

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

Résumé

Orientation : Médecine Vétérinaire

Titre de la thèse en français :

Etude étiologique de l'entérotoxémie bovine

Titre de la thèse en anglais :

Study of the aetiology of bovine enterotoxaemia

Candidat : Christophe Manteca Villanueva

Promoteur : Prof. J. Mainil

Co-promoteur : Prof. G. Daube

Département et Service : département des Maladies Infectieuses et Parasitaires, secteur de Bactériologie

Date de la défense publique : le 23 juin 2003

Composition du Jury : J. Mainil, G. Daube, A. Kaeckenbeeck, F. Coignoul, L. Istasse, B. Losson, D. Marlier, F. Rollin, P. Deprez, D. Taylor

DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

Depuis de nombreuses années, le veau Blanc Bleu Belge est régulièrement frappé par des mortalités brutales, touchant des sujets en bon état général. Une enquête informelle avait permis d'estimer que près de 4% des jeunes animaux mourraient ainsi brutalement dans des conditions qui rappellent l'entérotoxémie. En effet, la brutalité de la clinique et les lésions intestinales de type hémorragique permettaient de poser le diagnostic d'une entérotoxémie due à *Clostridium perfringens*, par analogie avec les cas décrits dans la littérature. Néanmoins, ce syndrome était encore mal connu sur le terrain, la clinique peu différenciée (diagnostics de fulguration, de septicémie...) et le tableau nécropsique peu défini (diagnostic macroscopique de salmonellose, de volvulus...). Les analyses bactériologiques se limitaient à la mise en évidence de la présence de *C. perfringens* dans le contenu intestinal, sans tenir réellement compte du fait que cette bactérie y réside naturellement. Aucun des outils permettant une lutte autre qu'empirique contre cette pathologie n'était donc réellement en place.

Le travail présenté ici, inséré dans une approche plus globale de la problématique (développement de méthodes génétiques et immunologiques de diagnostic, épidémiologie moléculaire...), voulait répondre à plusieurs questions :

- Peut-on mieux définir les circonstances d'apparition de cette pathologie ?
- Quels sont les symptômes permettant d'individualiser ce syndrome ?

- Quelles lésions macroscopiques et microscopiques y sont associées ?
- *C. perfringens* représente-t-il l'étiologie réelle de cette pathologie ; si non, quelles sont les agents infectieux potentiellement incriminables ?
- Si *C. perfringens* est bien l'étiologie, quelle est (sont) la (ou les) toxine(s) impliquée(s) ? Est-il possible qu'un clone spécifique, particulièrement virulent, de cette bactérie soit responsable de la pathologie ?
- Est-il possible, sur base des réponses apportées, de reproduire le syndrome clinique en remplissant les postulats classiques et moléculaires de Kock ?
- La connaissance de l'étiologie bactérienne et toxinique permet-elle la mise en place d'une stratégie vaccinale adaptée ?

Pour répondre à ces questions, il était nécessaire d'obtenir un large matériel d'étude (veaux mort d'entérotoxémie et veaux témoins) et des objectifs préalables ont donc dû être rencontrés : établissement d'un large réseau de vétérinaires sentinelles et d'éleveurs, établissement d'une fiche anamnétique étendue, mise en place de méthodes bactériologiques et moléculaires spécifiques aux anaérobies.

RÉSULTATS

Circonstances d'apparition, signes cliniques et tableau lésionnel

Septante-huit bovins constituent la population « cas ». Ils répondent à la définition du terme « entérotoxémie » adop-

tée à partir de communs dénominateurs des descriptions du terrain: morts brutales associées à des lésions intestinales aiguës congestives, voire hémorragiques. Soixante-quatre bovins ne répondant aucunement à cette définition constituent la population « témoins ».

Nonante pour cent de la population « cas » sont des veaux de race Blanc Bleu Belge âgés de 2 à 4 mois. Un tiers de ces animaux ont une conformation excellente. Beaucoup plus rarement, des animaux à l'engrais (4%) ou des animaux adultes (2,5%) sont touchés.

Le plus fréquemment, l'animal est trouvé mort ou comateux, sans signe précurseur. Dans le cas contraire, les signes cliniques sont des coliques, rapidement suivies de coma et de mort, mais parfois accompagnées de troubles nerveux. La diarrhée, hémorragique ou non, est rare, de même que le météorisme. Sans intervention, la mort apparaît en $2,4 \pm 2$ heures. Dans 67% des cas, on relève, 24 à 36 heures avant la mort, l'existence de conditions stressantes. Dans 58% des cas, ces stress sont de nature alimentaire (Tableau).

Tableau. Comparaisons des fréquences d'existence des facteurs de risque dans les populations d'animaux « cas » et « témoins »

Facteur		CAS	TEMOIN	Stats
Fréquence des repas	1 fois par jour	1,3	10	**
	2 à 3 fois par jour	18,7	26	NS
	A volonté	80	64	**
Type d'aliment	Lait (veau au pis)	75	70,6	NS
	Lactoreplaceur	3,9	2	NS
	Concentrés	45,5	29,4	*
	Céréales	11,7	9,8	NS
	Fourrages	48,1	47,1	NS
	Ensilage	1,3	3,9	NS
	Pâturage	51,9	19,6	***
Présence de stress	OUI	67,1	50	*
	NON	32,9	50	*
Changement de ration	OUI	24,7	27,5	NS
	NON	75,3	72,5	NS
Excès d'alimentation	OUI	5,7	5,6	NS
	NON	94,3	94,4	NS
Oestrus de la mère	OUI	6,1	0	*
	NON	93,9	100	*
Changement de prairie	OUI	15,4	5,9	*
	NON	84,6	94,1	*
Abreuvement insuffisant	OUI	6,3	0	*
	NON	93,7	100	*
Traitement (vaccins, vermifuge, chirurgie...)	OUI	4,8	6,3	NS
	NON	95,2	93,7	NS

Le cadavre montre un embonpoint normal, voire excellent. Même lors d'autopsie précoce, une putréfaction débutante de la sangle abdominale peut être présente. L'intestin est souvent (78%) dilaté par les gaz. Les lésions consistent dans 90% des cas en une jéjuno-iléite aiguë nécro-hémorragique, avec un contenu le plus souvent liquide, hémorragique et abondant. Les lésions sont limitées à quelques dizaines de centimètres du jéjunum (67%), mais peuvent être généralisées à l'ensemble de l'intestin grêle, voire étendues au cæcum et au colon (22% des cas). Une adénite aiguë, rarement hémorragique, des ganglions mésentériques satellites est présente (87%). Les reins sont congestionnés, mais rarement hémorragiques. Le « rein pulpeux » décrit chez le mouton n'a jamais été observé.

Histologiquement, la nécrose des villosités intestinales se déroule en trois phases: le sommet de la villosité est d'abord totalement nécrosé, ce qui aboutit à une intense hémorragie intra-luminale; les cellules épithéliales bordant l'axe des villosités et, finalement, l'axe conjonctivo-vasculaire sont ensuite atteints. Les bactéries ne pénètrent que de manière très limitée dans la paroi intestinale. Les portions encore intactes des villosités, la sous-muqueuse et les vaisseaux sanguins montrent une margination importante de polymorphonucléaires neutrophiles et de lymphocytes, ainsi que de quelques macrophages. Une éosinophilie tissulaire intense est observée dans 25% des cas. Les cellules nerveuses des complexes sympathiques et parasympathiques de la musculature et de la sous-muqueuse montrent parfois un début de dégénérescence. Les ganglions mésentériques présentent un aspect fortement réactionnel voire des zones de nécrose. Des zones de dégénérescence hépatocytaire sont présentes au pourtour des veines centro-lobulaires.

Etude de la flore bactérienne intestinale

Des résultats significatifs n'ont été obtenus qu'en atmosphère anaérobie; les résultats des analyses en atmosphère aérobie ne sont donc pas présentés.

C. perfringens a été isolé plus fréquemment à partir du contenu intestinal des animaux « cas » que « témoins » (79% vs 19%). Outre *C. perfringens*, *C. sordellii* a été plus fréquemment isolé à partir des animaux « cas » (20%). Les autres espèces clostridiennes ne sont apparues qu'avec des fréquences anecdotiques.

Les études de dénombrements des flores anaérobies ont permis d'observer des nombres significativement plus élevés de *C. perfringens* à hauteur des lésions chez les animaux « cas » ($10^7 - 10^{7.5}$ Unités Formant Colonies <UFC>/ml de contenu) par rapport aux animaux « témoins » ($10^4 - 10^5$ UFC/ml de contenu). Par contre, les résultats des dénombrements de la flore anaérobie totale et des formes sporulées ne montraient pas de différences significatives entre les deux populations d'animaux.

Toxinotypage de *C. perfringens* et *C. sordellii*

Les 705 souches de *C. perfringens* isolées ont été toxinotypées par hybridation ADN-ADN sur colonies au moyen de sondes génétiques spécifiques des gènes codant pour les toxines majeures α , β , ϵ , ι , pour l'entérotoxine et la toxine $\beta 2$. Toutes appartenaient au toxinotype A non entérotoxigène (positif seulement pour la toxine α), mais un tiers d'entre elles renfermaient en plus le gène codant pour la toxine $\beta 2$. Si les souches $\beta 2+$ étaient présentes chez deux tiers des veaux de chaque population d'animaux, elles étaient cependant présentes en plus grands nombres chez les animaux «cas» que chez les animaux «témoins», quoique de manière statistiquement non significative.

Les souches de *C. sordellii* isolées étaient négatives avec les sondes correspondant aux gènes qui codent pour les toxines HT et LT. Comme elles étaient, de plus, biochimiquement proches de *C. bifermentans* qui est une espèce non pathogène, il est peu probable que ces souches jouent un rôle dans l'entérotoxémie.

Reproduction expérimentale des lésions d'entérotoxémie

Un veau de race Holstein, âgé de 2 semaines, en bonne santé, indemne des pathogènes digestifs classiques à cet âge a été utilisé pour l'essai de reproduction expérimentale des lésions en anses intestinales ligaturées. Les souches de *C. perfringens* et *C. sordellii* utilisées provenaient de cas d'entérotoxémie, hormis une souche toxigène de référence de *C. sordellii* d'origine humaine. La production de toxine α par les souches de *C. perfringens* a été préalablement confirmée par ELISA.

La souche de *C. perfringens* qui produisait les plus hauts taux de toxine α et qui était positive pour les gènes codant pour la toxine $\beta 2$ reproduisait le plus fidèlement les lésions d'entérite nécro-hémorragique aiguë constatée dans les cas d'entérotoxémie.

Séroconversion

Les taux d'antitoxine α après vaccination du veau et/ou de sa mère grâce à des vaccins commerciaux ont été suivis afin d'optimiser le protocole de vaccination pour protéger les veaux entre 2 et 4 mois. Un taux d'antitoxine α plus élevé a été obtenu en vaccinant le veau à l'âge d'un mois et en effectuant une injection de rappel à l'âge de deux mois. La vaccination de la mère permet un enrichissement du colostrum en anticorps spécifiques, mais n'est pas compatible avec le protocole de vaccination du veau.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'entérotoxémie touche essentiellement des veaux viables de bonne conformation et âgés de 2 à 4 mois. Elle apparaît vraisemblablement suite à des modifications brutales de diverses natures, les modifications qualitatives

ou quantitatives de la ration étant les plus fréquentes. Le système allaitant, les concentrations riches en aliments concentrés et pauvres en fibre et la mise en pâture à une époque où l'herbe est riche en protéines solubles semblent des facteurs favorisant. La prévention zootechnique de cette pathologie passera donc par la gestion des facteurs potentiellement responsables de la fragilisation ou de la rupture de l'écologie microbienne intestinale. L'expérience acquise lors de nombreuses visites d'exploitation anormalement touchées par cette pathologie permet d'affirmer l'efficacité de cette prévention.

La prépondérance de la race Blanc Bleu au sein de la population victime d'entérotoxémie est probablement due à son importance en Belgique dans la spéculation du veau au pis. Ainsi, en France, l'entérotoxémie touche essentiellement les veaux de race blonde d'Aquitaine et ceux de race charolaise, ces deux races étant plus représentées dans l'élevage du veau au pis. Plus qu'une sensibilité propre de la race Blanc Bleu à l'entérotoxémie, c'est donc le type de spéculation qui paraît prédisposer à cette pathologie. Cette constatation n'élimine pas nécessairement une sensibilité particulière et congénitale de certains individus. Une corrélation entre l'apparition d'entérotoxémies dans une exploitation et l'utilisation particulière d'un géniteur n'a cependant pas pu être mise en évidence.

L'utilisation de grandes quantités de concentrés dans l'alimentation a été rendue responsable de certaines entérotoxémies. La grande quantité d'amidon contenu dans ces aliments et la faible quantité de fibres prédisposent en effet aux dérives de flore intestinale. Dans certains cas en effet, la diminution (ou la dilution) importante de la quantité de concentrés distribués a amené une diminution du nombre d'entérotoxémies. La mise en pâture reste un moment crucial quant à l'apparition d'entérotoxémies. La haute concentration en protéine et le faible taux de cellulose de l'herbe en cette période sont probablement les causes de la dérive de flore. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de rôle joué par de hautes adjonctions azotées aux pâtures.

Cette pathologie se caractérise également par son extrême brutalité, souvent limitée à un syndrome abdominal aigu, sans présence de diarrhée hémorragique. Le diagnostic différentiel des images d'entérites hémorragiques segmentaires inclura essentiellement la salmonellose, la coccidiose, certaines colibacillooses et les modifications vasculaires non inflammatoires constatées en cas de morts brutales.

La lésion la plus caractéristique est une jéjuno-iléite aiguë nécro-hémorragique avec un contenu intestinal liquide, nettement hémorragique et abondant. Cette observation est une caractéristique lésionnelle qui singularise les entérotoxémies en Belgique, car elle n'a pas été décrite dans les cas publiés auparavant. Seules les entérotoxémies attribuées à *C. perfringens* de type B et C sont systématiquement décrites comme produisant ce caractère liquide et hémorragique du contenu intestinal.

Les lésions histologiques sont caractéristiques de lésions nécrotiques intenses des villosités intestinales, accompa-

gnées d'une forte réaction inflammatoire avec infiltration massive de polymorphonucléaires neutrophiles et de lymphocytes. Les lésions hépatiques sont elles caractéristiques d'une toxémie d'origine intestinale (= entérotoxémie). L'éosinophilie constatée chez un quart des animaux «cas» en absence de tout parasitisme intense est plus difficile à expliquer. Il pourrait cependant s'agir d'une réaction de Schwann (anaphylaxie de type I) due à des réactions antigènes (toxines bactériennes)-anticorps (IgE) et aboutissant à la production de facteurs chimiotactiques éosinophiliques par des mastocytes. Cette explication a également été avancée dans des cas d'entérite nécrotique éosinophilique foudroyante chez l'homme.

Quoique certains échappent à cette règle, la majorité des animaux «cas» témoignent d'une nette augmentation des UFC de *C. perfringens* (facteur 100 à 10000) dans le contenu intestinal. Cette augmentation est étroitement corrélée à l'intensité des lésions constatées. Elle correspond à l'augmentation de l'ensemble des *C. perfringens* et non pas une frange particulièrement virulente de cette population, comme il fut constaté par ribotypage des souches isolées. Dans des cas marginaux d'entérotoxémie, il est possible qu'une synergie existe entre *C. perfringens* et certains *E. coli*. Les autres clostridies pathogènes et les salmonelles ont été isolées avec une fréquence trop faible pour être considérées comme des étiologies plausibles de la majorité des cas diagnostiqués sur le terrain. Les souches de *C. sordellii*, bien qu'isolées assez fréquemment, se sont révélées très probablement non pathogènes.

Les souches de *C. perfringens* isolées appartiennent toutes au toxinotype A non entérotoxinogène. En l'état actuel des connaissances, cette étiologie sera retenue comme celle du syndrome défini dans ce travail. Un tiers des souches de *C. perfringens* isolées contiennent aussi le gène codant pour la toxine β_2 , une toxine capable d'engendrer des entérites

nécrotiques chez le porcelet. Une reproduction expérimentale des lésions en anse ligaturée permet de poser l'hypothèse d'une synergie entre la toxine α et la toxine β_2 dans un certain nombre de cas d'entérotoxémie, sans exclure la participation éventuelle de certaines toxines mineures. Ces toxines devront donc faire l'objet d'une attention particulière lors de la mise au point des vaccins dédiés à la prévention de cette pathologie.

L'obtention de titres élevés en anticorps dirigés contre la toxine α durant la période à risque majeur d'entérotoxémie (entre 2 et 4 mois) pourra être réalisé par vaccination du veau à un mois avec une injection de rappel quatre semaines plus tard. Des rappels bi-annuels sont nécessaires pour maintenir ces titres. En cas d'entérotoxémie précoce dans l'exploitation, la vaccination des mères aux septième et huitième mois de gestation permet d'obtenir des taux élevés en anticorps colostraux. Cette vaccination maternelle semble cependant incompatible avec une vaccination précoce du veau.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Dr M.-P. Marot, P. Simon, K. Renier et N. Colin pour leur aide dans la collecte ou l'analyse des résultats. Nous remercions également les Fédérations de Lutte contre les Maladies du Bétail, le Ministère de la Région Wallonne pour l'environnement, les ressources naturelles et l'agriculture ainsi que l'IRSIA (Institut pour l'Encouragement de la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture; conventions 5313, 5432, 5551) qui ont financés ces recherches. Nous tenons de plus à remercier vivement les nombreux vétérinaires praticiens et les éleveurs qui ont bien voulu participer à l'enquête.

RÉFÉRENCES

- BALDWIN E. Clostridial enterotoxemia. *Vet. Med.*, 1959, **10**, 123-127.
- BLOOD D.C., HELWING D.M. Enterotoxaemia of calves. *Aust. Vet. J.*, 1957, **33**, 144-146.
- CLARKSON M.J., FAULL W.B., KERRY J.B. Vaccination of cows with clostridial antigen and passive transfer of clostridial antibody from bovine colostrum to lambs. *Vet. Rec.*, 1985, **116**, 467-469.
- DAUBE G., SIMON P., LIMBOURG B., MANTECA C., MAINIL J., KAECKENBEECK A. Hybridization of 2659 *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**, 496-501.
- ESPINASSE J. Les maladies à anaérobies des bovins. *Bull. GTV*, 1980, **80**, 33-41.
- GARMORY H.S., CHANTER N., FRENCH N.P., BUESCHEL D., SONGER J.G., TITBALL R.W. Occurrence of *Clostridium perfringens* β 2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. *Epidemiol. Infect.*, 2000, **124**, 61-67.
- GILBERT M., JOLIVET-REYNAUD C., POPOFF M.R. Beta 2 toxin, a novel toxin produced par *Clostridium perfringens*. *Gene*, 1997, **203**, 65-73.
- HATHEWAY C.L. Toxigenic clostridia. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1990, **3**, 66-98.
- MONTGOMERIE R.F. *Clostridium perfringens* (*Clostridium welchii*) enterotoxaemia in the ruminant. *Can. Vet. J.*, 1961, **2**, 439-450.
- NILO L., AVERY R.J. Bovine enterotoxaemia: 1. *Clostridium perfringens* types isolated from animal sources in Alberta and Saskatchewan. *Can. Vet. J.*, 1963, **4**, 31-37.

- NILO L., RUTH E., MOFFAT E., AVERY R.J. Bovine enterotoxaemia: 2. Experimental reproduction of the disease. *Can. Vet. J.*, 1963, **4**, 288-299.
- NILO L. *Clostridium perfringens* in animal disease: a review of current knowledge. *Can. Vet. J.*, 1980, **21**, 141-148.
- PETIT L., GIBERT M., POPOFF M. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol.*, 1999, **7**, 104-110.
- POPOFF M.R. Les entérotoxémies. *Rev. Méd. Vét.*, 1989, **140**, 479-491.
- SHIRLEY G.N. Clostridial enteritis in cattle. *Vet. Rec.*, 1958, **70**, 478-480.
- SONGER J.G. Clostridial diseases of domestic animals. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1996, **9**, 216-234.
- STERNE M. Clostridial infections. *Brit. Vet. J.*, 1981, **137**, 443-454.
- VANCE H.N. *Clostridium perfringens* as a pathogen of cattle: a literature review. *Can. J. Comp. Med.*, 1967, **31**, 248-251.
- PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THÈSE**
- MANTECA C., DAUBE G. L'entérotoxémie en Belgique: I) Introduction et contexte bibliographique. *Ann. Méd. Vét.*, 1994, **138**, 155-164.
- MANTECA C., KAECKENBEECK A. Des postulats de Koch à l'entérotoxémie bovine: petites histoires et vieux papiers. *Ann. Méd. Vét.*, 2000, **144**, 155-164.
- MANTECA C., DAUBE G., JAUNIAUX T., LIMBOURG B., KAECKENBEECK A., MAINIL J.G. L'entérotoxémie en Belgique: II) Epizootiologie élémentaire et pathologie descriptive. *Ann. Méd. Vét.*, 2000, **144**, 75-82.
- 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.
- MANTECA C., DAUBE G., JAUNIAUX T., LINDEN A., PIRSON V., DETILLEUX J., GINTER A., COPPE P., KAECKENBEECK A., MAINIL J.G. A role for the *Clostridium perfringens* β 2 toxin in bovine enterotoxaemia? *Vet. Microbiol.*, 2002, **86**, 191-202.