

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année 2006-2007 - Thèse n°

APPORT DIAGNOSTIQUE DU DENOMBREMENT DE Clostridium perfringens DANS L'INTESTIN GRÊLE DES RUMINANTS SUSPECTS D'ENTEROTOXEMIE

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I

(Médecine - Pharmacie)

et soutenue publiquement le 26 janvier 2007

pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Sylvain POURCHER

Né le 15 Novembre 1979

à Clermont-Ferrand



DEPARTEMENT ET CORPS ENSEIGNANT DE L'ENVL
Directeur : Stéphane MARTINOT

Mise à jour : 20/09/2006

	PR EX	PR 1	PR 2	MC	Contractuel, Associé, IPAC et ISPY	AERC	Chargés de consultations et d'enseignement
DEPARTEMENT SANTE PUBLIQUE VETERINAIRE							
Microbiologie, Immunologie, Pathologie Générale	Y. RICHARD		A. KODJO	V. GUERIN-FAUBLEE D. GREZEL			
Pathologie infectieuse			A. LACHERETZ M. ARTOIS	J. VALARD			
Parasitologie et Maladies Parasitaires	MC. CHAUVE	G. BOURDOISEAU		MP. CALLAIT CARDINAL L. ZENNER			
Qualité et Sécurité des Aliments			P. DEMONT C. VERMADZY A. LACHERETZ	A. GONTHER S. COLARDELLE			
Législation et Jurisprudence				P. SABATIER ML. DELIGNETTE K. CHALVET-MONFRAY			
Bio-informatique - Bio-statistique							
DEPARTEMENT ANIMAUX DE COMPAGNIE							
Anatomie			T. ROGER	S. SAWAYA	C. BOULOCHER ME. DUCLOS		
Chirurgie et Anesthésiologie		J.P. GENEVOIS	D. FAU E. VIGUIER D. REMY		S. JUNOT (MCC) K. PORTIER (MCC) C. DECOSNE-JUNOT (MCC)	C. CAROZZO	
Anatomie pathologique/Dermatologie-Cancérologie			C. FLEURY	T. MARCHAL	P. BELLI D. PIN D. WATRELOT-VRIEUX (MCC)		
Hématologie		C. FOURNEL					
Médecine interne		J.L. CADORE		L. CHARBANNIE F. PONCE M. HUGONNARD C. ESCRIOLL	J. SONEI (MCC)		I. BUBLOT
Imagerie Médicale							
DEPARTEMENT PRODUCTIONS ANIMALES							
Zootéchnie, Ethologie et Economie Rurale		M. FRANCK		L. MOUINIER D. GRANCHER L. ALVES DE OLIVEIRA G. EGRON			
Nutrition et Alimentation				S. BUF P. GUERIN R. FRIKHA M.A. ARCANGIOLI D. LE GRAND	A. C. LEFRANC		G. LESOBRE P. DEBARNOT D. LAURENT
Biologie et Pathologie de Reproduction		F. BADINAND	M. RACHAL-BRETIN				
Pathologie Animaux de Production		P. BEZILLE	T. ALOGINOUWA				
DEPARTEMENT SCIENCES BIOLOGIQUES							
Physiologie/Thérapeutique				J.J. THIEBAULT J.M. BONNET-GARIN			
Biophysique/Biochimie		E. BENOIT F. GARNIER		V. LAMBERT			
Génétique et Biologie moléculaire				T. BURONFOSSE			
Pharmacologie/Toxicologie, Législation du Médicament		G. KECK	P. JAUSSAUD P. BERNY		C. FARMER T. AVISON		
Langues							
DEPARTEMENT HIPPIQUE							
Pathologie équine		J.L. CADORE		A. BENAMOU-SMITH			
Clinique équine		O. LEPAGE		A. LEBLOND	M. GLANGL		

A Monsieur le Professeur Claude Gharib,
Professeur à la faculté de Médecine de Lyon
*Qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider cette thèse,
Qu'il trouve ici l'assurance de mon profond respect*

A Monsieur le Professeur Pierre Bézille
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon
*Qui m'a proposé ce travail et a su rester disponible,
Et pédagogue tout au long de sa réalisation,
Qu'il trouve ici l'expression de mes remerciements sincères*

A Monsieur le Professeur Denis Grancher
Maître de conférence à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon
*Qui m'a fait l'honneur d'accepter de participer à mon jury de thèse
Qu'il trouve ici le témoignage de ma gratitude et de ma considération*

**A Jeannine Bernardot et toutes les personnes du laboratoire d'analyse de bactériologie
de l'unité pédagogique de pathologie du bétail de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon**
*Pour leur précieuse aide et contribution à ce travail
Pour leur gentillesse
Respectueux remerciement*

A la mémoire de mes deux grands-pères

Puissiez vous être fier de ce que j'ai accompli

A mes parents

Qui ont toujours su me soutenir tout au long de mes études. Je n'oublierai jamais votre amour et tous vos sacrifices. J'espère vous apporter en retour la plus grande satisfaction.

A Elise

Qui m'a apporté la plus belle chose de la vie : l'amour. Je souhaite que nos vies restent liées à jamais.

A ma sœur Julie

Pour toutes ces années partagées, à nos souvenirs d'enfance. Je te suis très reconnaissant pour ta précieuse aide. Je te souhaite une excellente santé, beaucoup de réussites professionnelles et plein de bonheur avec Guillaume.

A mes deux grands-mères

Dont leur gentillesse n'ont d'égale que l'immensité de l'univers. Je souhaite pouvoir un jour donner autant de tendresse et de générosité que vous avez pu m'apporter.

A Guillaume

Pour notre amitié. J'espère pouvoir partager encore de nombreuses parties de pêche, de pétanque et de console. Je te souhaite beaucoup de bonheur, mon bof

A mes oncles et tantes, Guy, Marylène et Alain, Nicole et Michel ; et mes cousins Nicolas, Franck, Céline, Cédric, Angélique, Magalie et Sonia

Pour tous les moments passés en votre présence

A Suzanne

Pour m'avoir permis de me loger durant mes stages de formation vétérinaire

A Noël et Isabelle

Pour m'avoir hébergé à Paris et soutenu au cours des oraux du concours vétérinaire

A Stéphane et Stéphanie

Qui par leur recommandation m'ont permis de découvrir des personnes formidables

Aux Docteurs vétérinaires, Régine Bouscaud, Jean-Marie Monfraix et Alibert De Biasi

*Qui ont su me faire partager leur savoir et leur passion, me faire confiance et m'épauler dans les débuts de l'exercice vétérinaire. Vous resterez à jamais des modèles à suivre dans cette profession. Un grand merci à vos assistantes : **Nadège, Sandra, Sylvie et Marie Claude** pour leur gentillesse, sans oublier **Maria** pour ces délicieux repas.*

A mes amis entraiguois, Jérôme, Manu, Jean-Marie, Arnaud et tous les autres

Pour tous les moments inoubliables passés depuis notre enfance. Je ne vous oublierai jamais et j'espère partager encore de nombreuses soirées en votre compagnie.

A Baine et Lolo

Que je considère comme deux frères. Vous avez toujours été là dans les bons et mauvais moments. J'espère que notre amitié se poursuivra tout au long de notre vie.

A mes amis de prépas, Nonoss (ta sérénité en toutes circonstances m'a toujours épaté), **Perrin** (hé là c'est quoi, dommage que tu sois supporters lyonnais), **Pignon** (l'homme sage), **Clément** (ma grosse tétine), **Pin** (mon barbu préféré), **Ion, Brice, Erwan** et bien d'autres.

A Tiflette

Pour toutes les soirées légendaires (au Cap d'Agde, à l'école), les fameuses parties de cartes (coinchés, dame de pique, crapette), les concerts de fin de soirée et nos deux années de colocation. Je n'oublierai jamais tout ce que l'on a partagé ensemble.

A Garga, mon fils de clinique

Pour avoir partagé des instants captivant en cliniques. Tu resteras pour moi le Koeman de l'équipe de foot de l'ENVL.

Au groupe 9, Pov (mon éponge préféré), **PH** (partenaires de gardes et de discussions productives), **Ericka** (toujours occupée mais au combien disponible quand on a besoin de toi), **Emilie** et **Simon** (qui malgré certains différends, vous restez deux personnes que j'apprécie). A nos enfants de clinique.

A Marcel pour tout ce que tu as fait pour moi. Merci énormément

A Jeff, Camille, Pipo et Bertrand pour leur amitié

A Goupil (mon dieu de la pétanque), **Bed** (vive johny et la bêtaillère), **Alliage, Betty, Pat** et tous les autres HML.

A tarvel, Loic, Doume, Tigrou, Mel pour m'avoir hébergé bien des fois dans leur humble demeure. Dédicace à l'ancien petit Tarvel (**CO, Tom et Laguite**).

A Jérémy et Boro, pour m'avoir fait découvrir la joie de vivre des Chtis.

A Amandine pour ta coopération. Merci.

A l'équipe de football de l'ENVL, CO, Dibule, Loule, Tony et tous les autres.

A tous mes parents, à mes frères et soeurs de clinique de D2.

A Cindy (le zizou de l'ENVL), **Amélie** (beaucoup de bonheur avec sylvain), **Aurélie** et toutes les personnes de la promotion OBI que j'ai côtoyées.

A ma poulotte, je suis ravi de t'avoir rencontrée et te souhaite plein de réussite et de bonheur.

A Henri pour ton humour inégalable

Au IDG, Lob, Franky, Nouille, Jamy...

Au RHD, Sandrine (vive les livraisons de croquettes), **Emilie, Roger, Yoko** et les autres

A nos poulots FBI (Flo, Toup'ti, Mathilde, Lisou, Vomito, Grisou, Roxanne, Gaele, Lionel et tous les autres)

Aux vétérinaires, Dr Lesobre, Dr Debarnot et Dr Laurent pour avoir contribué à ma formation de vétérinaire.

A Vulcane ma toutoune adorée, mais aussi à **Ely, Puce** et tous les autres qui m'ont accompagné jusqu'à présent.

TABLE DES MATIERES

Table des Matières.....	11
Liste des figures.....	15
Liste des tableaux	17
Introduction	19
1^{ère} Partie : Etude bibliographique	20
I. Etio-pathogénie	21
A. Bactéries	21
1. Clostridium perfringens.....	21
a. Morphologie	21
b. Habitat.....	22
c. Formes de résistance : les spores.....	22
d. Caractères biochimiques et culturels	23
2. Clostridium sordellii.....	23
a. Morphologie	23
b. Habitat.....	24
c. Caractères biochimiques.....	24
B. Les toxines clostridiennes.....	24
1. La toxine α	24
a. Structure	25
b. Gène codant.....	25
c. Activité biologique	25
2. La toxine β 1.....	26
a. Structure	26
b. Gène codant.....	26
c. Activité biologique	26
3. La toxine β 2.....	26
a. Structure	27
b. Gène codant.....	27
c. Action biologique	27
4. La toxine ϵ	27
a. Structure	27
b. Gène codant.....	27
c. Activité biologique	28
5. La toxine ι	28
a. Structure	28

b. Gène codant.....	29
c. Activité biologique.....	29
6. L'entérotoxine (CPE).....	30
a. Structure.....	30
b. Gène codant.....	30
c. Activité biologique.....	30
7. Toxine létale LT.....	32
8. La toxine HT.....	32
C. La classification.....	34
1. Les toxinotypes.....	34
a. Entérotoxémie due à Clostridium perfringens de type A non entérotoxigène.....	35
b. Entérotoxémie due à Clostridium perfringens de type B.....	36
c. Entérotoxémie due à Clostridium perfringens de type C.....	36
d. Entérotoxémie due à Clostridium perfringens de type D.....	36
e. Entérotoxémie due à Clostridium perfringens de type E.....	37
f. Entérotoxémie due à Clostridium perfringens de type A entérotoxigène.....	37
g. Entérotoxémie à Clostridium sordellii.....	37
2. La classification génotypique.....	38
II. Causes favorisantes et pathogénie des entérotoxémies.....	40
A. Flore intestinale et entérotoxémie.....	40
1. Ecologie intestinale.....	40
2. Pathogénie des entérotoxémies.....	41
B. Les causes favorisantes et entérotoxémies.....	42
1. Facteurs extrinsèques.....	42
a. L'alimentation.....	42
b. Le stress, le péristaltisme et la sécrétion biliaire.....	44
c. Le climat et la saison.....	44
d. Utilisation d'antibiotiques.....	44
e. Le parasitisme.....	45
2. Facteurs intrinsèques.....	45
a. L'espèce.....	45
b. L'âge.....	46
c. La race et la conformation.....	46
III. Diagnostic.....	47
A. Les bases épidémiologiques.....	47
B. Les bases cliniques.....	47
1. La forme clinique suraiguë.....	47
2. La forme clinique aiguë.....	52

C. Les bases lésionnelles	53
1. Aspect général	53
a. Aspect extérieur.....	53
b. Aspect interne	53
2. Les organes internes	54
a. L'appareil cardio-respiratoire.....	54
b. L'appareil digestif	55
D. Diagnostic de laboratoire.....	60
1. La recherche de toxines.....	60
a. Counter-immuno-electrophorèse (CIEP)	60
b. Test intradermique	62
c. La séroneutralisation sur souris.....	62
d. Méthode du test d'agglutination reverse passive	63
e. Méthode utilisant un essai de cellules Vero	64
f. ELISA	65
2. Recherche de gènes codants : méthode PCR (Polymerase Chain Reaction).....	69
3. La recherche de bactéries	72
a. La chromatographie.....	72
b. Immunofluorescence directe.....	72
c. L'examen bactériologique.....	73
IV. Prophylaxies.....	75
1. Prophylaxie sanitaire	75
2. Prophylaxie médicale	76
a. L'antibiothérapie	76
b. La sérothérapie.....	76
c. La vaccination	76
Conclusion partielle :.....	79
2^{ème} partie : Etude expérimentale	81
I. Matériels, méthodes et sujets	83
B. Recrutement des sujets	83
1. Les sujets du groupe « entérotoxémie »	83
2. Les sujets du groupe « non entérotoxémie »	83
C. Protocole expérimental	84
1. Mise en place du protocole.....	84
2. Les prélèvements.....	84
3. Techniques d'analyses.....	84
a. Préparation des dilutions	84
b. Ensemencement des milieux de cultures.....	85

D. Méthodes d'analyse et traitement statistique.....	86
V. Résultats	86
A. Dénombrement de la flore de l'iléon à J+1 post-mortem des sujets suspects ou non d'entérotoxémie.....	86
1. Etude des concentrations de clostridies.....	87
2. Etude des concentrations de coliformes	89
3. Etude des concentrations des entérocoques.....	91
4. Etude des concentrations de la flore totale.....	93
B. Influence du site de prélèvement et du délai de conservation post-mortem des prélèvements à + 4°C sur le dénombrement de fractions bactériennes (clostridies, coliformes, entérocoques et flore totale) de l'intestin grêle.....	95
1. Résultats du dénombrement de la flore totale	96
2. Résultats du dénombrement des coliformes.....	97
3. Résultats du dénombrement des entérocoques.....	98
4. Résultats du dénombrement des clostridies.....	99
VI. Discussion	100
A. Analyse critique des résultats obtenus.....	100
1. Les sujets inclus	100
2. Les prélèvements intestinaux	100
3. Les techniques d'analyse.....	101
B. Importance du dénombrement de Clostridium perfringens et du mode de conservation du prélèvement dans le diagnostic d'entérotoxémie	102
C. Conclusion et perspectives	104
CONCLUSION	105
Annexe 1 :	107
Annexe 2 :	118
Annexe 3	130
Annexe 4	132
Annexe 5	134
Annexe 6	136
Annexe 7	138
Annexe 8	141
BIBLIOGRAPHIE	143

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Photographie de <i>Clostridium perfringens</i> observée au microscope optique (cliché de DUMARCHE) G×1000.....	22
Figure 2 : Photographie de <i>C. sordellii</i> observée au microscope optique (cliché de DUMARCHE) G×1000.....	23
Figure 3 : Mécanismes d'action de la toxine ι de <i>C. perfringens</i> [76].....	29
Figure 4 : Mécanismes d'action de l'entérotoxine de <i>C. perfringens</i> [76]	31
Figure 5 : Schéma récapitulatif des activités biologiques des toxines de <i>C. perfringens</i> [69].	32
Figure 6 : Mécanismes d'action des bactéries dans l'intestin grêle [74].....	41
Figure 7 : Résultats de counter-immuno-électrophorèse pour un échantillon contenant des toxines de <i>C. perfringens</i> (a) et un échantillon témoin négatif (b) [48].....	61
Figure 8 : Schéma de la méthode ELISA simple et double « sandwich » dans la recherche des toxines de <i>C. perfringens</i> (Unité Pédagogique de Microbiologie)	66
Figure 9 : Schéma de la méthode PCR (Unité pédagogique de Génétique Moléculaire)	69
Figure 10 : Exemples de quelques amorces de toxines de <i>C. perfringens</i> utilisées pour la technique PCR [44]	70
Figure 11 : Diagramme en boîte type BoxPlot.....	86
Figure 12 : Distribution des populations de clostridies de l'iléon à J+1 post-mortem en fonction des classes de concentrations et du statut de l'animal	87
Figure 13 : Distribution des populations de clostridies de l'iléon à J+1 post-mortem en fonction de leurs concentrations logarithmiques et du statut des sujets.....	88
Figure 14 : Distribution des populations de coliformes de l'iléon à J+1 post-mortem en fonction des classes de concentrations et du statut des sujets	89
Figure 15 : Distribution des populations de coliformes de l'iléon à J+1 post-mortem en fonction de leurs concentrations logarithmiques et du statut des sujets.....	90
Figure 16 : Distribution des populations des entérocoques de l'iléon à J1 post-mortem en fonction des classes de concentrations et du statut des sujets	91
Figure 17 : Distribution des populations des entérocoques de l'iléon à J1 post-mortem en fonction de leurs concentrations logarithmiques et du statut des sujets.....	92
Figure 18 : Distribution des populations de la flore totale aéro-anaérobie de l'iléon à J1 post-mortem en fonction des classes de concentrations et du statut des sujets.....	93
Figure 19 : Distribution de la flore totale de l'iléon à J1 post-mortem en fonction de leurs concentrations et du statut des sujets.....	94
Figure 20 : Représentation de la cinétique des concentrations de la flore totale en fonction du temps, du statut des sujets et du site de prélèvement	96
Figure 21 : Représentation de la cinétique des concentrations des coliformes en fonction du temps, du statut des sujets et du site de prélèvement	97

Figure 22 : Représentation de la cinétique des concentrations des entérocoques en fonction du temps, du statut des sujets et du site de prélèvement 98

Figure 23 : Représentation de la cinétique des concentrations des clostridies en fonction du temps, du statut des sujets et du site de prélèvement 99

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Synthèse des propriétés biologiques des toxines de <i>Clostridium perfringens</i> [18, 69].....	33
Tableau 2 : Production des différentes toxines létales majeures par les toxinotypes de <i>Clostridium perfringens</i> [18, 74].....	35
Tableau 3 : Les différents génotypes en rapport avec les toxinotypes [69].....	39
Tableau 4 : Diagnostic différentiel des différentes causes de mort subite chez les ruminants [84, 21, 45, 48, 57]	49
Tableau 5 : Synthèse des lésions caractéristiques observées à l'autopsie sur les ruminants morts d'entérotoxémie [45].....	59
Tableau 6 : Synthèse des avantages et inconvénients des méthodes de recherche des toxines de <i>C. perfringens</i>	68
Tableau 7 : Bilan de la méthode PCR dans le diagnostic de laboratoire de l'entérotoxémie ..	72
Tableau 8 : Récapitulatif des principaux vaccins commercialisés pour la prophylaxie sanitaire des entérotaxies (Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires 2005).....	78
Tableau 9 : Répartition des sujets en fonction de leur concentration de clostridies en UFC/mL et de leur statut	87
Tableau 10 : Répartition des sujets en fonction de leur concentration en UFC/mL des coliformes et de leur statut	89
Tableau 11 : Répartition des sujets en fonction de leur concentration en UFC/mL des entérocoques et de leur statut	91
Tableau 12 : Répartition des sujets en fonction de leur concentration en UFC/mL de la flore totale aéro-anaérobies et de leur statut	93
Tableau 13 : Valeurs logarithmiques des concentrations de la flore intestinale après conservation à + 4°C en fonction du délai post-mortem et du statut des sujets.....	95
Tableau 14 : Synthèse des données de l'étude des concentrations iléales de <i>C.perfringens</i> à J+1 post-mortem en vue d'un diagnostic d'entérotaxémie	103
Tableau 15 : Résultats du dénombrement iléal en <i>C. perfringens</i> des sujets suspects ou non d'entérotaxies à J+1 post-mortem	130
Tableau 16 : Résultats du dénombrement iléale en coliformes des sujets non entérotaxies à J+1 post-mortem.....	132
Tableau 17 : Résultats du dénombrement iléal en entérocoques des sujets non entérotaxies à J+1 post-mortem.....	134
Tableau 18 : Résultats du dénombrement iléal de la flore totale des sujets suspects ou non entérotaxies à J+1 post-mortem	136
Tableau 19 : Récapitulatif des valeurs logarithmiques des concentrations de la flore intestinale à différentes portions de l'intestin grêle après conservation à + 4°C en fonction du délai post-	

mortem du prélèvement et du statut des sujets.....	138
Tableau 20 : Milieux de cultures utilisés pour les examens bactériologiques avec indication des fournisseurs	141

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 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.

Nous exposerons dans une première partie les éléments bibliographiques utiles à la compréhension de l'étiopathogénie des entérotoxémies et aux différentes bases épidémiocliniques, lésionnelles et de laboratoire nécessaires pour l'étude expérimentale. Dans une seconde partie nous exposerons l'expérimentation effectuée dans le but d'établir un diagnostic bactériologique de cette maladie qui sera ensuite discutée.

1^{ERE} PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Les entérotoxémies sont des affections des ruminants dues à la pullulation dans l'intestin, de *Clostridium perfringens* avec production d'exotoxines protéiques létales. *Clostridium perfringens* est l'agent bactérien déterminant de la maladie. Cliniquement ces affections se caractérisent par une mort subite parfois précédée pendant quelques heures de troubles diarrhéiques, convulsifs et hémolytiques. L'autopsie révèle des lésions congestivo-hémorragiques disséminées dans l'intestin, des lésions exsudatives avec accumulation de liquide séro-hémorragique dans les grandes cavités séreuses et des lésions dégénératives des parenchymes (foie, rein et muscles) ; la putréfaction des cadavres étant particulièrement rapide.

C'est à partir de ces bases épidémiologiques et lésionnelles que s'appuie le diagnostic de suspicion d'entérotoxémie. Les analyses de laboratoire permettent ensuite de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

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].

A. Bactéries

Les bactéries responsables des entérotoxémies 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 bovins [16, 78, 24].

1. Clostridium perfringens

a. Morphologie

Clostridium perfringens est un bacille immobile, Gram positif, de 4 µm sur 1,5 µm avec des bords parallèles et des extrémités arrondies [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 (cliché de DUMARCHE) G×1000



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 10^3 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 10^6 à 10^9 bactéries par millilitre de prélèvement [74].

c.Formes de résistance : les spores

Les spores de *Clostridium perfringens* sont ovales et thermo-résistantes. La sporulation permet à la bactérie de résister dans le milieu extérieur lorsque les conditions ne sont plus favorables à sa survie c'est à dire lors de modifications de pH et de température [24, 100, 103].

La formation de spores mûres thermo-résistantes 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 thermo-résistantes formées [100].

d. Caractères biochimiques et culturels

Il s'agit d'une bactérie anaérobie stricte, aérotole'ante (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].

2. Clostridium sordellii

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

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 (cliché de DUMARCHE) G×1000



b. Habitat

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

c. Caractères biochimiques

C'est un bacille anaérobie, positif à la coloration de Gram. Il possède une uréase, fermente le glucose, le lévulose et le maltose. Il produit deux toxines : une toxine létale (LT) et une toxine nécrosante (HT) [100, 103].

B. 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 : eta, kappa, theta, 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, 102].

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.

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

croissance exponentielle [88, 90, 98].

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 métalloenzyme 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].

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].

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 membranaires 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 intrapéritonéale 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].

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 nouveaux-nés [32,46].

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].

b.Gène codant

Le gène *cpb1*, à l'origine de l'élaboration de cette toxine, réside sur un élément extrachromosomique, 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].

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 nouveaux-nés. 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].

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].

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].

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].

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 nouveaux-nés que la toxine β_1 [31].

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].

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].

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].

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].

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].

a. Structure

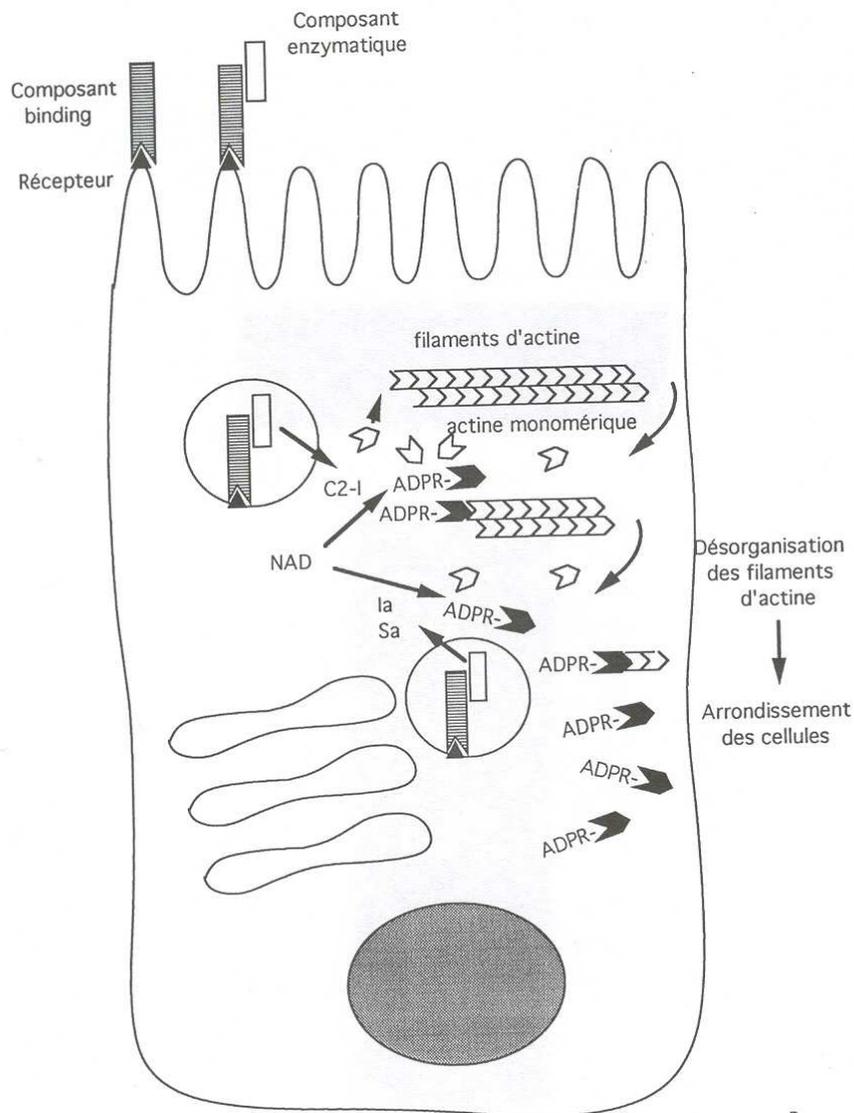
Il s'agit d'une toxine binaire, sécrétée sous forme inactive et activée par des enzymes protéolytiques [74, 103]. La modification des onze derniers acides aminés du côté N-terminal active la toxine. Elle est constituée de deux facteurs protéiques distincts (deux chaînes polypeptidiques), identifiés sous 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].

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].

c. Activité biologique

Figure 3 : Mécanismes d'action de la toxine ι de *C. perfringens* [76]



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 de 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.

6.L'entérotoxine (CPE)

L'entérotoxine (CPE) est produite lors de la sporulation de *C. perfringens* [18, 103] suite à la lyse de la cellule, à la différence des autres toxines sécrétées en phase de croissance exponentielle [18].

a.Structure

Il s'agit d'un polypeptide constitué d'une chaîne de poids moléculaire de 35 kDa, thermolabile et libéré dans l'organisme lors de la lyse de la cellule végétative. L'activation de la toxine nécessite l'action d'enzymes protéolytiques malgré sa grande résistance à la plupart des enzymes digestives [18, 76, 90, 103].

b.Gène codant

Le gène *cpe*, codant pour l'entérotoxine, est localisé sur un locus du chromosome mais de récentes études ont montré sa présence extrachromosomique (plasmide) associée à un élément génétique mobile [90].

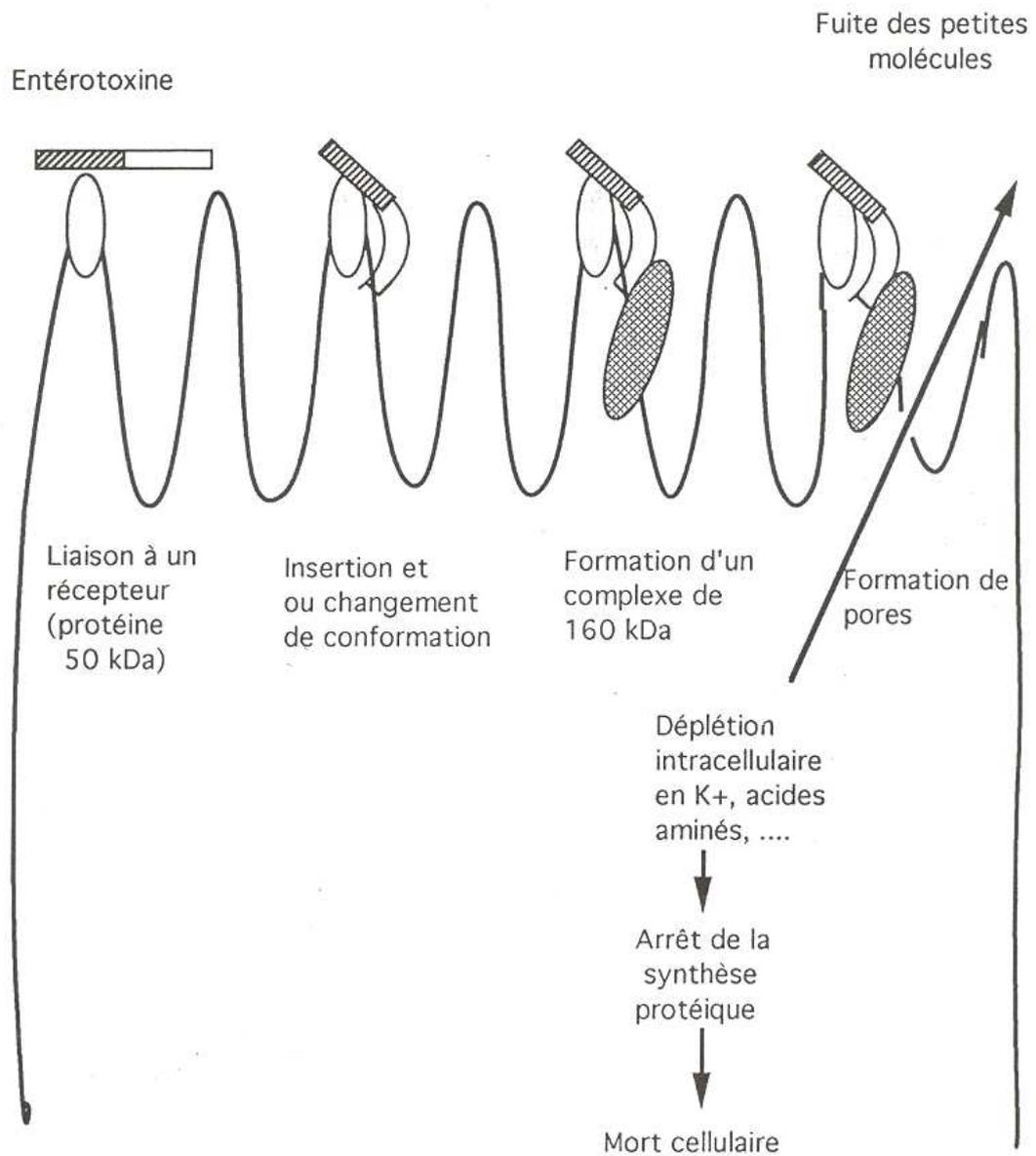
Lors de cas d'entérite hémorragique de veaux, la technique PCR (Polymerase Chain Reaction) a permis d'isoler le gène *cpe* de l'entérotoxine en association avec les toxines des souches décrites dans le toxinotype E (α et ι). Le gène *cpe*, codant pour l'entérotoxine, est en continuité du gène de la toxine ι mais ne s'exprime pas lors de la sporulation, on parle de séquence *cpe* silence. L'origine de cette expression silencieuse s'explique par l'existence de mutations de la séquence, d'un manque de codon initiateur et promoteur [7, 91].

c.Activité biologique

Son activité biologique induit une accumulation de liquide dans l'intestin de la plupart des espèces [18].

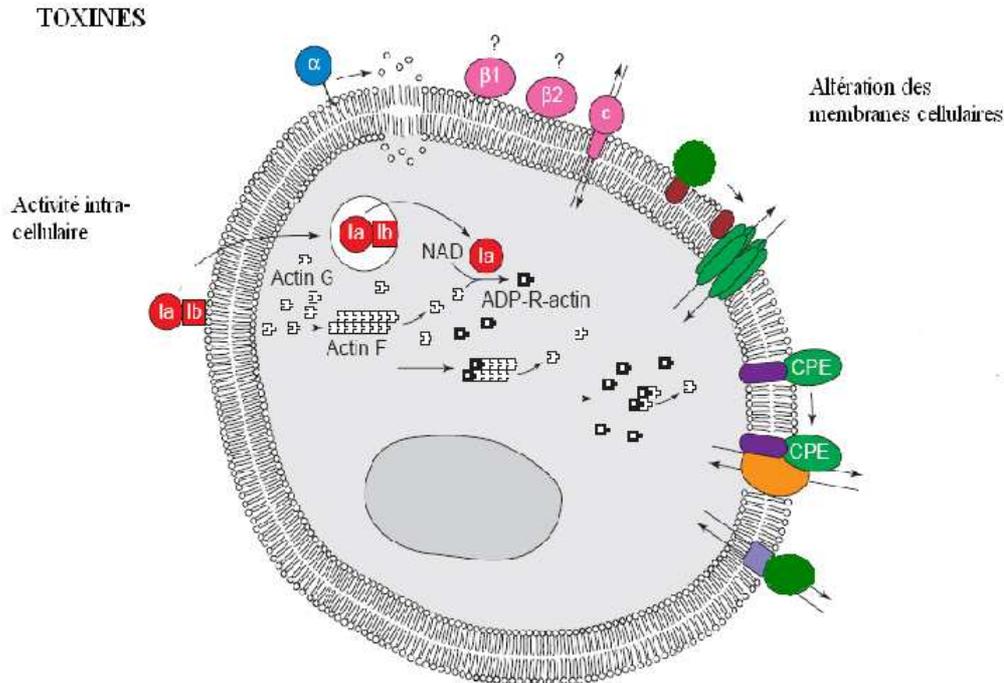
Son mécanisme d'action moléculaire fait intervenir la reconnaissance d'un récepteur sur la membrane à bordure en brosse de l'intestin [76]. Le domaine N-terminal est le site cytotoxique tandis que le domaine C-terminal est responsable de l'activité par la reconnaissance de récepteurs. L'entérotoxine s'insère dans la membrane cytoplasmique et s'associe à une autre protéine pour former des complexes de grande taille. Son action entraîne la formation de pores conduisant à une altération de la perméabilité des membranes, une inhibition de la synthèse des macromolécules, une désintégration du cytosquelette et une lyse de la cellule. La réponse cytotoxique de l'entérotoxine est rapide de l'ordre de 20 à 30 minutes [90, 76, 103].

Figure 4 : Mécanismes d'action de l'entérotoxine de *C. perfringens* [76]



C. perfringens produit de nombreuses toxines dont l'activité biologique de chacune varie en fonction du gène codant pour ces protéines.

Figure 5 : Schéma récapitulatif des activités biologiques des toxines de *C. perfringens* [69]



7. Toxine létale LT

Elle est produite par *Clostridium sordellii*. Cette protéine s'est révélée érythémateuse et oedémateuse par injection intradermique chez le cobaye ou en intrapéritonéale chez le porc de guinée, létale chez la souris et cytotoxique pour les cellules Véro. Elle provoque une accumulation de liquide non hémorragique dans les anses intestinales ligaturées. Elle est responsable d'œdème et d'hémorragies. Elle est produite pendant la phase de croissance des bactéries.

Les groupes thiols qui sont protégés par des ponts disulfures semblent être essentiels dans l'activité létale [3, 73, 100].

8. La toxine HT

Elle est produite par *Clostridium sordellii*. C'est une toxine de 300 000 daltons de poids moléculaire, cytotoxique pour les cellules. Elle entraîne une accumulation de liquides hémorragiques dans les anses iléales, qui a été démontré expérimentalement chez le lapin. Son activité biologique est semblable à celle de la toxine A de *Clostridium difficile* [3, 65].

Tableau 1 : Synthèse des propriétés biologiques des toxines de *Clostridium perfringens*

[18, 69]

Toxine	Gène	Localisation génétique	Mode d'action	Effet pathogène	Organes cibles
α	<i>cpa</i> ou <i>plc</i>	Chromosome	Phospholipase C, sphingomyelinase, dégénérescence 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 vasculaire, 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
ϵ	<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		
Entéro - toxine	<i>cpe</i>	Chromosome/ plasmide	Formation de pores (résistante à la trypsine)	Cytotoxique, érythémateuse, létale et fuites d'eau et des électrolytes	Intestins

C. La classification

Il existe plusieurs classifications pour les différentes souches de *Clostridium perfringens*. La classification la plus ancienne, établie par Wilson en 1933, est basée sur la répartition des souches selon cinq types (A, B, C, D et E), selon leur caractère de synthèse des quatre toxines létales majeures (α , β , ϵ et ι) qui sont des exotoxines létales pour la souris sans enrichissement [18]. Cette ancienne classification est trop restreinte et ne prend pas en compte les nouvelles toxines découvertes (β_2) [47]. De plus, sur le terrain les entérotoxémies sont associées à un mélange de toxinotypes regroupant pour chacun une association de plusieurs toxines produites par *C. perfringens*. Ainsi, le tableau clinique et lésionnel décrit pour chacun de ces toxinotypes a été obtenu soit dans des conditions naturelles extrêmement rares soit en reproduction expérimentale.

La représentation ci-dessous des différents toxinotypes a pour seul but de montrer la spécificité de l'activité biologique des différentes exotoxines protéiques. Récemment, une classification génotypique a été développée [56].

1. Les toxinotypes

La méthode de typage classique repose sur les tests de létalité de souris. L'injection intraveineuse d'un surnageant brut de milieu de culture avec séroprotection utilisant des anticorps neutralisants permet d'identifier les toxines responsables de mort de la souris. Ces toxinotypes ont été ensuite sous divisés en groupes selon la production des toxines mineures. Chaque toxinotype a été associé à une maladie afin d'éclairer leur pathogénie [56]. Cependant, l'échantillon des souches est réduit à des régions géographiques limitées entraînant des modifications de la classification. Cette modification repose sur la toxine principalement produite par la souche lors de la maladie observée [18].

Tableau 2 : Production des différentes toxines létales majeures par les toxinotypes de *Clostridium perfringens* [18, 74]

Toxinotypes	Toxines			
	Alpha	Beta	Epsilon	Iota
A	++	-	-	-
B	+	++	+	-
C	+	++	-	-
D	+	-	++	-
E	+	-	-	++

++ *Principale toxine produite*

+ *Toxine secondaire produite en général en moindre quantité*

- *Toxine non produite*

*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 [46, 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 intravasculaire 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].

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 nouveaux-nés 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].

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 frustes 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, âgés de 2 à 10 jours, développent une entérite hémorragique et nécrotique [24, 37, 90].

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

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].

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].

f. Entérotoxémie due à *Clostridium perfringens* de type A entérotoxinogène

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].

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 épidémiologique 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.

2. La classification génotypique

Une nouvelle classification a été proposée, se basant sur la capacité génétique d'une souche à produire une toxine. Elle utilise la mise en évidence des gènes codant pour les toxines par la technique PCR (Polymerase Chain Reaction). Les éléments extrachromosomiques sont mobiles et souvent instables, entraînant une grande variabilité des souches. En effet, la toxine α et l'entérotoxine sont codées par des gènes chromosomiques, tandis que les gènes des autres toxines sont portés par des plasmides.

La définition des souches par cette classification est plus indicatrice de leur potentiel de virulence que la précédente. En particulier, elle est plus appropriée pour l'identification des souches porteuses du gène *cpe* codant pour l'entérotoxine étant donnée sa production réduite à partir des milieux de culture usuels. La classification génotypique, en mettant en évidence les gènes des toxines produites par les différentes souches de *Clostridium perfringens*, est plus précise que la classification phénotypique. Cependant, cette classification a des limites : la présence d'un gène ne signifie pas forcément l'expression de la toxine, comme le gène *cpe* silencieux de l'entérotoxine lors de son association avec le gène de la toxine ι [7, 69, 91].

Tableau 3 : Les différents génotypes en rapport avec les toxintypes [69]

Classification toxintypique	Les génotypes
A	plc plc, cpe plc, cpb2 plc, cpe, cpb2
B	plc, cpb1, etx plc, cpb1, etx, cpe
C	plc, cpb1 plc, cpb2 plc, cpb1, cpe plc, cpb2, cpe plc, cpb1, cpb2 plc, cpb1, cpb2, cpe
D	plc, etx plc, etx, cpe
E	plc, iap plc, iap, ibp plc, iap, ibp, cpe

II. CAUSES FAVORISANTES ET PATHOGENIE DES ENTEROTOXEMIES

A. Flore intestinale et entérotoxémie

1. Ecologie intestinale

Le tube digestif des ruminants est colonisé par une microflore endogène formée de nombreux micro-organismes capables de se développer en anaérobiose [81, 82].

La flore digestive des ruminants est constituée essentiellement de bactéries anaérobies strictes, non sporulées, cellulolytiques et amylolytiques. Les clostridies, quant-à elles, sont présentes au sein de l'intestin mais en faible concentration [75, 21, 82].

Un équilibre se forme au sein de l'écosystème intestinal, permettant une stabilité dans des conditions physiologiques et alimentaires inchangées. Cet équilibre est essentiel pour l'implantation de la flore bactérienne intestinale chez le nouveau-né du fait de la stérilité préalable de son tube digestif [15]. Dès les premiers jours de vie, les entérobactéries et les streptocoques prédominent. Puis, les lactobacilles, les bifidobactéries et les clostridies s'implantent dans l'intestin [21, 74]. Dès l'âge de 4 jours, on dénombre entre 10^4 à 10^9 unités formant colonies (UFC) par millilitre de bactéries du contenu duodénal et jéjunal. La colonisation de l'iléon est plus importante (10^6 à 10^9 UFC/mL) [15]. Les bactéries de la flore normale de l'intestin s'opposent au développement des bactéries pathogènes, c'est « l'effet barrière » [21, 74].

L'effet barrière est spécifique dans le sens où certaines souches cibles y sont sensibles [21]. Au sein de l'intestin, le dénombrement de la flore bactérienne se situe entre 10^{10} et 10^{11} UFC/millilitre de contenu intestinal avec une prédominance de bactéries anaérobies strictes. Les micro-organismes s'organisent sous la forme de populations en état d'équilibre, en occupant des sites préférentiels à leur développement au sein du tractus digestif [9, 82]. Les bactéries anaérobies sont présentes en faible quantité dans le haut du tube intestinal alors que leur densité est plus importante dans la partie distale de l'intestin notamment dans l'iléon. Le nombre de clostridies dans un intestin sain est inférieur à 10^3 UFC par millilitre de contenu intestinal [74].

Une compétition s'effectue pour l'utilisation des matières énergétiques, azotées et des nutriments nécessaires pour leur développement. Des bactéries utilisent les produits formés par d'autres bactéries pour leur multiplication. Certaines bactéries élaborent des substances toxiques comme le sulfure d'hydrogène (H^2S), des acides gras volatils, des bactériocines, ce qui limite la prolifération d'autres bactéries [21].

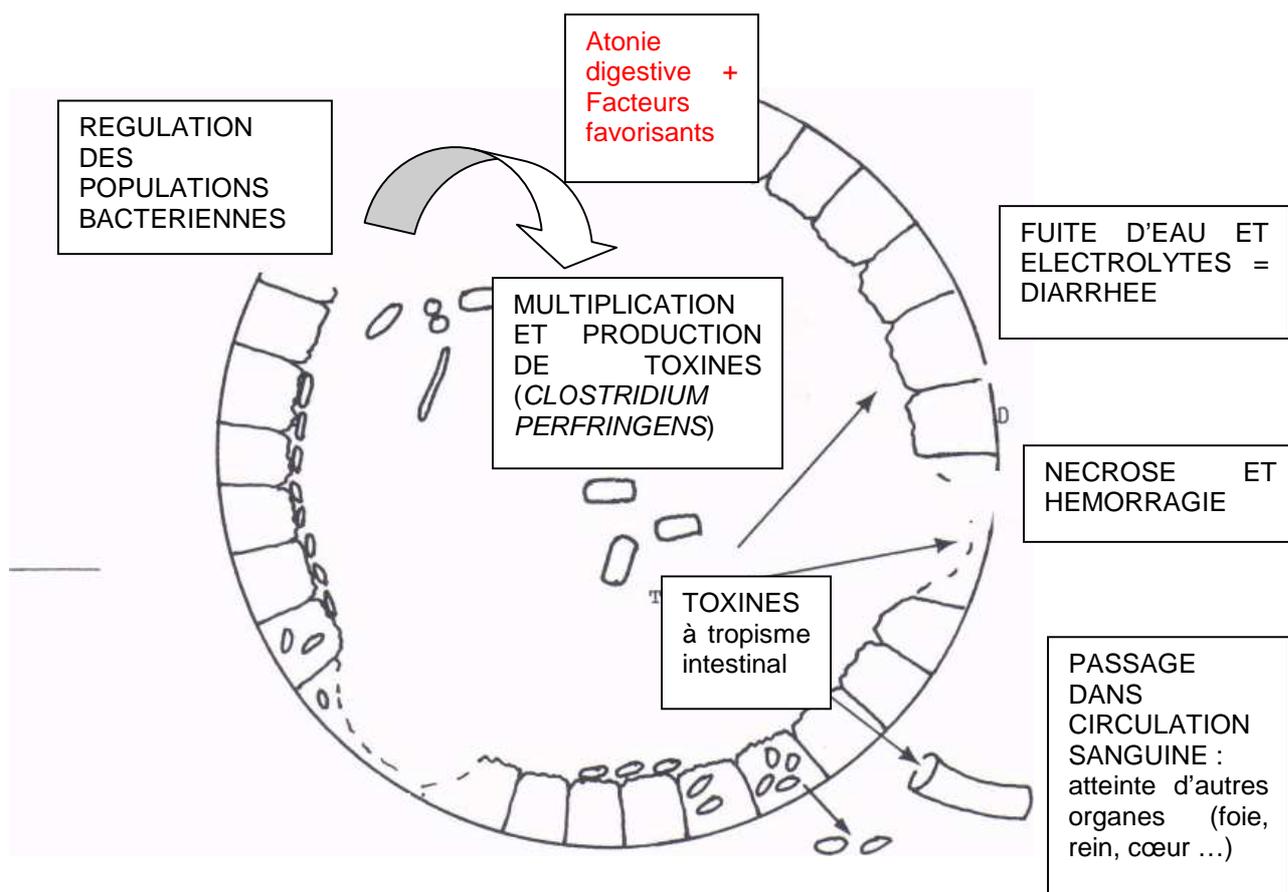
2. Pathogénie des entérotoxémies

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].

Figure 6 : Mécanismes d'action des bactéries dans l'intestin grêle [74]



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].

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.

B. Les causes favorisantes et entérotoxémies

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.

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 à 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 pâturages 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].

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].

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 pâtures. 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.

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].

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].

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 décrivons brièvement ces différents facteurs intrinsèques.

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].

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 prédisposées 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

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 South-down [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.

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.

A. 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 [59]. 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.

B. 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.

1. La forme clinique suraiguë

➤ Mort subite

La forme suraiguë se manifeste par une mort subite [33, 37, 74, 75, 87, 102]. Le ruminant est souvent retrouvé mort ou comateux sans aucun signe clinique précurseur [59]. 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].

➤ 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 4 : 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
METABOLIQUE	Indigestion spumeuse ou gazeuse aiguë	Météorisation (distension creux flanc gauche puis flanc droit) Accumulation de gaz ou mousse dans le rumen Œsophage congestionné en partie cervicale et exsangue en partie thoracique
	Tétanie d'herbage ou hypomagnésémie	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 4 (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 4 (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-INFECTIION	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 toxi-infectieux
	TOXI-INFECTIIONS 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

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 [46, 55, 40, 37] avec des tremblements généralisés. 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 cardio-respiratoire avec une dyspnée, une hypotension, une tachycardie et un pouls faible et rapide [55, 58, 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].

➤ **Les symptômes digestifs**

Le syndrome diarrhéique est typique de l'entérotoxémie et souvent présent en fin d'évolution clinique [5, 18]. Cette diarrhée, le plus souvent hémorragique, peut être fétide, bulleuse et de couleur blanche, jaune ou brune [5, 37, 46, 77, 88].

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].

➤ **Les symptômes nerveux**

Les crises convulsives sont souvent présentes dans l'expression des formes aiguës et dominant 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 [46, 40, 101].

L'animal se tient souvent à l'écart du troupeau, en opisthotonos [24, 40]. Une cécité, un nystagmus intermittent et des oscillations horizontales des yeux peuvent être observés [102, 90, 40].

D'autres ruminants sont prostrés dans un état comateux évoluant vers la mort [80, 74, 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'entérotoxémie. Néanmoins, les manifestations

cliniques conduisant à un diagnostic d'entérotoxémie 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.

C. 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'entérotoxémie. L'existence de dominantes lésionnelles 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'entérotoxémie [45].

1. Aspect général

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, 74, 59, 37]. Les muqueuses sont le plus souvent très congestionnées [74], 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 [57]. 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].

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, 74, 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 [90]. 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].

2. Les organes internes

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, 57]. Parfois ils sont œdémateux, avec un dépôt de fibrine ou un exsudat séreux ou sérofibrineux dans les alvéoles [74, 40, 18, 34, 101]. 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 [57]. 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 intra-alvéolaire associés à une hyperplasie lymphoïde péribronchiolaire et une atelectasie [55, 101, 24, 40].

➤ 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 [74, 25, 18, 57]. Un œdème périvasculaire est présent plus souvent autour des petites et moyennes artères que des veines [101]. Ces lésions proviennent de l'altération de l'endothélium vasculaire par les toxines provoquant une augmentation de sa perméabilité [29, 74].

- **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.

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 ulcératives [58, 61, 18, 59, 37].

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.

➤ 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 séro-hémorragique. Les anses intestinales sont dilatées par la présence de gaz issu des bactéries [46, 59, 57]. 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, 57, 59].
- 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 ulcéralive 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, 57].
- 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

- **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 intraluminaire,
- une nécrose totale de l'épithélium villositaire avec préservation de l'axe conjonctivo-vasculaire,
- 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 [37, 41]. 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].

➤ 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.

➤ Les reins

- Aspect macroscopique

Les reins apparaissent congestionnés ou hémorragiques, de consistance diminué mais ils peuvent dans certains cas ne présenter aucune lésion [59, 34, 41, 74, 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.

- Aspect microscopique

Au niveau microscopique, les lésions des reins se traduisent par une dégénérescence parenchymateuse [24]. Les observations microscopiques montrent des lésions de péri-glomérulite subaiguë focale en anneau, de nécrose des cellules épithéliales des tubes contournés proximaux et distaux [59, 40, 41]. La limite cortex-médulla présente un aspect hémorragique avec une corticale granuleuse, jaune et friable [40, 59].

➤ 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 graisseuse 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 [74, 34, 18, 59].

➤ 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, 91, 40, 24].

➤ 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'entérotaxémie, 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 glycogénolyse 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 entérotaxémies, *a contrario*, une absence de glucose dans l'urine ne permet en aucun cas d'effectuer un diagnostic d'exclusion [102, 30, 40].

➤ 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, 74, 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 [29, 13, 42, 102]. 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].

- *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 intracérébrale. 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, 101, 102].

Le tableau suivant synthétise les lésions les plus caractéristiques lors d'entérotaxémie.

Tableau 5 : Synthèse des lésions caractéristiques observées à l'autopsie sur les ruminants morts d'entérotaxémie [45]

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

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.

D.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.

1.La recherche de toxines

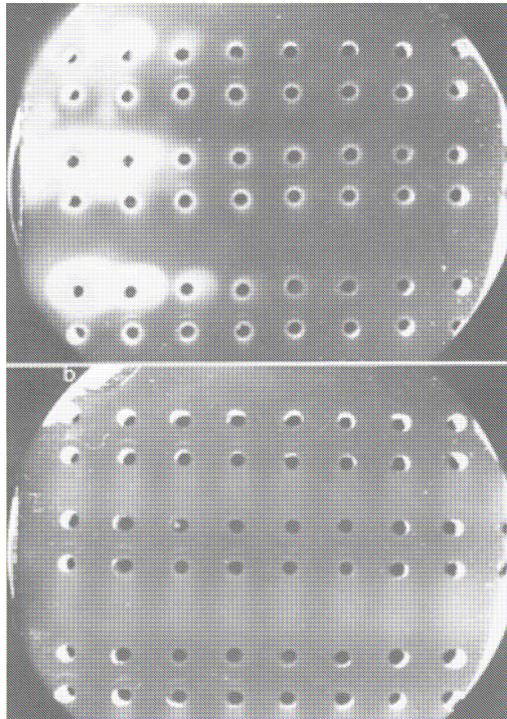
La recherche de toxines est réalisée sur le contenu intestinal, les épanchements séreux, les tissus lésés ou le surnageant de culture [2].

a. Counter-immuno-electrophorèse (CIEP)

➤ Protocole

La technique est basée sur une réaction immunologique de précipitation entre les toxines et les anticorps anti-toxines. Les échantillons sont disposés dans des puits selon une certaine disposition. En effet, les toxines, particules chargées négativement, sont déposées dans les puits du côté de la cathode pour migrer vers l'anode, et les sérums, sans charge, sont déposés du côté anode pour migrer vers la cathode. Après un passage en chambre d'électrophorèse, à une intensité de 12mA pendant 30 minutes, des lignes de précipités apparaissent après révélation avec de l'acide tannique à 2%. Le titrage est possible et s'effectue par la détermination de la dernière dilution entraînant l'apparition d'un précipité [48].

Figure 7 : Résultats de counter-immuno-électrophorèse pour un échantillon contenant des toxines de *C. perfringens* (a) et un échantillon témoin négatif (b) [48]



*a : les précipités sont obtenus avec *C.perfringens* entérotoxine et des sérums spécifiques d'anti-entérotoxine. Les puits sont associés par paire, ceux du haut contiennent une quantité décroissante d'entérotoxine de la gauche vers la droite, ceux du bas contiennent une quantité similaire de sérum. La cathode est en haut et l'anode en bas de la figure.*

b : pas de précipité donc absence de l'entérotoxine dans l'échantillon

➤ Avantages

Cette méthode permet de détecter la présence de l'entérotoxine au-delà de 0.2 µg/mL. Elle est plus sensible que d'autres techniques utilisées pour la détection de l'entérotoxine comme le test intradermique (3,8 µg/mL) ou la diffusion en gélose (3 µg/mL) mais moins sensible que les tests récents comme le test ELISA. Cette méthode est rapide, on obtient le résultat au bout de 30 minutes. La facilité de lecture des résultats, présence ou non de précipités, permet d'effectuer le titrage de la toxine. Elle possède une excellente spécificité et sensibilité pour la recherche de l'entérotoxine [48].

➤ Inconvénients

Cette méthode n'a été expérimentée que sur la recherche de l'entérotoxine, réduisant ainsi son champ d'utilisation.

b. Test intradermique

➤ Protocole

Cette méthode biologique repose sur l'activité nécrosante des toxines sur la peau des porcs de Guinée ou des cobayes.

C'est l'activité érythémateuse qui est exploitée. La toxine est injectée à raison de 0,05 mL par voie intradermique. La lecture est faite 18 heures après par la mesure du diamètre de la réaction : Unité Erythémateuse (U.E.) correspond à une réaction de 8 mm. La correspondance de l'unité érythémateuse par rapport à la quantité de toxine est de 3,41 UE pour 1 µg de toxine. On peut modifier l'expérience en additionnant de la trypsine qui possède une activité activatrice (toxine ε et ι) ou inhibitrice (toxine β et α) selon la toxine [5, 94, 103].

➤ Avantages

La réalisation de cette méthode par injection intradermique est facile. L'altération cutanée est facilement détectable visuellement et le résultat est obtenu très rapidement par une simple mesure.

➤ Inconvénients

Cette méthode est peu sensible et peu spécifique. La détection peut s'effectuer à partir d'un seuil de 0,19 µg de toxine soit 3,8 µg/mL. De plus, on ne peut pas détecter l'entérotoxine car celle-ci ne possède pas d'activité nécrosante.

Elle s'utilise sur des animaux vivants ce qui constitue un inconvénient éthique.

Les toxines possédant des facteurs létaux peuvent entraîner la mort de l'animal avant l'apparition des symptômes cutanés caractéristiques [5, 94, 103].

c. La séroneutralisation sur souris

Cette technique biologique repose sur l'effet léthal des toxines bactériennes. C'est la méthode de référence utilisée pour le toxinotypage.

➤ Protocole

Elle correspond à la neutralisation spécifique de l'activité létale des toxines à l'aide d'antisérums sur des souris vivantes. Cette méthode consiste en l'injection d'aliquotes de filtrats de culture de *C. perfringens*, issus des prélèvements, soit directement, soit préalablement neutralisé par l'antisérum spécifique.

Dans un premier temps, on inocule 0,2 mL du filtrat par voie intraveineuse sur les souris. La mort de la souris, dans un délai de 30 minutes à trois heures, signale la présence d'une toxine létale. Son identification est obtenue en neutralisant les filtrats avec les sérums anti-types et en inoculant un volume de 0,3 mL de celui-ci par voie intraveineuse. Si la souris reste vivante après la neutralisation par les antisérums alors nous pouvons identifier les toxines présentes dans le prélèvement. Des essais ont été effectués par injection intra-péritonéale mais celle-ci nécessite plusieurs injections afin d'obtenir une quantité suffisante de toxine pour le

même résultat [5, 42].

➤ Avantages

La séroneutralisation permet d'identifier l'ensemble des toxines présentes dans le prélèvement. Cette technique était très utilisée pour déterminer la présence et l'importance des différents toxinotypes de *C. perfringens* dans cette maladie.

➤ Inconvénients

Cette méthode manque de sensibilité et spécificité. La sensibilité est faible ; la dose létale minimale est de 3 µg de toxine β2 ce qui est moindre par rapport à d'autres techniques utilisées. La faible sensibilité s'explique par l'existence de résistance à l'effet létal des toxines pour certaines souris, augmentant le nombre de faux négatifs [31,66].

Cette technique reste discutable sur le plan éthique car elle utilise de nombreuses souris vivantes.

Les antisérums spécifiques utilisés sont difficiles à se procurer et extrêmement chers. L'absence d'antisérums entérotoxine ne permet pas de mettre en évidence l'action de l'entérotoxine (CPE) par cet outil diagnostic [44, 5].

d.Méthode du test d'agglutination reverse passive

➤ Protocole

Des billes de latex sont sensibilisées par l'utilisation d'un sérum purifié à partir de lapins ou moutons immunisés contre les exotoxines de *C. perfringens*. Elles sont enduites d'anticorps spécifiques de la toxine à rechercher. Ensuite les particules de latex sont déposées en présence du prélèvement sur des plaques de microtitration. Le témoin négatif est représenté par des particules sensibilisées avec des animaux non immunisés.

Pour obtenir une quantification des toxines, on utilise différentes dilutions des filtrats de cultures. Ils sont déposés dans des puits avec les particules de latex. La lecture consiste à détecter une agglutination pour les différentes dilutions réalisées. Le test est considéré comme positif lorsque une agglutination s'effectue dans le fond du puit et négatif si celle-ci n'est présente [44].

➤ Avantages

Ce test est très sensible avec une détection de l'entérotoxine pour un seuil de 2 ng/mL de cultures bactériennes et une bonne spécificité [44]. Le résultat est obtenu au bout de 24 heures. Des études montrent que la sensibilité est de 96.5 % et la spécificité de 95.2 % pour la détection de la toxine ε. Son utilisation nécessite peu de réactifs et du matériel peu coûteux [64].

L'un des avantages est l'obtention du résultat par une simple lecture visuelle ne nécessitant pas l'utilisation d'appareil (comme le spectrophotomètre pour la méthode ELISA). Le test d'agglutination au latex permet d'avoir une indication simple de la présence de la toxine [64].

➤ Inconvénients

La sensibilité et la spécificité restent plus faibles que le test ELISA. Il existe des réactions croisées avec les antigènes de toxines provenant d'autres espèces de clostridies, diminuant la spécificité de cette méthode [64].

e. Méthode utilisant un essai de cellules Vero

Il s'agit d'une méthode semi-quantitative consistant à l'interprétation de la mortalité des cellules Vero (cellules de reins de singes) induites par les toxines [6].

➤ Protocole

On utilise une microplaque avec des puits dans lesquels on dépose les dilutions du prélèvement et on ajoute les cellules Vero. La microplaque est incubée à 37°C pendant la nuit. Les résultats sont attribués visuellement sous forme de score (4, 3, 2, 1 ou 0) correspondant respectivement au degré de cytotoxicité (mort des cellules Vero) respectif (100%, 75%, 50%, 25% et 0%). On considère que le seuil minimal de cytotoxicité correspond à un score de 2 ou 3.

➤ Avantages

Ce test est peu coûteux et on obtient le résultat après 24 heures. Cette méthode a une sensibilité variable en fonction des toxines. La sensibilité de détection de l'entérotoxine peut être établie au-delà d'un seuil de 40 ng/mL de l'échantillon. Pour la toxine β_2 , la concentration minimale à partir de laquelle on observe les effets cytotoxiques sur les cellules Vero se situe à 0,2 $\mu\text{g/mL}$ [31].

➤ Inconvénients

Cette technique de laboratoire n'est pas reproductible. Si le test est répété avec le même échantillon, le titre de cytotoxicité peut changer, cet échantillon positif la première fois peut devenir négatif la seconde fois. En effet, l'un des problèmes majeurs réside dans l'interprétation des résultats. La lecture est subjective entraînant des variations de résultats en fonction des opérateurs. La possibilité d'obtenir des faux négatifs ou des faux positifs diminue réciproquement la sensibilité et la spécificité.

f.ELISA

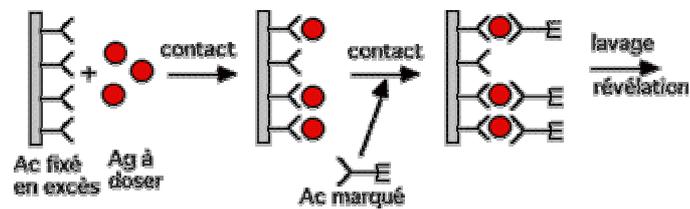
Le test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) est une technique immuno-enzymatique permettant de rechercher les anticorps ou les antigènes (toxines) dans un substrat choisi.

➤ Protocole

Les solutions, issues des prélèvements, sont réparties sur des microplaques composées de puits. Les éléments du test se fixent les uns après les autres sur ce support après plusieurs étapes d'incubation. On prépare une gamme de dilutions du prélèvement contenant ou non la toxine recherchée à l'aide d'une solution tampon PBS (phosphate buffer saline : solution saline à pH physiologique). Des lavages avec du PBS-Tween (le Tween20® est un détergent qui va améliorer l'efficacité de ceux-ci) sont réalisés entre chaque étape pour éliminer les éléments non fixés. La technique ELISA est directe par la recherche de la toxine, on parle de « système en sandwich ou double sandwich ».

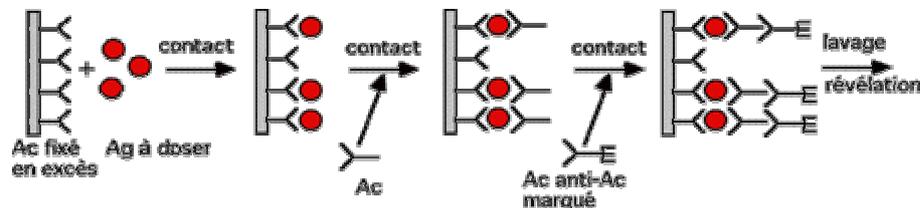
Dans cette technique, on adsorbe une grande quantité d'anticorps monoclonaux dans chaque puit de façon à permettre la fixation de ceux-ci au fond des puits de microtitration. Cet anticorps est appelé anticorps de capture. Après incubation, on rince pour éliminer ceux en excès. On ajoute l'échantillon contenant l'antigène qui se complexera et se fixera sur l'anticorps de capture. Après incubation, les puits sont vidés par retournement et rincés par ajout d'une solution de PBS-tween (phosphate buffered saline) d'une quantité de 200 µL par puit. On ajoute des anticorps (polyclonaux) reconnaissant un ou des épitopes de la toxine. Ce second est nommé anticorps de détection. On effectue de nouveau une incubation et plusieurs rinçages comme décrits précédemment. Cet anticorps pourra être quantifié lui-même avec un traceur ou par un anticorps anti-Ig de détection conjugué à une enzyme (péroxydase). On incube avec une solution révélatrice de TMB (tétra méthyl benzidine), contenant le substrat de l'enzyme. La réaction est stoppée en ajoutant du NH_2SO_4 (50 µL par puit) et la plaque est mesurée au spectrophotomètre. Si la réaction est positive (présence de la toxine recherchée), le substrat est dégradé et une coloration apparaît. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'enzyme présent donc à la concentration de toxines recherchées. Les anticorps anti-Ig sont disponibles dans le commerce, cela facilite le travail de l'expérimentateur car le marquage est une opération délicate à réaliser en laboratoire. On parle de technique sandwich car l'antigène est compris entre l'anticorps de capture et de détection [28, 37, 38, 36, 49].

Figure 8 : Schéma de la méthode ELISA simple et double « sandwich » dans la recherche des toxines de *C. perfringens* (Unité Pédagogique de Microbiologie)



ELISA « sandwich »

Ag = toxine de C.perfringens



ELISA double « sandwich »

Ag = toxine de C.perfringens

➤ Avantages

Cette technique est très utilisée car elle présente une excellente sensibilité et spécificité pour l'ensemble des toxines. Le résultat est obtenu rapidement (8 heures). Le seuil de détection des toxines β et ι est de 1ng/mL pour une culture pure ou des préparations purifiées et de 0.1 ng/mL pour la toxine ϵ [49]. La toxine α peut être décelée pour des valeurs seuils de 0,005 μ g par mL d'aliment cuit, de 1 à 8 ng par mL de culture pure et de 25 ng/mL de contenu intestinal d'animal infecté [51, 52, 90]. Pour la toxine ϵ , les seuils de détection sont de 2 ng/mL de prélèvement purifié, de 0.1 ng/mL de culture pure et de 4-8 ng/mL de contenu intestinal d'animal infecté [90, 50, 99]. Cette méthode permet de détecter l'entérotoxine avec une sensibilité de 2-4 ng/mL de prélèvement de fèces [6].

Des études montrent que la sensibilité et la spécificité sont respectivement de 90,5% et 89,2% pour la toxine β et de 97,4% et 94,6% pour la toxine ϵ [23]. Pour l'ensemble des toxines de *C. perfringens*, elles se situent entre 90 et 100% en comparaison aux autres tests comme la neutralisation de la souris dont les valeurs sont plus faibles [90].

➤ Inconvénients

La sensibilité et la spécificité sont assez variables en fonction de l'anticorps utilisé. Des faux positifs peuvent être présents en raison de possibles réactions croisées avec les antigènes de toxines produits par d'autres espèces de clostridies. La spécificité du test s'en trouve alors diminuée.

Les inconvénients majeurs de cette méthode sont sa complexité et le coût du matériel aussi bien dans la préparation que dans la lecture des résultats (utilisation d'un spectrophotomètre) [64].

La méthode de recherche des toxines est très utilisée pour identifier les toxines présentes dans un prélèvement intestinal (test ELISA, test d'agglutination reverse passive). La sensibilité et la spécificité de ces méthodes sont variables. Pour la méthode ELISA, elles sont excellentes. Cependant, la précision du diagnostic par détection des toxines n'est pas toujours suffisante. Certaines toxines sont labiles et dégradées rapidement après la mort du ruminant, tandis que d'autres sont produites et activées dans les mêmes circonstances. En effet, la toxine ϵ peut être produite post-mortem dans l'intestin des animaux expliquant sa découverte chez des animaux sains [90, 101]. En ce qui concerne la toxine β , elle est très sensible à l'action de la trypsine et peut être détruite en quelques heures après sa synthèse dans l'organisme [50]. Lors d'entérotaxémie, plusieurs toxines clostridiennes sont synthétisées et responsables de la mort subite de l'animal ; ceci nécessite la recherche de la totalité des toxines au sein d'un échantillon augmentant le coût global de l'analyse. Le diagnostic peut être erroné si l'on ne met pas en relation les résultats avec d'autres données épidémiologiques et nécropsiques

Tableau 6 : Synthèse des avantages et inconvénients des méthodes de recherche des toxines de *C. perfringens*

METHODES DE LABORAOIRE	AVANTAGES	INCONVENIENTS	SEUIL DE DETECTION DES TOXINES
<i>Test intradermique</i>	Facile de réalisation Lecture facile (mesure réaction cutanée)	Sensibilité et spécificité faible Utilisation de souris Pas de détection de l'entérotoxine	3,8 µg/ml pour chaque toxine
<i>Séroneutralisation des souris</i>	Lecture du résultat facile (mort) Utilisation pour les toxinotypages	Sensibilité et spécificité faible Utilisation de nombreuses ne souris Pas de détection de l'entérotoxine	3 µg/ml pour β2
<i>Counter-immuno électrophorèse</i>	Rapide Lecture facile des résultats (précipité) Bonne sensibilité et spécificité pour l'entérotoxine	Limitée à l'entérotoxine	0,2 µg/ml d'entérotoxine
<i>Méthode sur cellule Vero</i>	Rapide, peu coûteuse	Lecture trop subjective Sensibilité et spécificité variable	40 ng/ml d'entérotoxine 0,2 µg/ml de toxine β2
<i>Test d'agglutination reverse passive</i>	Bonne sensibilité et spécificité Lecture du résultat facile mais subjective	Réaction croisée diminuant la spécificité	2 ng/ml d'entérotoxine
<i>ELISA</i>	Excellente sensibilité et spécificité pour toutes les toxines, rapide Pas de subjectivité du résultat	Chère, réalisation complexe	2-4 ng/ml de toxine β et ι 4-8 ng/ml de toxine ε 25 ng/ml de toxine α 4 ng/ml d'entérotoxine

2. Recherche de gènes codants : méthode PCR (Polymerase Chain Reaction)

➤ Protocole

La méthode PCR (Polymerase Chain Reaction) est une amplification sélective d'une séquence d'ADN double brin à partir d'un couple d'amorces oligonucléotidiques s'hybridant de part et d'autre de cette séquence. Le but est de réaliser une succession de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN. Cette méthode implique l'utilisation de séquences connues des gènes des toxines [44]. Les recherches sur les amorces spécifiques d'ADN pour les différents gènes codant pour les toxines se sont développées durant ces dernières années. La méthode PCR permet la détection de toxines dans les prélèvements de fèces ou de culture [42].

On prépare un milieu réactionnel contenant des enzymes (Taq polymérase), du $MgCl_2$, du Tris-HCl, du KCl, des amorces oligonucléotidiques, des dNTPs et de l'ADN cible [32, 44]. Un cycle de PCR se déroule en 3 étapes : dénaturation (30 s à 94°C), hybridation des amorces (30 s à température variable) et élongation de l'ADN cible à 72°C.

Figure 9 : Schéma de la méthode PCR (Unité pédagogique de Génétique Moléculaire)

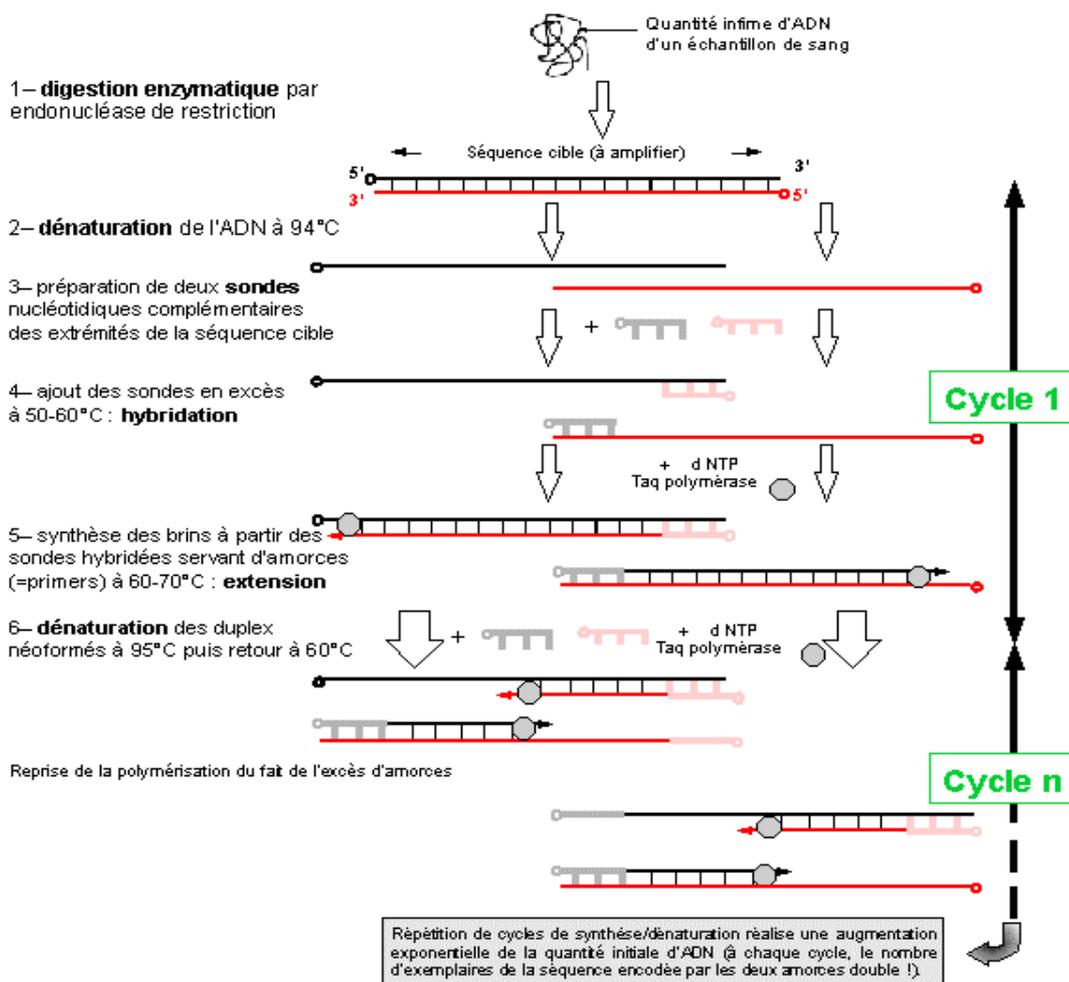


Figure 10 : Exemples de quelques amorces de toxines de *C. perfringens* utilisées pour la technique PCR [44]

Primer ε1

CTACTACTCA TACTGTGGGA ACTTCG

Total number of bases is : 26.
DNA sequence composition : 6A, 7C, 5G, 8T,

Sequence name : EPSILON 443

Primer β1

AACTTAACTG GATTATGTC TTCA

Total number of bases is : 24.
DNA sequence composition : 7A, 4C, 3G, 10T,

Sequence name: beta 1

Primer ε2

GGAGTCTTTC TATTAAGGCA CCAGGA

Total number of bases is : 26.
DNA sequence composition : 7A, 5C, 7G, 7T,

Sequence name : EPSILON 953

Primer β2

ATAGTAGAAA AATCAGGTTG GACA

Total number of bases is : 24.
DNA sequence composition : 11A, 2C, 6G, 5T,

Sequence name: beta 2

Primer α1

AAGTTACCTT TGCTGCATAA TCCC

Total number of bases is : 24.
DNA sequence composition : 6A, 7C, 3G, 8T,

Sequence name : PL3

Primer ent1

CAAGCATCTG TAGAATATGG ATTGG

Total number of bases is : 26.
DNA sequence composition : 8A, 3C, 7G, 8T,

Sequence name : ENTERO 418

Primer α2

ATAGATACTC CATATCATCC TGCT

Total number of bases is : 24.
DNA sequence composition : 7A, 7C, 2G, 8T,

Sequence name : PL7

Primer ent2

GTCCAAGGGT ATGAGTTAGA AGAACG

Total number of bases is : 26.
DNA sequence composition : 9A, 3C, 9G, 5T,

Sequence name : ENTERO 808

La température lors de l'étape d'hybridation est variable selon les gènes : 46°C pour les gènes *cpa*, *etx* et *iap*, 39°C pour le gène *cpb*, 48°C pour le gène *cpb2*, 52°C pour le gène *cpe* [45]. Les amorces utilisées sont sélectionnées sur la base du codage des gènes des toxines α , β , ϵ et ι . Ces amorces de synthèse sont constituées d'une séquence généralement de 18 à 30 nucléotides.

En vue d'un résultat, on pratique une électrophorèse à 8 V.cm⁻¹ en comparant un marqueur de poids moléculaire à chaque milieu réactionnel, obtenu par PCR, placés sur un gel d'agarose à 2 %. On peut par cette méthode effectuer une amplification d'un simple fragment du gène de la toxine ou une amplification simultanée de plusieurs fragments de différents gènes de toxines (2 ou 3, duplex ou triplex). La seule différence se situe dans la quantité d'amorces utilisée, 3 μ L de chaque amorce pour un duplex et 2 μ L pour un triplex. Le protocole reste néanmoins le même pour chaque expérience [44].

➤ Avantages

In vitro, la sensibilité et la spécificité s'avèrent excellentes et supérieures à celles des méthodes classiques [44].

La PCR est praticable directement sur les premières cultures de colonies de bactéries. Elle permet de détecter la présence de gènes instables en milieu de culture, comme les gènes *cpb 1* et *cpb 2*. Ces gènes seraient perdus lors de techniques biologiques.

La PCR permet d'analyser très rapidement, au sein d'un échantillon, un grand nombre de souches de bactéries. On aboutit à un diagnostic de certitude concernant la présence des différents types de clostridies. Cette méthode est très fiable et rapide, on peut obtenir un résultat en quelques heures (environ 4 heures) [44, 32, 66].

Elle est très utilisée pour déterminer la capacité d'un prélèvement à produire l'entérotoxine (CPE). Elle permet d'avoir un résultat rapide pour l'entérotoxine sans avoir besoin de faire sporuler les souches *in vitro*, qui reste difficile à effectuer, permettant de réduire et d'éliminer le nombre de faux négatifs [66, 90].

La PCR est utilisée pour améliorer la prophylaxie médicale. Les protocoles vaccinaux utilisent des vaccins dont les valences sont souvent proches, voire identiques (voir IV Prophylaxie). La connaissance des différents toxinotypes peut permettre d'utiliser les vaccins adapter aux cas présents sur le terrain. Par exemple, des études montrent la découverte fréquente du gène *cpb2* codant pour la toxine β 2 dans les cas d'entérotoxémies chez les ovins et caprins. Cette découverte peut inciter les chercheurs à développer un vaccin incluant l'antitoxine β 2 dans la prévention de la maladie [34].

➤ Inconvénients

L'inconvénient majeur de cette méthode reste son coût très élevé. La sensibilité est diminuée lorsque l'on utilise des prélèvements de fèces ou de contenu intestinal plutôt que des cultures pures [44, 66].

Par cette méthode, la détection du gène codant des toxines permet d'affirmer avec certitude la présence de l'agent pathogène dans l'échantillon. Cependant, un gène codant peut être « silencieux » comme le gène de l'entérotoxine associé au gène ι , c'est-à-dire ne s'exprimant pas au sein de l'organisme. Sa présence au sein d'un prélèvement ne signifie pas

forcément l'expression de la toxine.

La méthode de recherche des gènes codants par PCR est la plus récente. Elle a été développée parallèlement aux avancées de la recherche génotypique. Cette technique s'avère très utile dans les investigations épidémiologiques de l'entérotoxémie. Elles contribuent à la mise en place de protocoles vaccinaux adaptés au terrain. Cependant, la présence du gène codant pour une toxine ne permet pas de conclure à un diagnostic de certitude d'entérotoxémie. Le gène codant pour la toxine peut être silencieux c'est-à-dire sans fabrication de la toxine [7]. De plus, la méthode PCR étant trop onéreuse, elle reste peu utilisable en méthode courante de diagnostic d'entérotoxémie des ruminants

Tableau 7 : Bilan de la méthode PCR dans le diagnostic de laboratoire de l'entérotoxémie

<i>METHODE DE LABORAOIRE</i>	<i>AVANTAGES</i>	<i>INCONVENIENTS</i>
PCR (polymerase chain reaction)	Rapide, bonne sensibilité et spécificité pour toutes les toxines, apport en prophylaxie médicale	Chère, diminution de la sensibilité pour prélèvement de contenu intestinal, gène «silencieux »

3.La recherche de bactéries

a.La chromatographie

La chromatographie en phase gazeuse permet de détecter les acides gras volatils élaborés par les clostridies. Ces acides gras sont issus de l'activité lipidolytique de celles-ci. *Clostridium perfringens* produit de l'acide-acétique et de l'acide butyrique.

La chromatographie en deux phases gaz-liquide est plus précise. Elle se base sur l'identification des lipases actives sur un substrat lipidique connu (glycérol butyrate). Les deux enzymes spécifiques de *Clostridium perfringens* sont une phospholipase et une estérase non diffusible [5].

Cette méthode permet de déterminer uniquement l'espèce présente dans le prélèvement. La quantité de substances isolées n'est pas proportionnelle à la quantité de clostridies présentes dans le prélèvement.

b.Immunofluorecence directe

L'immunofluorescence directe permet d'identifier *Clostridium perfringens* au sein de la flore anaérobie d'un prélèvement. Elle permet d'identifier jusqu'à 220 germes/mL mais il faut disposer des sérums spécifiques. Ces sérums sont élaborés à partir de lapins. Les anticorps purifiés sont marqués par l'iso-thiocyanate de fluorescéine permettant la lecture au

microscope par visualisation d'une fluorescence orange importante pour les prélèvements contenant *Clostridium perfringens*.

Cette méthode est facile, rapide (30 minutes). La lecture du résultat par fluorescence est subjective diminuant la sensibilité et la spécificité de cette méthode. Son rôle se limite à la l'identification de *Clostridium perfringens*.

c. L'examen bactériologique

➤ Les prélèvements

D'après POPOFF, les prélèvements doivent être effectués sur un cadavre récent c'est-à-dire quelques heures après la mort pour éviter la prolifération des clostridies post-mortem [74]. Dans notre étude expérimentale, les prélèvements ont été réalisés dans les 24 heures post-mortem ce qui pourrait diminuer la spécificité de notre test en augmentant le nombre de faux-positifs. Les prélèvements conseillés sont une portion d'intestin avec son contenu, ou le liquide des épanchements séro-hémorragiques dans les grandes cavités, ou alors un organe tels que le foie, les reins. Néanmoins, le prélèvement de choix reste la portion d'intestin grêle avec son contenu [14, 41, 102].

Le conditionnement du prélèvement peut s'effectuer dans du chloroforme à 0.5 %, permettant à l'échantillon de conserver toute sa toxicité entre 48 heures et 4 jours. Néanmoins cette technique comporte certains inconvénients : le dosage du chloroforme doit être précis car l'utilisation de fortes concentrations induit une forte toxicité chez la souris, entraînant une inefficacité de la technique de séroneutralisation [102].

POPOFF conseille de collecter les prélèvements dans un milieu de transport pour culture anaérobie ou dans un tube rempli entièrement en limitant au maximum les bulles d'air [75]. Pour notre étude, le prélèvement est effectué sur des anses ligaturées d'intestin grêle aux deux extrémités avec son contenu. D'après PHILIPPEAU et al le dénombrement de *C. perfringens* est significatif seulement si les échantillons sont conservés à +4°C pendant une durée maximale de 24 heures [70, 71]. L'une des analyses de notre étude expérimentale sera basée sur des prélèvements conservés pendant 4 jours à +4°C afin de contrôler ce délai de conservation.

L'examen bactériologique consiste en l'isolement, l'identification des bactéries dominantes et le dénombrement de celles-ci pour pouvoir interpréter les résultats [18, 75].

➤ L'isolement et l'identification des bactéries intestinales

L'examen direct des bactéries s'effectue par une coloration de Gram sur contenu intestinal. L'isolement de *Clostridium perfringens* doit être effectué avec rapidité et précaution en raison de la multiplication rapide des bactéries chez un animal mort [90].

L'isolement et l'identification peuvent s'effectuer à l'aide de différents milieux de culture. Les milieux de cultures utilisés pour identifier *C. perfringens* doivent avoir des critères de différenciation.

EL SANOUSI et ABDEL SALAM ont décrit des protocoles mis au point pour l'isolement

et l'identification des différentes souches de *C. perfringens*. Ce test est fondé sur la présence ou l'absence, d'une enzyme, la lécithinase, sur l'hémolyse synergique avec la toxine de *Streptococcus* du groupe B et l'inhibition de ces souches en présence des antisérums appropriés et leur réaction en milieu « lactose, gélatine, nitrate et mobilité » accompagné de la fermentation de certains sucres. Ce protocole permet d'avoir un isolement et une identification de *C. perfringens* très fiable. Néanmoins, le protocole doit être appliqué de façon rigoureuse afin d'isoler ce germe au sein d'un prélèvement. Il semble fastidieux pour un laboratoire d'effectuer la totalité des tests nécessaires pour aboutir à l'identification de *C. perfringens* par ce protocole [1].

L'isolement est délicat lorsque le prélèvement est polymicrobien (contenu intestinal). Il ne pourra s'effectuer qu'en employant des milieux sélectifs et des méthodes d'ensemencement en surface ou en masse. Il est conseillé de centrifuger le milieu pour permettre la séparation des bactéries et des différentes particules présentes dans l'enceinte [103].

La culture sur gélose au sang est très utilisée. Elle peut se faire sur gélose au sang ou gélose Columbia à 5% de sang de mouton additionnée de cyclosérine en chambre anaérobie sous une atmosphère contrôlée (90 % d'azote, 5% de dihydrogène et 5% de dioxyde de carbone) en 24-48 heures. On observe autour des colonies de *C. perfringens* un halo clair de lyse complète et de diamètre assez faible [2, 86, 100].

Le milieu de Willis composé de lactose, de jaune d'œuf, de lait écrémé, de rouge neutre et de néomycine permet de déceler par virage du rouge neutre la présence de *Clostridium perfringens*. En effet, elle est la seule bactérie anaérobie possédant une lécithinase et une lactase.

Dans notre partie expérimentale, nous avons utilisé le milieu Tryptone Sulfite Néomycine pour l'isolement des clostridies. Ce milieu de culture sera détaillé plus précisément dans la deuxième partie.

L'isolement et l'identification, des clostridies dans les prélèvements, ne sont pas suffisants pour établir de façon formelle un diagnostic d'entérotoxémie, il est nécessaire d'effectuer un dénombrement des clostridies.

➤ Le dénombrement des fractions bactériennes sur contenu intestinal

Pour POPOFF, la mesure d'une concentration en clostridies supérieur à 10^6 unités formant colonies par millilitre (UFC/mL) de contenu intestinal permet de poser un diagnostic d'entérotoxémie [74]. Pour PHILIPPEAU et all, il faut que le prélèvement soit prélevé dans un délai inférieur à 15 heures post-mortem pour qu'une concentration supérieure à 10^7 UFC/mL soit significative d'une entérotoxémie. En effet, selon ces auteurs, chez un animal sain, la population de clostridies atteint un seuil de 10^6 UFC par millilitre, après 15 heures post-mortem, dans des conditions de conservation à température ambiante [70].

Lors de suspicion d'entérotoxémie, il est possible d'effectuer, parallèlement à la recherche de clostridies, un dénombrement des coliformes, des entérocoques et de la flore totale aéro-anaérobie (protocole utilisé dans notre partie expérimentale). Il est important de mettre en relation les valeurs de *C. perfringens* à celles de quelques populations bactériennes intestinales pour effectuer un contrôle de qualité du prélèvement [95].

La réalisation de cette méthode est facile et peu coûteuse. La sensibilité et la spécificité de cette méthode sont très discutées. En effet, le délai entre la mort de l'animal et le dénombrement de *Clostridium perfringens* du prélèvement mais aussi la durée de conditionnement du prélèvement influenceraient les résultats obtenus. Selon certains auteurs, ces critères induisent de faux positifs et négatifs diminuant la spécificité et la sensibilité du test. Nous avons essayé dans notre étude expérimentale de répondre en partie à ces interrogations.

IV. PROPHYLAXIES

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.

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.

2. Prophylaxie médicale

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

a. 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].

b. 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].

c. La vaccination

La vaccination est utilisée lors de cas déclarés d'entérotoxémie. Elle consiste à stimuler la protection immunitaire. La réponse immunitaire post vaccinale est variable selon les espèces. La protection est moindre chez l'espèce caprine par rapport à l'espèce ovine pour un même vaccin [35]. En effet, THOMSON et BATTY, en 1958, estiment qu'un taux supérieur à 0,1 unité d'antitoxine est suffisant pour avoir une bonne protection vaccinale cependant pour les caprins, il faut 2 à 3 injections pour atteindre ce taux de protection. Elle est à l'origine de la production d'anticorps de type IgG et IgM [74, 89].

Les vaccins sont constitués de plusieurs anatoxines c'est-à-dire des toxines inactivées par la chaleur ou l'adjonction de produits chimiques tout en gardant leur pouvoir immunogène. De nos jours, la plupart des vaccins sont polyvalents de 2 à 8 valences. Ils présentent l'avantage de protéger l'animal contre les différentes clostridies toxigènes. Les vaccins utilisés sont aussi protecteurs contre les toxines de *C. septicum*, *C. oedematiens*, *C. novyi*, *C. tetani*, *C. chauvoei* [75, 46, 95].

Le protocole vaccinal est identique d'un type de vaccin à l'autre ; une primovaccination est réalisée par deux injections à 3-4 semaines d'intervalles, puis un rappel annuel est nécessaire.

Les femelles gestantes sont vaccinées 2 à 6 semaines avant la mise bas. Cette protection est efficace pour le nouveau-né lors de la prise du colostrum.

Les jeunes issus de mères vaccinées ont une première injection à la huitième semaine, à la différence de ceux issus de mères non vaccinées dont la vaccination a lieu à la deuxième semaine [18, 75].

On considère qu'une bonne protection immunitaire est établie chez les caprins si le protocole vaccinal prévoit un rappel tous les 4 mois [102, 74, 89].

La vaccination met en place une immunité à seuil. Cela signifie que la maladie pourra se développer si les toxines produites sont supérieures en quantité aux anticorps produits. La vaccination peut s'avérer insuffisante lors d'entérotoxémie. En effet, les vaccins commercialisés ne prennent pas en compte les toxines β_2 et l'entérotoxine (CPE), ce qui pose problème pour la toxine β_2 , qui est impliquée dans de nombreux cas d'entérotoxémies bovines [62, 18, 95].

Tableau 8 : Récapitulatif des principaux vaccins commercialisés pour la prophylaxie sanitaire des entérotaxies (Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires 2005)

Vaccins ND	Propriétés	Composition	Indications	Protocole vaccinal
SERANAMIX® (CEVA santé animale)	Inactivé, formolé et adjuvé, composé de souches sélectionnées pour leur haut pouvoir immunogène et d'antitoxines purifiées et concentrées	Antitoxines : β de <i>Clostridium perfringens</i> type C, ϵ de <i>C. perfringens</i> type D, de <i>C. novyi</i> B, de <i>C. septicum</i> , de <i>C. tetani</i> Anaculture d' <i>Escherichia coli</i> B41 K99	Ovins, caprins et lapins, prévention des toxico-infections dues aux anaérobies les plus fréquents en particulier, prévention de l'entérotaxémie de l'agneau de 100 jours, prévention du tétanos, colibacillose néonatale du jeune en relation avec l'antigène d'adhérence K99.	Primovaccination : en milieu sain : 2 injections à 21 jours d'intervalle, en milieu contaminé : 2 injections à 48 heures d'intervalle. Rappel : annuel en milieu sain, tous les 6 mois en milieu contaminé. Animaux en gestation : la 2 ^e injection doit être faite 1 mois avant la mise bas
COGLAMUNE® (CEVA santé animale)	Inactivé adjuvé utilisé pour l'immunisation contre les toxico-infections à <i>Clostridium perfringens</i>	Antitoxine α , β et ϵ de <i>Clostridium perfringens</i>	Bovins, ovins, caprins, porcins et lapins : prévention des clostridioses à <i>Clostridium perfringens</i> de type A, B, C et D	
COGLAVAX® (CEVA santé animale)	Lutte contre les toxico-infections à clostridies	Antitoxines de <i>Clostridium perfringens</i> α , β et ϵ , de <i>C. septicum</i> , de <i>C. oedematiens</i> (ou <i>novyi</i>), de <i>C. tetani</i> et d'anaculture de <i>C. chauvoei</i>	Bovins, ovins, caprins et lapins : prévention des entérotaxies, de l'œdème malin de la caillette, de l'hépatite infectieuse nécrosante, du tétanos et des gangrènes gazeuses.	Primovaccination : - 2 injections séparées de 4 à 6 semaines - Rappel annuel
MILOXAN® (MERIAL SAS)	Lutte contre les infections à germes anaérobies	Anatoxines de <i>Clostridium perfringens</i> β et ϵ (type B, C et D), <i>C. septicum</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. tetani</i> , de <i>C. sordellii</i> et anaculture de <i>C. chauvoei</i>	Bovins, ovins et caprins : entérotaxies, charbon symptomatique, œdème malin de la caillette, hépatite infectieuse nécrosante, tétanos et gangrènes gazeuses	Animaux en gestation : la seconde injection de primo vaccination ou rappel 2 à 6 semaines avant la mise bas Jeunes issus de mères vaccinées : vaccination à partir de 8 semaines
TASVAX® <i>Huit</i> (SHERING- PLOUGH vétérinaire)	Lutte contre les toxico-infections à clostridies	Anatoxines de <i>Clostridium perfringens</i> α , β et ϵ , <i>C. oedematiens</i> type B, <i>C. septicum</i> , <i>C. tetani</i> et anaculture de <i>C. chauvoei</i>	Bovins, ovins et caprins : entérotaxies, charbon symptomatique, gangrènes gazeuses, tétanos, hépatite infectieuse nécrosante, œdème malin de la caillette.	Jeunes issus de mères non vaccinées : vaccination à partir de 2 semaine
COVEXIN 10® (SHERING- PLOUGH vétérinaire)	Lutte contre les clostridioses	Anatoxines : <i>C. perfringens</i> α , β et ϵ , <i>C. novyi</i> , <i>septicum</i> , <i>tetani sordellii</i> , <i>hemolyticum</i> et anaculture <i>C. chauvoei</i>	Bovins, ovins et caprins : Entérotaxémie et tétanos	

CONCLUSION PARTIELLE :

L'entérotoxémie est une affection des ruminants aboutissant la plupart du temps à une mort subite. L'agent principal de cette maladie est *Clostridium perfringens*. Cette bactérie commensale de l'intestin grêle produit des toxines, responsables de la mort de l'animal et des lésions observées à l'autopsie, lors de sa multiplication. Les bases épidémiologiques, cliniques et nécropsiques ne sont pas suffisantes pour établir un diagnostic de certitude d'entérotoxémie. Cette suspicion d'entérotoxémie nécessite une confirmation par des méthodes de laboratoire. Le diagnostic bactériologique repose sur le dénombrement dans le contenu de l'intestin grêle de *Clostridium perfringens*. Dans la littérature, les valeurs de référence admises pour établir un diagnostic d'entérotoxémie sont variables en fonction du délai entre la mort du ruminant et l'analyse bactériologique. En conséquence, il semble nécessaire de vérifier si cette méthode est utilisable pour un diagnostic dans un délai de 24 heures post-mortem. Il nous paraît également utile de s'intéresser à l'influence du site de prélèvement et à la durée de conservation de celui-ci.

2^{EME} PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

Dans notre première partie, nous avons exposé les différentes bases épidémiologiques, cliniques et lésionnelles de l'entérotoxémie nécessaires pour établir un diagnostic de forte suspicion d'entérotoxémie. Il est indispensable de recourir à une analyse de laboratoire pour confirmer celui-ci.

Dans le but d'affiner le diagnostic de l'entérotoxémie, l'unité pédagogique de pathologie du bétail de l'école nationale vétérinaire de Lyon (ENVL) a réalisé une étude expérimentale de terrain. Elle repose sur le dénombrement post-mortem de la population de *Clostridium perfringens* en relation avec quelques fractions bactériennes (coliformes, entérocoques) de l'intestin grêle chez des sujets morts d'une suspicion ou non d'entérotoxémie.

L'objectif de ce travail est de vérifier l'utilité de cette méthode afin d'établir un diagnostic d'entérotoxémie. Pour cela il semble nécessaire de rechercher l'influence des variables susceptibles d'interférer sur les résultats de cette méthode. Nous nous intéresserons notamment au délai entre la mort du sujet et le dénombrement de *Clostridium perfringens* mais également aux écarts susceptibles de résulter des lieux de prélèvements de l'intestin et enfin des conditions de conservation et d'acheminement du prélèvement.

I. MATERIELS, METHODES ET SUJETS

B. Recrutement des sujets

L'étude expérimentale a été menée de mars 2002 à juin 2006 sur 48 ruminants référés à l'unité pédagogique de pathologie du bétail de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon (ENVL) issus d'élevages environnant. Les ruminants sont répartis en 26 sujets morts d'une suspicion d'entérotoxémie (groupe entérotoxémie) et en 22 sujets morts ou euthanasiés suite à une maladie autre qu'une entérotoxémie (groupe non entérotoxémie). Les autopsies de l'ensemble des sujets sont réalisées à l'ENVL.

Les sujets d'expérimentation sont d'espèces (ovine, bovine et caprine), d'âges (2 jours à 15 ans) et de races différentes. Le délai pour la réalisation des autopsies et des analyses bactériologiques se situe dans un délai de 24 heures post-mortem.

1. Les sujets du groupe « entérotoxémie »

Les 26 sujets sont des ruminants morts subitement (18 bovins, 4 caprins et 4 ovins). A partir des bases épidémiologiques, cliniques et nécropsiques, le diagnostic de forte suspicion d'entérotoxémie des sujets a été établi en excluant les maladies comprises dans le diagnostic différentiel de mort subite. Les données concernant chaque sujet sont répertoriées dans les tableaux récapitulatifs situés en Annexe 1.

2. Les sujets du groupe « non entérotoxémie »

Les 22 sujets sont des ruminants (15 bovins, 6 ovins et 1 caprin) morts suite aux complications de leur maladie, ou euthanasiés avec un produit injectable en intraveineuse à base d'embutramide, de mébézonium et de tétracaïne (T61®). Parmi les sujets, on en a deux qui sont mort subitement, mais l'autopsie a permis d'écarter la suspicion d'entérotoxémie. Le diagnostic de chaque sujet a été établi selon les bases épidémiologiques, cliniques et lésionnelles, permettant d'exclure avec certitude une entérotoxémie. Les données

épidémiologiques, cliniques et lésionnelles sont récapitulées, pour chaque sujet, dans les tableaux en Annexe 2.

C. Protocole expérimental

1. Mise en place du protocole

L'étude expérimentale comprend une analyse post-mortem de la flore intestinale des sujets listés. La référence J0 correspond au jour de la mort du sujet. Dans la suite de notre étude expérimentale, nous assimilons la référence J+1 au jour qui suit la mort de l'animal, J+3 au troisième jour post-mortem et J+5 au cinquième jour post-mortem.

La première étude consiste à dénombrer les concentrations iléales en clostridies en rapport avec d'autres fractions bactériennes (entérocoques, coliformes et flore totale aéro-anaérobie) de la flore intestinale sur la totalité des sujets du groupe entérotoxémie et non entérotoxémie à J+1 post-mortem.

La deuxième étude expérimentale a été menée sur 8 sujets utilisés dans la première étude, 4 sujets du groupe entérotoxémie (M) et 4 sujets du groupe non entérotoxémie (S). La numération des fractions bactériennes décrites ci-dessus a été réalisée à partir de prélèvements effectués sur différentes portions de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) à J+1, puis à J+3 et J+5 post-mortem après leurs conservations à + 4°C.

2. Les prélèvements

Durant l'autopsie, l'expérimentateur prélève sur chaque sujet une portion d'intestin grêle avec son contenu homogénéisé. Les anses intestinales sont prélevées, ligaturées aux deux extrémités et transmises sans délai au laboratoire d'analyse, déposées dans un pot en plastique (15 cm de diamètre) fermé par un couvercle. L'identification du site de prélèvement et du sujet est inscrite sur le contenant.

La partie distale de l'iléon constitue le site de prélèvements des 48 sujets. Pour 8 d'entre eux, 4 suspects et 4 non suspects d'entérotoxémies, les prélèvements sont réalisés sur trois portions distinctes de l'intestin grêle : le duodénum, le jéjunum et l'iléon.

Les prélèvements ont été analysés au laboratoire de microbiologie médicale du service de pathologie du bétail de l'ENVL. Un dénombrement de la flore totale aéro-anaérobie, des coliformes, des entérocoques et des clostridies sont effectués sur chaque prélèvement.

3. Techniques d'analyses

a. Préparation des dilutions

Nous avons préparé une gamme de dilutions à partir du contenu intestinal prélevé. Pour l'obtention de la dilution 10^{-1} , on prélève un gramme de contenu intestinal que l'on dilue avec 9 mL de Ringer au 1/4, homogénéisé et filtré dans un flacon stérile. L'association de billes stériles permet d'obtenir une meilleure homogénéisation du milieu par agitation au Vortex (ND).

A partir de cette dilution à 10^{-1} , on prépare la dilution suivante au centième à 10^{-3} . On prélève 0,1 mL de la dilution mère dans laquelle on ajoute 9,9 mL de Ringer lactate® stérile dans des tubes stériles. Ensuite, on effectue de nouvelles dilutions à partir de la précédente pour aboutir à 10^{-5} et 10^{-7} . Au final nous disposons de 3 dilutions : 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} .

b. Ensemencement des milieux de cultures

Pour notre expérimentation, le dénombrement de la flore intestinale a nécessité l'utilisation de différents milieux de culture : une gélose trypticase soja (pour la flore aéro-anaérobie totale), un milieu Mac Conkey (pour les coliformes), un milieu D-Coccosel (pour les entérocoques) et un milieu tryptone sulfite néomycine (TSN) (pour *C. perfringens*) (Annexe 8) [63].

Le milieu TSN (tryptone sulfite néomycine) contient des antibiotiques (néomycine et polymixine) qui ont un spectre d'activité sur les Gram négatif et les streptocoques, permettant l'inhibition de la plupart des bactéries de l'intestin grêle [54]. Ce milieu contient un critère de différenciation des anaérobies : le sulfite de sodium dont la réduction est révélée par le fer (précipitation du sulfure de fer). *Clostridium perfringens* sulfito-réducteur permet la réduction et l'obtention d'une coloration noire des colonies bactériennes. Les colonies de *C. perfringens* apparaissent noires, brillantes, irrégulières, de plusieurs millimètres de diamètre.

La gélose trypticase soja (GTS) est un milieu peu sélectif. Il permet le dénombrement de la flore totale aéro-anaérobie.

Le milieu Mac Conkey est utilisé pour la culture des coliformes. Ce milieu contient deux inhibiteurs de la flore Gram + : les sels biliaires et le cristal violet.

Le milieu D-Coccosel est destiné à l'isolement sélectif et à la différenciation des entérocoques fécaux pour lesquels la tolérance à la bile et l'hydrolyse de l'esculine sont considérées comme des caractères constants. Les entérocoques fécaux sont identifiés par des colonies noires [63].

On prélève 1 mL de chaque dilution préparée et on effectue un ensemencement dans la masse de la gélose maintenue en surfusion à 45°C dans des boîtes de Pétri sauf pour le milieu tryptone-sulfite-néomycine (TSN). Pour le milieu TSN, l'ensemencement est réalisé dans la masse de la gélose en surfusion maintenue dans un tube à essai stérile fermé à son extrémité. Cet ensemencement n'est pas réalisé sous chambre anaérobie à atmosphère contrôlée mais simplement sous un bec bunsen qui est un brûleur à gaz servant à créer et à maintenir une zone de travail stérile dans un rayon de 20 cm environ autour de la flamme. Les tubes à essais utilisés sont stérilisés à l'autoclave pendant 10 minutes à 121°C.

L'incubation s'effectue à 38°C pour les milieux GTS, D-coccosel et Mac Conkey, à 42°C pour le milieu TSN pendant 24 heures pour permettre d'enrichir la culture et faciliter la sélection de *Clostridium perfringens*.

Après une incubation des ensemencements issus des différentes dilutions durant 24 heures, le dénombrement est effectué par examen visuel avec un compteur de colonies 50 300 (Bioblock Scientific®).

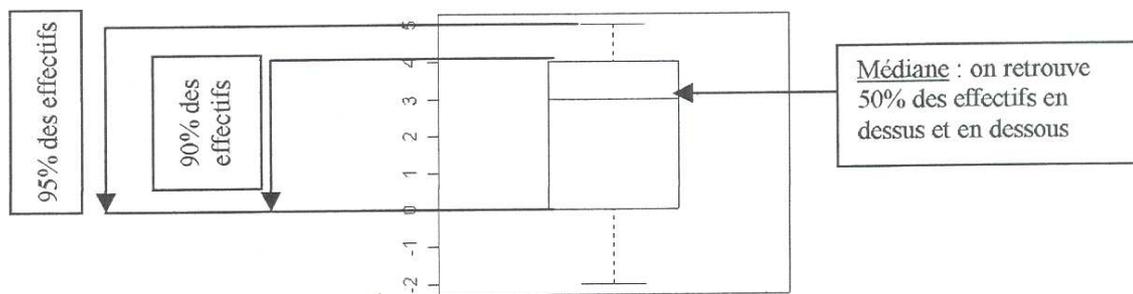
Les dilutions effectuées permettent à partir du dénombrement des différentes fractions bactériennes de l'intestin grêle d'obtenir la concentration de chacune d'elles. La concentration

minimale obtenue à partir des différentes dilutions est 10^3 UFC/mL. Une extrapolation est effectuée en considérant les résultats non quantifiables à la dilution 10^{-3} comme égaux à 10^3 UFC/mL permettant d'établir une analyse statistique après transformation logarithmique. L'interprétation des résultats sera effectuée en prenant en considération cette extrapolation

D.Méthodes d'analyse et traitement statistique

L'étude de la flore intestinale de l'iléon un jour (J+1) post mortem est réalisée à partir d'un test non paramétrique de comparaison des moyennes de Mann-Whitney-Wilcoxon après transformation logarithmique des valeurs de dénombrement des populations bactériennes. La méthode de représentation utilisée est un diagramme en boîte de type Box Plot.

Figure 11 : Diagramme en boîte type BoxPlot



L'analyse statistique de la flore intestinale, sur les prélèvements issus du protocole J+1, J+3 et J+5 post-mortem à différents sites de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon), est réalisée à partir d'un test d'analyse de variance à 3 facteurs (ANOVA 3), après transformation logarithmique des valeurs de dénombrements des populations bactériennes. C'est une méthode de comparaison de plusieurs moyennes permettant de tester l'effet d'un ou plusieurs facteurs qualitatifs sur une variable quantitative.

V. RESULTATS

A.Dénombrement de la flore de l'iléon à J+1 post-mortem des sujets suspects ou non d'entérotaxémie

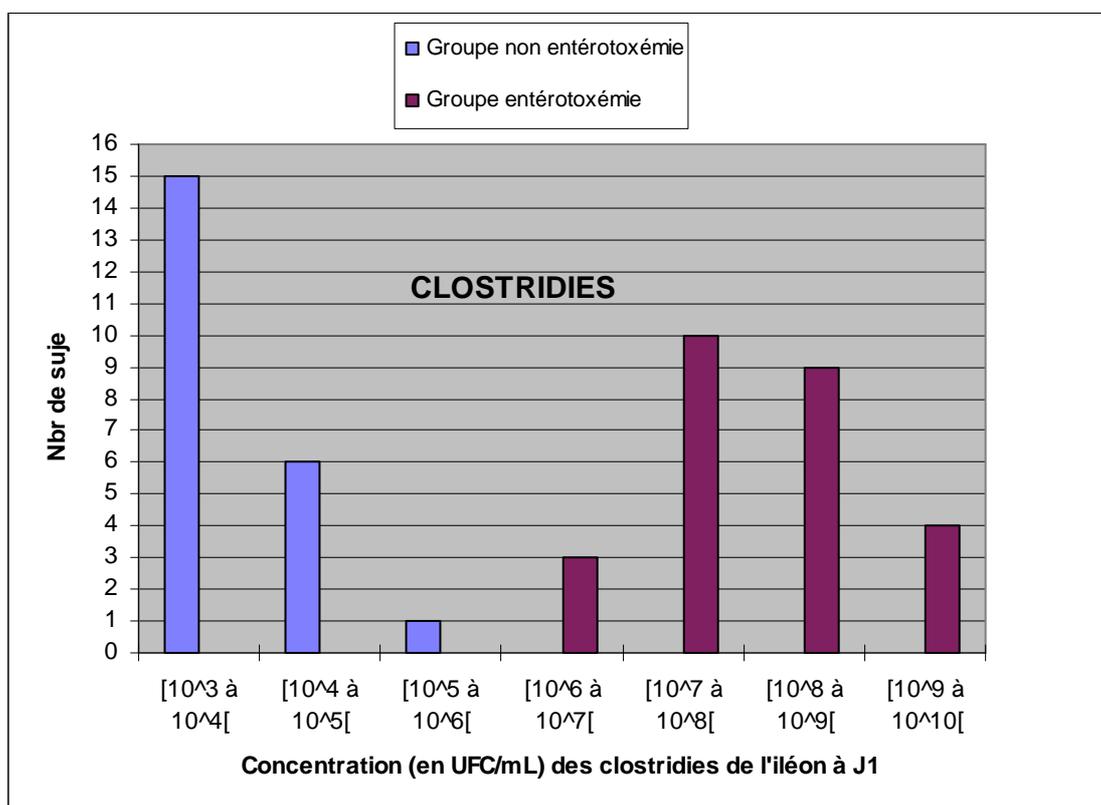
Le dénombrement de la flore intestinale post-mortem a été effectué sur chaque sujet : les fractions suivantes ont été dénombrées : la flore totale aéro-anaérobie, les coliformes (*E. coli*), les entérocoques (*Enterococcus faecalis* et *faecium*) et *Clostridium perfringens*.

1. Etude des concentrations de clostridies

Tableau 9 : Répartition des sujets en fonction de leur concentration de clostridies en UFC/mL et de leur statut

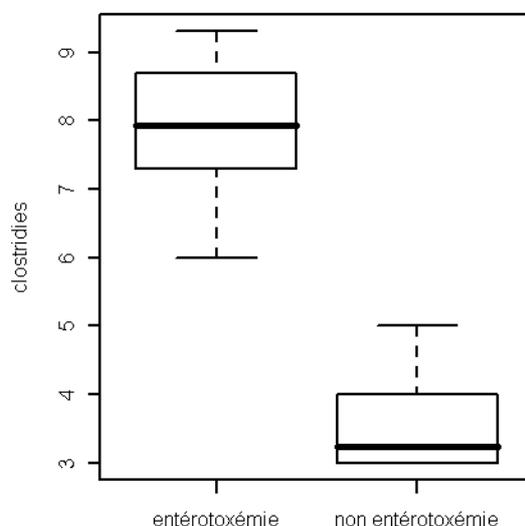
Statut des sujets	Concentrations iléales en clostridies à J+1 post-mortem en UFC/mL						
	$[10^3 \text{ à } 10^4[$	$[10^4 \text{ à } 10^5[$	$[10^5 \text{ à } 10^6[$	$[10^6 \text{ à } 10^7[$	$[10^7 \text{ à } 10^8[$	$[10^8 \text{ à } 10^9[$	$[10^9 \text{ à } 10^{10}[$
Sujets non entérotoxémie	15	6	1	0	0	0	0
Sujets entérotoxémie	0	0	0	3	10	9	4

Figure 12 : Distribution des populations de clostridies de l'iléon à J+1 post-mortem en fonction des classes de concentrations et du statut de l'animal



Les données logarithmiques des concentrations iléales en clostridies sont répertoriées en Annexe 3.

Figure 13 : Distribution des populations de clostridies de l'iléon à J+1 post-mortem en fonction de leurs concentrations logarithmiques et du statut des sujets



On observe une différence significative ($p=2.699e-09$) de la concentration des clostridies en fonction du statut des sujets. Les sujets du groupe entérotoxémie ont une concentration iléale en *C. perfringens* supérieures aux sujets du groupe non entérotoxémie. La médiane, c'est-à-dire la valeur pour laquelle on retrouve 50% des sujets en dessous et en dessus de cette valeur, est de 7.10^7 UFC/mL pour le groupe entérotoxémie et de 3.10^3 UFC/mL pour le groupe non entérotoxémie. La concentration iléale minimale en *C. perfringens* est supérieure ou égale à 10^6 UFC/mL pour les sujets du groupe entérotoxémie tandis que la concentration en *C. perfringens* maximale est de 10^5 UFC/mL pour les sujets du groupe non entérotoxémie. Les deux groupes de sujets sont indépendants.

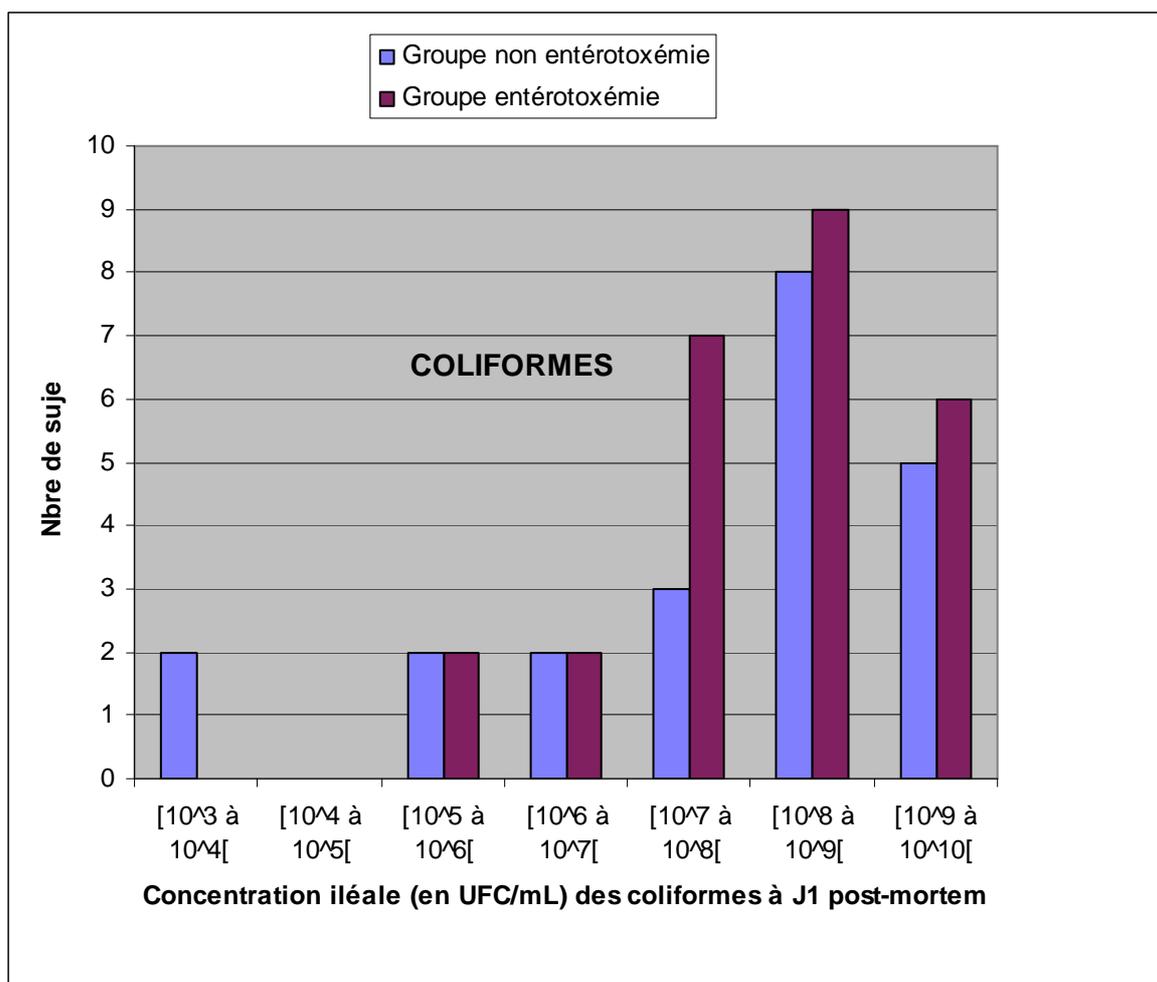
Pour le groupe non entérotoxémie, nous ne pouvons pas interpréter les valeurs minimales en concentration clostridienne du fait de l'extrapolation de certaines données. On observe seulement que 90% des sujets de ce groupe se situe en dessous de la valeur de 10^4 UFC/mL.

2. Etude des concentrations de coliformes

Tableau 10 : Répartition des sujets en fonction de leur concentration en UFC/mL des coliformes et de leur statut

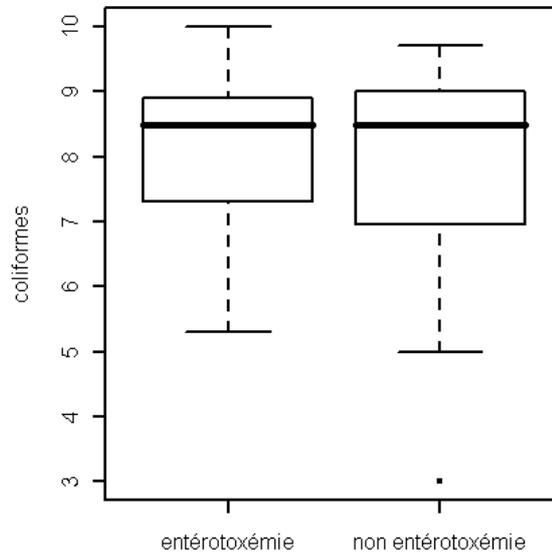
Statut des sujets	Concentration iléale des coliformes à J+1 post-mortem						
	[10 ³ à 10 ⁴ [[10 ⁴ à 10 ⁵ [[10 ⁵ à 10 ⁶ [[10 ⁶ à 10 ⁷ [[10 ⁷ à 10 ⁸ [[10 ⁸ à 10 ⁹ [[10 ⁹ à 10 ¹⁰ [
Sujets non entérotoxémie	2	0	2	2	3	8	5
Sujets entérotoxémie	0	0	2	2	7	9	6

Figure 14 : Distribution des populations de coliformes de l'iléon à J+1 post-mortem en fonction des classes de concentrations et du statut des sujets



Les données logarithmiques des concentrations iléales en coliformes sont répertoriées en Annexe 4.

Figure 15 : Distribution des populations de coliformes de l'iléon à J+1 post-mortem en fonction de leurs concentrations logarithmiques et du statut des sujets



On n'observe aucune différence significative ($p > 0,05$) pour les concentrations des coliformes en fonction du statut des sujets. Les concentrations iléales en coliformes ne varient pas en fonction du statut de l'animal. La médiane se situe pour les deux groupes à une valeur de $3 \cdot 10^8$ UFC/mL.

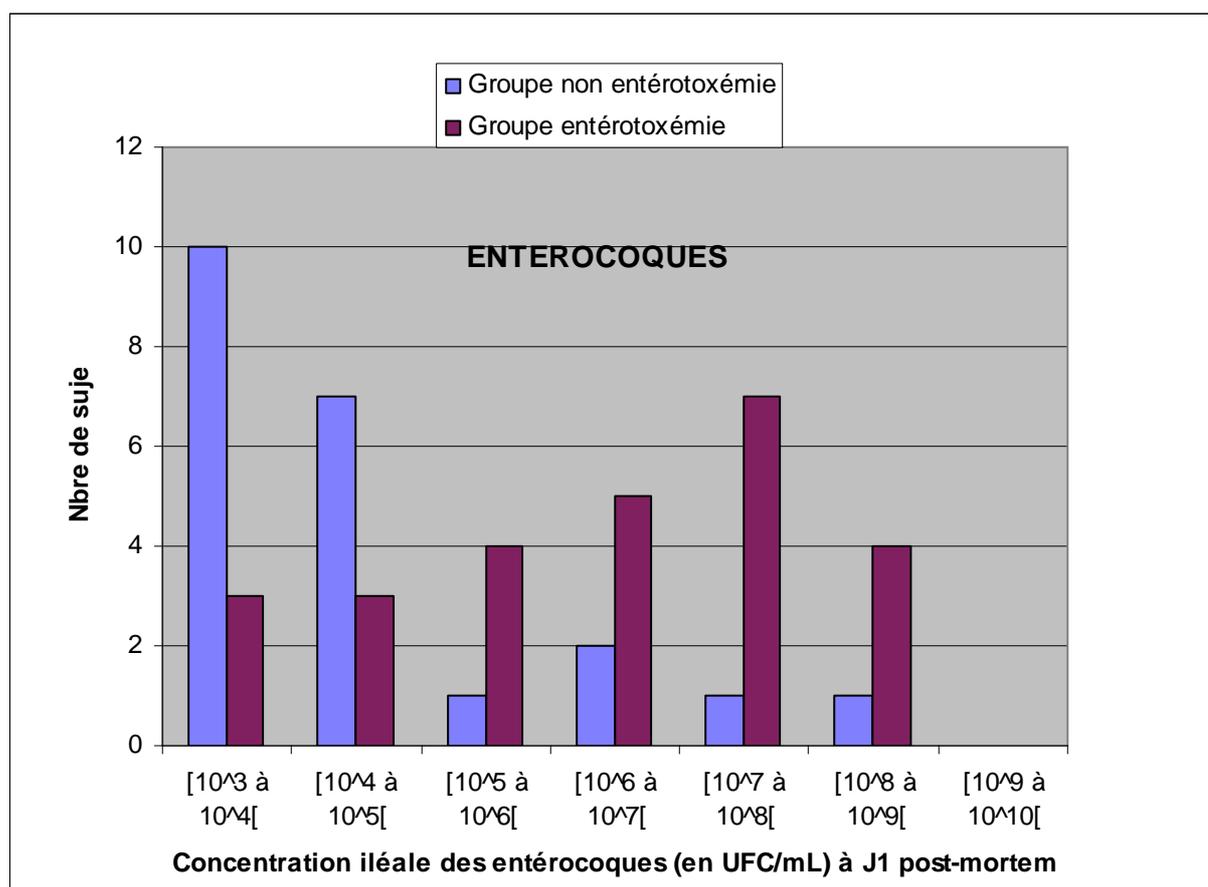
Pour les deux groupes, on note que 90% de l'effectif des deux groupes est compris entre $[10^7, 10^9]$ UFC/mL. On note pour le groupe non entérotoxémie que deux sujets ont une concentration iléale de 10^3 UFC/mL.

3. Etude des concentrations des entérocoques

Tableau 11 : Répartition des sujets en fonction de leur concentration en UFC/mL des entérocoques et de leur statut

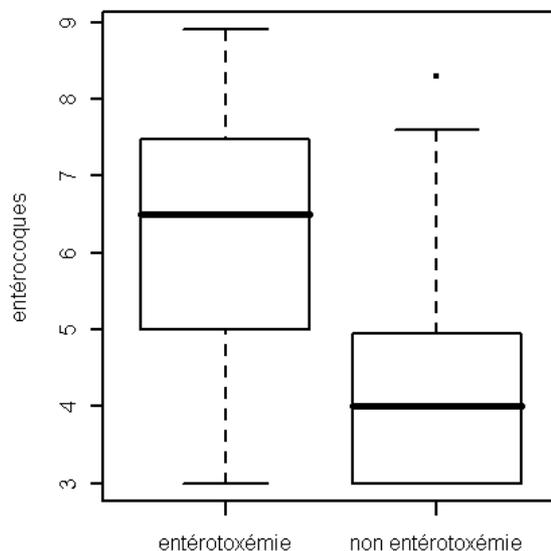
Statut des sujets	Concentration iléale des entérocoques à J1 post-mortem						
	[10 ³ à 10 ⁴ [[10 ⁴ à 10 ⁵ [[10 ⁵ à 10 ⁶ [[10 ⁶ à 10 ⁷ [[10 ⁷ à 10 ⁸ [[10 ⁸ à 10 ⁹ [[10 ⁹ à 10 ¹⁰ [
Sujets non entérotoxémie	10	7	1	2	1	1	0
Sujets entérotoxémie	3	3	4	5	7	4	0

Figure 16 : Distribution des populations des entérocoques de l'iléon à J1 post-mortem en fonction des classes de concentrations et du statut des sujets



Les données logarithmiques des concentrations iléales des entérocoques sont répertoriées en Annexe 5.

Figure 17 : Distribution des populations des entérocoques de l'iléon à J1 post-mortem en fonction de leurs concentrations logarithmiques et du statut des sujets



On observe une différence significative ($p=0,001004$) des concentrations des entérocoques de l'iléon en fonction du statut. Les concentrations iléales en entérocoques sont plus élevées pour les sujets du groupe entérotaxémie par rapport à ceux du groupe non entérotaxémie.

Pour le groupe entérotaxémie, 90% de l'effectif du groupe se trouve dans un intervalle de $[10^5, 3.10^7]$ UFC/mL.

Pour le groupe non entérotaxémie, 90% de l'effectif de ce groupe se situe en dessous de la valeur de 10^5 UFC/mL. La concentration minimale en entérocoques de ce groupe n'est pas déterminable quantitativement du fait de l'extrapolation.

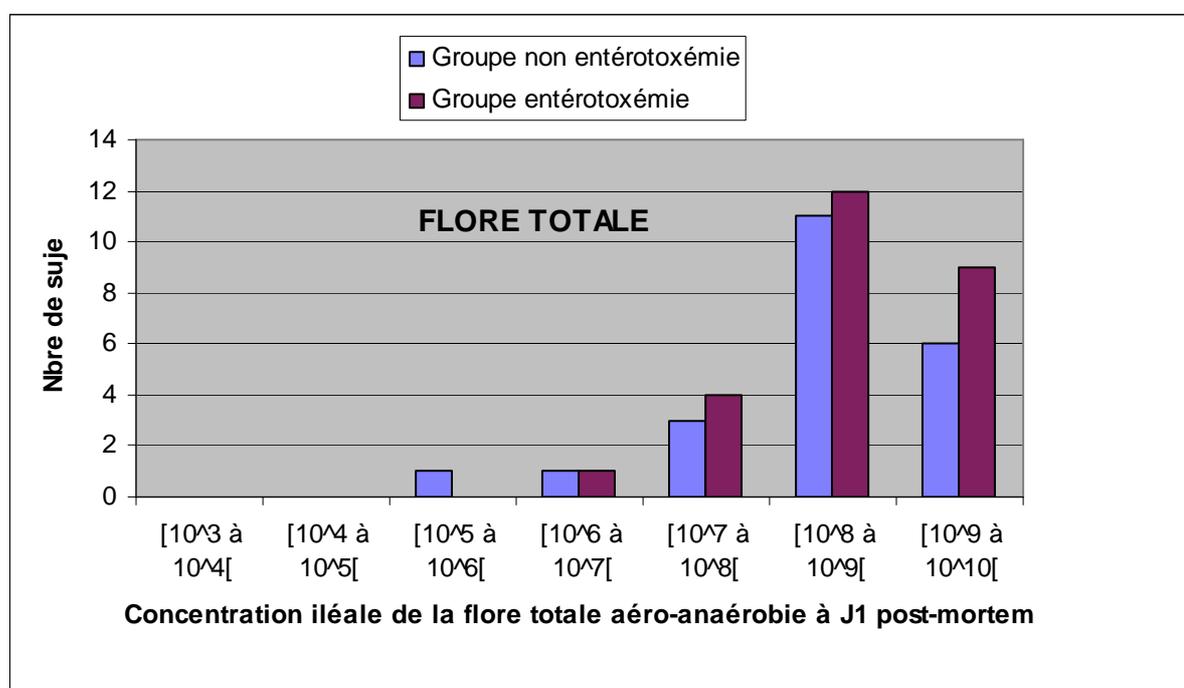
La médiane est de 3.10^6 UFC/mL pour le groupe entérotaxémie et de 10^4 UFC/mL pour le groupe non entérotaxémie.

4. Etude des concentrations de la flore totale

Tableau 12 : Répartition des sujets en fonction de leur concentration en UFC/mL de la flore totale aéro-anaérobies et de leur statut

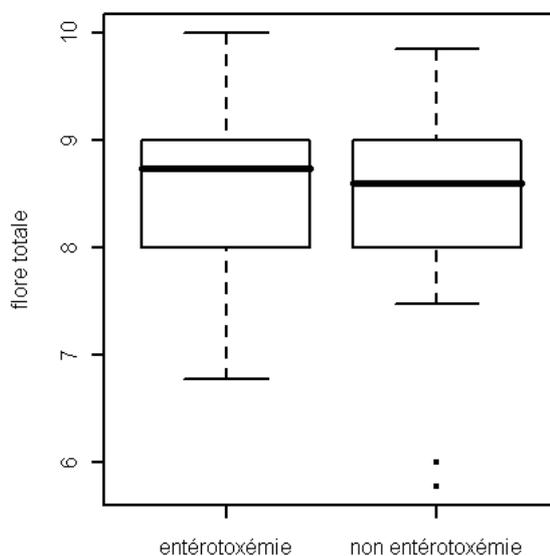
Statut des sujets	Concentration iléale de la flore totale à J1 post-mortem						
	[10 ³ à 10 ⁴ [[10 ⁴ à 10 ⁵ [[10 ⁵ à 10 ⁶ [[10 ⁶ à 10 ⁷ [[10 ⁷ à 10 ⁸ [[10 ⁸ à 10 ⁹ [[10 ⁹ à 10 ¹⁰ [
Sujets non entérotoxémie	0	0	1	1	3	11	6
Sujets entérotoxémie	0	0	0	1	4	12	9

Figure 18 : Distribution des populations de la flore totale aéro-anaérobie de l'iléon à J1 post-mortem en fonction des classes de concentrations et du statut des sujets



Les données des concentrations de flore totale sont étudiées après transformation logarithmique. L'ensemble des données est répertorié en Annexe 6.

Figure 19 : Distribution de la flore totale de l'iléon à J1 post-mortem en fonction de leurs concentrations et du statut des sujets



La différence n'est pas significative ($p=0,6042$) pour les concentrations de la flore totale en fonction du statut des sujets. La concentration iléale de la flore totale ne varie pas en fonction des sujets suspects ou non d'entérotoxémie.

Les valeurs, pour lesquelles 90% de l'effectif des deux groupes est présentes, se situe dans un intervalle de $[10^8, 10^9]$ UFC/mL.

Synthèse des résultats

Les résultats montrent une différence significative pour la concentration iléale en *Clostridium perfringens* à J+1 post-mortem entre les sujets du groupe entérotoxémie et ceux du groupe non entérotoxémie. En effet, cette concentration est supérieure à 10^6 UFC/mL pour l'ensemble des sujets du groupe « entérotoxémie » et inférieure à 10^5 UFC/mL pour l'ensemble des sujets du groupe « non entérotoxémie ». Les deux groupes sont indépendants.

Le dénombrement des entérocoques à J+1 post-mortem montre une différence significative entre les sujets des deux groupes. Les sujets du groupe entérotoxémie ont en majorité une concentration iléale en entérocoques supérieure à celle des sujets non suspects. En effet, 90% de l'effectif du groupe « entérotoxémie » se situe dans un intervalle de $[10^5, 10^7]$ UFC/mL tandis que 90% du groupe « non entérotoxémie » se situe en dessous de la concentration iléale d'entérocoques de 10^5 UFC/mL.

En ce qui concerne les concentrations iléales en coliformes et flore totale aéro-anaérobie, aucune différence significative n'est à noter entre les deux groupes. La majorité des sujets se situent pour les concentrations iléales en coliformes dans un intervalle de $[10^7, 10^9]$ UFC/mL et pour la flore totale aéro-anaérobie dans un intervalle de $[10^8, 10^9]$ UFC/mL.

Au bilan, les sujets suspects d'entérotoxémie ont une concentration iléale à J+1 post-mortem en *Clostridium perfringens* significativement supérieure aux sujets non entérotoxémie. Pour les autres fractions bactériennes, la concentration iléale en entérocoques des sujets du

groupe entérotoxémie est supérieure aux sujets de l'autre groupe, tandis que les concentrations iléales en flore totale et coliformes sont semblables entre les sujets des deux groupes. Les concentrations similaires des coliformes et de la flore totale chez les sujets suspects ou non d'entérotoxémie permettent de conclure à une uniformité des prélèvements. Un contrôle de qualité du prélèvement peut s'effectuer à partir de ces deux populations de bactéries.

Suite à ces résultats, la deuxième partie de l'étude expérimentale s'intéresse à l'influence du site de prélèvement et du temps de conservation du prélèvement à +4°C.

B. Influence du site de prélèvement et du délai de conservation post-mortem des prélèvements à + 4°C sur le dénombrement de fractions bactériennes (clostridies, coliformes, entérocoques et flore totale) de l'intestin grêle

Dans cette deuxième étude, le dénombrement de fractions bactériennes de la flore de l'intestin grêle, des 4 sujets suspects d'entérotoxémie et des 4 sujets non suspects d'entérotoxémie, est réalisé à différents sites (duodénum, jéjunum, iléon) et à différents jours de conservation (J+3 et J+5 post-mortem) à +4°C du prélèvement effectué à J+1 post-mortem. Le temps, le site de prélèvement et le statut des sujets sont trois facteurs qualitatifs étudiés par rapport à une variable quantitative correspondant à chaque concentration des différentes populations bactériennes.

Tableau 13 : Valeurs logarithmiques des concentrations de la flore intestinale après conservation à + 4°C en fonction du délai post-mortem et du statut des sujets

Délai post-mortem	Sujets	Valeurs logarithmiques moyennes des concentrations des prélèvements intestinaux conservés à + 4°C à partir de J+1											
		Duodénum				Jéjunum				Iléon			
		E	FT	Cl	Col	E	FT	Cl	Col	E	FT	Cl	Col
J+1	Entérotoxémie	5,06	8,54	6,75	8,5	5,39	9,19	7,42	8,86	5,54	9,03	8,29	8,64
	Non entérotoxémie	3,15	8,44	3	8,51	3	8,42	3,07	8,54	3,08	8,56	3,12	8,11
J+3	Entérotoxémie	5,72	8,79	6,83	8,27	5,77	9,25	7,98	8,81	5,78	8,67	8,05	8,56
	Non entérotoxémie	3	8,1	3	7,83	3,25	8,31	3	7,94	3,08	8,44	3	7,48
J+5	Entérotoxémie	5,48	8,37	6,94	7,89	5,81	9,1	7,44	8,66	6,11	8,85	8,17	8,27
	Non entérotoxémie	3,15	7,98	3	7,44	3,63	8,42	3	7,51	3,4	7,77	3	7,06

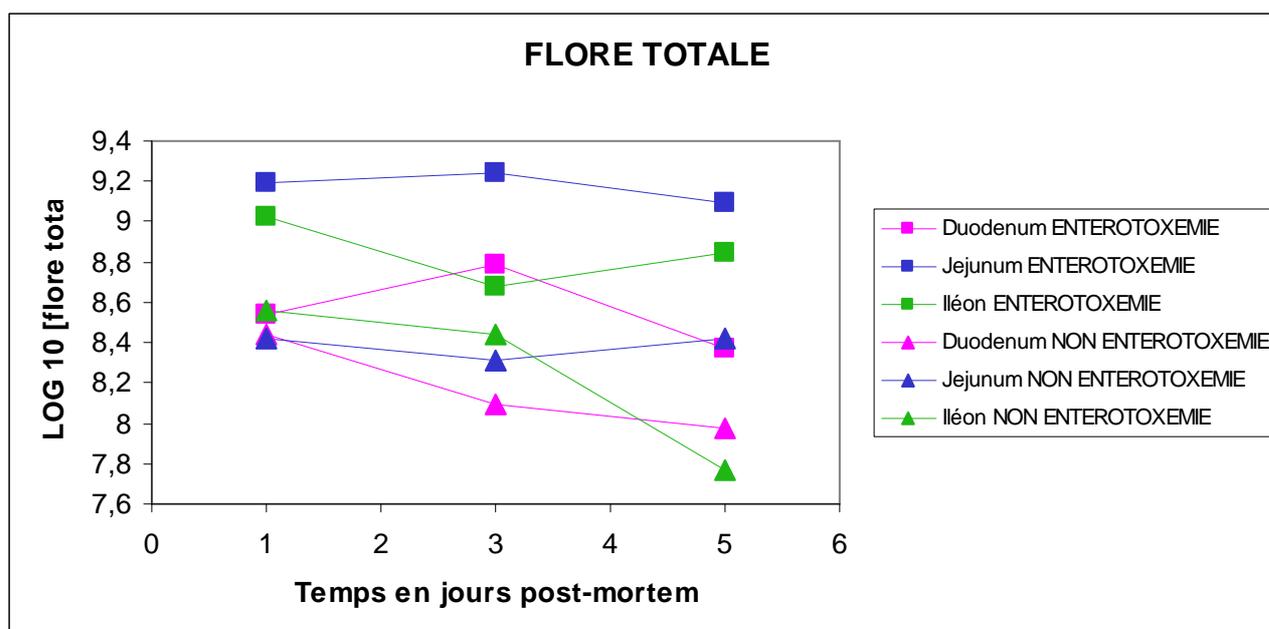
FT : flore totale aéro-anaérobie, E : entérocoques, Cl : clostridies, Col : coliformes

Les valeurs logarithmiques des concentrations de chaque sujet sont récapitulées en Annexe 7.

1. Résultats du dénombrement de la flore totale

Les données logarithmiques des concentrations moyennes de la flore totale des sujets des deux groupes sont répertoriées dans le tableau 13.

Figure 20 : Représentation de la cinétique des concentrations de la flore totale en fonction du temps, du statut des sujets et du site de prélèvement



Légendes : Sujets « non entérotoxémie »  Sujets entérotoxémie 
--- Iléon --- Jéjunum --- Duodénum

Pour l'ensemble des sujets, il n'y a pas de différence significative ($p > 0,05$) des concentrations de la flore totale en fonction du temps. La concentration moyenne de la flore totale des sujets ne varie pas entre J+1 et J+5 post-mortem sur un prélèvement conservé à +4°C.

Pour les sujets suspects d'entérotoxémie, on note une différence significative ($p = 0,003674$) de la concentration de la flore totale en fonction du site de prélèvement. Le jéjunum est le site de l'intestin grêle où la flore totale est plus importante par rapport au duodénum et l'iléon.

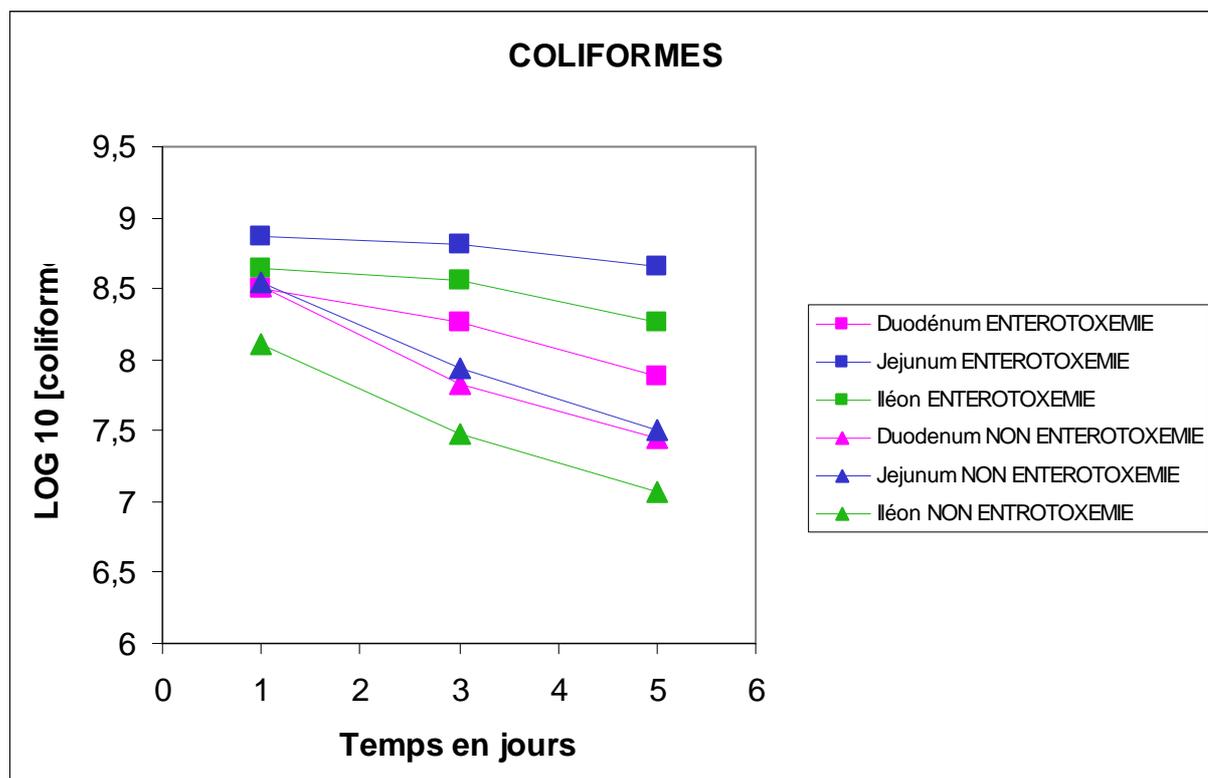
Pour les sujets non suspects d'entérotoxémie, on n'observe aucune différence significative des concentrations de la flore totale en fonction des sites de prélèvements. Le site de prélèvement n'influence pas le dénombrement de la flore totale pour un sujet non atteint d'entérotoxémie.

On observe un intervalle de concentration en flore totale compris entre $[10^8, 10^9]$ UFC/mL pour l'ensemble des sujets des deux groupes.

2. Résultats du dénombrement des coliformes

Les données logarithmiques des concentrations moyennes des coliformes des sujets des deux groupes sont répertoriées dans le tableau 13.

Figure 21 : Représentation de la cinétique des concentrations des coliformes en fonction du temps, du statut des sujets et du site de prélèvement



Pour l'ensemble des sujets, on n'observe aucune différence significative ($p > 0,05$) des concentrations des coliformes en fonction du temps. Les concentrations de coliformes pour les sujets entre J+1 et J+5 post-mortem pour un prélèvement conservé à +4°C restent stable.

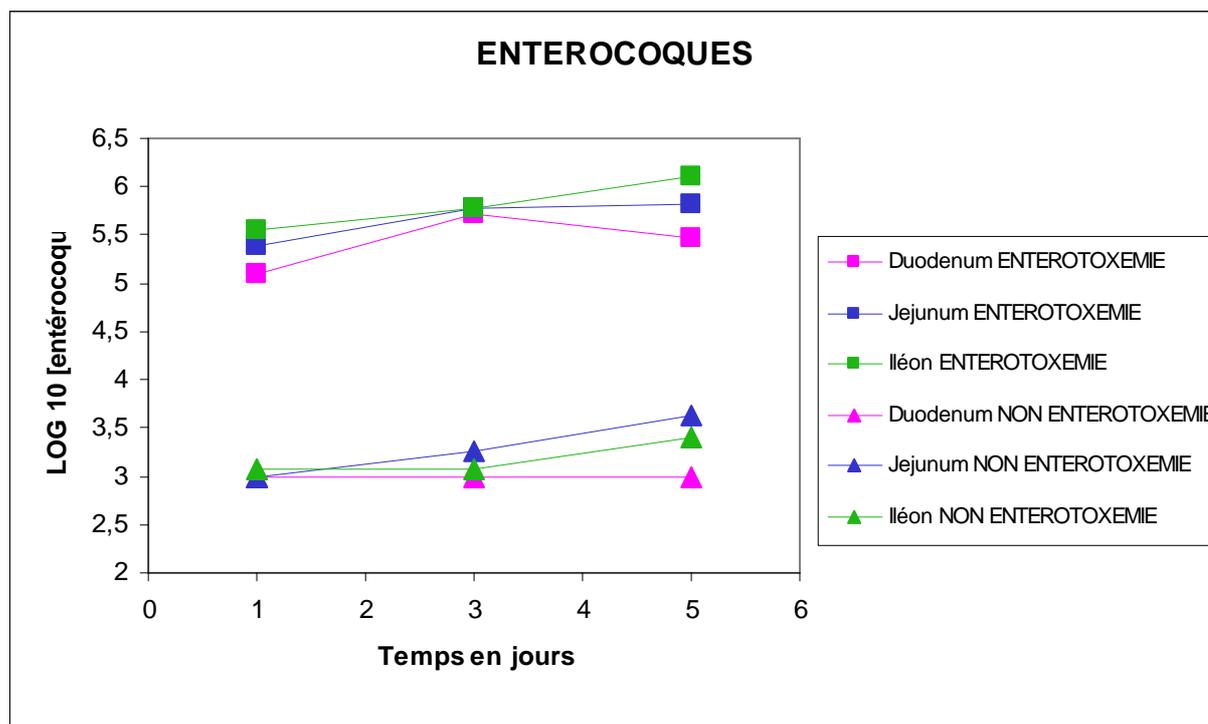
On observe une différence significative ($p = 0,04866$) de la concentration des coliformes chez les sujets suspects d'entérotaxémie en fonction du site de prélèvement. La concentration des coliformes est plus élevée dans le jejunum par rapport à l'iléon qui lui-même a une concentration supérieure au duodénum.

En ce qui concerne les sujets non suspects d'entérotaxémie, on ne note aucune différence significative ($p > 0,05$) de la concentration des coliformes en fonction du site de prélèvements.

3. Résultats du dénombrement des entérocoques

Les données logarithmiques des concentrations moyennes en entérocoques des sujets des deux groupes sont répertoriées en annexe 3.

Figure 22 : Représentation de la cinétique des concentrations des entérocoques en fonction du temps, du statut des sujets et du site de prélèvement

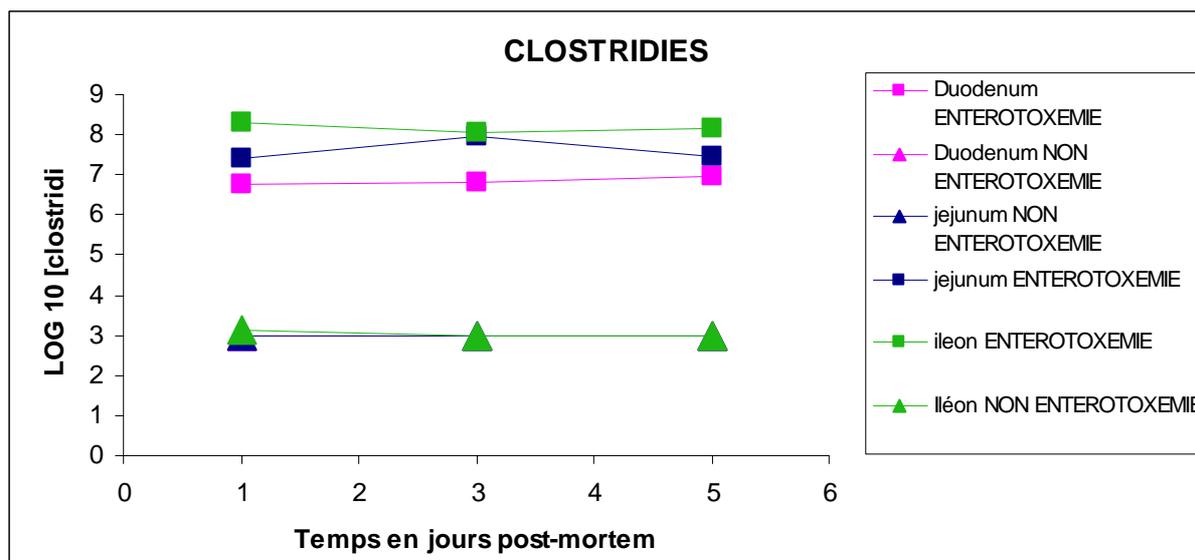


Pour la totalité des sujets, aucune différence significative ($p > 0,05$) n'est observée pour la concentration des entérocoques en fonction du temps mais aussi du site de prélèvement. Il n'y a pas de variation de la concentration des entérocoques pour les sujets entre J+1 et J+5 post-mortem sur un prélèvement conservé à $+4^{\circ}\text{C}$. Le site de prélèvement n'est pas un facteur de variation de la concentration de la population d'entérocoques aussi bien pour les sujets suspects ou non d'entérotaxémie.

4. Résultats du dénombrement des clostridies

Les données logarithmiques des concentrations des entérocoques pour la totalité des sujets sont répertoriées dans le tableau 15.

Figure 23 : Représentation de la cinétique des concentrations des clostridies en fonction du temps, du statut des sujets et du site de prélèvement



L'interprétation des données pour les sujets non suspects d'entérotaxémie n'est pas réalisable en raison de l'extrapolation de certaines données.

Pour les sujets suspects d'entérotaxémie, une différence significative ($p=0.0001100$) est observée pour la concentration des clostridies en fonction du site de prélèvement. L'iléon est la portion de l'intestin grêle où la concentration en clostridies est la plus élevée, suivie du jejunum et enfin du duodénum.

De plus, aucune différence significative ($p>0,05$) est notée pour les concentrations clostridiennes en fonction du temps de conservation du prélèvement à $+4^{\circ}\text{C}$ entre J+1 et J+5 post mortem.

Synthèse des résultats

Le temps de conservation entre J+1 et J+5 post-mortem du prélèvement à $+4^{\circ}\text{C}$ n'est pas un facteur influençant la cinétique des concentrations des différentes populations bactériennes de l'intestin grêle. Pour l'ensemble des sujets, le dénombrement de la flore intestinale reste constant entre J+1 et J+5 post-mortem dans les conditions de conservation énoncées précédemment. Ceci est intéressant pour le diagnostic de laboratoire de l'entérotaxémie, utilisant la concentration en *Clostridium perfringens*.

Les sujets suspects d'entérotaxémie ont une population clostridienne plus élevée dans l'iléon par rapport aux autres portions de l'intestin grêle (jejunum et duodénum). Le jejunum

constitue le site de prélèvement, des sujets suspects d'entérotoxémie, à privilégier pour les populations de coliformes et de flore totale aéro-anérobie.

Le site de prélèvement ne constitue pas un facteur de variation des concentrations de la flore intestinale pour les sujets non suspects d'entérotoxémie.

Au bilan, le site de prélèvement le plus favorable pour le dénombrement de *Clostridium perfringens* est l'iléon. Un délai de 4 jours de conservation à +4°C du prélèvement de contenu intestinal réalisé à J+1 post-mortem, dans les conditions décrites dans notre protocole, ne modifie pas les concentrations des fractions bactériennes étudiées, et plus particulièrement celle de *C. perfringens* nécessaire au diagnostic de l'entérotoxémie.

VI. DISCUSSION

A. Analyse critique des résultats obtenus

1. Les sujets inclus

Les entérotoxémies affectent toutes les espèces animales mais plus particulièrement les ruminants. La population de ruminants concernée par notre étude est très diversifiée concernant la race, le sexe et l'âge. La partie bibliographique nous a permis de montrer que la variété des facteurs intrinsèques (âge, sexe et race) sont plutôt à relier aux conduites d'élevages qu'à des facteurs déterminants d'apparition d'entérotoxémie. Nous considérons que cette diversité n'influence pas les résultats obtenus. Notre étude montre qu'une différence de concentration iléale en *C. perfringens* est significative entre un sujet suspect ou non d'entérotoxémie quelques soient son âge, sexe et race.

Des études menées sur des élevages bovins charolais par PHILIPPEAU et des bovins blanc-bleu-belge par MANTECA [59, 71, 72] montrent l'atteinte préférentielle de certaines catégories de ruminants : les veaux en croissance (à la mise à l'herbe), des veaux non sevrés (moins de 6 mois) et des bovins en engraissement (taurillon, vache de réforme). Dans notre étude, le nombre de sujets de chaque espèce ne nous permet pas d'établir un pourcentage pour chaque classe d'âge. Par exemple l'âge du sevrage varie selon l'espèce et le mode d'élevage. Néanmoins, nous constatons que la moitié des sujets suspects d'entérotoxémie est constitué de jeunes ruminants non sevrés.

2. Les prélèvements intestinaux

Les prélèvements de l'intestin grêle sont recueillis sur des sujets issus d'élevages avoisinants l'ENVL dans les 24 heures post-mortem. L'heure de la mort de l'animal ne peut pas être connue avec exactitude. En effet, l'éleveur ne peut pas évaluer celle-ci sans une marge d'erreur de quelques heures. Ce délai post-mortem de 24 heures pourrait affecter les résultats du dénombrement de la flore intestinale. Selon PHILIPPEAU, POPOFF [70], le délai de prélèvements doit se situer entre 6 et 12 heures post-mortem car au-delà le diagnostic bactériologique est insuffisant pour établir un diagnostic d'entérotoxémie. Selon ces auteurs, à partir de 6 heures post-mortem la numération de *C. perfringens* est indicatrice d'une forte suspicion d'entérotoxémie pour une valeur supérieure à 10^8 UFC/mL.

En pratique, le respect de cet intervalle de temps pour le prélèvement est difficile à

respecter dans la plupart des cas. Néanmoins, les résultats de notre étude révèlent qu'un délai de 24 heures post-mortem peut être encore un indicateur diagnostique pour une valeur de *C. perfringens* supérieure ou égale à 10^7 UFC/mL de contenu iléal.

Dans cet essai, nous n'avons pas pris en considération la température de conservation du cadavre jusqu'au prélèvement. D'après l'expérience de PHILIPPEAU et al., vue précédemment, nous pouvons discuter l'importance de fixer une température stable (20°C) de conservation de l'animal post-mortem. En effet, sur une journée, la fluctuation de la température extérieure et du cadavre met en évidence la difficulté d'établir une température stable de conservation.

Notre étude énonce que le site de prélèvement le plus approprié est l'iléon. Il s'agit de la portion de l'intestin grêle où la concentration clostridienne est la plus importante chez les sujets atteints d'entérotaxémies. Ce résultat contraste avec celui de PHILIPPEAU et LATOUR [72, 88] qui propose le prélèvement du jéjunum. Les concentrations en coliformes et la flore totale aéro-anaérobie, indicateurs de la qualité du prélèvement, corroborent l'utilisation de celui-ci. Elles sont maximales dans le jéjunum. Néanmoins, pour rechercher *C. perfringens*, il est préférable de prélever l'iléon. De plus, l'avantage de ce prélèvement réside dans la facilité de sa réalisation lors de l'autopsie. Le paquet sub-terminal permet par son identification aisée d'effectuer les prélèvements toujours au même endroit et ainsi de limiter un éventuel facteur de variation lié au site de prélèvement.

3. Les techniques d'analyse

Les techniques réalisées pour l'ensemencement des différents milieux de culture ont été décrites dans le protocole expérimental. Elles sont simples à mettre en œuvre et ne nécessitent pas d'équipement particulier. Ceci contraste fortement avec les techniques utilisées et préconisées par PICARD, SEDALLIAN et POPOFF notamment pour les clostridies [72, 86]. En effet, ils recommandent un ensemencement en chambre anaérobie sous atmosphère contrôlée (mélange de 90% d'azote, 5% de dihydrogène et 5% de dioxyde de carbone) de manière à inhiber le développement des bactéries aérobies strictes. Cette technique nécessite un équipement spécifique et coûteux. Le choix de notre technique expérimentale a pris en compte le faible coût et la facilité de réalisation de la méthode en vue d'une éventuelle reproduction par d'autres laboratoires. L'ensemencement en masse dans un tube à essai avec un milieu TSN (tryptone sulfite néomycine) en surfusion à proximité d'un bec Bunsen est suffisant pour le dénombrement de *C. perfringens*.

La concentration minimale détectable dans notre étude est de 10^3 UFC/mL. Ce manque de précision peut être discuté dans l'interprétation des résultats des sujets non entérotaxémies pour la concentration en clostridies. Ce facteur peut contribuer à augmenter le nombre de faux négatifs. Dans ce cas précis, le dénombrement des populations de coliformes et de la flore totale, indicateur de la qualité du prélèvement, sont nécessaires dans l'interprétation des résultats. Les valeurs normales des concentrations de ces différentes fractions pour les sujets non entérotaxémies par rapport aux sujets entérotaxémies permettent d'effectuer un contrôle de qualité du prélèvement. Par exemple, les sujets 4740 et 5877 ont une concentration iléale en *Clostridium perfringens* de 10^3 UFC/mL avec des valeurs de concentrations en coliformes et flore totale comparable à celles des autres sujets, comprises entre $[10^7, 10^9]$ UFC/mL. Il est parfaitement justifié dans cette étude de ne pas avoir fait des dilutions inférieures à 10^{-3} . En effet, d'après la littérature, pour conclure à l'évolution d'une entérotaxémie il est nécessaire d'avoir un accroissement de concentration de *C. perfringens* supérieure à 10^6 UFC/mL et la concentration admise pour un animal sain est de 10^3 UFC/mL [74].

B.Importance du dénombrement de Clostridium perfringens et du mode de conservation du prélèvement dans le diagnostic d'entérotoxémie

Les résultats obtenus révèlent des variations du dénombrement de la flore iléale à J+1 post-mortem entre les sujets des deux groupes. En effet, la population de clostridies est plus élevée chez les sujets fortement suspects d'entérotoxémie par rapport aux sujets non entérotoxémie en relation avec une similitude des concentrations des coliformes et flore totale.

D'après POPOFF, la valeur seuil 10^6 UFC/mL en *Clostridium perfringens* du contenu intestinal sur un prélèvement effectué rapidement après la mort de l'animal est suffisante pour diagnostiquer une entérotoxémie [74]. Des études récentes en élevage bovin charolais (PHILLIPPEAU et al) [71, 72] ont été réalisées afin d'établir une grille de diagnostic bactériologique en fonction du délai entre l'analyse bactériologique et la mort du bovin. Elles montrent que la valeur seuil de 10^6 UFC/mL n'est interprétable que pour un échantillon prélevé dans un laps de temps de six heures post-mortem. Au-delà de ce délai, la concentration de 10^8 UFC/mL est la valeur seuil pour la confirmation d'une entérotoxémie jusqu'à 15 heures post-mortem. Après 15 heures post-mortem, l'analyse bactériologique est insuffisante pour établir un diagnostic d'entérotoxémie, en raison de l'existence de faux positifs [71, 72].

Dans notre étude les prélèvements sont effectués dans un délai de 24 heures post-mortem, les résultats des concentrations en *C. perfringens* montrent que le groupe des sujets non entérotoxémie et le groupe des sujets suspects d'entérotoxémie sont indépendants. Nous n'avons pas obtenus de faux négatifs et de faux positifs témoignant d'une sensibilité et d'une spécificité optimales. Néanmoins, un échantillon plus important permettrait probablement de déterminer ces valeurs de manière plus significative.

Sur les 26 sujets suspects d'entérotoxémie, on note des concentrations en *C. perfringens* de 10^6 UFC/mL pour 3 sujets et des valeurs supérieures ou égales à 10^7 UFC/mL pour 23 sujets (10 sujets à 10^7 UFC/mL, 9 à 10^8 UFC/mL et 4 à 10^9 UFC/mL). La valeur seuil de 10^7 UFC/mL permet de déceler 23 sujets sur 26 suspects d'entérotoxémie. Elle a été définie comme concentration seuil suffisante pour permettre de confirmer une suspicion d'entérotoxémie et de limiter le nombre éventuel de faux positifs. En ce qui concerne les 22 sujets du groupe non entérotoxémie, 19 sujets ont une concentration iléale en *C.perfringens* inférieure ou égale à 10^4 UFC/mL (15 sujets à 10^3 UFC/mL et 4 sujets à 10^4 UFC/mL) et 3 sujets se situent au dessus de cette concentration. La valeur seuil de 10^4 UFC/mL est suffisante pour permettre d'exclure une entérotoxémie tout en limitant d'éventuel faux négatifs.

La confirmation diagnostique résulte de la comparaison des résultats d'analyses obtenus aux limites rapportées ci-dessus. Entre ces deux concentrations seuils, minimale et maximale, il appartient au praticien d'interpréter le résultat dans le contexte épidémiologique et nécropsique. En cas de forte suspicion un tel résultat permettra sa confirmation et son exclusion dans le cas contraire.

Tableau 14 : Synthèse des données de l'étude des concentrations iléales de *C.perfringens* à J+1 post-mortem en vue d'un diagnostic d'entérotoxémie

	<i>Concentration iléale de C.perfringens en UFC/mL à J+1 post-mortem</i>		
	$\leq 10^4$	$]10^4, 10^7[$	$\geq 10^7$
Nombre de sujets	19	6	23
Diagnostic entérotoxémie	Exclusion entérotoxémie	Exclusion ou confirmation d'entérotoxémie en fonction du contexte épidémio-clinique et nécropsique	Entérotoxémie

Les concentrations iléales en coliformes et flore totale aéro-anaérobie sont équivalentes entre des sujets suspects ou non d'entérotoxémie. Elles constituent un bon indicateur de la qualité du prélèvement dans des valeurs comprises entre $[10^7, 10^9]$ UFC/mL. D'après la bibliographie, la concentration intestinale en coliformes se situe entre 10^7 et 10^8 UFC/mL. Dans notre étude, deux sujets ont des concentrations en coliformes de 10^3 UFC/mL. Pour le sujet 5382, un traitement antibiotique ciblé sur les bactéries Gram – a été réalisé et a altéré cette population. En parallèle, le dénombrement de la flore totale aéro-anaérobie est compris dans les valeurs préalablement définies, montrant ainsi la bonne qualité de notre prélèvement. Le sujet 5666 possède aussi une concentration faible en coliformes, cependant la concentration semblable en flore totale aéro-anaérobie laisse supposer une moindre qualité du prélèvement.

En ce qui concerne les entérocoques intestinaux, les sujets positifs ont une concentration supérieure à celles des sujets négatifs. Cette différence s'explique par l'alimentation. Les rations riches en glucides rapidement fermentescibles (amidon) contribuent à développer des acidoses ruminales souvent présentes chez les sujets atteints d'entérotoxémie. Les différences observées de concentrations en entérocoques pour les sujets des deux groupes résultent des modifications physiologiques liées à l'acidose ruminale (pH acide, modification du transit). En effet, les entérocoques peuvent se développer dans des conditions hostiles expliquant une concentration supérieure chez les sujets atteints d'entérotoxémie. Les variations importantes de concentrations, entre sujets suspects ou non d'entérotoxémie ne permettent pas à la population d'entérocoques de constituer un bon indicateur de qualité du prélèvement.

Dans la deuxième partie expérimentale, il nous a semblé important de répéter à trois et cinq jours post-mortem le dénombrement des clostridies et de quelques fractions de la flore intestinale après conservation du prélèvement à + 4°C. Les résultats obtenus montrent l'absence de croissance des différentes populations bactériennes (coliformes, entérocoques et clostridies) après conservation à + 4°C pendant 4 jours. Ces résultats sont en accord avec les

études de DE JONG démontrant que la température minimale de croissance de *C. perfringens* est de +10°C [20]. Notre méthode de prélèvement d'anses intestinales a permis de maintenir stable le contenu intestinal dans son contenant tissulaire en limitant le contact avec l'oxygène de l'air grâce aux ligatures des extrémités des anses. Ce délai de conservation du prélèvement est plus important que celui de 24 heures post-mortem décrit dans la littérature [70, 71]. La différence de technique de prélèvements, entre le contenu intestinal dans un flacon stérile rempli à ras bord et des anses intestinales ligaturées aux deux extrémités avec son contenu intestinal, rend difficile la comparaison de ces délais de conservation. Cette durée de conservation est intéressante en pratique car elle permet aux vétérinaires d'effectuer un prélèvement sous 24 heures post-mortem et de le transmettre sous conditionnement à + 4°C. Le laboratoire dispose de 4 jours à partir de l'envoi du prélèvement pour effectuer l'analyse bactériologique. Le dénombrement des clostridies n'est pas modifié permettant alors une interprétation des résultats pour un diagnostic d'entérotoxémie.

C. Conclusion et perspectives

L'examen bactériologique nécessite l'identification et le dénombrement intestinal de *C. perfringens* chez les ruminants. Cette méthode permet à partir de valeurs seuils de concentrations en *C. perfringens* d'établir un diagnostic d'entérotoxémies. Dans notre étude, le dénombrement de quelques fractions bactériennes de l'intestin (coliformes et flore totale) a été effectué en plus des clostridies dans le but de vérifier la qualité de notre prélèvement. La flore aéro-anaérobie et les coliformes contribuent par leur dénombrement iléale à effectuer un contrôle de qualité des prélèvements.. Selon notre essai, des valeurs seuils de concentrations en *C. perfringens* dans le contenu intestinal inférieures à 10⁴ UFC/mL et supérieures à 10⁷ UFC/mL permettent d'exclure ou de confirmer une entérotoxémie, jusqu'à 24 heures post-mortem. Le prélèvement peut être conservé durant 4 jours à une température de +4°C jusqu'à analyse bactériologique. L'influence du délai post-mortem et des modalités de conservation des prélèvements sont les points pour lesquels la sensibilité et la spécificité de l'analyse bactériologique étaient auparavant discutables. Notre étude répond à ces interrogations et démontre que cette méthode peut contribuer de façon simple et peu coûteuse à établir un diagnostic d'entérotoxémie à partir d'une suspicion établie sur les bases épidémiologiques, cliniques et nécropsiques.

Notre étude a permis de montrer que le délai de 24 heures entre la mort du ruminant et le dénombrement intestinal de *C. perfringens* ne constitue pas un inconvénient afin d'établir un diagnostic de certitude d'entérotoxémie. Ainsi il semblerait intéressant d'étudier pour quel délai supérieur à celui-ci, notre méthode pourrait être validée.

CONCLUSION

Nous avons conduit une étude visant à vérifier la validité d'une technique de laboratoire de confirmation d'une forte suspicion d'entérotoxémie.

Il s'agit du dénombrement de la concentration iléale de *Clostridium perfringens* réalisé sur un prélèvement effectué 24 heures post-mortem. Notre étude a porté sur 26 ruminants très fortement suspects cliniquement d'entérotoxémie et 22 ruminants pour lesquels ce diagnostic était exclu avec certitude.

Nos résultats démontrent qu'une concentration iléale en *Clostridium perfringens* supérieure ou égale à 10^7 unités formant colonies par millilitre de liquide intestinal permet le diagnostic de certitude. Cette concentration reste stable dans le prélèvement conservé au réfrigérateur jusqu'à 4 jours après la mort. A l'inverse, les résultats obtenus sur les animaux non atteints d'entérotoxémie permettent d'exclure ce diagnostic 15 fois sur 22 au seuil de concentration de 10^3 unités formant colonies par millilitre et 19 fois sur 22 au seuil de 10^4 unités formant colonies par millilitre. Cette méthode d'analyse simple et peu coûteuse de mise en œuvre est parfaitement adaptée aux contraintes de la pratique vétérinaire quotidienne.

Elle doit être préconisée plutôt qu'une méthode de biologie moléculaire à chaque fois qu'il s'agit d'une confirmation clinique et non pas d'une étude épidémiologique.

Professeur P. BÉZILLE
Pathologie du Bétail
E.N.V. LYON
Tél. 04 78 87 26 00

Le Professeur responsable
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

 27/11/06

Le Président de la thèse



Vu : Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

LE DIRECTEUR


Stéphane MARTINOT

Vu et permis d'imprimer
Lyon, le **10 DEC. 2008**

Pour Le Président de l'Université
Le Président du Comité de Coordination
Des Etudes Médicales

Professeur F.N GILLY



ANNEXE 1 :

Synthèse des données épidémiocliniques et nécropsiques des sujets du groupe « entérotoxémie »

N° enregistrement	Espèce	Age	Commémoratif Anamnèse	Mort subite	Autopsie	Analyse post mortem	Site de prélèvement	Diagnostic
4335	Bovin charolais	10 mois	<u>Alimentation</u> : Ensilage de maïs	oui	Bon état général <u>Grandes cavités</u> : liquide séro-hémorragique péritonéale et péricardique Rumen : pH acide (5-6), congestion <u>Intestin grêle</u> : congestion et contenu séro-hémorragique Foie, rein : pâles et mous	J1	Iléon	Forte suspicion d'entérotoxémie
4407	Caprin	12 jours	-Chevreaux cases communes -14 morts sur 21 à 10j âge -Changement de lait à 6j -Mort en ½ journée Clinique : diarrhée	oui	Bon état général <u>Intestin</u> : contenu intestinal séro-hémorragique Reins : pulpeux	J1	Iléon	Forte suspicion d'entérotoxémie
4420	Bovin charolais	7 ans	-Vaches en décubitus antemortem	oui	Bon état engraissement Foie, reins : dégénérescence, pâles Intestin grêle : congestion, contenu séro-hémorragique	J1	Iléon	Forte suspicion d'entérotoxémie

N° enregistrement	Espèce	Age	Commémoratif Anamnèse	Mort subite	Autopsie	Analyse post mortem	Site de prélèvement	Diagnostic
4474	Ovin	6 mois	<u>Alimentation</u> : Herbe pâture depuis mars - pas de vaccination <u>Vermifugation</u> netobimin	oui	Autolyse avancée	J1	Iléon	Forte suspicion d'entérotoxé -mie
4618	Bovin charolais	2 jours	-Aux prés -6 morts	oui	<u>Yeux</u> : Enophtalmie prononcée <u>Poumons</u> : congestion <u>Intestin grêle</u> : contenu liquide, hémorragique, NL hypertrophiés <u>Foie</u> : autolyse <u>Reins</u> : noir, consistance ↓	J1	Iléon	Forte suspicion d'entérotoxé -mie
4672	Caprin chamoisé	7 jours	-10 morts dont 4 morts subites	oui	Bon état engraissement <u>Poumons</u> : congestion et œdème <u>Intestin grêle</u> : contenu séro-hémorragique <u>Foie</u> : consistance ↓	J1	Iléon	Forte suspicion d'entérotoxé -mie

N° enregistrement	Espèce	Age	Commémoratif Anamnèse	Mort subite	Autopsie	Analyse post mortem	Site de prélèvement	Diagnostic
4795	Bovin holstein	3 jours	-8 veaux morts sur 19 veaux	oui	Bon état général Poumon : densification congestivo-hémorragique cranio ventrale sur les 2 poumons Intestin grêle : congestion-hémorragique avec contenu séro-hémorragique	J1	Iléon	Forte suspicion d'entérotoxémie
4890	Bovin montbéliard	6 mois	- Engraissement Clinique : meugle, débat	oui	Intestin grêle : dilatés Cœur : pétychies sous endocardiques et sous épicaardiques Foie, reins : consistance ↓	J1	Iléon	Forte suspicion d'entérotoxémie
4987	Caprin	4-5 mois	-6 morts brutales Alimentation : foin, luzerne, ensilage de maïs, orge Clinique : diarrhée profuse	oui	Etat général : animal très gras Foie : stéatose Intestin grêle : entérite congestivo hémorragique Rumen : pH acide 5 Rein : consistance ↓, « pulpeux »	J1	Iléon	Forte suspicion d'entérotoxémie

N° enregistrement	Espèce	Age	Commemoratif Anamnèse	Mort subite	Autopsie	Analyse post mortem	Site de prélèvement	Diagnostic
5094	Bovin holstein	6 j	-2 veaux morts avec un symptôme diarrhéique	oui	Etat général : déshydraté (enophtalmie) Caillette : congestion Intestin grêle : congestion, contenu hémorragique Foie, rein : consistance ↓	J1	Iléon	Forte suspicion d'entérotoxé-mie
5128	Bovin holstein	10 ans	-vache de réforme, ration riche en concentrés	oui	Etat général : très gras Rumen : pH 5 Foie : hépatomégalie, friable, petites douves Poumon : œdème, congestion Cœur : pétéchies, suffusions sous épocardiques	J1, J3, J5	Iléon	Forte suspicion d'entérotoxé-mie
5137	Bovin montbéliard	8 ans	-Gestante -2 morts subites en un mois -Pas vaccination Alimentation : pas de transition alimentaire	oui	Intestin grêle : congestion intestinale avec contenu +/- hémorragique Cœur : Pétéchies sous endocardique Foie : consistance ↓ Poumon : Pneumonie aiguë Oesophagostomose	J1	Ileon	Forte suspicion d'entérotoxé-mie

N° enregistrement	Espèce	Age	Commémoratif Anamnèse	Mort subite	Autopsie	Analyse post mortem	Site de prélèvement	Diagnostic
5195	Bovin montbéliard	2 ans	-2 cas de morts subites aux près en 3mois Alimentation : foin + ensilage d'herbe + ensilage de maïs	oui	Bon état général Cœur : suffusions hémorragiques sous épocardiques Rumen : ruminite Reins, foie : autolyse Intestin grêle : dilatés + contenu hémorragique	J1, J3, J5	Ileon	Forte suspicion d'entérotoxémie
5258	Bovin holstein	2 mois	Aucun élément rapporté	oui	Très bon état général Grandes cavités : liquide séro-hémorragique dans cavité péritonéale et pleurale Cœur : suffusion sous endocardiques Rumen : pH 4 Intestin grêle : congestion hémorragique, contenu hémorragique Reins : « pulpeux »	J1	Ileon	Forte suspicion d'entérotoxémie

N° enregistrement	Espèce	Age	Commemoratif Anamnèse	Mort subite	Autopsie	Analyse post mortem	Site de prélèvement	Diagnostic
5293	Bovin charolais	12 ans	-animaux destinés à la réforme dans un pré de prairies naturelles + concentrés -2 morts subites	oui	Bon état général Reins : consistance ↓ Rate : boueuse Foie : hépatomégalie Intestin grêle : dilatés, contenu hémorragique	J1	Iléon	Forte suspicion d'entérotoxé-mie
5303	Bovin limousin	15 jours	- mort au pré	oui	Bon état général Grandes cavités : liquide séro-hémorragique dans cavité abdominale Cœur : suffusions sous épocardiques Intestin grêle : entérite hémorragique, dilaté	J1	Iléon	Forte suspicion d'entérotoxé-mie
5376	Bovin Mont-béliarde	6 mois	-quelques animaux météorisations -Mort aux prés	oui	Très bon état général Foie, rate, reins : autolyses. Intestin grêle : congestion, distension gazeuse, contenu séro-hémorragique Rumen : pH 4, ruminite	J1	Iléon	Forte suspicion d'entérotoxé-mie

N° enregistrement	Espèce	Age	Commémoratif Anamnèse	Mort subite	Autopsie	Analyse post mortem	Site de prélèvement	Diagnostic
5466	Bovin Charolaise	4 mois	- mort au pré	oui	Bon état général Rumen, caillette : congestion Intestin grêle : congestion, distendu gaz, contenu séro-hémorragique	J1	Iléon	Forte suspicion d'entérotoxémie
5468	Bovin Charolaise	1 mois	- mort au pré Clinique : coliques sourdes	oui	Bon état général Grandes cavités : liquide séro-hémorragique dans cavité abdominale Cœur : suffusions sous endocardique Intestin grêle: hémorragie, congestion, lésions dégénératives Caillette : caillot de lait Rate : « boueuse » Foie, reins : autolyse	J1	Iléon	Forte suspicion d'entérotoxémie

N° enregistrement	Espèce	Age	Commémoratif Anamnèse	Mort subite	Autopsie	Analyse post mortem	Site de prélèvement	Diagnostic
5498	Ovin	5 ans	<u>Alimentation</u> : Foin, tritricale, ration non équilibrée <u>Clinique</u> : décubitus, port de tête absent, amaurose, convulsion.	oui	Très bon état général <u>Grandes cavités</u> : liquide séro-hémorragique cavité péritonéale <u>Foie, poumon</u> : congestionnés <u>Reins</u> : « pulpeux » <u>Cœur</u> : pétéchies sous épicaudiques <u>Rate</u> : hypertrophie <u>Rumen</u> : pH=5 <u>Intestin grêle</u> : congestion proximale, muqueuse hémorragique	J1, J3, J5	Duodénum jéjunum Iléon	Forte suspicion d'entérotoxé -mie
5734	Bovin Montbéliarde	2 ans	-Au pré : prairie naturelle <u>Clinique</u> : opisthotonos, pédalage, convulsion	oui	Bon état engraissement <u>Cœur</u> : suffusion séro-hémorragiques péricardique <u>Intestin grêle</u> : autolyse, dilatation gaz, contenu séro-hémorragique <u>Foie</u> : autolyse	J1	Ileon	Forte suspicion d'entérotoxé -mie

N° enregistrement	Espèce	Age	Commémoratif Anamnèse	Mort subite	Autopsie	Analyse post mortem	Site de prélèvement	Diagnostic
5752	Bovin Limousine	6 mois	- Veau au pré Alimentation : Foin + concentré - Pas vaccination - Pas de traitement	oui	Bon état général Esophage : ulcères en coup d'ongles Caillette : congestion Intestin grêle : entérite congestivo-hémorragique Colon : Trichures Foie : hépatomégalie	J1, J3, J5	Duodénum jéjunum iléon	BVD + Forte suspicion d'entérotoxémie
5788	Bovin Holstein	4 ans	Aucun élément rapporté	oui	Très bon état général Reins : consistance ↓ Foie : friable Rumen : ruminite, pH 5 Intestin dilaté : dilatés par gaz, congestion, contenu hémorragique	J1	Iléon	Forte suspicion d'entérotoxémie

N° enregistrement	Espèce	Age	Commémoratif Anamnèse	Mort subite	Autopsie	Analyse post mortem	Site de prélèvement	Diagnostic
5829	Caprin	2 ans	Aucun élément rapporté	oui	Bon état d'engraissement Rumen, caillette : congestion Intestin grêle : congestion hémorragique, contenu séro-hémorragique NL : congestion, hémorragique	J1	Iléon	Forte suspicion d'entérotoxémie
5904	Bovin charolais	2 mois	Clinique : décubitus, diarrhée, dilatation abdominale	oui	Très grasse Foie : friable Cœur : pétéchies sous endocardiques Intestin grêle : lésions dégénératives et hémorragiques, contenu hémorragique	J1	Iléon	Forte suspicion d'entérotoxémie
5906	Ovin charolais	3 s	-pas de vaccination	oui	bon état général Intestin grêle : congestion, contenu séro-hémorragique Reins : autolyse Urine : glucosurie	J1, J3, J5	Duodénum, Iléon, jéjunum	Forte suspicion d'entérotoxémie

ANNEXE 2 :

Synthèse des données épidémiologiques et nécropsiques des sujets du groupe « non entérotoxémie »

N° enregistrement	Espèce	Age	Commémoratif Anamnèse	Mort subite	Autopsie	Analyse post mortem	Site de prélèvement	Diagnostic
44440	Bovin charolais	5 mois	-2 veaux morts -Vaccination grippe Clinique : dyspnée, toux, jetage, hyperthermie	non	Bon état engraissement Muscles : pâles Poumons : lésions bronchopneumonie lobes antérieurs Intestin grêle : Congestion, hémorragie	J1	Iléon	Broncho-pneumonie
44449	Bovin mont-béliard	3 s	-Cryptosporidiose sur élevage -Diarrhée sur des veaux âgés de 15 j à 3 s Clinique : hyperthermie, diarrhée profuse et continue, déshydratation Traitement : halofuginone, kaomycine, Ca, P, Vit E, Se	non	Bon état engraissement Caillette : dilatée par gaz Rumen : exculcérations, lait caillé Coloration Ziehl-Neelsen : +++	J1	Iléon	Cryptosporidiose

N° enregistrement	Espèce	Age	Commémoratif Anamnèse	Mort subite	Autopsie	Analyse post mortem	Site de prélèvement	Diagnostic
4740	Bovin holstein	3 mois	-2 génisses présentant symptômes nerveux Clinique : Génisse en décubitus latéral, amaurose convulsions, opisthotonos, pousser au mur, grincement de dents, diarrhée Traitement : solution parentérale (sorbitol + dextrose), ampicilline + acide clavulanique	non	Etat engraissement correct Intestin grêle : pas de lésions Foie : Rouge sombre, consistance normale Reins : bruns clairs Dosage du plomb (foie) : 80ppm (VU < 10 ppm)	J1	Iléon	Intoxication au plomb
4826	Bovin charolais	2 mois	Abandon à l'ENVL Amputation du membre antérieur gauche (ostéite des phalanges)	T 61®	Etat corporel : maigre Foie, reins, NL mésentériques : décolorés, consistance normale Intestin : congestion iléon, caecum	J1, J3, J5	Duodénum, Jéjunum Iléon	Post chirurgie

N° enregistré-	Espèce	Age	Commémoratif Anamnèse	Mort subite	Autopsie	Analyse post mortem	Site de prélèvement	Diagnostic
5009	Ovin		-Problème de ration : faible concentration énergétique de la ration Clinique : femelle gestante prêt à agneler, anorexie, abattement	non	Etat de cachexie Intestin grêle : congestion Foie : friable Utérus : jumaux	J1	Iléon	Toxémie de gestation
5179	Bovin charolais	5 jours	- pas de vaccination	oui	Bon état général Poumons, trachée : œdème agonique Cœur : pâle (décoloration blanchâtre et striée) des ventricules Muscles : décoloration (cuisse) Intestin grêle : dilaté	J1	Iléon	Carence vitE/ sélénium

N° enregistrement	Espèce	Age	Commemoratif Anamnèse	Mort subite	Autopsie	Analyse post mortem	Site de prélèvement	Diagnostic
5228	Bovin holstein	4 ans	-6 cas de fièvre vitulaire Clinique: décubitus latéral, paralysie langue, anorexie, arumination, Urine: corps cétoniques ++++ Traitement: solution parentérale de calcium + magnésium, tétracycline, dexaméthasone	non	Etat général: très grasse Rumen: pH 4 Intestin grêle: anses dilatées Utérus: métrite aigue Cœur: péricardite, myocardite Poumon: congestion, œdème	J1	Iléon	Vache grasse + Péricardite
5241	Ovin	8 jours	-6 agneaux morts à 10 j Clinique: diarrhée, hyperthermie, amaigrissement	non	Etat général: cachexie Cœur: disparition graisse coronaire NL: hypertrophie des mésentériques Membres: arthrite du carpe droit Intestin grêle: contenu liquidien non hémorragique	J1	Iléon	Collibacillose septicémique

N° enregistré-ment	Espèce	Age	Commémoratif Anamnèse	Mort subite	Autopsie	Analyse post mortem	Site de prélèvement	Diagnostic
5360	Bovin mont-béliard	4 ans	<u>Clinique</u> : anorexie totale, melaena, anémie, souffle cardiaque	T61®	Bon état général <u>Rumen</u> : contenu sec + glands <u>Intestin grêle</u> : boudin de sang sur 30 cm dans jéjunum <u>Reins</u> : pâles	J1	Iléon	Intoxication au gland
5382	Bovin charolais	1 mois	<u>Clinique</u> : Diarrhée, ataxie animal ballonné (gastroplogie) <u>Traitement</u> : céphalosporine + colistine, réhydratation parentérale (soluté Ringer Lactate ®)	non	<u>Carcasse</u> : séreuses blanches <u>Caillette</u> : 2 ulcères <u>Intestin grêle</u> : contenu liquidien jaune <u>Reins</u> : néphrite chronique et infarctus	J1	Iléon	Gastro-entérite-néonatale paralysante
5415	Bovin charolais	2 mois	<u>Alimentation</u> : ensilage de maïs, herbe, concentré, foin à volonté <u>Clinique</u> : amaigrissement, diarrhée hémorragique, couché, convulsions <u>Traitement</u> : benzylpénicilline + dihydrostreptomycine, dexaméthasone, decoquinane	T61®	Hydrocachexie <u>NL</u> : méésentériques hypertrophiés <u>Intestin grêle</u> : congestionné	J1	Iléon	Entérite chronique (coccidiose)

N° enregistrement	Espèce	Age	Commemoratif Anamnèse	Mort subite	Autopsie	Analyse post mortem	Site de prélèvement	Diagnostic
5615	Bovin charolais	6 jours	-4 veaux morts Clinique: dyspnée, œdème pulmonaire Traitement: furosemide, benzylpenicilline + neomycine, methylprednisolone	non	Bon état général Poumons: consistance augmentée, congestion lobes antérieurs Intestin grêle: dilaté Foie: autolyse	J1	Iléon	Suspicion RSV
5618	Ovin suffolk	1 mois	Clinique: ataxie, raideur des postérieurs, dyspnée	non	Très bon état général Muscles: décoloration blanchâtre en plages des masses musculaires (cuisse, lombaire, myocarde) Foie: clair, friable	J1	Iléon	Carence vitamine E et sélénium

N° enregistré-ment	Espèce	Age	Commémoratif Anamnèse	Mort subite	Autopsie	Analyse post mortem	Site de prélèvement	Diagnostic
5666	Bovin holstein	5 ans	<p>Clinique : lait (jaune), quartier (congestion), T= 40.7°C, diarrhée</p> <p>Traitement : marbofloxacin, flunixin Intramammaire : cefquinome</p>	non	<p>Mamelle : mammite quartier antérieur et postérieur gauche</p> <p>Foie : petites douves</p> <p>Intestin grêle : congestion diffuse</p>	J1	Iléon	Mammite toxigène
5789	Bovin mont-béliard	3 mois	<p>-Arthrite suppurée depuis 3 semaines</p> <p>Clinique : abattement, difficulté ambulatoire, diarrhée, anorexie</p>	T61®	<p>Etat général correct</p> <p>Membres : arthrite suppurée du carpe gauche</p> <p>Intestin : dilaté</p> <p>Reins : autolyse</p>	J1, J3, J5	Duodé-num, jéjunum, iléon	Arthrite carpe gauche

N° enregistrement	Espèce	Age	Commemoratif Anamnèse	Mort subite	Autopsie	Analyse post mortem	Site de prélèvement	Diagnostic
5805 a	Ovin	2 ans	-Brebis malades fin de gestation Clinique : abdomen dilaté, arrêt rumination Traitement : acide propionique + noix vomique, bicarbonate, méthio B12, propylène glycol	non	Très grasse Utérus : triplé, fin de gestation Foie : jaune, mou, consistance ↓ Poumons : densification rouge des lobes antérieurs, moyens. Cœur : pétéchies sous endocardiques	J1	Iléon	Toxémie de gestation
5805 b	Ovin	5 ans	Aucun élément rapporté	non	Très grasse Utérus : fin de gestation : jumeaux Foie : rouge, mou, consistance diminué Poumons : densification lobes craniaux	J1	Iléon	Toxémie de gestation

N° enregistré-ment	Espèce	Age	Commémoratif Anamnèse	Mort subite	Autopsie	Analyse post mortem	Site de prélèvement	Diagnostic
5869	Ovin	1 mois	-3 agneaux morts dans le mois Clinique : dyspnée, hyperthermie, décubitus latéral, anorexie	non	Mauvais état général Cœur : liquide séreux dans la cavité péricardique (péricardite), lésions blanchâtres sous endocardiques Poumons : pleuropneumonie	J1, J3, J5	Duodénum, jéjunum, iléon	Péricardite (mycoplasme)
5876	Bovin charolais	15 ans	Clinique : abatement, anorexie, atonie du rumen,	non	Animal déshydraté Rumen : dilaté Caillette : dilatée Foie, reins : brun clair, consistance ↓ Cœur : pétéchiés sous épocardiques et suffusions sous endocardiques Foie, reins : autolyse	J1, J3, J5	Duodénum, jéjunum, iléon	Syndrome hôflund

N° enregistrement	Espèce	Age	Commémoratif Anamnèse	Mort subite	Autopsie	Analyse post mortem	Site de prélèvement	Diagnostic
5877	Bovin mont-béliard	4 ans	Alimentation : Ensilage maïs et herbe + foin Clinique : arumination, anorexie, diarrhée, gestante 8 mois, amaigrissement Détecteur de métal : positif Traitement : aimant, acide propionique + noix vomique, florfenicol, paraffine, flunixin, L-ornithine, L-citrulline, L-arginine, sorbitol	non	Mauvais état général Grandes cavités : Péritonite Utérus : gestante 8 mois Caillette : ulcère Intestin : Foyers hémorragiques sur le colon Foie : jaune clair, stéatose	J1, J3, J5	Duodénum, jéjunum, iléon	Corps étrangers + hépatose puerpérale
5900	Ovin	1 mois	Aucun élément rapporté	oui	Bon état général Grandes cavités : caillot de sang et liquide séro-hémorragique à proximité du foie Foie : rupture faces viscérales et diaphragmatiques, rouge bordeaux Intestin : dilaté, congestion	J1	Iléon	Hémorragie interne (rupture hépatique)

N° enregistré-ment	Espèce	Age	Commémoratif Anamnèse	Mort subite	Autopsie	Analyse post mortem	Site de prélèvement	Diagnostic
5912	Caprin	6 mois	diarrhée depuis plusieurs jours, anorexie Clinique : hyperthermie, déshydratation, diarrhée.	non	Bon état général Caillette et caecum : piquetés hémorragiques Rate : hypertrophiée Intestin grêle : contenu liquidien jaune	J1	Iléon	Entérite colibacillaire

ANNEXE 3

Tableau 15 : Résultats du dénombrement iléal en *C. perfringens* des sujets suspects ou non d'entérotoxémies à J+1 post-mortem

N°identification	Espèce	LOG 10 [Clostridies]	Statu t
4440	bovine	3,60	Sujet non suspect d'entérotoxémie
4449	bovine	3	Sujet non suspect d'entérotoxémie
4740	bovine	3	Sujet non suspect d'entérotoxémie
4826	bovine	3	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5009	ovine	3	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5179	bovine	3,47	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5228	bovine	4	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5241	ovine	4,84	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5360	bovine	4	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5382	bovine	3,77	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5415	bovine	4	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5615	bovine	3	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5618	ovine	3	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5666	bovine	5	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5789	bovine	3	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5869	bovine	3,47	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5876	bovine	3	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5877	bovine	3	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5900	ovine	3	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5912	caprine	4,47	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5805 a	ovine	4	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5805 b	ovine	3	Sujet non suspect d'entérotoxémie
4335	bovine	8,69	Sujet suspect d'entérotoxémie
4407	caprine	6,30	Sujet suspect d'entérotoxémie
4420	bovine	6	Sujet suspect d'entérotoxémie
4474	ovine	7,84	Sujet suspect d'entérotoxémie
4618	bovine	9,30	Sujet suspect d'entérotoxémie
4672	caprine	7	Sujet suspect d'entérotoxémie
4795	bovine	8,60	Sujet suspect d'entérotoxémie
4890	bovine	9	Sujet suspect d'entérotoxémie

**Tableau 15 bis : Résultats du dénombrement iléal en *C. perfringens* des sujets suspects
ou non d'entérotoxémies à J+1 post-mortem**

N°identification	Espèce	LOG 10 [Clostridies]	Statu t
4987	caprine	8	Sujet suspect d'entérotoxémie
5094	bovine	6,30	Sujet suspect d'entérotoxémie
5128	bovine	7	Sujet suspect d'entérotoxémie
5137	bovine	7,30	Sujet suspect d'entérotoxémie
5195	bovine	8	Sujet suspect d'entérotoxémie
5293	bovine	8,30	Sujet suspect d'entérotoxémie
5303	bovine	7,30	Sujet suspect d'entérotoxémie
5376	bovine	7,69	Sujet suspect d'entérotoxémie
5466	bovine	8,77	Sujet suspect d'entérotoxémie
5468	bovine	7,30	Sujet suspect d'entérotoxémie
5498	ovine	8	Sujet suspect d'entérotoxémie
5734	bovine	7	Sujet suspect d'entérotoxémie
5752	bovine	9	Sujet suspect d'entérotoxémie
5788	bovine	7,30	Sujet suspect d'entérotoxémie
5829	caprine	8,30	Sujet suspect d'entérotoxémie
5904	bovine	8,69	Sujet suspect d'entérotoxémie
5258	bovine	9	Sujet suspect d'entérotoxémie
5906	ovine	7,47	Sujet suspect d'entérotoxémie

ANNEXE 4

Tableau 16 : Résultats du dénombrement iléale en coliformes des sujets non entérotoxémies à J+1 post-mortem

N° identification	Espèce	LOG 10 [Coliformes]	Statut
4440	bovine	9,60	Sujet non suspect d'entérotoxémie
4449	bovine	8,60	Sujet non suspect d'entérotoxémie
4740	bovine	9,00	Sujet non suspect d'entérotoxémie
4826	bovine	9,48	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5009	ovine	6,95	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5179	bovine	9,70	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5228	bovine	8,70	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5241	ovine	8,70	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5360	bovine	7,90	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5382	bovine	3,30	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5415	bovine	5,00	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5615	bovine	6,60	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5618	ovine	8,48	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5666	bovine	3,30	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5789	bovine	8,30	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5869	bovine	7,48	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5876	bovine	7,70	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5877	bovine	8,95	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5900	ovine	5,78	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5912	caprine	8,48	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5805 a	ovine	9,30	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5805 b	ovine	9,30	Sujet non suspect d'entérotoxémie
4335	bovine	6,30	Sujet suspect d'entérotoxémie
4407	caprine	8,48	Sujet suspect d'entérotoxémie
4420	bovine	8,70	Sujet suspect d'entérotoxémie
4474	ovine	8,00	Sujet suspect d'entérotoxémie
4618	bovine	9,30	Sujet suspect d'entérotoxémie
4672	caprine	8,60	Sujet suspect d'entérotoxémie
4795	bovine	7,00	Sujet suspect d'entérotoxémie
4890	bovine	7,60	Sujet suspect d'entérotoxémie
4987	caprine	9,30	Sujet suspect d'entérotoxémie

Tableau 16 bis: Résultats du dénombrement iléale en coliformes des sujets non entérotoxémies à J+1 post-mortem

N°identification	Espèce	LOG 10 [Coliformes]	Statut
5094	bovine	8,90	Sujet suspect d'entérotoxémie
5128	bovine	7,70	Sujet suspect d'entérotoxémie
5137	bovine	8,48	Sujet suspect d'entérotoxémie
5195	bovine	9,60	Sujet suspect d'entérotoxémie
5293	bovine	7,00	Sujet suspect d'entérotoxémie
5303	bovine	5,30	Sujet suspect d'entérotoxémie
5376	bovine	8,78	Sujet suspect d'entérotoxémie
5466	bovine	9,60	Sujet suspect d'entérotoxémie
5468	bovine	9,00	Sujet suspect d'entérotoxémie
5498	ovine	8,48	Sujet suspect d'entérotoxémie
5734	bovine	7,30	Sujet suspect d'entérotoxémie
5752	bovine	7,48	Sujet suspect d'entérotoxémie
5788	bovine	7,30	Sujet suspect d'entérotoxémie
5829	caprine	5,30	Sujet suspect d'entérotoxémie
5904	bovine	8,60	Sujet suspect d'entérotoxémie
5258	bovine	6,90	Sujet suspect d'entérotoxémie
5906	ovine	10,00	Sujet suspect d'entérotoxémie

ANNEXE 5

Tableau 17 : Résultats du dénombrement iléal en entérocoques des sujets non entérotoxémies à J+1 post-mortem

N°identification	Espèce	LOG 10 [Entérocoques]	Stat ut
4440	bovine	4	Sujet non suspect d'entérotoxémie
4449	bovine	3	Sujet non suspect d'entérotoxémie
4740	bovine	3,47	Sujet non suspect d'entérotoxémie
4826	bovine	3	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5009	ovine	3,47	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5179	bovine	6	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5228	bovine	4,69	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5241	ovine	5,60	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5360	bovine	3,30	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5382	bovine	8,30	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5415	bovine	3	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5615	bovine	6,30	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5618	ovine	4,47	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5666	bovine	4,47	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5789	bovine	3	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5869	bovine	3,30	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5876	bovine	3	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5877	bovine	3,30	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5900	ovine	4	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5912	caprine	4,95	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5805 a	ovine	7,60	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5805 b	ovine	4,69	Sujet non suspect d'entérotoxémie
4335	bovine	3	Sujet suspect d'entérotoxémie
4407	caprine	8,77	Sujet suspect d'entérotoxémie
4420	bovine	5	Sujet suspect d'entérotoxémie
4474	ovine	5,84	Sujet suspect d'entérotoxémie
4618	bovine	7,30	Sujet suspect d'entérotoxémie
4672	caprine	7,60	Sujet suspect d'entérotoxémie
4795	bovine	8,90	Sujet suspect d'entérotoxémie
4890	bovine	6,30	Sujet suspect d'entérotoxémie
4987	caprine	8,47	Sujet suspect d'entérotoxémie

Tableau 17 bis : Résultats du dénombrement iléal en entérocoques des sujets suspects ou non entérotoxémies à J+1 post-mortem

N°identification	Espèce	LOG 10 [Entérocoques]	Stat ut
5094	bovine	7	Sujet suspect d'entérotoxémie
5128	bovine	8	Sujet suspect d'entérotoxémie
5137	bovine	5,30	Sujet suspect d'entérotoxémie
5195	bovine	7	Sujet suspect d'entérotoxémie
5293	bovine	5,69	Sujet suspect d'entérotoxémie
5303	bovine	6,30	Sujet suspect d'entérotoxémie
5376	bovine	4,30	Sujet suspect d'entérotoxémie
5466	bovine	7,47	Sujet suspect d'entérotoxémie
5468	bovine	7,95	Sujet suspect d'entérotoxémie
5498	ovine	7	Sujet suspect d'entérotoxémie
5734	bovine	3,30	Sujet suspect d'entérotoxémie
5752	bovine	4,47	Sujet suspect d'entérotoxémie
5788	bovine	3	Sujet suspect d'entérotoxémie
5829	caprine	6,90	Sujet suspect d'entérotoxémie
5904	bovine	6,69	Sujet suspect d'entérotoxémie
5258	bovine	6	Sujet suspect d'entérotoxémie
5906	ovine	4	Sujet suspect d'entérotoxémie

ANNEXE 6

Tableau 18 : Résultats du dénombrement iléal de la flore totale des sujets suspects ou non entérotoxémies à J+1 post-mortem

N° identification	Espèce	LOG 10 [Flore totale]	Stat ut
4440	bovine	9,60	Sujet non suspect d'entérotoxémie
4449	bovine	7,60	Sujet non suspect d'entérotoxémie
4740	bovine	8	Sujet non suspect d'entérotoxémie
4826	bovine	9,30	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5009	ovine	8,47	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5179	bovine	9	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5228	bovine	8,60	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5241	ovine	8,84	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5360	bovine	8,47	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5382	bovine	8	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5415	bovine	7,47	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5615	bovine	8,30	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5618	ovine	8,95	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5666	bovine	6	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5789	bovine	8,84	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5869	bovine	8,60	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5876	bovine	7,47	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5877	bovine	9,30	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5900	ovine	5,77	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5912	caprine	8,69	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5805 a	ovine	9,84	Sujet non suspect d'entérotoxémie
5805 b	ovine	9,30	Sujet non suspect d'entérotoxémie
4335	bovine	8,69	Groupe 1
4407	caprine	8,90	Sujet suspect d'entérotoxémie
4420	bovine	9	Sujet suspect d'entérotoxémie
4474	ovine	8,47	Sujet suspect d'entérotoxémie
4618	bovine	9,30	Sujet suspect d'entérotoxémie
4672	caprine	9	Sujet suspect d'entérotoxémie
4795	bovine	8,95	Sujet suspect d'entérotoxémie
4890	bovine	7,47	Sujet suspect d'entérotoxémie
4987	caprine	9,69	Sujet suspect d'entérotoxémie

Tableau 18 bis : Résultats du dénombrement iléal de la flore totale des sujets suspects ou non entérotoxémies à J+1 post-mortem

N°identification	Espèce	LOG 10 [Flore totale]	Stat ut
5094	bovine	9	Sujet suspect d'entérotoxémie
5128	bovine	8,30	Sujet suspect d'entérotoxémie
5137	bovine	8,60	Sujet suspect d'entérotoxémie
5195	bovine	9,60	Sujet suspect d'entérotoxémie
5293	bovine	7,30	Sujet suspect d'entérotoxémie
5303	bovine	6,77	Sujet suspect d'entérotoxémie
5376	bovine	8,69	Sujet suspect d'entérotoxémie
5466	bovine	9,60	Sujet suspect d'entérotoxémie
5468	bovine	9	Sujet suspect d'entérotoxémie
5498	ovine	8,84	Sujet suspect d'entérotoxémie
5734	bovine	7,47	Sujet suspect d'entérotoxémie
5752	bovine	8,47	Sujet suspect d'entérotoxémie
5788	bovine	8	Sujet suspect d'entérotoxémie
5829	caprine	8	Sujet suspect d'entérotoxémie
5904	bovine	8,77	Sujet suspect d'entérotoxémie
5258	bovine	7	Sujet suspect d'entérotoxémie
5906	ovine	10	Sujet suspect d'entérotoxémie

ANNEXE 7

Tableau 19 : Récapitulatif des valeurs logarithmiques des concentrations de la flore intestinale à différentes portions de l'intestin grêle après conservation à + 4°C en fonction du délai post-mortem du prélèvement et du statut des sujets

N° identification	Espèce	LOG 10 FT	LOG 10 Coli	LOG 10 Entero	LOG 10 Clostridies	Site	Temps (jours)	Sujets
5752	B	7,84	7,60	5,47	8,30	D	1	M
5904	B	8,47	8	7,30	8	D	1	M
5906	O	8,84	8,84	4	5,69	D	1	M
5498	O	9	9,60	3,60	5	D	1	M
5789	B	7,60	7,30	3	3	D	1	S
5869	B	8,30	7,84	3,30	3	D	1	S
5876	B	8,90	9,84	3	3	D	1	S
5877	B	8,95	9	3,30	3	D	1	S
5752	B	8,30	7,47	5,47	8,30	D	3	M
5904	B	8,84	8,60	7,69	8	D	3	M
5906	O	8,6	8	5,69	5	D	3	M
5498	O	9,30	9	4	6	D	3	M
5789	B	8	8	3	3	D	3	S
5869	B	7,30	5,69	3	3	D	3	S
5876	B	8,30	9	3	3	D	3	S
5877	B	8,77	8,60	3	3	D	3	S
5752	B	8,30	7,60	5,60	8,17	D	5	M
5904	B	8,47	7,47	7,30	8	D	5	M
5906	B	8,69	9	4	5,90	D	5	M
5498	O	8	7,47	5	5,69	D	5	M
5789	B	7,69	7	3	3	D	5	S
5869	B	6,77	6,30	3,30	3	D	5	S
5876	B	8,95	8,77	3	3	D	5	S
5877	B	8,47	7,69	3,30	3	D	5	S
5752	B	8,47	7,47	4,47	9	I	1	M
5904	B	8,77	8,60	6,69	8,69	I	1	M
5906	O	10	10	4	7,47	I	1	M
5498	O	8,84	8,47	7	8	I	1	M
5789	B	8,84	8,30	3	3	I	1	S

Tableau 19 (bis) : Récapitulatif des valeurs logarithmiques des concentrations de la flore intestinale en fonction du site, du temps de conservation post-mortem du prélèvement et du statut des sujets

N° identification	Espèce	LOG 10 FT	LOG 10 Coli	LOG 10 Entero	LOG 10 Clostridies	Site	Temps (jours)	Sujets
5869	B	8,60	7,47	3,30	3,47	I	1	S
5876	B	7,47	7,69	3	3	I	1	S
5877	B	9,30	8,95	3	3	I	1	S
5752	B	8	7,47	4,30	8,30	I	3	M
5904	B	9	8,77	6,60	9	I	3	M
5906	O	9	9,30	6,30	7	I	3	M
5498	O	8,69	8,69	5,90	7,90	I	3	M
5789	B	9	9	3	3	I	3	S
5869	B	7,47	5	3,30	3	I	3	S
5876	B	8,30	7,30	3	3	I	3	S
5877	B	9	8,60	3	3	I	3	S
5752	B	7,77	6,60	3,84	7,77	I	5	M
5904	B	9,30	9	6,69	9	I	5	M
5906	O	9,30	9	5,90	7,30	I	5	M
5498	O	9	8,47	8	8,60	I	5	M
5789	B	8,60	8,47	3	3	I	5	S
5869	B	7,47	6	4,60	3	I	5	S
5876	B	6,30	5,30	3	3	I	5	S
5877	B	8,69	8,47	3	3	I	5	S
5752	B	9	7,95	3,47	8,17	J	1	M
5904	B	9	8,90	6,30	8,60	J	1	M
5906	O	9,47	9,30	4	5,30	J	1	M
5498	O	9,30	9,30	7,77	7,60	J	1	M
5789	B	7,30	7,77	3	3	J	1	S
5869	B	9	7,84	3	3,30	J	1	S
5876	B	8,77	9,47	3	3	J	1	S
5877	B	8,60	8,30	3	3	J	1	S
5752	B	8,90	7,47	3,60	8,30	J	3	M
5904	B	9,30	9	6,69	9	J	3	M
5906	O	9,47	9,47	5	6,60	J	3	M
5498	O	9,30	9,30	7,77	8	J	3	M

Tableau 19 (bis) : Récapitulatif des valeurs logarithmiques des concentrations de la flore intestinale en fonction du site, du temps de conservation post-mortem du prélèvement et du statut des sujets

N° identification	Espèce	LOG 10 FT	LOG 10 Coli	LOG 10 Entero	LOG 10 Clostridies	Site	Temps (jours)	Sujets
5789	B	8	8	4	3	J	3	S
5869	B	9	7,69	3	3	J	3	S
5876	B	7,47	8,60	3	3	J	3	S
5877	B	8,77	7,47	3	3	J	3	S
5752	B	9	8	3,77	8,47	J	5	M
5904	B	9	8,84	6	8	J	5	M
5906	O	8,47	8,47	5	6,30	J	5	M
5498	O	9,90	9,30	8,47	7	J	5	M
5789	B	8,60	8,47	4,90	3	J	5	S
5869	B	8,47	5,77	3,60	3	J	5	S
5876	B	8,60	8,47	3	3	J	5	S
5877	B	8	7,30	3	3	J	5	S

FT : Flore totale

Coli : coliformes

Entéro : entérocoques

Espèce : B : Bovin ; O : Ovin ; C : Caprin

Site de prélèvement : D : duodénum ; J : jéjunum ; I : iléon

Sujets : S : non suspects entérotaxémie ; M : suspects entérotaxémie

ANNEXE 8

Tableau 20 : Milieux de cultures utilisés pour les examens bactériologiques avec indication des fournisseurs

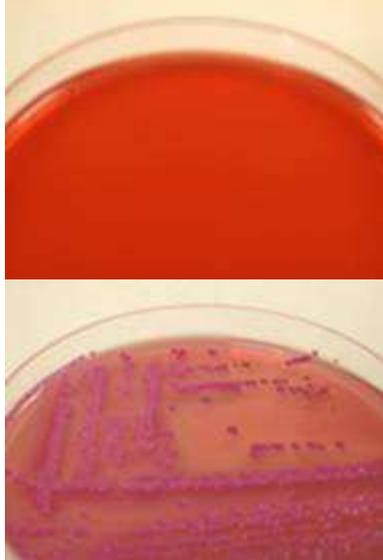
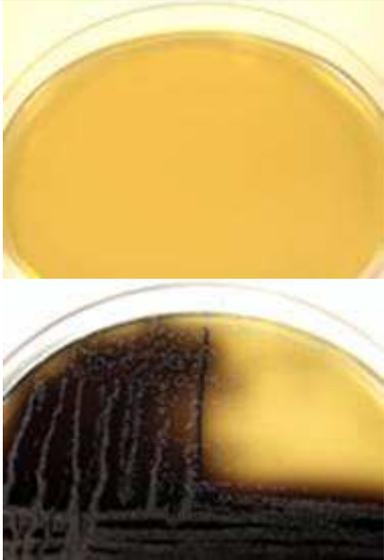
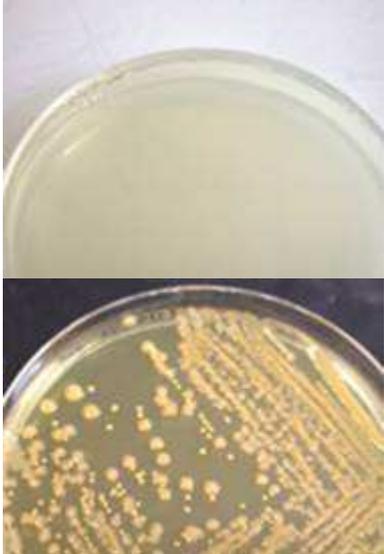
MILIEUX DE CULTURE	COMPOSITION (formule en g/L en eau distillée)		FOURNISSEURS	ASPECT DU MILIEU avant et après utilisation
Mac Conkey	Peptone Lactose Sels biliaires Cristal violet Rouge neutre Chlorure de sodium Agar pH = 7,1	20 10 1.5 0.001 0.05 5 15	Bio-Rod	
TSN (tryptone sulfite néomycine)	Tryptone Sulfite de sodium Sulfate de néomycine Sulfate de polymyxine Extrait de levure Citrate de fer Agar pH = 7,2	15 1 0.05 0.02 10 0.5 13.5	Bio-Rod	

Tableau 20 (bis) : Milieux de cultures utilisés pour les examens bactériologiques avec indication des fournisseurs

MILIEUX DE CULTURE	COMPOSITION (formule en g/L eau distillée)		FOURNISSEURS	ASPECT DU MILIEU avant et après utilisation
D-Coccossel	Bio-Trypcase Bio-Thione Extrait de levure Bile de bœuf Chlorure de sodium Citrate de sodium Esculine Citrate de fer ammoniacal Azide de sodium Agar pH = 7,1	17 3 5 10 5 1 1 0.5 0.25 13.5	Bio-Mérieux	
GTS (gélose trypticase soja)	Peptone trypsique de caséine Peptone de farine de soja Chlorure de sodium Agar pH = 7.2	15 5 5 20	Bio-Mérieux	

BIBLIOGRAPHIE

- 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, 112:19
- 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* typhoid 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

- 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., ROMBOUTS 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
- 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
- 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- LEONHARD 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* α 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* α 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

- 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., MINIL J.G. A role for the *Clostridium perfringens* β 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
- 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

- 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
- 89- SONGER O.S., SONGER M.J., HILLYER M.H., MORGAN K.L. Injection site and antibody respnses 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 intra-espèces 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., MACLACHLAN N.J. *Clostridium*, Veterinary microbiology 2nd édition, 2004, 535p

NOM : POURCHER

PRENOM : Sylvain

**TITRE : APPORT DIAGNOSTIQUE DU DENOMBREMENT DE
Clostridium perfringens DANS L'INTESTIN GRÊLE DES
RUMINANTS SUSPECTS D'ENTEROTOXEMIE**

Thèse vétérinaire : Lyon , 26 janvier 2007

RESUME : Les entérotoxémies sont des affections fréquentes des ruminants caractérisées le plus souvent par une mort subite. La confirmation diagnostique recourt à des analyses visant à démontrer la présence de l'un des toxinotypes de *Clostridium perfringens* et de ses toxines. Ces méthodes complexes peuvent être remplacées en pratique par le simple dénombrement de *C. perfringens* dans le contenu intestinal. Nous l'avons validé sur 48 cadavres de ruminants. Les résultats démontrent qu'une concentration iléale en *Clostridium perfringens* supérieure ou égale à 10^7 unités formant colonies par millilitre de liquide intestinal permet le diagnostic de certitude. Cette concentration reste stable dans le prélèvement conservé au réfrigérateur jusqu'à 4 jours après la mort. A l'inverse, les résultats obtenus sur les animaux non atteints d'entérotoxémie permettent d'exclure ce diagnostic 15 fois sur 22 au seuil de concentration de 10^3 unités formant colonies par millilitre et 19 fois sur 22 au seuil de 10^4 unités formant colonies par millilitre.

MOTS CLES :

- Ruminants
- Entérotoxémie
- Diagnostic
- *Clostridium perfringens*
- Dénombrement

JURY :

Président :	Monsieur le Professeur Claude GHARIB
1er Assesseur :	Monsieur le Professeur Pierre BEZILLE
2ème Assesseur :	Monsieur le Professeur Denis GRANCHER

DATE DE SOUTENANCE :

le 26 janvier 2007

ADRESSE DE L'AUTEUR :

10 rue des tisserands
63720 ENTRAIGUES