussi des entérotoxémies chez le mouton et des entérites hémorragiques néonatales chez le veau [90,103]. Cette prédilection de la maladie pour les nouveau-nées est due à la neutralisation de la trypsine par le colostrum. En effet, la trypsine détruit la toxine β mais elle est inhibée par les substances antitrypsines contenues dans le colostrum. Les toxines β et ϵ affectent le système nerveux et provoquent de sévères dépressions, se traduisant par une forte mortalité. Le rôle de la toxine ϵ , dans les affections du cerveau, est moins important que celui de la toxine β , en raison de l'inhibition des enzymes protéolytiques, nécessaires à son activation, par le colostrum [93,103].

L'entérotoxémie due à *C. perfringens* de type B prend souvent un caractère enzootique. La mortalité au sein d'un troupeau peut atteindre entre 40 et 90% des animaux. Il n'y a pas de transmission entre troupeaux voisins [93].

D'après les cas décrits dans la littérature, ce toxinotype est souvent associé à une entérite hémorragique. Les lésions de l'intestin comprennent une congestion, de l'œdème et des hémorragies.

Le résultat est une entérotoxémie accompagnée d'une entérite avec ulcérations et hémorragies de l'intestin grêle [103].

I.6.1.C. Entérotoxémie due à *Clostridium perfringens* de type C

Ce toxinotype produit les toxines α et β . La maladie présente un caractère sporadique et rarement enzootique [74 ,93].

Il a été décrit chez les adultes sous la dénomination de maladie de « Struck ». Dans les années 60, la description de cas correspondant à ce toxinotype a eu une très grande importance économique par les pertes occasionnées [74, 46, 24, 88,93].

Les cas décrits pour ce toxinotype présentent une nécrose de la muqueuse intestinale sans diarrhée apparente [90]. Les symptômes sévères s'installent en 24 à 48 heures : coliques, douleur abdominale et une diarrhée hémorragique. L'animal développe des signes nerveux et meurt dans un délai de 2 à 24 heures Les premiers symptômes

observés chez les veaux sont frustrés et se traduisent essentiellement par une anorexie [24].

Chez les agneaux allaitants, souvent âgés de quelques jours, les signes cliniques sont moins importants. On observe des tremblements et de la prostration. Les jeunes, en bonne santé, âgé de 2 à 10 jours, développent une entérite hémorragique et nécrotique [24,37, 90].

I.6.1.D. Entérotoxémie due à *Clostridium perfringens* de type D

Le toxinotype D produit les toxines α et ϵ . La toxine ϵ est considérée comme le facteur essentiel d'apparition de la maladie [74].

L'entérotoxémie, connue sous le nom de maladie du « rein pulpeux » (pulpy kidney disease) et décrite chez des cas en rapport avec le toxinotype D, est responsable de 37 nombreuses mortalités chez les ovins conduisant à de lourdes pertes économiques [46].

L'affection se traduit au sein d'un troupeau le plus souvent sous forme sporadique [93]. Elle affecte les agneaux âgés de moins d'un an et occasionnellement les chèvres et les veaux [103] et se traduit par une mort subite. La toxine majeure ϵ entraîne essentiellement des symptômes nerveux (opisthotonos, amaurose,...). Elle se traduit par une incoordination, un tourner en rond, de la nervosité, de l'inappétence, de la prostration, de l'opisthotonos et des fasciculations des yeux [24,46].

Il ne semble pas fortement impliqué dans les cas d'entérotoxémies chez les bovins. En effet, les bovins semblent développer une faible immunité naturelle contre la toxine ϵ à la différence des ovins [18].

Chez les caprins, ce type d'entérotoxémie se traduit par une entérocolite, tandis que chez les ovins, les lésions affectent le cerveau et le foie (œdème) et très peu de modifications sont observés au niveau de l'intestin [67].

I.6.1.E. Entérotoxémie due à *Clostridium perfringens* de type E

Le toxinotype E décrit chez certains sujets est caractérisé par la production de toxines α et ι [74]. Son incidence est peu élevée dans l'entérotoxémie. Des expériences restent à effectuer pour éclaircir le rôle pathogène de cette souche. La toxine ι est constituée de deux sous unités, l'une permettant la reconnaissance des récepteurs spécifiques cellulaires, l'autre étant le support de l'activité biologique. Ces sous unités expliquent la sensibilité variable selon les espèces [19, 66,90]. Ce toxinotype est décrit dans des cas d'entérites hémorragiques du veau [7].

I.6.1.F. Entérotoxémie due à *Clostridium perfringens* de type A entérotoxigène

Ce toxinotype possède un rôle important en médecine humaine, il produit l'entérotoxine responsable de gastroentérite humaine d'origine alimentaire [74].

La toxine a très peu d'action sur les cellules de la muqueuse intestinale mais elle provoque une accumulation de liquide dans l'intestin se traduisant par de la diarrhée.

Chez les bovins et caprins, peu d'études ont démontré une véritable implication de ce pathovar dans le développement de la maladie. Elle a été classée dans le toxinotype de type A même si cette toxine a été isolé dans les autres toxinotypes [18, 27,74].

I.6.1.G. Entérotoxémie à *Clostridium sordellii*

Clostridium sordellii est à l'origine d'entérites hémorragiques chez les bovins et les ovins, mais aussi des entérotoxémies. Les toxines de *C. sordellii* ont été isolées dans le péritoine d'animaux qui sont mort subitement avec un diagnostic de forte suspicion d'entérotoxémie [4, 16,78].

La classification phénotypique est ancienne et ne prend pas en compte les nouvelles toxines qui ont découvertes ces dernières années comme la toxine β_2 . De plus il est difficile sur le terrain d'attribuer un toxinotype spécifique pour chaque cas d'entérotoxémie. En effet, aucun tableau épidémio-clinique et lésionnel n'est spécifique d'un toxinotype particulier mais plutôt de l'action des multiples toxines produites au sein de l'intestin de l'animal [24, 16,78].

De nos jours, elle ne semble plus appropriée et trop restreinte pour définir l'entérotoxémie. De nouvelles classifications ont vu le jour comme la classification génotypique.

I.6.2. Classification génotypique [Rood 1998]

Des souches de même toxinotype pourraient avoir des génomes différents, avec la mobilité probable de gènes de la virulence, notamment des gènes plasmidiques [Daube 1992].

La 14 classification phénotypique, jugée trop restreinte, est progressivement abandonnée au profit d'une classification génotypique (Tableau III).

Tableau III : Toxinotypes et génotypes associés de *Clostridium perfringens* [Latour 2004].

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 plc, cpb1, cpe</i> <i>plc pb2, 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>

Clostridium perfringens produit une grande variété de toxines.

La bibliographie sur l'action des toxines clostridiennes chez les petits ruminants révèle de nombreuses études sur la toxine ϵ et très peu sur d'autres toxines comme la toxine α . Les scientifiques s'interrogent davantage sur l'entérotoxémie type D.

D'après les modes d'action, les phases de la pathogénie sont identiques chez les ovins et les caprins : altération et perméabilisation de la paroi intestinale, pénétration des toxines puis des bactéries dans l'organisme et action sur les organes cibles.

On distingue une variabilité spécifique au niveau de la sensibilité aux toxines. Les caprins seraient dépourvus de récepteurs à la toxine ϵ fonctionnels dans l'encéphale. L'absence de récepteurs 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 α et β_2 dans l'entérotoxémie caprine type A, maladie causant des décès chez le chevreau.

CHAPITRE II
EPIDEMIOLOGIE

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 IV).

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

Toxinotype	Symptomatologie associée	Espèces cibles	Distribution
A₁	Gangrène gazeuse	Homme	Cosmopolite
	Mammite	Bovin	G-B ,Japon
	Entérite nécrotique	Volaille	Cosmopolite
	Colite	Equins	Scandinavie
	Commensal de l'intestin,sol	Homme,animal	Cosmopolite
A₂	Intoxication Alimentaire	Homme	Cosmopolite
B₁	Dysenterie de l'agneau	Ovins , bovins, équins	Afrique du Sud, G-B
B₂	Entérotoxicité	Ovins ,caprins	Iran
C₁	Struck	Ovins	Afrique du Sud, G-B, Australie
C₂	Entérite nécro-hémorragique	Ovins , bovins, équins	USA ,G-B
C₃	Entérite nécro-hémorragique	Porcelet	USA, G-B, Scandinavie
C₄	Entérite nécro-hémorragique	Homme, volaille	Allemagne
C₅	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.1.2. IMPORTANCE ET PRÉVALENCE EN FRANCE

L'importance de la maladie est tout d'abord médicale, car l'issue est souvent fatale. Elle est aussi économique car elle occasionne des pertes d'effectif et des chutes de production.

En France, l'entérotoxémie constitue une dominante pathologique des petits ruminants, plus particulièrement en élevages intensifs. Etant donné la faible valeur économique individuelle de ces animaux, les examens et les prélèvements post-mortem, pourtant indispensables à la confirmation et à la précision du diagnostic, sont loin d'être systématiques. Les données sur les petits ruminants, en particulier sur les chèvres, sont rares et souvent obtenues à partir de petits effectifs.

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 5) : *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].

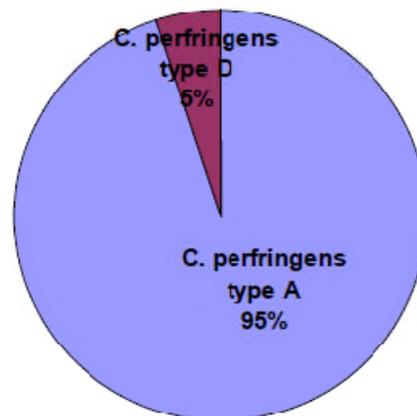


Figure 5 : Proportion des différents toxinotypes de *Clostridium perfringens* dans les entérotoxémies ovines [Manteca et al. 2005].

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.1.3. 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, 2002]. Les mécanismes de la chronicité à l'échelle de l'élevage ou individuelle sont inconnus. La persistance des spores de *C. perfringens* dans l'environnement à un haut niveau suite à l'excrétion par de nombreux animaux malades ou porteur, peut générer de nouveau cas spontanément [Chartier 2002]

II.1.4. 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 V) [Chartier et Broqua 1995].

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

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

- non décrit + possible ou rare ++ couran

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].

Les agent étiologiques majeurs d'entérotoxémie sont les mêmes chez les ovins et les caprins. En France, *C. perfringens* type A est le plus souvent incriminé, suivi de *C. perfringens* type D. *C. perfringens* type D semble plus fréquent chez les caprins. Mais les données de terrain recueillies en France ne s'accordent pas avec les données bibliographiques internationales. Etant donné l'engouement scientifique pour *C. perfringens* type D dans les autres pays, il semblerait qu'il soit le principal agent étiologique d'entérotoxémie chez les ovins et les caprins en dehors de l'Europe.

C. sordellii apparaît dans 15% des cas d'entérotoxémie, mais sa virulence est discutée. Elle semble écartée chez les ovins en France. Des études supplémentaires sont nécessaires pour préciser la pathogénicité de cette bactérie chez les caprins.

La forme épidémiologique de la maladie diffère selon l'espèce. L'entérotoxémie ovine touche essentiellement les agneaux à l'engrais. La forme caprine sévit plutôt dans les élevages laitiers intensifs. L'âge est un paramètre important qui détermine le principal agent étiologique.

La maladie se présente classiquement sous la forme de flambées épizootiques ou de cas sporadiques. Une forme chronique existe chez les caprins.

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.A.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.B.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 α dans 100% des prélèvements et de la toxine ϵ dans 15% des prélèvements [Uzal 2004]. Une autre étude sur un effectif plus grand à l'abattoir, révèle que la toxine ϵ 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.

II.2.1.C. 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 générations 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.A. Contamination par *C. perfringens*

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]

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 le duodénum [Uzal et Kelly 1998].

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.B. 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 réplication est très court. On assiste alors à une explosion de la population clostridienne.

II.2.3. Les causes favorisantes et entérotoxémies**II.2.3.1. Facteurs extrinsèques**

Nous avons montré précédemment qu'une perturbation de l'équilibre de la flore intestinale associée à une atonie digestive conduit à la multiplication des clostridies et à la production de toxines. Les causes favorisantes, principalement l'alimentation, apparaissent véritablement déterminantes dans le développement des entérotoxémies.

II.2.3.1.A. L'alimentation**Rappels préliminaires**

PDI : Protéines vraies réellement digestibles dans l'intestin

PDIM : PDI qui proviennent des protéines vraies formées par la population microbienne du rumen

PDIME : PDIM qui correspondent à la teneur de l'aliment en énergie fermentescible dans le rumen

PDIMN : PDIM qui correspondent à la teneur de l'aliment en azote fermentescible dans le rumen

PDIA : PDI qui sont d'origine alimentaire.

L'alimentation est le principal facteur de risques responsable des déséquilibres de la flore intestinale l'origine des entérotoxémies.

En effet, une alimentation trop riche en matières azotées ou glucidiques fermentescibles joue un rôle primordial [21, 43, 75, 95].

Les matières azotées alimentaires subissent dans le rumen une dégradation plus ou moins intense et rapide à l'origine de la production d'ammoniac. Cette dégradation est très rapide pour les constituants non protéiques (amides, peptides, acides aminés libres...) qui diffusent dans le

liquide du rumen. Elle est aussi très rapide en ce qui concerne l'urée de part l'action des uréases libres en concentration importante. Quant à la dégradation des protéines, elles sont attaquées dès qu'elles sont libérées des cellules lors de la rupture des membranes pendant de la mastication ou sous l'action des bactéries cellulolytiques. Les produits de dégradation des constituants azotés fermentescibles (ammoniac, acides aminés et peptides) sont utilisés par les corps microbiens du rumen pour élaborer des protéines. Cependant, une partie des protéines alimentaires n'est pas dégradées dans le rumen.

La notion de protéines vraies réellement digestibles dans l'intestin (PDI) a été développée en tant que système original (Institut National de la Recherche Agronomique : INRA) pour calculer les apports et les besoins azotés des ruminants. Les PDI comprennent les protéines digestibles dans l'intestin d'origine alimentaire (PDIA) et les protéines digestibles d'origine microbienne (PDIM).

Chaque aliment est caractérisé par deux valeurs azotées, l'une par sa teneur en azote fermentescible dans le rumen ($PDIN = PDIA + PDIMN$), l'autre par sa teneur en matière organique digestible ou en énergie digestible ($PDIE = PDIA + PDIME$). Lors d'apport excessif d'azote fermentescible (excès de PDIN par rapport au PDIE), l'énergie de la ration n'est pas suffisante pour utiliser les produits de dégradation des constituants azotés pour la fabrication de protéines microbiennes. L'ammoniac se trouve en excès dans le rumen provoquant une alcalose ruminale suite au passage à travers la paroi du rumen et à la diffusion dans le sang. Cette hyperammoniémie inhibe, par action directe sur les centres moteurs, l'éructation, le péristaltisme intestinal et aboutit à une atonie intestinale. Le foie ne peut plus effectuer son rôle de détoxification (réactions de désaminations oxydatives de l'ammoniaque en urée) et une insuffisance hépatique s'installe. Une partie de cette urée revient au rumen par la salive ; l'ammoniac qu'elle y donne s'ajoute à l'ammoniac déjà excédentaire et n'est d'aucune utilité pour la population microbienne. Cette augmentation intempestive du taux ammoniacal dans le tube digestif favorise la prolifération d'une flore alcalinophile, notamment *C. perfringens*, dans l'intestin à l'origine d'entérotoxémie [42].

Dans ces circonstances, l'excès de substrats alimentaires atteignant l'intestin favorise la prolifération des clostridies. On trouve cette situation lors d'alimentation riche en azote fermentescible : herbe jeune de pâturage, ensilages d'herbe riches en azote soluble ou apports d'urée trop importants et ingérés rapidement. Lors de la mise aux pâtures aux printemps avec une herbe riche en azote fermentescibles, le risque d'entérotoxémie est accru. La littérature relate que l'apport d'engrais (ammoniacaux et potassiques) sur des pâtures favorise une augmentation des taux de matières azotées solubles des pâtures, entraînant une surcrudescence de cas d'entérotoxémies des ruminants paissant sur celles-ci [42, 43, 46, 74].

Des situations similaires sont décrites lors de rations acidogènes (excès de glucides fermentescibles), par exemple excès de céréales sans transition, entraînant une acidose lactique du rumen avec une diminution du pH intra-ruminal à 5 ; une atonie du rumen et du réseau s'installe. La multiplication des clostridies et la toxinogénèse sont alors favorisées par l'arrivée de substrats alimentaires non digérés (amidon et protéines non fermentés) [25, 95].

Les transitions alimentaires brutales ne permettent pas à la flore de s'adapter, par exemple le passage d'une flore cellulolytique à une flore protéolytique lors de la mise aux pâtures au printemps après une ration riche en fourrages l'hiver. Cette transition brutale peut favoriser le développement des clostridies au dépend de l'équilibre préexistant. Lorsque les conditions climatiques sont favorables, la même situation se présente à l'automne suite à une repousse abondante de l'herbage [25].

II.2.3.1.B. Le stress, le péristaltisme et la sécrétion biliaire

Le stress constitue un facteur de risque d'entérotoxémie. La perturbation de la digestion par une mauvaise irrigation du tube digestif suite à un stress (manipulations brutales, tonte, transport) provoque une libération d'adrénaline entraînant une vasoconstriction de la circulation du tube digestif. Il provoque un ralentissement du transit voire son arrêt et une perturbation du pH gastrique [46]. On aboutit à une stase intestinale [10].

Une diminution du péristaltisme entraîne une rupture de l'effet dépresseur de la flore digestive et contribue à la multiplication des clostridies. En effet, *Clostridium perfringens* n'adhère pas de façon spécifique à la muqueuse intestinale et est éliminé par le transit tout comme les toxines libres dans la lumière. L'augmentation de celui-ci a un effet protecteur et limite les atteintes tissulaires [76]. Il est plus important dans la partie proximale de l'intestin ce qui est à mettre en rapport avec la plus forte densité de bactéries dans la partie distale de celui-ci [74]. Toutes modifications du péristaltisme intestinal prédisposent l'animal à une prolifération bactérienne [17].

La sécrétion biliaire possède un rôle antiseptique qui n'est pas à négliger dans les cas d'entérotoxémie [43]. Les acides biliaires conjugués inhibent la multiplication des bactéries non présentes à l'état naturel au niveau du tube digestif. Les actions des acides biliaires permettent la sélection de certaines souches bactériennes [74].

II.2.3.1.C. Le climat et la saison

Les entérotoxémies sont souvent décrites comme des maladies saisonnières, la majorité des cas se situe au printemps et à l'automne. Ces périodes correspondent aux saisons de changement brutal d'alimentation au printemps avec la mise à l'herbe des ruminants et un apport excessif de matières protéiques. En effet, on passe d'une ration hivernale riche en cellulose (fourrages) à une alimentation très riche en matières protéiques avec les pâtures [17].

Les fortes variations de températures influent également sur l'apparition des entérotoxémies. En effet, un refroidissement brusque provoque une atonie digestive, permettant la prolifération des bactéries pathogènes comme les clostridies. De nombreux cas d'entérotoxémies ont été observés suite à une nuit très froide sur des animaux aux pâturages. Même si la température peut jouer un rôle important dans le processus de déclenchement d'une entérotoxémie, il faut le mettre en corrélation avec d'autres facteurs favorisants [17].

On note que cette description saisonnière des entérotoxémies correspond plus à des facteurs de conduite d'élevage avec une transition alimentaire brutale (excès de matières protéiques ou glucidiques) plutôt qu'à des facteurs climatiques.

II.2.3.1.D. Utilisation d'antibiotiques

L'antibiothérapie, dont l'action vise à détruire ou à inhiber un ou plusieurs agents pathogènes, a également un effet sur les bactéries commensales du tube digestif. Cette action peut passer inaperçue sur le plan clinique.

L'utilisation excessive des antibiotiques est un problème actuel. Leur administration par voie orale de manière inadaptée entraîne la sélection ou l'émergence de certaines souches bactériennes dans le tube digestif. Les molécules les plus utilisées sont à visée Gram négatif, ce qui contribue à la sélection des bactéries Gram positif comme les clostridies. La flore commensale du tube digestif est sensible aux antibiotiques, qui la modifient et favorisent la prolifération des bactéries toxigènes. Les antibiotiques distribués à titre thérapeutique ou préventif sélectionnent dans le tube digestif des souches bactériennes résistantes à des familles d'antibiotiques. Ceci c'est accentué durant ces dernières années [43].

Il est à noter que certains antibiotiques (gentamycine) induisent l'expression de gènes, comme le gène *cpb2* de plus en plus représentés dans les entérotoxémies bovines, mais sans conséquence pratique [27].

II.2.3.1.E. Le parasitisme

Le parasitisme peut interférer et favoriser l'entérotoxémie. Les parasites intestinaux des ruminants créent par leur action traumatisante des portes d'entrée aux bactéries anaérobies. Des études montrent qu'une forte infestation des agneaux et des chevreaux par *Moniezia expansa* favorisent les entérotoxémies. En effet, des lésions inflammatoires sont responsables d'un épaissement de la muqueuse intestinale (une coupe histologique révèle une destruction de l'épithélium et de l'endothélium vasculaire) favorisant l'absorption des toxines [96].

Ostertagia se développe dans les glandes gastriques, diminuant l'acidité de la caillette. Cette modification du pH provoque une diminution du péristaltisme permettant la prolifération des clostridies. La coccidiose et la *cryptosporidiose* provoquent des réactions inflammatoires importantes de l'intestin, altérant la muqueuse intestinale et favorisant la dissémination des toxines de *Clostridium perfringens* par voie sanguine [10, 74].

La fasciolose (Fasciola hepatica) est souvent associée aux entérotoxémies. Les douves altèrent le fonctionnement hépatique par une destruction des hépatocytes et une obstruction des canaux biliaires, modifiant le rôle bactéricide de la bile et diminuant le péristaltisme intestinal [10].

Les lésions du pancréas peuvent favoriser l'apparition des entérotoxémies. La diminution de la sécrétion glandulaire exocrine et en particulier de la trypsine, inductrice ou inhibitrice de certaines toxines, peut interférer dans cette pathologie [43].

II.2.3.2. Facteurs intrinsèques

Les différents éléments de l'épidémiologie descriptive sont souvent abordés, tels que l'espèce, la race, le sexe, l'âge, dans les causes favorisantes des entérotoxémies néanmoins ils ne sont pas considérés comme prépondérants dans cette maladie. Nous décrirons brièvement ces différents facteurs intrinsèques.

II.2.3.2.A.L'espèce

Les entérotoxémies concernent toutes les espèces mais elles sont plus fréquentes chez les ruminants, et tout particulièrement les ovins [33, 74]. Cette prédisposition peut s'expliquer par le fait qu'ils sont plus exposés par les systèmes de productions intensifs à une alimentation favorisant les entérotoxémies [17].

II.2.3.2.B.L'âge

L'âge des ruminants atteints d'entérotoxémie est ample, allant d'un jeune de 48 heures à l'âge adulte [57]. Néanmoins certaines classes d'âges sont plus décrites tels que les jeunes ou les animaux de réforme [17]

Pour les jeunes ruminants : le sevrage, la période de l'engraissement ou l'allaitement avec une bonne laitière semblent prédisposés l'animal à cette maladie. En ce qui concerne les adultes, les plus touchés sont ceux à l'engraissement (réformes) ou en lactation avec des rations riches en concentrés, en bandes sur des pâturages luxuriants au printemps et à l'automne [74]. Les différentes classes d'âges décrites sont plutôt à rapprocher avec les conduites d'élevages utilisées et l'alimentation. En effet, pour les bovins, les entérotoxémies affectent toutes les catégories mais les plus touchés sont [95, 57, 74, 33]

- les veaux allaitants à la mise à l'herbe
- les veaux de boucherie alimentés au distributeur automatique
- les taurillons à l'engrais en début ou en fin d'engraissement
- les vaches laitières surtout pendant la période péripartum
- les vaches de réformes

II.2.3.2.C.La race et la conformation

Chez les bovins, les races à viandes sont les plus exposées à la maladie (charolaise, blonde d'aquitaine, Blanc Bleu Belge) car considérées comme races à croissance rapide, elles sont soumises à une alimentation très énergétique [17, 37, 59]. Les races Blanc Bleu Belge et charolaise sont fréquemment citées dans les cas d'entérotoxémie, mais ceci est explicable par le fait que la majeure partie des études se sont portées sur celles-ci. Alors que d'autres races comme les Prim'Holstein peuvent être également concernées dans des conduites d'élevages intensives [80]. On retrouve aussi cette description chez les ovins telles pour la race Southdown [17].

Les animaux atteints sont souvent les plus beaux sujets (gras ou en bon état d'engraissement) au sein du troupeau [74, 33, 17].

Depuis de nombreuses années, on accorde beaucoup d'importances aux facteurs de la réceptivité intrinsèque et extrinsèque. En fait, derrière ces facteurs intrinsèques (race, sexe, âge) se cachent des conduites d'élevage différentes qui conditionnent le risque d'entérotoxémie. Une conduite d'élevage avec une alimentation intensive génère le risque d'entérotoxémie alors qu'un système extensif le réduit.

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.3. Pathogénie des entérotoxémies

Cet équilibre de la flore intestinale peut être modifié chez les ruminants notamment lors de perturbation en amont du tube digestif c'est à dire au niveau du rumen. Dans ces conditions, les substrats délivrés dans l'intestin permettent de sélectionner un profil de flore différent comme les clostridies.

Lors de perturbation de la flore intestinale, *Clostridium perfringens* peut se multiplier à une vitesse élevée : l'effectif peut décupler en dix minutes, passant de 10^5 UFC/mL à 10^7 UFC/mL de contenu intestinal en une heure [10].

Les clostridies ne peuvent pas adhérer à la muqueuse intestinale par des facteurs d'attachement (comme *E. coli*) [53] ou envahir les cellules épithéliales (comme *Salmonella*). Elles se multiplient dans la lumière de l'intestin uniquement en cas d'altération de l'équilibre bactérien. La pathogénie de ces bactéries dépend uniquement de la capacité lors de la phase de multiplication des bactéries à produire des toxines. Ces toxines ont une action locale sur l'intestin puis diffusent dans l'organisme via la circulation sanguine pour atteindre les organes cibles [74,85].

Dans un premier temps, une multiplication importante des clostridies commence dans les parties distales de l'intestin grêle où leur concentration en tant qu'hôtes habituels est inférieure à 10^3 UCF/mL de contenu intestinal. L'apparition de la maladie nécessite l'altération de l'équilibre de la flore bactérienne. Cette altération doit être beaucoup plus importante chez les adultes ; qui possèdent une flore digestive installée jouant le rôle de barrière, que chez les jeunes dont la flore digestive est précaire. De nombreuses études expérimentales ont tenté de reproduire *in vitro* les étapes observées *in vivo*. Expérimentalement, la plupart des affections naturelles ont pu être reproduites par une administration intraduodénale de culture complète, de cellules suspendues dans un milieu frais, d'extraits cellulaires, de surnageant de culture ou même de toxines purifiées concomitant à une atonie digestive [74].

La régulation des populations bactériennes multiplication et production de toxines (*clostridium perfringens*) fuite d'eau et électrolytes = diarrhée, nécrose et hémorragie passage dans circulation sanguine : atteinte d'autres organes (foie, rein, cœur ...) Toxines à tropisme intestinal Atonie digestive + Facteurs favorisants importante chez les adultes, qui possèdent une flore digestive installée jouant le rôle de barrière, que chez les jeunes dont la flore digestive est précaire. De nombreuses études expérimentales ont tenté de reproduire *in vitro* les étapes observées *in vivo*. Expérimentalement, la plupart des affections naturelles ont pu être reproduites par une administration intraduodénale de culture complète, de cellules suspendues dans un milieu frais, d'extraits cellulaires, de surnageant de culture ou même de toxines purifiées concomitant à une atonie digestive.

Dans un deuxième temps, les bactéries produisent les toxines responsables des symptômes et des lésions observées lors de la maladie. Les toxines altèrent la paroi intestinale et diffusent dans l'organisme par la circulation sanguine pour atteindre les organes cibles (cœur, poumon, foie, rein et cerveau).

L'élément primordial dans la prolifération des clostridies est l'atonie digestive. Les causes d'atonie digestive sont multiples. Elles peuvent être humorales (acidose ou alcalose ruminale, acidose ou alcalose sanguine), alimentaire (alimentation intensive, changement brutal de ration, insuffisance de lest) ou toxiques (acide cyanhydrique des légumineuses). Cette atonie digestive entraîne une accumulation résultante de matières alimentaire insuffisamment fragmentées favorisant la pullulation des clostridies et la résorption des toxines [59].

L'équilibre de la flore bactérienne, mis en place après la naissance de l'animal, évite la prolifération de bactéries pathogènes au sein du tube digestif. Cependant, toute modification de cet équilibre fragile peut favoriser l'apparition d'une maladie. De nombreuses causes favorisantes participent à la perturbation de l'écologie intestinale [10,21]. Nous allons développer ces différentes causes dont la principale est l'alimentation.

CHAPITRE III

DIAGNOSTIC

Les entérotoxémies sont à l'origine d'une grande majorité des cas de mort subite. Le diagnostic des entérotoxémies repose sur des données épidémiologiques, cliniques et lésionnelles. Sur le terrain, à partir de ces données il est possible d'établir un diagnostic de forte suspicion d'entérotoxémie mais le diagnostic de certitude repose sur des analyses de laboratoire. Nous exposerons ci-après les bases du diagnostic de suspicion et de certitude.

III.1. Les bases épidémiologiques

Les critères épidémiologiques sont nécessaires pour orienter le diagnostic vers un cas d'entérotoxémie. Ceux-ci, incluant les facteurs de risques, prédisposent l'animal à une prolifération des clostridies dans l'intestin qui synthétisent des toxines dont leurs actions évoluent vers une mort subite du ruminant.

Il s'agit d'une maladie fréquente. On note en Belgique près de 7000 veaux morts subitement chaque année dans des conditions évoquant fortement une entérotoxémie. L'entérotoxémie n'est pas une maladie contagieuse. Elle peut se manifester au sein d'un élevage sous forme de cas sporadiques, voire enzootiques en affectant jusqu'à 5 à 30 % du troupeau. L'apparition de plusieurs cas au sein d'un élevage peut s'expliquer par l'existence de mêmes facteurs de risque [74].

L'entérotoxémie est une maladie provoquant des morts subites sporadiques, le plus souvent dans un troupeau conduit avec un régime alimentaire intensif, à l'occasion de changements alimentaires brutaux ou changements climatiques.

Parmi la totalité des facteurs énoncés, l'alimentation et les conduites d'élevage sont les facteurs les plus importants à prendre en considération dans le but d'établir un diagnostic de suspicion d'entérotoxémie [17,74].

Les bases épidémiologiques sont nécessaires pour orienter le diagnostic vers une suspicion d'entérotoxémie mais à partir de ces données il faut intégrer les bases cliniques et lésionnelles.

III.2. Les bases cliniques

En raison de la rapidité d'évolution de la maladie, c'est-à-dire une mort subite, il est difficile d'effectuer un diagnostic clinique. Ces affections se caractérisent par une mort subite parfois précédée pendant quelques heures de troubles diarrhéiques, convulsifs ou hémolytiques. D'un point de vue didactique, nous pouvons distinguer différentes formes cliniques même si la plus fréquente est la mort subite.

III.2.1. La forme clinique suraiguë

Mort subite

La forme suraiguë se manifeste par une mort subite [33,37,102]. Le ruminant est souvent retrouvé mort ou comateux sans aucun signe clinique précurseur. Ce sont souvent des animaux sains, en très bon état général qui suite à l'apparition de la maladie, sont découverts morts dans un délai de huit heures [5,37].

III.2.2.La forme clinique aiguë

Cette forme clinique est caractérisée par l'apparition brutale de symptômes souvent généraux évoluant rapidement vers la mort [5,36] . L'entérotoxémie s'exprime par des signes cliniques majeurs tels que les symptômes diarrhéique, hémolytique et convulsifs. A coté de ces symptômes dominants, apparaissent des symptômes mineurs, inconstants.

Les symptômes généraux

Les ruminants présentent un abattement accompagné de difficultés locomotrices [58,46] . Souvent, les jeunes animaux sont anorexiques et prostrés en décubitus latéral avec des tremblements généralisés [46,55,40]. Une diarrhée, avec tuméfaction important de l'anus, peut s'ajouter à ces signes cliniques, ainsi qu'une enophtalmie, signe de déshydratation [58].

La maladie peut se traduire par une hyperthermie (41 à 42°C)[28,14,87].On retrouve chez certains sujets, notamment les veaux, des modifications du fonctionnement cardiorespiratoire avec une dyspnée, une hypotension, une tachycardie et un pouls faible et rapide[55,40].

Des cas de forme clinique aiguë avec action de l'entérotoxine (CPE) présentent une vasodilatation généralisée qui s'accompagne d'un choc hypovolémique entraînant la mort de l'animal[18] .



Figure 6 : mort subite suite a une Entérotoxémie(CEVA SANTE ANIMAL)

Les symptômes digestifs

Le syndrome diarrhéique est typique de l'entérotoxémie et souvent présent en fin d'évolution clinique . Cette diarrhée, le plus souvent hémorragique, peut être fétide, bulleuse et de couleur blanche, jaune ou brune.

Des études de GKIOURTZIDIS ont relaté l'existence de douleurs abdominales, de diarrhées hémorragiques sur des agneaux atteints d'entérotoxémie. Les animaux présentent des coliques intenses séparées de phases de rémission ; les animaux se plaignent, se débattent et se tapent sur l'abdomen [32, 37, 46, 75, 102].



Figure 07 :symptome digistive(diarrhée typique d'entérotaxémie)[CEVA SANTE ANIMAL]

Les symptômes nerveux

Les crises convulsives sont souvent présentes dans l'expression des formes aiguës et dominent le tableau clinique. Les symptômes se manifestent par des grincements de dents, du pédalage, du ptyalisme, des contractions des muscles notamment ceux de l'encolure, une hyperesthésie, des pertes de connaissances et des convulsions intermittentes tonico-cloniques[40,101].

L'animal se tient souvent à l'écart du troupeau, en opisthotonos . Une cécité, un nystagmus intermittent et des oscillations horizontales des yeux peuvent être observés [102,40,90] .

D'autres ruminants sont prostrés dans un état comateux évoluant vers la mort [80,57].

L'association de signes cliniques digestifs (diarrhée), nerveux (crises convulsives), hémolytiques et d'une évolution fatale extrêmement rapide font partie des critères cliniques orientant le diagnostic vers une suspicion d'entérotaxémie. Néanmoins, les manifestations cliniques conduisant à un diagnostic d'entérotaxémie sont assez diffuses en dehors de l'évolution brutale vers la mort. Ce diagnostic repose essentiellement sur un diagnostic d'exclusion des différentes pathologies responsables de mort subite.

Sur le terrain, ces manifestations cliniques sont rarement observées par le praticien, ce dernier a souvent recours à une autopsie qui peut lui fournir de précieux renseignements.



Figure 08 :mort subite suite a des symptômes nerveux (CEVA SANTE ANIMAL)

Tableau VI : Etude clinique de l'entérotoxémie type D chez les ovins et les caprins. Fréquence relative des symptômes décrits dans la bibliographie [Blackwell et al. 1991, Chartier 2002, Clark 2003, Popoff 1994, Uzal 2004, Van Metre et al. 2000]

Symptômes décrits dans la bibliographie	Fréquence chez les caprins	Fréquence chez les ovins
Mort subite		
En quelques heures	++	++
En 2-4 jours	+++	-
Chronicité	+	-
Symptômes digestifs		
Distension abdominal	++	-
Ramollissement des selles	+	+
Diarrhée profuse fibrino-hémorragique	+++	-/+
Douleur, bêlements plaintifs	++	-
Symptômes nerveux		
Ataxie	-	+
Léthargie, coma, décubitus latéral	+	++
Opisthotonos	-/+	++
Pédalage en fin d'évolution	+	++

++ Fréquent
 + Assez Fréquent
 -/+ Variable
 - Non décrit

ENTÉROTOXÉMIE À *C. SORDELLII*

C. sordellii atteint les ovins et les caprins de tout âge, les agneaux sont plus fréquemment touchés [Popoff 1989]. Cependant il est rarement isolé, et peu de cas sont décrits. Par ailleurs, sa pathogénicité est contestée car les souches isolées chez des animaux entérotoxémiques ne semblent pas être virulentes (cf. I.2.2.3. Rôle dans la pathogénie).

Il serait responsable de mort subite. Les signes cliniques rapportés sont principalement des signes digestifs d'entérite et d'abomasite, et des signes de toxémie.

Le diagnostic différentiel chez le nouveau-né est surtout à établir avec la septicémie à *Manheimia haemolytica*.

Chez les animaux plus âgés, l'affection doit être distinguée d'une salmonellose à *Salmonella Thyphimurium*, d'une listériose à *Listeria monocytogenes*, et d'autres clostridioses [Popoff 1994, Songer 1998].

ENTÉROTOXÉMIE À *C. SEPTICUM*

Synonyme : Braxy, Bradsot, œdème malin

Cette affection est rare et principalement décrite dans les pays anglo-saxons. Elle s'observe essentiellement chez les ovins entre 6 et 18 mois, mais peut également atteindre les caprins. Les saisons de prédilection sont l'automne et l'hiver, car les animaux sont parfois contraints d'ingérer de l'herbe gelée.

Cette maladie se traduit par une mort subite. Dans les cas les moins sévères, les animaux malades sont anorexiques et très abattus. Les signes cliniques rapportés sont des douleurs abdominales, de l'incoordination motrice et faiblesse musculaire. La température rectale atteint 41-42°C. Un ballonnement abdominal est parfois observé [Popoff 1994]

L'entérototoxicité provoque une mort subite chez les ovins et les caprins. Dans le cas des formes les plus foudroyantes, l'animal meurt en quelques heures seulement. L'entérototoxicité ovine présente une plus forte variabilité clinique, qui dépend de l'agent étiologique en cause: syndrome hémolytique dans le cas de la maladie de l'agneau jaune, simple entérite foudroyante dans le cas d'une infection à *C. perfringens* type C ou troubles nerveux dans le cas d'une entérototoxicité de type D. Au contraire, la forme caprine se manifeste principalement par des signes digestifs, quel que soit l'agent étiologique ou l'âge de l'animal atteint.

L'entérototoxicité de type D est la plus décrite. Deux catégories de symptômes dominent le tableau clinique. Les symptômes digestifs (diarrhée hémorragique, distension abdominale, douleurs) sont présents à la fois chez les ovins et les caprins avec une plus grande fréquence chez les chèvres, qui parfois ne manifestent aucun autre symptôme. Les symptômes nerveux (ataxie, pédalage, opisthotonos, coma) sont également observés dans les 2 espèces mais dominent le tableau clinique de l'entérototoxicité ovine. Dans l'espèce caprine, on considère que les quelques signes nerveux observés sont dus à l'anoxie cérébrale. Par ailleurs, les caprins peuvent développer une forme chronique, tandis que les ovins sont touchés exclusivement par des formes aiguës.

III.3. Les bases lésionnelles

Le diagnostic nécropsique est indispensable pour permettre d'exclure certaines pathologies responsables de mort subite (ulcères de caillette, fulguration...) [33]. L'autopsie doit être rapide et complète. Elle permet de mettre en évidence des lésions en rapport avec une suspicion d'entérototoxicité. L'existence de lésions dominantes rapportées à un toxinotype particulier reste très théorique et non adapté au terrain. Une grille lésionnelle a été récemment mise en place permettant de relever l'ensemble des lésions et de les comparer aux lésions caractéristiques d'entérototoxicité [45].

III.3.1.Aspect général

III.3.1.A.Aspect extérieur

A l'autopsie, les cadavres présentent souvent un bon état d'engraissement, comme de la graisse sous-cutanée abondante témoin d'un embonpoint exagéré, montrant que cette maladie n'est pas la phase terminale d'une maladie chronique [57,59]. Les muqueuses sont le plus souvent très congestionnées, mais dans certains cas elles peuvent être pâles, cyanosées ou ictériques [59,10]. L'action hémolytique de la toxine α se traduit par un ictère pré-hépatique généralisé. En effet, la destruction importante des hématies provoque une libération intense d'hémoglobine dans le plasma. L'accumulation de la bilirubine libérée par l'activité intense de la glycurono-conjugaison aboutit à cet ictère[80,102].

En ce qui concerne les cas d'entérotoxémies liées à *Clostridium sordellii*, la surface de la peau crépite à la palpation, ce qui est à différencier des gangrènes gazeuses (issue d'une plaie traumatique) dont cette bactérie est agent. Une congestion du cadavre et un liquide sanguinolent s'écoulant par le mufler ont été observés chez certains sujets[16,57,78].

III.3.1.B.Aspect interne

A l'ouverture des cavités abdominale et thoracique, on constate la présence d'un épanchement séreux et sanguinolent voire de l'ascite pour certains sujets, lésions majeures des toxines α et β [61,34]. En effet, ces toxines agissent sur l'endothélium des vaisseaux en augmentant leur perméabilité, ce qui est responsable de l'apparition d'hémorragies et d'épanchements. Une putréfaction rapide du cadavre s'installe après la mort, affectant d'abord le rein et le foie [57]. Les séreuses péritonéales, pleurales et péricardiques présentent des pétéchies et des suffusions. Dans certains cas les séreuses sont recouvertes de fibrine[74,18,24].

III.3.2.Les organes internes

III.3.2.A.L'appareil cardio-respiratoire

Les poumons

- **Au niveau macroscopique**

Les modifications circulatoires sont à l'origine des lésions de l'appareil respiratoire. Les poumons présentent une congestion active [29]. Parfois ils sont œdémateux, avec un dépôt de fibrine ou un exsudat séreux ou sérofibrineux dans les alvéoles[40,18,34]. L'accumulation d'écume retrouvée souvent dans les voies respiratoires est à relier à une souffrance ante mortem plutôt qu'à une lésion caractéristique d'entérotoxémie. Des ecchymoses et des pétéchies peuvent être visibles sur le diaphragme, la séreuse pleurale et le thymus mais ceux-ci ne présentent en général aucune anomalie [18,37].

- **Au niveau microscopique**

Lors d'injection intraveineuse de toxine α et ι , on retrouve un œdème interstitiel et intraalvéolaire associés à une hyperplasie lymphoïde péribronchiolaire et une atelectasie [55,101,24].

Le cœur et l'appareil vasculaire

- Au niveau macroscopique

Le cœur présente des pétéchies et des ecchymoses sur l'endocarde, l'épicarde et le myocarde. Un épanchement séro-hémorragique dans le péricarde est observé dans la majorité des cas. Un œdème périvasculaire est présent plus souvent autour des petites et moyennes artères que des veines [102]. Ces lésions proviennent de l'altération de l'endothélium vasculaire par les toxines provoquant une augmentation de sa perméabilité [29,74].



Figure 09 : Péricardite exsudative (CEVA SANTE ANIMAL)

- Au niveau microscopique

Les lésions myocardiques sont souvent minimales. Les cellules cardiaques présentent des dégénérescences vacuolaires ou hyalines.

Elles peuvent montrer de légères infiltrations calcaires ainsi qu'une caryolyse [80]. Dans quelques cas, on constate une minéralisation des parois des vaisseaux comme l'aorte, des veines et des artères [40]. Néanmoins ces lésions ne sont pas systématiques et significatives d'entérotoxémie.

III.3.2.B.L'appareil digestif**La cavité buccale**

Chez certains sujets, il a été décrit des cas de stomatites avec hyperplasie locale de l'épithélium linguale. La stomatite est plutôt à considérer comme une lésion concomitante et non spécifique de l'entérotoxémie [40].

La caillette et le rumen

Les pré-estomacs ne présentent généralement pas de lésions significatives [57]. Ils sont souvent remplis d'aliments et en particulier de lait chez les jeunes [75]. Une ruminite, de gravité variable, est associée à un décollement de l'épithélium du rumen. Le pH du rumen est souvent acide, compris entre 4-5 [10,92]. La caillette est souvent congestionnée et présente des ecchymoses, des pétéchies en surface et des hémorragies diffuses non ulcéraives [58,61].

D'après ROEDER et al. en 1987, la toxine α a été soupçonnée de provoquer une inflammation de la caillette chez le veau pouvant aller jusqu'à l'ulcère perforant [[79,40]. Il en est de même pour la toxine ι avec une gastrite associée à des hémorragies de la muqueuse avec une infiltration neutrophilique importante [91]. Mais depuis, les recherches histologiques effectuées sur la paroi de la caillette ne permettent pas de définir ces lésions comme significatives d'entérotoxémie.



Figure 10 :Surcharge ruminale

Le contenu abondant et la sécheresse du rumen indiquent un iléus paralytique.

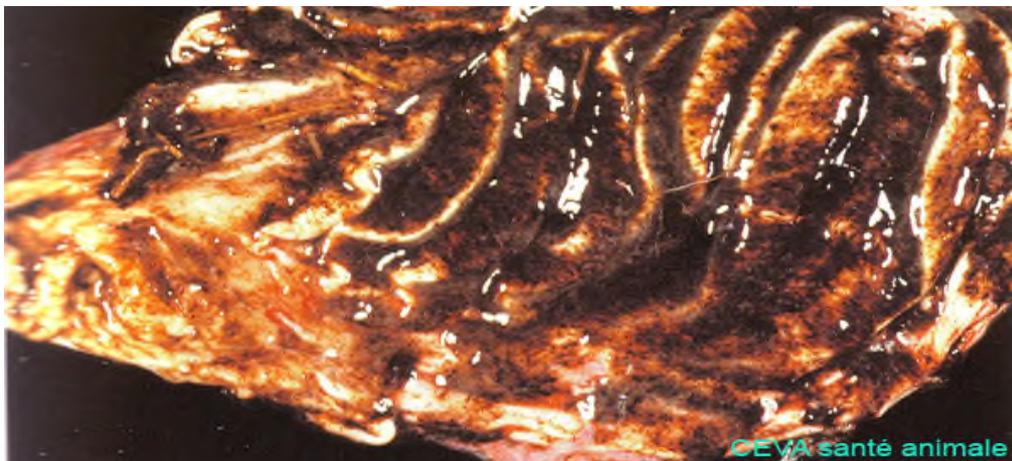


Figure 11 :Abomasite hémorragique
Sang digéré de couleur noire dans la lumière de la caillette.

L'intestin grêle

- Aspect macroscopique

Les lésions de l'intestin grêle sont systématiques lors d'entérotoxémie. La lésion typique est une entérite hémorragique ou séro-hémorragique avec un contenu liquidien sérohémorragique. Les anses intestinales sont dilatées par la présence de gaz issu des bactéries [46,59]. Il peut être affecté dans sa totalité (entérite aiguë diffuse) ou seulement dans certaines zones localisées du jéjunum ou de l'iléon (entérite aiguë localisée) [57]. La paroi présente un œdème, une congestion,

une nécrose et des hémorragies. Des pétéchies sur le jéjunum et le colon peuvent être présentes dans certains cas avérés de la maladie [40,2,75,59].

Depuis de nombreuses années, on a essayé d'associer chaque lésion de l'intestin grêle à un toxinotype particulier qui sont décrites ci suivant :

- Dans les cas de toxinotype A, les lésions essentielles sont celles d'entérite ou de gastroentérite (œdème, hémorragies, pétéchies et nécrose) avec une congestion des vaisseaux du mésentère. Les lésions se situent le plus souvent sur le jéjunum et l'iléon. Le contenu intestinal est liquidien et de nature hémorragique ou non [18,55].
- Pour le toxinotype B, la nécrose de la muqueuse intestinale de l'iléon provoque la destruction complète des villosités [57,41].
- Dans le toxinotype C, on retrouve une congestion de l'intestin et une entérite hémorragique ulcérateuse surtout dans la portion du jéjunum et de l'iléon. Une couleur violacée est visible sur des portions voire la totalité des anses intestinales [46,37].
- Pour le toxinotype D, les zones de congestion sont de plus en plus importantes en regard de l'iléon [57].
- Les lésions du toxinotype E sont semblables à celles du toxinotype A, avec une nécrose hémorragique, une congestion intense et des pétéchies. Le contenu est muqueux et hémorragique [57].

Cette classification lésionnelle en fonction d'un toxinotype montre une certaine homogénéité des lésions rendant difficile une interprétation lésionnelle toxinotypique. En effet, les lésions caractéristiques telles qu'une entérite hémorragique ou séro-hémorragique avec congestion, un contenu intestinal liquidien et hémorragique sont décrites dans chaque toxinotype



Figure 12:Entérite

Cette lésion est due à l'action de la toxine epsilon sur la muqueuse

hémorragique

- Aspect microscopique

Au microscope, on observe une nécrose et une destruction des villosités intestinales. Les principales lésions se situent au niveau de la muqueuse et de la sous muqueuse [37,18,91].

Trois types de nécrose ont été décrits :

- une nécrose au sommet des villosités avec hémorragie intraluminale,
- une nécrose totale de l'épithélium villositaire avec préservation de l'axe conjonctivovasculaire,
- une nécrose de l'axe conjonctivo-vasculaire menant à la disparition totale de la villosité [59].

La membrane nécrosée des villosités est souvent à l'origine d'une destruction totale de celles-ci. La nécrose est limitée à la muqueuse alors que l'hémorragie et l'hyperhémie affectent à la fois la muqueuse et la sous-muqueuse. Dans les portions saines, on observe un afflux important de polynucléaires neutrophiles, de lymphocytes et de macrophages [59]. La lamina propria est partiellement détruite suite à cette forte infiltration ; les capillaires sont dilatés et une grande densité de bactéries en bâtonnet, Gram + sont visibles au niveau des villosités [2].

Le colon et le caecum

Les portions terminales du tube digestif sont souvent moins affectées. Une colite congestive ou hémorragique et une typhlite sont constatées. La musculature de ces organes est infiltrée par des neutrophiles, des macrophages et des lymphocytes [41,57]. Dans certains cas, une colite pseudomembraneuse est présente chez les caprins mais cette lésion n'est pas spécifique [102]. Parfois, on observe la présence de nécrose hémorragique et pétéchies sur la muqueuse du colon et du caecum [57].



Figure 13 : Entérotoxémie - tassement du contenu caecal. La stase intestinale favorise la prolifération des Clostridies. Ici, on peut remarquer la jéjunite et l'hyperhémie des vaisseaux mésentériques.

III.3.2.C.Appareil urinaire

Les reins

- Aspect macroscopique

Les reins apparaissent congestionnés ou hémorragiques, de consistance diminuée mais ils peuvent dans certains cas ne présenter aucune lésion [59,34,41,25]. L'ictère produit par l'action hémolytique de la toxine α entraîne l'accumulation de produits toxiques conduisant à une néphrite. Des hémorragies et des pétéchies peuvent être observées dans le cortex rénal [57,80]. Le rein pulpeux, dû à la toxine ϵ , est typique et évocateur d'entérotoxémie chez les ovins et plus rare chez les bovins. Cette diminution de consistance est liée à une dégénérescence rénale mais selon certains auteurs cette lésion serait surestimée et liée en grande partie à l'autolyse rapide en quelques heures de l'organe [102].

D'après notre étude, nous avons pu constater que la diminution de consistance liée à l'autolyse est beaucoup moins intense et très facile à différencier de celle liée aux toxines de l'entérotoxémie [données personnelles du Professeur BEZILLE]. Le rein est entièrement détruit, très mou et difficile à couper à l'autopsie. L'absence du rein pulpeux n'est pas un critère d'exclusion de l'entérotoxémie.



Figure 14 :rein pulpeux.

L'autolyse accélérée du parenchyme rénal est une lésion caractéristique de l'entérotoxémie

- Aspect microscopique

Au niveau microscopique, les lésions des reins se traduisent par une dégénérescence parenchymateuse. Les observations microscopiques montrent des lésions de périglomérulite subaiguë focale en anneau, de nécrose des cellules épithéliales des tubes contournés proximaux et distaux. La limite cortex-médulla présente un aspect hémorragique avec une corticale granuleuse, jaune et friable.



Figure 15 :Entérotoxémie ictérique

Les reins présentent une couleur noirâtre due à la néphrose hémoglobinurique et le foie est orangé à cause de la stase intestinale.

La vessie et urine

Très peu de lésions sont décrites pour cet organe.

Dans quelques cas, la vessie est congestionnée avec une urine rouge liée à la présence d'hémoglobine. Chez les ovins atteints d'entérotoxémie, l'analyse d'urine révèle la présence de glucose en grande quantité. Des études sur des agneaux ont montré qu'environ la moitié d'entre eux présentait une forte glucosurie. La glycolyse des réserves hépatiques entraîne une élévation du taux de glucose sanguin. L'hypothèse la plus probable est une décharge de catécholamines suite à un œdème cérébral due à l'action de la toxine ϵ . Une glucosurie élevée peut être un indicateur dans le diagnostic des entérotoxémies, a contrario, une absence de glucose dans l'urine ne permet en aucun cas d'effectuer un diagnostic d'exclusion [102, 30,40].

III.3.2.D. Le système lymphatique

Les nœuds lymphatiques mésentériques et médiastinaux sont systématiquement hypertrophiés, œdémateux et hémorragiques. On constate de larges zones de nécrose sur les portions corticales et médullaires des ganglions [2, 74, 59, 41, 92, 40,24].

La rate

La rate est de consistance diminuée. Une splénomégalie avec ou sans congestion et des pétéchies sont quelques fois mises en évidence [57, 18, 41,61]. Ceci reste très théorique car il est difficile d'apprécier une splénomégalie chez les ruminants selon la présence ou non de splénocontraction au moment de la mort.

Le foie

Le foie est généralement de consistance friable, congestionné, décoloré et des « foyers de nécrose » sont présents. Dans certains cas, des lésions importantes de dégénérescence grasseuse sans congestion sont observées, associées à de larges zones de dégénérescence granuleuse voire vacuolaire ainsi qu'une caryolyse des hépatocytes entourant les veines centro-lobulaires intervenant dans le drainage sanguin des territoires entériques lésés [2,74,59,41,91,40].

III.3.2.E. Système nerveux

Le cerveau

- Aspect macroscopique

En général, le cerveau est congestionné voire hémorragique. En effet, on trouve des phénomènes congestifs ou même hémorragiques sur les méninges. Le cerveau est mou, avec des sillons peu profonds et des crevasses sur le cortex cérébral [40,57,90].

Chez les ovins, la présence de foyers d'encéphalomalacie oriente le diagnostic vers une action de la toxine ϵ . Ces foyers sont caractérisés par des lésions focales symétriques[29]. Une nécrose bilatérale et symétrique du parenchyme du cerveau s'installe, touchant le corpus striatum, le thalamus et plus rarement le cortex cérébelleux. Les études d'UZAL, par injection intraveineuse de toxine ϵ chez des veaux, décrivent aussi des lésions d'encéphalomalacie symétrique avec l'association de symptômes nerveux[101,13,42,29].

- Aspect microscopique

Les toxines agissent indirectement sur le système nerveux central par l'augmentation de la perméabilité vasculaire dans le plexus choroïde. On observe une dégénérescence des jonctions serrées des cellules de l'endothélium vasculaire du cerveau, provoquant un gonflement et une rupture des astrocytes [90,13]. L'augmentation de la perméabilité des capillaires provoque une perte de substances (eau, protéines plasmatiques) d'où une augmentation de la pression intracrânienne. Des œdèmes périvasculaires et intercellulaires, une transsudation plasmatique sont observés. En effet, la matière blanche du thalamus, du cervelet et de la capsule interne sont atteintes d'œdème [74,90].

La toxine ϵ , chez les ovins, est souvent responsable d'œdème du cerveau et d'hémorragies situés au niveau des méninges et du cervelet. Ceci se traduit par des espaces intercellulaires et périvasculaires importants et une dégénération des cellules de Purkinje [40,90,102].

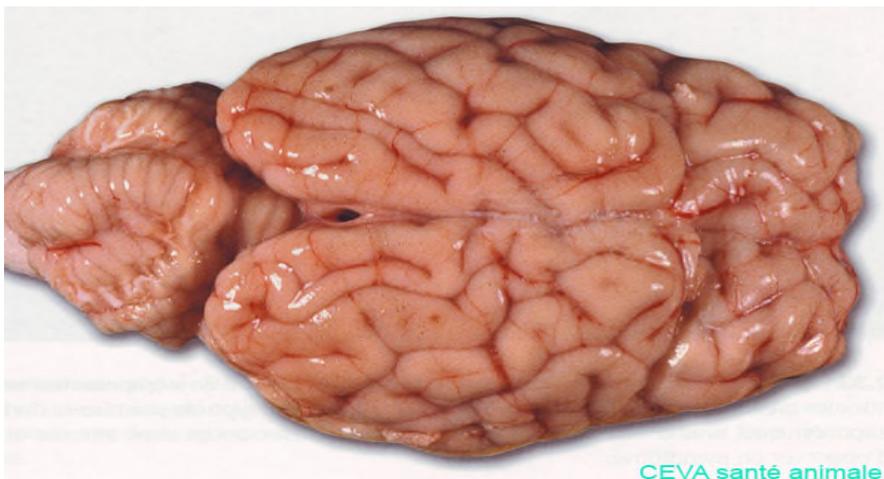


Figure 16 :Entérotaxémie ictérique

Encéphale avec anémie, probablement due à l'action de la toxine hémolytique de *Clostridium perfringens* de type A.

Autres organes

De la même manière que chez les ovins, d'autres organes sont congestionnés et oedématiés. L'oedème pulmonaire est une lésion également courante. Le rein pulpeux n'est pas caractéristique et est moins significatif que chez les ovins. Le rein pulpeux n'apparaît pas si l'autopsie a lieu immédiatement après la mort.

Le tableau suivant synthétise les lésions les plus caractéristiques lors d'entérotoxémie

Tableau VII : Synthèse des lésions caractéristiques observées à l'autopsie sur les ruminants morts d'entérotoxémie [45]

Organes cibles	Lésions et observations caractéristiques d'entérotoxémies
CARCASSE	Putréfaction rapide, bon état d'engraissement, belle conformation, parfois muqueuses ictériques
CAVITES ABDOMINALE ET THORACIQUE	Epanchement séro-hémorragique péritonéal et péricardique
CAILLETTE	Muqueuse congestionnée, parfois hémorragique voire nécrotique
INTESTIN GRELE	Muqueuse congestionnée, parfois hémorragique voire nécrotique Contenu intestinal liquide séro-hémorragique
FOIE	Congestionné, friable, décoloré et hypertrophié
REIN	Congestion de la corticale Pétéchies, hémorragies sous-capsulaire, « reins pulpeux » (ovin)
CŒUR	Pétéchies, suffusions péricardique, endocardique, myocardique
POUMON	Œdème, congestion active
GANGLIONS	Adénite congestive, œdémateuse ou hémorragique
CERVEAU	Œdème, hémorragie, « foyers d'encéphalomalacie » (ovin)

Les lésions provoquées par *C. perfringens* type D chez les ovins et les caprins sont en accord avec les principaux symptômes qui dominent le tableau clinique d'entérotoxémie dans chacune de ces espèces. La principale différence est le degré de lésion du tractus gastro-intestinal. Les caprins présentent des lésions essentiellement et parfois exclusivement abdominales et digestives, avec une prédominance dans les parties distales de l'intestin. Les ovins présentent plutôt des altérations généralisées liées à la toxémie et les lésions digestives ne sont pas systématiques. Une autopsie précise permet d'orienter sérieusement le diagnostic et suffit souvent en pratique.

Tableau VIII : Grille des lésions nécropsiques d'entérotoxémie type D [Blackwell et al. 1991, Ferrer et al. 2002, Popoff 1994, Uzal et Kelly 1 1998, Uzal 2004]

Lésions décrites dans la bibliographie	Fréquence chez les Caprins	Fréquence chez les Ovins
Etat corporel : Bon, présence de réserves adipeuses	-/+ / ++	++
Séreuses : Pétéchies, congestion	+	++
THORAX		
Cavité thoracique : Epanchement séreux ou séro-hémorragique	-/+	++
Cœur : Epanchement péricardique Pétéchies et hémorragie du myocarde et endocarde	-/+	+
Poumon : Œdème sévère	++	++
ABDOMEN		
Cavité abdominale : Epanchement séreux à séro-hémorragique	-/+ / ++	++
Foie : Hypertrophie, œdème	-/+	+
Rate : Hypertrophie, œdème	-/+	+
Nœuds lymphatiques : Hypertrophie, œdème	-/+	+
Intestin grêle : Iléite, muqueuse hémorragique, lumière intestinale remplie de fibrine	-/+ / ++	+
Caecum : Typhlite	+ / ++	-
Colon : Colite fibrino-hémorragique : muqueuse hémorragique, présence de pseudo membranes blanches, débris de muqueuses et de fibrine dans la lumière colique	++ / +++	-
Rein : Pulpeux : fortement autolysé, couleur foncée et consistance gélatineuse	- / +	+ / ++
Urines : Présence de glucose	- / +	+ / ++

+++ Très fréquent ++ Fréquent + Possible - Absent ou non décrit

Notons l'importance de l'autopsie qui permet d'observer les lésions caractéristiques d'entérotoxémie. Néanmoins l'ensemble de ces lésions n'est pas pathognomonique. Les bases épidémiologiques, cliniques et lésionnelles permettent essentiellement d'exclure les maladies intervenant dans le diagnostic différentiel de mort subite.

Cependant sur le terrain, ce diagnostic d'exclusion permet d'établir une hypothèse de forte suspicion d'entérotoxémie mais elle doit être confirmée par une analyse de laboratoire.

III.4. Diagnostic différentiel

Il est important de prendre en considération le diagnostic différentiel de mort subite. En effet, prenons l'exemple d'une mort subite d'un ruminant au pré au printemps, différentes maladies peuvent être suspectées et parmi celles-ci l'entérotoxémie. Le diagnostic différentiel inclut les fulgurations, l'électrocution, les météorisations spumeuses et gazeuses, les infections cutanées, les affections respiratoires (pneumonie,...), la thrombose de la veine cave postérieure, les déficiences cardiaques, les intoxications (If, galéga, gland,...), les tétanies d'herbage, l'hypocalcémie.

Le tableau suivant résume les différentes maladies comprises dans le diagnostic différentiel de mort subite.

Tableau IX : Diagnostic différentiel des différentes causes de mort subite chez les ruminant [84, 21,45,48,57]

ORIGINE DE LA MORT SUBITE	DIFFERENTES MALADIES	CRITERES DE DIAGNOSTIC
METABOLIQUE	Indigestion spumeuse ou gazeuse aiguë	Météorisation (distension creux flanc gauche puis flanc droit) Accumulation de gaz ou mousse dans le rumen (Esophage congestionné en partie cervicale et exsangue en partie thoracique)
	Tétanie d'herbage ou hypomagnésiémie	A la mise à l'herbe au printemps, en automne Stress thermique Dosage du magnésium sur LCR dans les 2h après la mort, sur humeur vitrée sous 48 heures
	Toxémie de gestation	Brebis grasse en fin de gestation Gestation multiple (double ou triple)
	Myopathie-dyspnée	Dégénérescence musculaire (carence vitamine E et sélénium), atteinte du myocarde aspect très pâle avec stries blanchâtres (dépôt de calcium) = dégénérescence de Zencker
	Ataxie enzootique	Paralysie spastique à la naissance Cuivre < 50 ppm
	Hypocalcémie	Post-vêlage chez vache haute productrice laitière
	Acidose lactique aiguë	Ingestion massive de glucides fermentescibles Contenu ruminal d'odeur aigrelette et pH acide < 6
	Intoxication cuivre	cuivre > 400 ppm Ictère, hémoglobinurie
	Nécrose du cortex cérébral	Opisthotonos, amaurose, crises convulsives et absence d'hyperthermie Au sevrage

Tableau X (bis): Diagnostic différentiel des différentes causes de mort subite chez les ruminants [84,21,45,48,57]

ORIGINE DE LA MORT SUBITE	DIFFERENTES MALADIES	CRITERES DE DIAGNOSTIC
CAUSES PHYSIQUES	Fulguration, électrocution, coup de chaleur	Fulguration : cavité buccale avec aliments, traces de brûlure linéaire ou étoilées, données météorologiques Réseau électrique défectueux
INTOXICATIONS	Végétaux toxiques (if, oenanthe, galéga, gland, crucifère)	If : circonstances, coliques, bradycardie, tremblement et coma
		Oenanthe : circonstances, abattement, hypersalivation, coliques, convulsions, paralysie des membres postérieurs
		Gland : circonstances, anorexie, inrumination, constipation puis diarrhée noirâtre et nauséabonde, anurie, convulsion et coma
		Galéga : œdème pulmonaire, hydrothorax
	Organophosphorés	Ptyalisme, diarrhée, myosis, convulsions
	Intoxication par azote non protéique	Urée : 500g Diarrhée, ballonnements, grincements de dents, convulsions, coma , pH ruminal 7-8
VASCULAIRES	Hémorragies	Muqueuses pâles Volume de sang collecté dans la lumière et paroi de l'organe Rupture utérine
	Thrombose de la veine cave	Thrombus à l'autopsie, hémoptysie, ascite

Tableau XI (bis): Diagnostic différentiel des différentes causes de mort subite chez les ruminants [[84, 21,45,48,57]

ORIGINE DE LA MORT SUBITE	DIFFERENTES MALADIES	CRITERES DE DIAGNOSTIC
MECANIQUE	Torsion ou volvulus de la caillette	Météorisation de la caillette Etat de choc
	Obstruction de l'œsophage	Corps étranger dans l'œsophage Masses musculaires thoracique et cervicale, nœuds lymphatiques de la tête congestionnées et hémorragiques
	Ulcère de caillette	Péritonite avec perforation de la caillette
TOXI-INFECTION	Mammite suraiguë (choc endotoxinique : <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>S. uberis</i> , <i>S.aureus</i>)	Choc endotoxinique Muqueuses congestionnées, foie toxico-infectieux
	TOXI-INFECTIONS gangréneuses à point de départ cutané, conjonctif ou musculaire (<i>C. sordellii</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. novyi B</i>)	Traumatisme inoculateur (gangrène gazeuse), nécrose musculaire, crépitation, odeur rance
	TETANOS (<i>Clostridium tetani</i>)	Plaie ou effraction tissulaire, paralysie spastique
	Septicémies à <i>E.coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>P.haemolytica</i> , <i>B.anthraxis</i> , <i>L.monocytogenes</i>	Choc septicémique : congestion, hémorragies multifocales, déshydratation Listériose : Méningo-encéphalite, convulsions, paralysie, bactériologie

III.5. Diagnostic de laboratoire

Les laboratoires disposent de nombreuses techniques pour effectuer les analyses sur des prélèvements issus de cas de suspicion d'entérotoxémie. Il s'agit de confirmer la suspicion :

- soit par la mise en évidence des toxines dans la lumière intestinale ou les sérosités exsudées dans les grandes cavités
- soit par la caractérisation du gène déterminant la production de l'exotoxine spécifique.
- soit par la technique d'identification et dénombrement de *Clostridium perfringens* dans l'intestin grêle associé ou non à un dénombrement de quelques fractions de la flore intestinale (coliformes et entérocoques)..

La spécificité et la sensibilité varient en fonction des différentes techniques utilisées.

III.5.1. 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.

III.5.1.A. 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 attente d'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 ϵ 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.

III.5.1.B.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 réaliser 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 se paramètre peu fiable. [Popoff 1979, Uzal 2004, Uzal et al. 2004].

III.5.1.C.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].

III.5.1.D.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 ϵ 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 ϵ , mais elle mal tolérée par la toxine β . 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

III.5.1.E.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.

III.5.2.MÉTHODES DE DIAGNOSTIC

III.5.2.A.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].

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'entérotaxémie 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.

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

Type de Clostridium	Présence chez l'animal sain	Valeur diagnostique chez les caprins	Valeur diagnostique chez les ovins
<i>C. perfringens type A</i>	Oui	Aucune	Chez l'agneau uniquement
<i>C. perfringens type B</i>	rare	Oui	oui
<i>C. perfringens type c</i>	rare	Oui	oui
<i>C. perfringens type D</i>	possible	Oui	non
<i>C. sordellii</i>	non	Oui	oui
<i>C. septicum</i>	non	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.

2) 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 sulfitoréducteurs (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'entérotoxémie.

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

III.5. 2. B. 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].

2) ELISA SUR CONTENU 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 α

test ELISA dispose d'une très bonne sensibilité pour la toxine α . 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 α et ne fournit un résultat positif que sur les animaux malades uniquement [Uzal 2004].

Toxine ϵ

Il a été démontré que de faibles taux de toxine ϵ existaient chez les animaux sains. Dans ce cas, les tests conventionnels ne détectent a priori pas la toxine ϵ . 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 ϵ passe rapidement dans l'organisme en disparaissant du contenu intestinal [Uzal 2004, Uzal et al. 2003].

Toxine β

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 ϵ est également mise en évidence [Uzal 2004].

3) 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 ϵ . Sa sensibilité et sa spécificité étant inférieures à celles du test ELISA, les faibles taux de toxine ϵ (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].

4) PCR (POLYMERASE 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 ϵ), 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 α , ϵ et β [Songer 1998].

Test qualitatif : PCR

Gène amplifié	Toxines recherchées	Type de <i>Clostridium perfringens</i>
<i>cpa</i>	α	A, B, C, D, E
<i>cpb</i>	β	B et C
<i>etx</i>	ϵ	B et 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].

III.5. 2.C.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 Kelly 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.

III.5. 2. D. 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 α 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 Kelly 1998].

III.5. 2.E. Etude des modifications due à l'intoxication

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 cétooses 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 urolithiase, 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 Kelly 1998, Uzal 2004].

2) 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].

3) 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 ϵ . 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 IV

PROPHYLAXIE

Avant de présenter la partie expérimentale, il semble nécessaire de détailler brièvement les moyens disponibles pour pallier à cette maladie lorsque le diagnostic de certitude est établi sur un ou des ruminants dans un élevage.

IV.1. Prophylaxie sanitaire

L'alimentation joue un rôle important dans les entérotoxémies. Il faut améliorer l'alimentation et les techniques d'élevage lorsque des cas d'entérotoxémies sont diagnostiqués dans un troupeau.

L'éleveur doit éviter les changements alimentaires brusques (au sevrage ou à la mise à l'herbe au printemps), la suralimentation constituée d'une ration avec des proportions en matières cellulosiques trop faible par rapport aux taux de matières azotés et glucidiques rapidement fermentescibles. Les changements brusques d'alimentation doivent être modifiés en faveur de transitions plus progressives pour permettre l'adaptation de la flore intestinale à la nouvelle ration.

L'apport de foin peut contribuer à rééquilibrer ces rations. En ce qui concerne les ruminants en ration d'engraissement, une homogénéisation des lots peut limiter les phénomènes de dominance, diminuant les risques d'entérotoxémie chez les sujets dominants ingérant une quantité supérieure d'aliments [74, 43].

La notion d'aliments lests est à prendre en compte. Une ration riche en foin donc en cellulose constitue l'aliment de lests par excellence pour les ruminants. Elle assure la réplétion des organes digestifs pour un faible apport de matière prévenant l'atonie digestive. L'apport de fibres de cellulose stimule la motricité digestive en particulier la rumination et la salivation servant de milieu tampon [17] Néanmoins il semble difficile dans les conduites d'élevages intensives de restreindre l'alimentation nécessaire pour optimiser la production. Les conseils sont difficiles à mettre en place car ils vont à l'encontre des objectifs de production de l'éleveur.

IV.2. Prophylaxie médicale

Le traitement des entérotoxémies est souvent inefficace et illusoire en raison de la rapidité et de la gravité de l'infection.

IV.2.1. L'antibiothérapie

L'utilisation des antibiotiques est nécessaire pour limiter la prolifération des clostridies intestinaux. Les clostridies sont sensibles à tous les antibiotiques sauf aux aminosides. On utilise en générale les β -lactamines ou les céphalosporines par voie orale. *Clostridium perfringens* a développé des phénomènes de résistances à certaines familles d'antibiotiques comme les tétracyclines, le groupe des érythromycine et lincosamine et le chloramphénicol, nécessitant une utilisation raisonnée de l'antibiothérapie [74, 88, 90].

IV.2.2. La sérothérapie

Elle consiste en l'administration de sérums (sérums homologues ou hétérologues monovalent ou polyvalent). Les sérums contiennent des anticorps qui neutralisent les toxines circulantes cependant ils n'agissent pas sur les toxines présentes sur les organes cibles. Son intérêt à titre curatif est limité. La protection lors de l'administration de sérums s'installent rapidement et

durent de 2 à 4 semaines. Cette méthode peut être utilisée en cas d'urgence mais le coût élevé et la difficulté à se fournir en sérums diminuent son utilisation [74]

IV.3. VACCINATION

IV.3.1. Préparation des vaccins

IV.3.1.A. OBTENTION DES ANTIGÈNES

Pour la préparation de chaque vaccin, on sélectionne la souche qui produit le titre le plus élevé de toxine. L'origine de cette souche n'a pas d'importance. Ainsi, une souche de *C. perfringens* D isolée chez un bovin de Nouvelle Zélande est une aussi bonne candidate qu'une souche ovine isolée en France. Il n'a pas été observé de dérive antigénique parmi les toxines de *Clostridium* [Popoff 1989].

Les bactéries sont cultivées en grande quantité dans des cuves à fermentation dans les conditions qui permettent le meilleur rendement de production de toxine. Après traitement au formaldéhyde, les organismes sont centrifugés. La toxine est récupérée dans le surnageant. Il s'agit alors d'un « toxoid ».

Le vaccin commercialisé par les laboratoires Schering-Plough, Covexin® 8 est un exemple de vaccin fabriqué à partir de « toxoid ».

La quantité de toxine produite en phase de croissance est mesurée par un test de l'activité enzymatique (lécithinase, hémolyse...) ou par un test *in vivo* comme le test MNT. La valeur est exprimée en dose minimale hémolytique, en terme de dose létale (DL50 pour la souris), ou en équivalent standard en antitoxine.

Dans la mesure où le retrait de *C. perfringens* induit une perte considérable de l'efficacité vaccinale, certains fabricants prennent le parti de laisser les cellules bactériennes dans la préparation pour créer une double immunité. Cette technique obtient de bons résultats, notamment avec le vaccin Xento® produit par Schering-Plough.

L'antigène est ensuite associé à un adjuvant. A ce stade, chaque lot de vaccin subit une série de contrôles chimiques, de stérilité, d'innocuité et d'efficacité.

L'efficacité du vaccin est vérifiée sur des animaux de laboratoire. Selon un protocole standard, on détermine le titre en anticorps neutralisant induits par la vaccination.

Les résultats sont exprimés en unités internationales. Pour chaque valence, les vaccins doivent induire un titre minimum d'anticorps neutralisant, normes définies comme assurant une protection suffisante contre les entérotoxémies survenant spontanément. Les vaccins à *C. sordellii* sont testés après épreuve virulente : les animaux doivent être protégés contre une injection standardisée de *Clostridium* toxigène [Popoff 1989].

Beaucoup de vaccins anti-clostridiens sont multivalents. Les valences se limitent souvent aux clostridies, mais certains sont couplés à d'autres maladies, comme Heptavac®, qui lutte conjointement contre les affections respiratoires avec une valence anti-pasteurelle [Walker 1992].

La mise au point de vaccins multivalents est onéreuse et délicate. Il serait plus judicieux d'adapter les formules des vaccins aux conditions épidémiologiques. Un nombre élevé de

valences peut remettre en cause leur efficacité. La prescription du vaccin approprié procure souvent de meilleurs résultats que ceux d'un vaccin large spectre [Popoff 1989].

IV.3.1.B.CHOIX DE L'ADJUVANT

Les adjuvants potentialisent la réaction immunitaire.

Sels minéraux

Les vaccins contre l'entérotoxémie sont le plus souvent adjuvés de sel minéral, comme l'hydroxyde d'aluminium, le phosphate d'aluminium ou le sulfate d'aluminium et de potassium. Mais le choix de l'adjuvant conditionne la qualité de la réponse immunitaire.

Chez le mouton, les animaux vaccinés avec un vaccin adjuvé au sulfate de potassium et d'aluminium ne produisent pas assez d'anticorps pour être protégés (100% létalité sur test MNT), même lorsque la dose vaccinale augmente. En revanche, 2 mL de vaccin adjuvé à l'hydroxyde d'aluminium permettent une immunité satisfaisante (test MNT négatif) [Srinivasan et al. 2001].

Des résultats similaires sont obtenus chez les chèvres [Uzal et Kelly 2 1998].

L'hydroxyde d'aluminium est l'adjuvant le plus utilisé par les fabricants.

Adjuvants huileux

Les adjuvants huileux obtiennent de meilleurs résultats que les autres adjuvants. Ils permettent une protection locale et générale sur 100% des sujets vaccinés [Uzal et Kelly 2 1998]

Lots	Titre en AC UI/MI	Lésions digestives	Lésions systémiques
Vaccin adjuvant huileux (5 chevreaux)	2,45-230	0/5	0/5
Vaccin adjuvant hydroxyde d'aluminium (4 chevreaux)	0,2-1,5	4/4	1/4
Témoin non vacciné (5 chevreaux)	<0.03	5/5	5/5

Les adjuvants huileux et leurs dérivés sont plus efficaces, car ils exercent une action « réservoir » : ils permettent une diffusion plus longue des antigènes dans le sang. De ce fait, la stimulation des macrophages et de la réponse humorale est plus intense et plus soutenue qu'avec un autre adjuvant. On obtient ainsi une meilleure réponse anticorps. L'hypothèse d'une injection unique serait alors envisageable [Uzal et al. 2 1999].

Mais les adjuvants huileux bénéficient d'une moins bonne résorption. Ils sont rarement utilisés à cause d'une forte réaction au site d'injection. Pour pallier cette intolérance locale, une injection intra-musculaire peut être pratiquée [Walker 1992].

Les adjuvants huileux sont utilisés dans l'industrie pharmaceutique pour produire des chèvres hyper-immunisées [Uzal et Kelly 2 1998]

IV.3.2. Spécialités et protocoles

En France, 5 spécialités vétérinaires contre les entérotoxémies sont disponibles pour les petits ruminants. [Petit 2005].

IV.3.2.A. MILOXAN® (LABORATOIRE MERIAL)

C'est un vaccin inactivé, adjuvé d'hydroxyde d'aluminium. Chaque dose de 2 mL permet le contrôle des infections à *C. perfringens* type B, C et D avec des taux d'anticorps antitoxine β et ϵ respectivement de 10 UI/mL et 5 UI/mL de sérum. Ce vaccin protège aussi contre *C. septicum*, *C. novyi*, *C. tetani* avec 2,5 UI/mL d'antitoxine et à 100% contre *C. chauvoei* et *C. sordellii*.

Il est donc indiqué dans la prévention des entérotoxémies à *C. perfringens* et *C. sordellii*, en particulier la dysenterie de l'agneau, la « struck disease » et la maladie du rein pulpeux. L'AMM est obtenue pour les espèces : bovins, ovins et caprins.

La primo vaccination s'effectue en 2 injections à 4-6 semaines d'intervalle dès l'âge de 15 jours pour les animaux nés de mère non vaccinée et dès l'âge de 8 semaines pour les animaux nés de mère vaccinée. Pour une meilleure immunité colostrale, les mères reçoivent une injection de rappel 2-6 semaines avant la date présumée de mise bas. Le rappel est annuel.

Etant donné l'hypersensibilité des chèvres, il est recommandé de pratiquer des injections test sur un petit effectif et il est déconseillé de vacciner en période de gestation.

IV.3.2.B. COGLAVAX® (LABORATOIRE ceva)

C'est un vaccin inactivé, adjuvé. Une dose de 2 mL permet de prévenir les infections à *C. perfringens* type A, B, C, et D avec des taux d'anticorps antitoxine α , β , et ϵ respectivement de 2, 10 et 5 UI/mL de sérum. Il protège aussi contre *C. septicum*, *C. novyi*, *C. tetani* et *C. chauvoei*. Ce vaccin est notamment indiqué dans la prévention des entérotoxémies chez les bovins, ovins, caprins et lapins.

Le protocole de vaccination est identique à celui de Miloxan®.

Les précautions d'emploi pour Miloxan® sont applicables pour Coglavax®.

IV.3.2.C. COGLAMUNE® (LABORATOIRE ceva)

Ce vaccin est équivalent au précédent, mais ne contient que les anatoxines de *C. perfringens*. Il est indiqué uniquement pour la prévention des entérotoxémies chez les bovins, ovins, caprins, porcins et lapins.

IV.3.2.D. TASVAX® HUIT (LABORATOIRE s chering plough)

C'est un vaccin inactivé, adjuvé à l'hydroxyde d'aluminium. Les taux minimaux en antitoxine α , β et ϵ de *C. perfringens* obtenus chez l'animal de contrôle sont respectivement 1, 10 et 5 UI/mL. Il protège également contre *C. septicum*, *C. novyi*, *C. chauvoei* et *C. tetani*. Il est préconisé pour la prévention des clostridioses, dont les infections à *C. perfringens* type A, B, C et D chez les bovins, ovins, caprins et les lapins. Le protocole de vaccination est identique aux précédé

IV.3.2.E.SERANAMIX® (LABORATOIRE ceva)

Vaccin inactivé, adjuvé à l'hydroxyde d'aluminium. Les taux minimaux d'antitoxine β et ϵ de *C. perfringens* permis par le vaccin sont respectivement de 10 et 5 UI/mL de sérum. Il prévient aussi contre les infections à *C. septicum*, *C. novyi*, *C. tetani* et *Escherichia coli*.

Ce vaccin est indiqué dans la prévention des maladies clostridiennes, notamment à *C. perfringens* type B, C et D, chez les ovins, caprins et lapins..

La primo vaccination se déroule en 2 injections de 5 mL à 21 jours d'intervalle ou 48 heures d'intervalle si la pression microbienne est élevée. Le rappel est effectué tous les 6 mois et 1 mois avant la mise bas pour les femelles gravides.

Le tableau X détail les vaccins contre l'entérotoxémie disponibles en France. Les vaccins sont tous inactivés et adjuvés avec l'hydroxyde d'aluminium. Les taux en anticorps antitoxine après injection sur un animal de contrôle sont équivalents d'un vaccin à l'autre. Les doses et les protocoles sont identiques pour la plupart. Sérénamix® fait exception, en pratique il est davantage utilisé chez le lapin.

Les réelles différences entre les spécialités sont les valences. *C. perfringens* type B, C et D sont retrouvés dans toutes les spécialités. La protection contre *C. perfringens* type A n'est pas systématique.

Or cet agent semble responsable de la majorité des entérotoxémies des petits ruminants en France. Seuls Coglavax® et Coglamune® possèdent cette valence. Miloxan® protège contre *C. sordellii*, dont la prévalence chez les petits ruminants est loin d'être négligeable. Toutefois, l'utilité de cette valence est discutable car le rôle de *C. sordellii* dans la pathogénicité est nul chez les ovins et reste à prouver chez les caprins. Les laboratoires Schering Plough s'appêtent à commercialiser un vaccin contenant une valence contre *C. sordellii*, sous le nom de Covexin® 10.

Tableau X : Vaccins contre les infections clostridiennes disponibles en France pour les petits ruminants en 2005 [Petit 2005]

Spécialité	Valences contre l'entérotoxémie	AMM	Protocole d'utilisation	Autres valences
Miloxan®	<i>C. perfringens B</i> <i>C. perfringens C</i> <i>C. perfringens D</i> <i>C. sordellii</i> <i>C. septicum</i>	Ovins, Caprins , Bovins	Primo : 2 injections de 2 mL à 4-6 semaines d'intervalle. Jeunes nés de mère non vaccinée : dès 15j Jeunes nés de mère vaccinée : dès 8 semaines Rappel : annuel Femelles gravides : 2- 6 semaines avant mise bas	<i>C. novyi</i> <i>C. tetani</i> <i>C. chauvoei</i>
				<i>C. novyi</i> <i>C. tetani</i> <i>C. chauvoe</i>
Coglavax®	<i>C. perfringens A</i> <i>C. perfringens B</i> <i>C. perfringens C</i> <i>C. perfringens D</i> <i>C. septicum</i>	Ovins, Caprins , Bovins, Lapins		<i>C. tetani</i>
				<i>C. tetani</i> <i>C. chauvoe</i>
Coglamune®	<i>C. perfringens A</i> <i>C. perfringens B</i> <i>C. perfringens C</i> <i>C. perfringens D</i>	Ovins, Caprins , Bovins, Lapins Porcins		<i>C. tetani</i> <i>C. chauvoe</i>
Tasvax®	<i>C. perfringens B</i> <i>C. perfringens C</i> <i>C. perfringens D</i> <i>C. septicum</i>	Ovins, Caprins , Bovins, Lapins		
Séranamix®	<i>C. perfringens B</i> <i>C. perfringens C</i> <i>C. perfringens D</i> <i>C. septicum</i>	Ovins, Caprins , Lapins	Primo: 2 injections de 5 mL à 21j d'intervalle en milieu sain, 48h d'intervalle en milieu contaminé. Rappel : 6 mois	<i>C. novyi</i> <i>C. tetani</i> <i>C. chauvoe</i>

La vaccination contre l'entérotoxémie est un acte répandu en élevage de petits ruminants, car la maîtrise totale des facteurs de risque étant difficile, elle semble être l'une des meilleures manières de se protéger de la maladie. En France 5 spécialités ont une AMM ovine et caprine. Toutes protègent contre les entérotoxémies de types B, C et D, et la plupart ont la valence de *C. septicum*. Seulement 2 ont la valence de *C. perfringens* type A et une seule a celle de *C. sordellii*. L'utilisation des vaccins doit se faire selon un choix raisonné par rapport à la prévalence des agents étiologiques d'entérotoxémie et à leur pathogénicité. En France, *C. perfringens* type A a la plus forte prévalence et la pathogénicité de *C. sordellii* est discutée. Si ces données ne sont pas erronées, il semblerait que certains vaccins commercialisés ne soient pas adaptés à la situation en France .

CONCLUSION

Les agents étiologiques d'entérotoxémie 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'entérotoxémie 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'entérotoxémie, 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. A l'autopsie, peu de lésions apparaissent. La forme caprine touche essentiellement l'animal adulte en production, induisant une diarrhée profuses 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.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- ABDEL SALAM I.S., EL SANOUSI S.M. Proposed scheme for isolation and identification of *Clostridium perfringens* and *Clostridium perfringens*-like organisms. *Revue Elev. Méd. Vét. Pays Trop.*, 1991, 44(2):153-158
- 2- AL-MASHAT R.R., TAYLOR D.J. Bacteria in enteric lesions of cattle. *Vet. Rec.*, 1983, 112:5-10
- 3- AL-MASHAT R.R., TAYLOR D.J. Production of diarrhoea and enteric lesions in calves by the oral inoculation of pure cultures of *Clostridium sordellii*. *Vet. Rec.*, 1983, 112:141-146
- 4- AL-MASHAT R., TAYLOR J. *Clostridium sordellii* in enteritis in an adult sheep, *Vet. Rec.*, 1983, 112:1
- 5- BAILLEUL M.N. Etude diagnostique et pathogénique des entérotoxémies chez les bovins, Thèse de doctorat vétérinaire, faculté de médecine de créteil, 1982, 79
- 6- BERRY P.R., RODHOUSE J.C., HUGHES S., BARTHOLOMEW B.A., GILBERT R.J. Evaluation of ELISA, RPLA, and Vero cell assays for detecting *Clostridium perfringens* enterotoxin in faecal specimens, *J. Clin Pathol*, 1988, 41:458-461
- 7- BILLINGTON S.J., WIECKOWSKI E.U., SARKER M.R., BUESCHEL D., SONGER J.G., McCLANE B.A. *Clostridium perfringens* type E animals enteritis isolates with highly conserved, silent enterotoxin gene sequences. *Infection and immunity*, 1998, vol 66, 9:4531-4536
- 8- BOUREAU H., COLLIGNON A., BARC M.C., KARJALAINEN T., BOURLIOUX P. Flore digestive et *Clostridium difficile* modèle expérimental d'étude de l'écologie microbienne et de la pathogénicité. *Bull. Acad. Vet. de France*, 1994, 67:55-62
- 9- BOURLIOUX P. Les anaérobies dans l'écosystème microbien du tractus digestif. *Med. Mal. Infect.*, 1990, 20:51-52
- 10- BRONZI D. Pathologie ovine Les entérotoxémies. *L'Action Vétérinaire* n°1608. 2002
- 11- BUNTING M., LORANT D.E., BRYANT A.E., ZIMMERMAN G.A., McINTYRE T.M., STEVENS D.L., PRESCOTT S.M. Alpha toxin from *Clostridium perfringens* induces proinflammatory changes in endothelial cells, *J. Clin. Invest.*, 1997, 100(3):565-574
- 12- BUOGO C., CAPAUL S., HANI H., FREY J., NICOLET J. Diagnostic of *Clostridium perfringens* type C enteritis in pigs using a DNA amplification technique (PCR), *J. Vet. Med.*, 1995, 42:51-58
- 13- BUXTON D., MORGAN K.T. Studies produced in the brains of colostrums deprived lambs by *Clostridium welchii* typh toxin. *Jour. of Comp. Pathol.*, 1976, 435-447
- 14- CARTER G.R., COLE J.R. *Clostridium*, Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology, fifth edition, 1990, 620p
- 15- CONTREPOIS M., GOUET PH. La microflore du tube digestif du jeune veau préruminant: dénombrement de quelques groupes bactériens à différents niveaux du tube digestif. *Ann. Rech. Vet.*, 1973, 4(1):161-170
- 16- COTTEREAU PH., GILBERT H., JOUBERT L., OUDAR J., PIERRE M. Deux cas d'entérotoxémie bovine à *Clostridium sordellii*. *Rev. Med. Vet.*, 1962, 113:34-40
- 17- COTTEREAU PH. Toxi-infections provoquées par des aliments infectés par des anaérobies notamment par *W. perfringens* et *W. agni*. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 1967, 67(9- 10):1293-1306
- 18- DAUBE G. *Clostridium perfringens* et pathologies digestives. *Ann. Med. Vet.*, 1992, 136 :5-30 144
- 19- DAUBE G., SIMON P., LIMBOURG B., MANTECA C., MAINIL., .KAECKENBEECK A. Hybridization of 2,659 *Clostridium perfringens* isolates with gene probes for seven toxins (α , β , ϵ , ι , θ , μ , and enterotoxin) and for sialidase. *Am. J. Vet. Res.*, 1996, 57(4):496-501
- 20- DE JONG A.E.I., ROMBOOTS F.M., BEUMER R.R. Behavior of *Clostridium perfringens* at low temperatures. *Int. Jour. of Food Microbiol.*, 2004, 97:71-80
- 21- DUCLUZEAU R., RAIBAUD P. Les interactions bactériennes dans le tube digestif. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 1989, 8(2):291-311

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 22- EBERT E., OPPLING V., WERNER E., CUSSLER K. Development and prevalidation of two different ELISA systems for the potency testing of *Clostridium perfringens* β and ϵ toxoid containing veterinary vaccines. FEMS Imm. and medical Micro., 1999, 24:299-311
- 23- EL IDRISSE A.H., WARD G.E. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Clostridium perfringens* enterotoxemia. Vet. Microbiol., 1992, 31(4):389-396
- 24- ENGLISH J.E. Field experience with *Clostridium enterotoxemia* in young animals. J.A.V.M.A., 1966, 149(12):1565-1570
- 25- ESPINASSE J. Les maladies à anaérobies des bovins. Bull. des G.T.V., 1980, 6:33-41
- 26- FERNANDEZ MIYAKAWA M.E., IBARRA C.A., UZAL F.A. In vitro effects of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin on water and ion transport in ovine and caprine intestine. Anaerobe, 2003, 9:145-149
- 27- FREY J. Toxines clostridiennes : pathogénie, implications cliniques, diagnostiques et preventives. Cycle de réunions des entérotoxémies, 2003
- 28- GARDNER D.E. Pathology of *Clostridium welchii* type D enterotoxaemia I. Biochemical and haematological alterations in lambs. J Comp Pathol. 1973, 83(4):499-507
- 29- GARDNER D.E. Pathology of *Clostridium welchii* type D enterotoxaemia. II. Structural and ultrastructural alterations in the tissues of lambs and mice. J Comp Pathol. 1973, 83(4):509-24
- 30- GARDNER D.E. Pathology of *Clostridium welchii* type D enterotoxaemia. III. Basis of the hyperglycaemic response, J Comp Pathol. 1973, 83(4):525-9.
- 31- GIBERT M., JOLIVET-RENAUD C., POPOFF M. Beta 2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. Gene, 1997, 20:65-73
- 32- GKIOURTZIDIS K., FREY J., BOURTZI-HATZOPOULOU E., ILIADIS N., SARRIS K. PCR detection and prevalence of α , β 1, β 2, ϵ , ι and enterotoxin genes in *Clostridium perfringens* isolated from lambs with clostridial dysentery. Vet. Microbiol., 2001, 8:39-43
- 33- GLOCK R.D., DEGROOT B.D. Sudden death of feedlot cattle. J. Anim. Sci., 1998, 76:315-319
- 34- GRECO G., MADIO A., BUONAVOGLIA D., TOTARO M., CORRENTE M., MARTELLA V., BUONAVOGLIA C. *Clostridium perfringens* toxin-types in lambs and kids affected with gastroenteric pathologies in Italy. Vet. Journal, 2005, 170:346-350
- 35- GREEN S., GREEN M.J., HILLYER M.H., MORGAN K.L. Injection site reactions and antibody responses in sheep and goats after the use of multivalent clostridial vaccines. Vet. Rec., 1987, 120:435-439
- 36- GREENHAM L.W., HARBER C., LEWIS E., SCULLION F.T. *Clostridium perfringens* in pelleted feed. Vet. Rec., 1987, 12:557
- 37- GRINER L.A., BRACKEN K.F. *Clostridium perfringens* (type C) in acute hemorrhagic enteritis of calves. J.A.V.M.A., 1953, 99-102
- 38- GRINER L.A. Enterotoxemia of sheep. I. Effects of *Clostridium perfringens* type D toxin on the brains of sheep and mice. Am. J. Vet. Res., 1961, 429-442
- 39- GRINER L.A., M.D.V., D.Ph., CARLSON W.D. Enterotoxemia of sheep. II. Distribution of I¹³¹ radioiodinated serum albumin in brains of *Clostridium perfringens* type D intoxicated lambs. Am. J. Vet. Res., 1961, 443-446
- 40- GRISEMER R.A., KRILL W.R. Enterotoxemia in beef calves 30 years' observation. J.A.V.M.A., 1962, 140(2):154-158
- 41- HEPPLER J.R. Necrotic enterotoxaemia in a calf due to *Clostridium welchii* type B. Vet. Rec., 1952, 6:633-635
- 42- JARRIGUE R. Principes de la nutrition et l'alimentation des ruminants. Besoins alimentaires des animaux. Valeur nutritive des aliments, Institut National de la Recherche Agronomique, 2nd édition, 1980, 621p

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 43- JOUBERT L., PAPAGEORGIOU C. Epizootologie et prophylaxie des infections anaérobies endogènes des animaux, Bull. Off. Int. Epiz., 1967, 67(9-10):1361-1377
- 44- KADRA B., GUILLOU J.P., POPOFF M., BOURLIOUX P. Typing of sheep clinical isolates and identification of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains by classical methods and by polymerase chain reaction (PCR). FEMS Immun. and Med. Microbiol., 1999, 24:259-266
- 45- LATOUR P., Les entérotoxémies chez les bovins : bilan bibliographique et contribution à l'amélioration du diagnostic nécropsique et bactériologique, Thèse de doctorat vétérinaire, Lyon, 2004, 174
- 46- LEFEVRE P.C., BLANCOU J., LHERMITTE R. Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail : Europe et régions chaudes 2. 2003, 1064-1072
- 47- LEOHARD L., Actualités bibliographiques, Thèse de doctorat vétérinaire, Lyon, 2004, 96
- 48- NAIK H.S., DUNCAN C.L. Rapid detection and quantitation of *Clostridium perfringens* enterotoxin by counter-immuno-electrophoresis, Appl. Microb., 1977, 34:125-128
- 49- NAGAHAMA M., KOBAYASHI K., OCHI S., SAKURAI J. Enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of toxins from *Clostridium perfringens*. FEMS Microbiol Lett., 1991, 68(1):41-4
- 50- NAYLOR R.D., MARTIN P.K., SHARPE R.T. Detection of *Clostridium perfringens* epsilon toxin by ELISA. Res. in Vet. Sci., 1987, 42:255-256
- 51- NAYLOR R.D., MARTIN P.K., BARKER L.T. Detection of *Clostridium perfringens* alpha toxins by enzyme-linked immunosorbent assay. Res. in Vet. Sci., 1997, 63:101-102
- 52- NAYLOR R.D., MARTIN P.K., BARKER L.T. Detection of *Clostridium perfringens* alpha toxin by enzyme-linked immunosorbent assay. Res. in Vet. Sci., 1997, 63:101-102
- 53- NAYLOR S.W., GALLY L.D., LOW J.C. Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. Int. Jour. of Med. Microbiol., 2005, 295:419-441
- 54- NEUT C., ROMOND C., DUBREUIL L. Comparaison des taux d'isolement des anaérobies stricts dans les prélèvements cliniques à l'aide de milieux sélectifs. Med. Mal. Infect., 1990, 20:89-92
- 55- NILO L. Effect on calves of the intravenous injection of the enterotoxin of *Clostridium welchii* type A. Jour. of Comp. Pathol., 1973, 83(2):265-269
- 56- NILO L. *Clostridium perfringens* in animal disease: a review of current knowledge. Can. Vet. J., 1980, 21:141-148
- 57- MANTECA CH., DAUBE G. Etude de l'entérotoxémie bovine en Belgique I. Introduction et contexte bibliographique, Ann. Med. Vet., 1994, 138 :155-164
- 58- MANTECA C., KAECKENBEECK A. Des postulats de Koch à l'entérotoxémie bovine : petites histoires et vieux papiers. Ann. Med. Vet., 2000, 144:405-408
- 59- MANTECA C., DAUBE G., JAUNIAUX T., LIMBOURG B., KAECKENBEECK A., MAINIL J.G. Etude de l'entérotoxémie bovine en Belgique. II. Epizootologie élémentaire et pathologie descriptive. Ann. Med. Vet., 2000, 145:75-82 146
- 60- MANTECA C., DAUBE G., PIRSON V., LIMBOURG B., KAECKENBEECK A., MAINIL J.G. Bacterial intestinal flora associated with enterotoxaemia in belgian blue calves. Vet. Microbiol., 2001, 81:21-32
- 61- MANTECA C., JAUNIAUX T., DAUBE G., CZAPLICKI G., MAINIL J.G. Isolation of *Clostridium perfringens* from three neonatal calves with haemorrhagic abomasitis. Revue Med. Vet., 2001, 152(8-9):637-639
- 62- MANTECA C., DAUBE G., JAUNIAUX T., LINDEN A., PIRSON V., DETILLEUX J., GINTER A., COPPE P., KAECKENBEECK A., MAINIL J.G. A role for the *Clostridium perfringens* beta 2 toxin in bovine enterotoxaemia? Vet. Microbiol., 2002, 86:191- 202
- 63- MARCHAL N., BOURDON J.L., RICHARD C. Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Doin, Paris, 1991, 509p

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 64- MARTIN P.K., NAYLOR R.D. A latex agglutination test for the qualitative detection of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. Res. in Vet. Sci., 1994, 56:259-261
- 65- MARTINEZ R.D., WILKINS T. Purification and characterisation of *Clostridium sordellii* hemorrhagic toxin and cross-reactivity with *Clostridium difficile* cytotoxin. Infect. Imm., 1998, 56:1215-1221
- 66- MEER R.R., SONGER G. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. Am. J. Vet. Res., 1997, 58(7):702-705
- 67- MIYAKAWA F.M.E., UZAL F.A. The early effects of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in ligated intestinal loops of goats and sheep. Vet. Res. Commun, 2003, 27(3):231-241
- 68- MORGAN K.T., KELLY B.G., BUXTON D. Vascular leakage produced in the brains of mice by *Clostridium welchii* type D toxin. Jour. of Comp. Pathol., 1975, 85(3):461-466
- 69- PETIT L., GIBERT M., POPOFF M.R. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype, Trends Microbiol., 1999, 7:104-110
- 70- PHILIPPEAU C., GONCALVES S., JULLIAND V. Diagnostic bactériologique des entérotoxémies. Le Point Vétérinaire, 2003, 237:12-13
- 71- PHILIPPEAU C., JULLIAND V., GONCALVES S. La place des entérotoxémies dans les morts subites en élevage charolais. Journées Nationales G.T.V., Nantes 2003
- 72- PICARD P., PHILIPPEAU C., JULLIAND V., MATHEVET P. Les entérotoxémies chez les bovines charolais de Bourgogne: les leçons de cinq ans d'étude. Bull. des G.T.V., 2005, 31:39-43
- 73- POPOFF M.R. Purification and characterisation of *Clostridium sordellii* lethal toxin and cross-reactivity with *Clostridium difficile* cytotoxin. Infect. Imm., 1987, 55:35-43
- 74- POPOFF M. Les entérotoxémies. Revue Med. Vet., 1989, 140 :479-491
- 75- POPOFF M. Les affections à *clostridium* chez les ovins. Bull.GTV, 1994, 3 :43-50
- 76- POPOFF M.R. Entérotoxines bactériennes: structure, mode d'action et approche vaccinale. Revue Med. Vet., 1996, 147(6):425-438
- 77- RAMISSE J., BREMENT A.M., POIRIER J.C., RABREAUD C., SIMONNET P. Flore microbienne isolée au cours de diarrhées néo-natales mortelles chez le veau, l'agneau et le porcelet. Revue Med Vet., 1979, 130(1):111-122
- 78- RICHARDS S.M., HUNT B.W. *Clostridium sordellii* in lambs. Vet. Rec., 1982, 22
- 79- ROEDER B.L., CHENGAPPA M.M., NAGARAJA T.G., AVERY T. Isolation of *Clostridium perfringens* from neonatal calves with ruminal and abomasal tympany, abomasitis, and abomasal ulceration. J.A.V.M.A., 1987, 190, 1550-1555
- 80- ROSE A.L., EDGAR G. Enterotoxaemic jaundice of sheep and cattle. Aus.Vet.J., 1936, 36, 212-220
- 81- SAVAGE D.C., DUBOS R., SCHAEGLER R.W. The gastrointestinal epithelium and its autochthonous bacterial flora. Jour. of Exp. Med., 1967, 127:67-76 147
- 82- SAVAGE D.C. L'écosystème digestif et sa colonisation. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 1989, 8(2):275-290
- 83- SAWIRES Y.S., SONGER J.G. *Clostridium perfringens*: insight into virulence evolution and population structure. Anaerobe, 2005, 11:303-324
- 84- SCHELCHER F., CABANIE P. Principales causes de mort subite des bovins, Le Point Vétérinaire, 2002, 228 : 20-26
- 85- SEBALD M. Pathogénicité des bactéries anaérobies. Med. Mal. Infect., 1990, 20:13- 14
- 86- SEDALLIAN A. Isolement et identification des bactéries anaérobies strictes. Principaux germes isolés de produits pathologiques. Med. Mal. Infect., 1990, 20:83-88
- 87- SHIRLEY G.N. Clostridial enteritis in cattle. Vet. Rec., 1958, 70(23):478-780
- 88- SMITH B.P., Diseases caused by *Clostridium perfringens* toxins, Large animal internal medicine. Diseases of horses, cattle, sheep and goat, 2nd edition, 1996, 2040p, 768- 771

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 89-** SONGER O.S., SONGER M.J., HILLYER M.H., MORGAN K.L. Injection site and antibody responses in sheep and goats after the use of multivalent clostridial vaccines, *Vet. Rec.*, 1987, 2:435-439
- 90-** SONGER J.G. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1996, 216-234
- 91-** SONGER J.G., MISKIMMINS D.W. *Clostridium perfringens* type E enteritis in calves: two cases and a brief review of the literature. *Anaerobe*, 2004, 10:239-242
- 92-** SONGER J.G., MISKIMMINS D.W. Clostridial abomasitis in calves: Case report and review of the literature. *Anaerobe*, 2005, 11:290-294
- 93-** STAMATIN N., UNGUREANU C. Epizootologie des clostridioses. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 1967, 67(9-10):1251-1292
- 94-** STARK R.L., DUNCAN C.L. Purification and biochemical properties of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin, *Inf. Imm.*, 1972, 5:662-673
- 95-** TARTERA P. Les entérotoxémies des ruminants. *L'Action Vétérinaire* n°1524. 16 juin 2000
- 96-** THOMAS P.I., DOWNEY N.E., DREADON R.S. Mortality in lambs due to enterotoxaemia associated with heavy infestations of *Moniezia expansa*. *NZ Vet. J.*, 1956, 14:161-5
- 97-** TIGAUD S., JOUVE M., IERMANN N., COMBE P. Identification et typage intraespèces des clostridies ; Electrophorèse des extraits protéiques totaux sur gel de polyacrylamide. *Med. Mal. Infect.*, 1990, 20:93-96
- 98-** TITBALL R.W., NAYLOR C.E., BASAK A.K. The *Clostridium perfringens* α -toxin, *Anaerobe*, 1999, 5:51-64
- 99-** VAIKOSEN E.S., IKHATUA U.J. Detection of high level of enterotoxin of *Clostridium perfringens* types C and D in small ruminants. *Small Ruminant Research*, 2005, 58:287-290
- 100-** VERON M., LE MINOR L. *Clostridium*, *Bactériologie médicale* 2nd édition, 1989, 1107p
- 101-** UZAL F.A., KELLY W.R., MORRIS W.E., ASSIS R.A. Effects of intravenous injection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in calves. *J. Comp. Path.*, 2002, 126:71-75
- 102-** UZAL F.A., Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats, *Anaerobe*, 2004, 10:135-143
- 103-** WALKER R. L., HIRSH D. C., MACLACH