

Chapitre III: Bacilles Gram positif sporulés

I. Bacillus

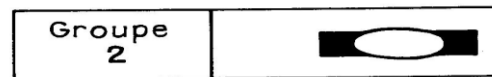
La famille des Bacillaceae comprend des bactéries sporulées, mobiles ou immobiles, Gram positif, aérobies stricts ou facultatives. Le genre *Bacillus* est très hétérogène et comprend au moins 36 espèces. Ce sont des bacilles à Gram positif ou à Gram variable (fréquemment, la coloration de Gram n'est positive que dans les très jeunes cultures), parfois capsulés, mobiles sauf *Bacillus anthracis*, aérobies ou aéro-anaérobies, le plus souvent catalase positive, donnant une réponse variable au test de l'oxydase, formant des spores (contrairement à ce qui se produit pour les espèces du genre *Clostridium*. Le phénomène de la sporulation n'est pas inhibé par l'oxygène).

La classification la plus utilisée se fonde sur la forme de la spore et distingue 3 groupes :

- bacilles à spore ovale ou arrondie non déformante (groupe le plus fréquent),



- bacilles à spore ovale déformante,



- bacilles à spore ronde déformante.



I.1 Habitat

Les *Bacillus* sont ubiquitaires car leurs spores leur confèrent une grande résistance. On en trouve dans les sols qui constituent le principal réservoir, dans l'eau de mer, dans l'eau douce et sur les plantes. On en trouve également dans les aliments, et même dans les produits "stérilisés" alimentaires ou médicamenteux à cause de la thermorésistance des spores.

I.2 Pouvoir pathogène

Bacillus anthracis est l'espèce la plus pathogène, responsable du "charbon" qui atteint les animaux, mammifères (ovins, caprins), certains oiseaux (autruches, canards), des insectes et leurs larves et occasionnellement l'homme.

Bacillus cereus occasionne des intoxications alimentaires chez l'homme, mais aussi chez l'animal, ce sont les avortements et les mammites qui dominent.

Les avortements se produisent chez les ovins et les bovins et la bactérie peut être isolée en culture pure à partir du placenta ainsi qu'à partir du contenu stomacal, du foie, de la rate, des reins et des poumons du fœtus.

Les mammites dont l'origine est souvent liée à l'introduction dans la mamelle de médicaments contaminés, sont observées chez les ruminants. Elles ont une gravité variable pouvant aller jusqu'à la mammite gangreneuse mortelle. Très fréquemment elles conduisent à une fibrose à l'origine d'une diminution persistante de la production lactée.

Bacillus subtilis, *licheniformis*, *sphaericus* sont également impliqués au cours d'intoxications alimentaires.

Certaines espèces, entomopathogènes (*B. thurigiensis*, *larvae*) sont utilisées à l'état de spores sous forme de poudre répandue à la surface des eaux stagnantes pour détruire les larves de moustiques.

1.3. *Bacillus anthracis*

1.3.1. Introduction

Le "charbon" est une maladie connue depuis l'antiquité (plaies d'Egypte). Les troupeaux de moutons sont ravagés mais la maladie frappe les bovidés ainsi que les chèvres.

- Dès 1780, Chabert décrit la maladie animale et insiste sur la coloration noire des organes des animaux charbonneux.
- En 1876, Koch réussit la culture de la bactérie et observe les spores.
- En 1881, la célèbre expérience de Pouilly-le-Fort donne à Pasteur la possibilité de démontrer la responsabilité de la bactérie dans la maladie et l'efficacité d'un vaccin constitué d'une souche de virulence atténuée par vieillissement.

1.3.2. Caractères bactériologiques

Bacillus anthracis est un grand bacille (5/1 µm) à Gram positif, immobile, sporulé, capsulé. Il forme une spore centrale, ovale et non déformante qui n'est toutefois pas toujours perceptible car la sporulation n'est effective que dans des circonstances particulières. Dans les produits pathologiques, *Bacillus anthracis* se présente sous forme isolée ou en courtes chaînes mais, en culture, il forme fréquemment des chaînes plus longues qui lui confèrent un aspect en "tiges de bambou".

La culture est facile ; *Bacillus anthracis* pousse en 24 heures à 37° C sur milieux usuels (GS). La bactérie est aéro-anaérobie facultative qui préfère cependant les conditions d'aérobiose. Donnent des colonies de 3 à 5 mm de diamètre qui ont un aspect R, "en tête de méduse". Sur gélose au sang, le germe apparaît non hémolytique en 24 heures mais, en prolongeant l'incubation, il se développe une légère zone d'hémolyse β. Après culture sur des géloses enrichies en sérum et/ou en bicarbonate et incubées à 37 C dans une atmosphère contenant 5-10 % de CO₂, le bacille synthétise sa capsule et les colonies ont un aspect lisse et brillant.

La sporulation nécessite une température comprise entre 15 et 42 C, une atmosphère humide et la présence d'oxygène. Ce qui a conduit à interdire l'autopsie des animaux morts de charbon (sauf dans des locaux spécialement équipés) et à obturer les orifices naturels des cadavres afin d'éviter l'exposition des bacilles à l'oxygène de l'air, la sporulation et la dissémination des spores. Par contre, en l'absence d'ouverture du cadavre, les germes de putréfaction provoquent une anaérobiose inhibant toute sporulation et conduisant à la mort des bactéries. Ainsi, expérimentalement, il n'est plus possible d'isoler *Bacillus anthracis* d'un cadavre 5 jours après la mort. Globalement, on préconise pour la destruction des spores : (la chaleur sèche : 120-140 C - 3 heures, la chaleur humide : 121 C - 10 minutes, le formol à 5 p. cent - 4 heures, le glutaraldéhyde à 2 p. cent - 2 heures, l'eau oxygénée à 3 p. cent - 1 heure, l'acide peracétique à 0,6 p. cent - 1 heure). Comme de nombreuses autres espèces du genre *Bacillus*, *Bacillus anthracis* possède une couche cristalline de surface (protection contre les chocs osmotiques).

1.3.3. Caractères antigéniques

Il élabore une toxine comprenant trois facteurs qui agissent en synergie : (I oedématogène, II immunogène et III létal).

Il possède divers antigènes : outre la toxine (facteur II), il existe un antigène capsulaire polypeptidique inhibant les défenses non spécifiques notamment la phagocytose et un antigène somatique polysaccharidique responsable d'une réaction de précipitation en présence d'anticorps spécifiques (réaction d'Ascoli cf. diagnostic).

1.3.4. Caractères biochimiques

Il est protéolytique, liquéfie la gélatine mais ne possède pas d'uréase. Il fermente certains sucres (glucose, maltose, saccharose) et produit de l'acétyl-méthyl-carbinol (VP+) qui est un caractère utilisé pour la classification des *Bacillus*.

1.3.5. Pouvoir pathogène

Chez l'animal, le charbon (ou anthrax) frappe surtout les mammifères herbivores et certains oiseaux, occasionnant une infection septicémique rapidement mortelle avec oedème hémorragique des muqueuses et exsudation de sang noir par les orifices naturels. Les lésions, pratiquement identiques chez toutes les espèces, sont caractéristiques (sang noirâtre, épais et incoagulable ; splénomégalie importante avec une pulpe de consistance boueuse ; hémorragies vésicales et rénales ; congestion et parfois hémorragies intestinales ; tumeur charbonneuse interne ou externe). De plus, le cadavre ne présente pas une rigidité complète et il se décompose très rapidement.

Chez l'homme, la forme cutanée, la plus fréquente, se manifeste par une lésion siégeant au point de pénétration du bacille constituée d'une pustule noirâtre entourée de petites vésicules et rapidement transformée en escarre nécrotique. L'infection évolue le plus souvent sans fièvre ni douleur ni altération de l'état général et guérit spontanément en peu de temps. Il existe cependant des formes graves (rares) avec oedème malin (pulmonaire, gastro-intestinale, septicémique).

1.3.6. Physiopathologie

La virulence des souches pathogènes est due d'une part à la capsule qui protège la bactérie de la phagocytose et d'autre part à la production de la toxine responsable des oedèmes hémorragiques.

C'est la spore qui pénètre dans l'organisme en traversant la peau ou les muqueuses lésées et donne naissance dans les tissus aux formes végétatives. Une réaction inflammatoire avec nécrose et thromboses vasculaires se développe et suffit souvent pour contrôler l'infection. Dans les formes graves, se succèdent envahissement ganglionnaire, dissémination par voie sanguine et propagation dans tous les tissus tandis que la toxine charbonneuse produite en grande quantité occasionne un choc toxique souvent mortel.

1.3.7. Epidémiologie

La maladie animale, sévit surtout aux Indes et en Afrique ainsi qu'au Moyen Orient et en Amérique du Sud. Les spores persistent dans les sols et les animaux se contaminent en broutant mais la maladie n'est pas directement transmissible d'animal contaminé à animal sain.

Hors contexte de bioterrorisme (comme en 2001, aux USA), les contaminations humaines sont presque toujours professionnelles. Ce sont en majorité des formes cutanées ; les formes graves sont exceptionnelles.

1.3.8. Diagnostic

On met en évidence la bactérie dans la sérosité des vésicules par culture ou dans le sang par hémoculture. Dans les prélèvements plurimicrobiens, selles ou expectorations, la recherche est plus difficile et il est recommandé d'éliminer la flore non sporulée par chauffage à 80°C.

Prélèvements : Sérosité ou pus de la lésion locale, mais aussi sang et éventuellement crachats si signes d'infection pulmonaire. Les prélèvements post mortem sont possibles car *B.anthraxis* provoque une hypocoagulabilité du sang.

Examen microscopique :

La culture est facile sur milieux ordinaires et la morphologie, l'aspect des colonies (des gros bacilles immobiles, à Gram positif, aux extrémités carrées, très évocatrices) et les caractères biochimiques permettent l'identification.

Culture sur gélose au sang et inoculation à l'animal :

Elles permettent d'affirmer le diagnostic. Contrairement aux autres espèces du genre, les souches virulentes de *Bacillus anthracis*, même à faible concentration, tuent le cobaye ou la souris en 24 à 48 heures.

La classique réaction d'Ascoli; qui est une réaction de précipitation entre l'antigène polysaccharidique de la souche et un sérum anticharbonneux, est peu sensible mais assez spécifique.

Un sérodiagnostic est possible mais n'est utile que pour vérifier l'efficacité de la vaccination chez l'animal.

1.3.9. Traitement

Bacillus anthracis est sensible aux antibiotiques et à la pénicilline G en particulier, mais il faut s'assurer que la souche n'est pas productrice de β lactamase. Il est toujours recommandé de pratiquer un antibiogramme.

1.3.10. Prophylaxie

Une prophylaxie animale est possible par vaccination. Les cadavres d'animaux morts de charbon doivent être enfouis sous chaux vive ou, mieux, incinérés. Les carcasses d'animaux morts du charbon contaminent le sol. Les spores peuvent rester viables pendant des décennies. Les animaux qui pâturent dans les zones infestées de spores, dits « champs maudits », s'infectent et perpétuent la chaîne d'infection. C'est pourquoi il faut (1) brûler les carcasses d'animaux ou les enterrer profondément dans la chaux vive, (2) décontaminer par l'autoclave les produits contaminés, (3) manipuler les produits animaux potentiellement infectés avec des gants et des blouses de protection, (4) vacciner éventuellement les animaux et les personnes exposées.

La vaccination contre le charbon a été mise au point par Louis Pasteur en 1881 : des cultures de *B. anthracis* en bouillon placées à l'étuve entre 42 et 52° C perdent progressivement leur virulence. Lorsqu'on les injecte à l'animal, elles peuvent immuniser l'animal. Malheureusement, l'efficacité de la vaccination est variable et souvent la protection n'est ni complète ni de longue durée.

2. Clostridium

Toutes les bactéries du genre *Clostridium* sont de gros bacilles à Gram positif qui peuvent donner des spores plus larges que le diamètre des bacilles. La plupart des espèces sont mobiles et possèdent des flagelles péritriches. Les bactéries du genre *Clostridium* ne poussent qu'en anaérobiose, soit sur boîtes de Petri placées dans des enceintes anaérobies (jarres anaérobies), soit dans des bouillons contenant des agents réducteurs. Dans ce dernier cas, la culture ne se fait qu'en profondeur.

Sur gélose au sang, placée en anaérobiose, certaines espèces donnent de grandes, d'autres de petites colonies. La plupart des colonies sont *hémolytiques*.

La caractéristique principale des bacilles anaérobies est non seulement leur incapacité à utiliser l'oxygène comme accepteur final d'hydrogène mais encore leur incapacité à se multiplier en présence d'oxygène.

2.1. Clostridium botulinum (l'agent du botulisme)

2.1.1. Habitat

Clostridium botulinum est une bactérie tellurique que l'on peut trouver occasionnellement dans l'intestin des animaux. Ses spores peuvent contaminer les légumes, les fruits et d'autres produits. Actuellement, le principal danger réside dans les conserves familiales (d'haricots verts, petits pois, les poissons fumés, les poissons frais gardés sous vide).

2.1.2. Pouvoir pathogène naturel

C. botulinum ne provoque pas habituellement d'infection chez l'homme bien qu'il ait été exceptionnellement impliqué dans l'infection de plaies et apparition ultérieure de botulisme. La maladie concerne souvent de nombreux animaux et la symptomatologie, dominée par des paralysies. Le *botulisme* est une *intoxication* qui résulte de l'ingestion d'aliments contaminés par des spores de *C. botulinum* qui ont germé et ont produit de la toxine. Elle est décrite aussi bien chez l'homme que chez les animaux. (L'incubation de la maladie est courte, 8 à 96 heures, et d'autant plus courte que la quantité de toxine absorbée est plus importante). Les signes cliniques sont essentiellement neurologiques : des paralysies.

2.1.3. Caractères bactériologiques

Bacille mobile, jamais isolé chez l'homme (il s'agit d'une intoxication), parfois dans l'aliment. Il est très protéolytique et très glucidolytique.

La spore a une thermo-résistance élevée. Elle résiste 3 à 5 heures au chauffage à 100° C et il faut chauffer au moins 15 minutes à 120° C pour la détruire (ce qui est fondamental dans l'industrie des conserves alimentaires).

La température optimale de culture est de 25° C ; le pH optimale légèrement alcalin. En bouillon sous huile, *C. botulinum* donne un trouble abondant avec dépôt dans le fond du tube. Il dégage une odeur caractéristique de beurre rance.

En gélose, les colonies de type SR, sont translucides à centre opaque.

2.1.4. La toxine botulinique

Il y a 6 variétés antigéniquement distinctes de toxines : A, B, C, D, E et F (rarement une septième variété : G). Chez l'homme, les toxines en cause sont principalement les toxines A, B et E et exceptionnellement les toxines C et F. Chez les animaux le botulisme est essentiellement dû aux toxines C et D et plus rarement aux toxines A, B et E.

Les toxines botuliniques sont parmi les substances les plus toxiques connues : 1 mg contient plus de 20 millions de doses minima mortelles (D.M.M.) pour la souris. Ce sont des neurotoxines qui agissent en inhibant la synthèse ou la libération d'acétyl-choline au niveau des synapses et des plaques neuro-musculaires, d'où la paralysie flasque.

Les toxines botuliniques sont de nature protéique. Elles sont antigéniques, peuvent être transformées en anatoxines et être neutralisées par des immunosérums (anti-toxines). Elles sont détruites par un chauffage de 10 minutes à 100° C.

La toxine botulinique est synthétisée par la bactérie au cours de sa croissance sous forme inactive. Lors de la mort bactérienne, elle subit une protéolyse qui la met sous forme active.

2.1.5. Diagnostic

Le diagnostic clinique repose sur les troubles paralytiques (vision) et la notion de contamination (parfois collective) après consommation d'un même aliment.

Le diagnostic biologique repose sur la recherche. La toxine botulique peut être recherchée dans un aliment, un produit biologique (sérum, vomissement, selles, contenu gastrique, organe prélevé post-mortem) ou un échantillon de sol ou de fourrage (méthode des souris protégées avec des immuno-sérums spécifiques).

2.1.6. Traitement

Puis que la variété de toxine botulinique responsable n'est habituellement pas connue, du sérum bivalent ou trivalent est administré par voie intraveineuse. Le traitement est complété par l'administration sous-cutanée d'anatoxine botulinique.

La prévention repose surtout sur les mesures légales concernant la préparation industrielle des conserves alimentaires et l'abattage des animaux.

2.2. Clostridium difficile

Clostridium difficile est retrouvé dans le sol ou l'eau (sous forme sporulée) et il est présent dans l'intestin de l'homme et de nombreuses espèces animales (y compris les oiseaux et les reptiles).

2.2.1. Caractères bactériologiques et biochimiques

Les souches de *Clostridium difficile* sont constituées de bacilles à Gram positif, de 0,5 à 1,9 µm de diamètre sur 3,0 à 16,9 µm de longueur, parfois groupés en chaînes de 2 à 6 cellules, généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche, anaérobies stricts, recouverts par une couche cristalline de surface (S-layer). La sporulation de la plupart des souches peut être obtenue en 48 heures après culture sur une gélose Brucella au sang. Les spores sont subterminales (parfois terminales), ovales et déformantes. Les souches de *Clostridium difficile* peuvent être toxigènes et les principales toxines responsables du pouvoir pathogène sont la toxine A et la toxine B (parfois qualifiée de cytotoxine). Selon leur capacité à produire ces toxines, les souches de *Clostridium difficile* se répartissent en trois groupes : les souches A-/B-, les souches A+/B+ et les souches A-/B+.

Clostridium difficile hydrolyse l'esculine, il produit une L-proline-aminopeptidase et il acidifie le cellobiose (réaction faiblement positive), le fructose et le glucose. Une réponse négative est obtenue pour les tests réduction des nitrates, production d'indole, lécithinase, lipase, hydrolyse de l'amidon, acidification de l'amidon, de l'amygdaline, de l'arabinose, du galactose, du glycogène, de l'inositol, de l'inuline, du lactose, du maltose, du mélibiose, du raffinose, du rhamnose, du ribose, du saccharose, l'hydrolyse de la gélatine est généralement positive

La température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37 C mais la culture est également obtenue à 25 et à 45 C. En bouillon, la croissance se traduit par un trouble, la

présence d'un sédiment et une acidification (pH de 5 à 5,5 après 5 jours d'incubation). Sur gélose au sang, après 24 heures d'incubation, les colonies sont circulaires ou à contour irrégulier, elles sont plates ou légèrement convexes, opaques, blanchâtres ou grisâtres et leur diamètre est compris entre 2 et 5 mm. Les colonies observées à la loupe binoculaire ont un aspect en verre brisé et l'odeur des cultures évoque celle du crottin de cheval. Après 48 d'incubation, les colonies obtenues sur gélose Brucella au sang enrichie en hémimine et en vitamine K1 présentent une fluorescence vert pâle sous lumière ultraviolette.

2.2.2. Pouvoir pathogène chez l'animal

Chez le cheval, le taux de portage semble faible (à moins qu'il ne soit sous estimé). Cliniquement, les poulains présentent une diarrhée hémorragique, une déshydratation, des coliques et une dyspnée. Chez les adultes, l'infection se traduit par une diarrhée qui peut être modérée ou intense, une perte d'appétit, des coliques et parfois une mort subite. À l'autopsie, le contenu intestinal est fluide, la muqueuse présente des lésions de nécrose (superficielle ou profonde), parfois un œdème modéré et elle peut être recouverte d'un exsudat fibrino-hémorragique. Comme chez de nombreuses espèces animales, *Clostridium difficile* est présent dans l'intestin des carnivores. Des cas de diarrhée à *Clostridium difficile* ont été décrits chez le chien et chez le chat. Ainsi dans les conditions expérimentales ou après un traitement antibiotique, le hamster, le cobaye, la souris et le rat sont sensibles à *Clostridium difficile*.

2.2.3. Facteurs de pathogénicité

L'adhésion aux cellules intestinales, favorisée par la mobilité de la bactérie et par un chimiotactisme pour le mucus intestinal. On a évoqué l'intervention de pili, le rôle des flagelles, le rôle de la couche cristalline de surface, la présence de protéines de 27 et de 40 kDa, des interactions électriques et même une intervention de la toxine A. La résistance à la phagocytose pourrait être due à la présence de polysaccharides de surface. Les lésions tissulaires pourraient partiellement résulter de l'action d'enzymes hydrolytiques (hyaluronidase, chondroïtine sulfatase, gélatinase et collagénase).

Le pouvoir toxino-gène résulte de l'action de 5 toxines éventuellement excrétées par les souches de *Clostridium difficile* :

- Les toxines A et B (cytotoxiques pour de nombreuses cellules, elles augmentent la perméabilité capillaire et elles peuvent provoquer des hémorragies)
- Une entérotoxine
- Une protéine de haut poids moléculaire apte à perturber le potentiel électrique des cellules intestinales et une ADP-ribosyltransférase, produite uniquement par quelques souches, ne semblent pas jouer un rôle important dans la pathogénie.

2.2.4. Diagnostic bactériologique

Le diagnostic d'une infection à *Clostridium difficile* repose sur la mise en évidence du germe ou de ses toxines.

Prélèvements :

Chez l'animal, la diarrhée peut être modérée ou absente et la recherche du germe ou de ses toxines peut être entreprise sur des fèces même non diarrhéiques si les commémoratifs y incitent. De même, au moins chez le cheval, la répétition des prélèvements est conseillée car le germe ou ses toxines ne sont parfois détectés que 5 jours après l'apparition des premiers signes cliniques.

La recherche de la toxine doit s'effectuer sur des prélèvements de fèces fraîches ou, si l'analyse ne peut être effectuée immédiatement, sur des fèces conservées à + 4 °C. En effet les toxines se dénaturent à 22 °C.

Identification du germe :

En l'absence de milieux sélectifs, l'isolement de *Clostridium difficile* est délicat car sa croissance peut être masquée par les autres bactéries de la flore fécale (d'où le qualificatif de *difficile* donné à cette clostridie).

Les fèces sont ensemencées directement, sans dilution initiale, et les boîtes sont incubées 48 heures en anaérobiose. Le fait d'utiliser des géloses préalablement incubées en anaérobiose permet d'augmenter la sensibilité et, d'une manière générale, une anaérobiose rapide augmente les chances d'isolement. La sensibilité est également favorisée par les procédés aptes à favoriser la germination des spores.

Détection des toxines :

La recherche d'une activité cytotoxique dans un filtrat de fèces est souvent considérée comme la méthode de référence.

2.2.5. Traitement

En médecine vétérinaire, le métronidazole a été utilisé pour le traitement des chats et des chevaux. La vancomycine a été utilisée chez le cobaye et chez des hamsters de laboratoire. L'érythromycine, la tiamuline et la tylosine pourraient être efficaces pour le traitement des porcelets.

2.3. *Clostridium tetani* (l'agent du tétanos)

2.3.1. Habitat

Clostridium tetani, se retrouve partout dans le sol où il survit sous sa forme sporulée. Commensal du tube digestif de plusieurs espèces animales (cheval, bovins, ovins), il est éliminé par les selles et sporule sur le sol. Il est particulièrement abondant dans les zones de pacage des animaux et à l'emplacement des anciennes écuries.

2.3.2. Pouvoir pathogène naturel

Les spores ou les formes végétatives introduites dans l'intestin sont inoffensives et, expérimentalement, on a pu montrer que les spores restent viables mais incapables de germer dans le tube digestif et que la toxine administrée par voie orale ou rectale est inoffensive. Ces faits expliquent que le tétanos ne peut être contracté par voie orale tant que le tube digestif est intact. Chez les animaux et notamment chez le cheval, les plaies des extrémités, les fractures ouvertes, la plaie ombilicale, les blessures obstétricales, les non-délivrances, les plaies de castration ou, d'une manière générale, les plaies chirurgicales souillées sont souvent à l'origine du tétanos.

Après germination des spores, le bacille se multiplie et synthétise une neurotoxine très puissante qui inhibe la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique et donc la libération des neuromédiateurs dans l'espace inter-synaptique. De très nombreuses espèces animales sont sensibles au tétanos, l'ordre de sensibilité décroissant est le suivant : cheval, porc, vache, chèvre, mouton, singe, cobaye, lapin, souris, rat, chien, chat, pigeon, animaux poïkilothermes.

Classiquement, le tétanos apparaît 5 à 10 jours (extrêmes 1 à 50 jours) après la contamination et il est d'autant plus grave que sa durée d'incubation est courte et que la porte d'entrée est localisée près de la tête

2.3.3. Caractères bactériologiques

Bacille mobile à Gram positif. La spore est terminale, déformante et donne au bacille un aspect en clou ou en baguette de tambour. La température optimale de croissance est de 37 °C. En bouillon sous huile, la culture se traduit par un trouble, la formation d'un sédiment lisse.

Les principaux produits du métabolisme sont le butanol, l'acétate, le butyrate, le propionate (produit en faible quantité) et parfois le lactate et le succinate. En gélose profonde, les colonies sont rondes à centre opaque. À la surface d'un milieu gélosé incubée 48 heures en anaérobiose, la croissance des souches mobiles se traduit par un voile et l'obtention de colonies nécessite un milieu très sec (séchage des boîtes 90 min. à 37 °C, couvercles ouverts) et/ou contenant 3 à 4 p. cent d'agar. Dans ces conditions, les colonies obtenues sur gélose au sang de mouton et de cheval sont très légèrement bombées, semi-translucides, à contour irrégulier, de couleur grisâtre, entourées d'une étroite zone d'hémolyse et leur diamètre atteint 2 à 5 mm. Certaines souches peu mobiles peuvent donner des colonies rondes à bords réguliers.

2.3.4. La toxine tétanique

Bien qu'il existe plusieurs variétés de *Clostridium tetani*, toutes produisent la même toxine. Celle-ci est produite par le germe durant sa croissance mais est aussi libérée par l'autolyse du corps bactérien. La toxine est une protéine, antigénique, qui contient deux facteurs : (1) la téanolysine responsable de l'hémolyse, de la nécrose et qui est cardiotoxique, (2) la tétanospasme (composée du fragment alpha qui est toxique et du fragment beta qui est antigénique) qui est le facteur essentiel de la toxicité neurologique. Comme la toxine diphtérique, la toxine tétanique peut être transformée en anatoxine par l'action combinée du formol et de la chaleur.

2.3.5. Diagnostic

Le diagnostic du tétanos est le plus souvent clinique et les laboratoires de bactériologie sont rarement sollicités. Le diagnostic clinique repose sur la constatation des contractures et la notion de blessure antérieure.

L'injection par voie intramusculaire du prélèvement dans le membre pelvien d'un cobaye peut conduire à une paralysie puis à une forme généralisée de tétanos. Cette technique s'avère parfois plus sensible que la culture.

Le diagnostic sérologique n'est pas réalisable car le tétanos ne provoque pas de réponse immunitaire.

2.3.6. Traitement et prévention

La prophylaxie sanitaire est difficile car il est impossible de détruire les spores présentes dans le milieu extérieur. Les opérations chirurgicales doivent s'effectuer avec du matériel stérile et dans des conditions maximales d'asepsie afin d'éviter une contamination par les spores. Les plaies accidentelles doivent être nettoyées et désinfectées et, le cas échéant, faire l'objet d'un parage chirurgical qui doit comporter l'élimination de tous les corps étrangers et de tous les tissus lésés. L'administration d'antibiotiques (pénicilline G ou métronidazole) peut également prévenir un risque de tétanos.

L'essentiel de la prophylaxie du tétanos repose sur la prophylaxie médicale basée sur la vaccination et, dans une moindre mesure, sur les sérums anti-tétaniques.

La neurotoxine tétanique, traitée durant un mois par le formol à une température de 38 °C, perd sa toxicité tout en conservant son immunogénicité et sa spécificité antigénique et elle devient une anatoxine. En ce qui concerne la médecine vétérinaire des vaccins anti-tétaniques sont disponibles pour le cheval, les ruminants, le porc et le chien. Toutefois, la vaccination n'est couramment pratiquée que chez les chevaux et les petits ruminants. La protection conférée par l'anatoxine tétanique est solide et durable à condition de respecter le protocole de vaccination (le plus souvent il consiste en une primo-vaccination réalisée par deux injections à quatre semaines d'intervalle, suivi d'un rappel un an plus tard puis tous les trois ans).

Chez un animal correctement vacciné, une injection d'anatoxine réalisée à l'occasion de tout traumatisme suspect est généralement suffisante pour prévenir un tétanos.

En cas de tétanos déclaré les sérums anti-tétaniques sont couramment employés en médecine vétérinaire.

En résumé, outre la sérothérapie par voie intraveineuse, le traitement fait appel aux antibiotiques administrés par voie générale et locale, à un parage chirurgical, à un traitement de la plaie par l'eau oxygénée et à une administration intramusculaire de sérum réalisée à proximité de la plaie. Le traitement est complété par l'administration de sédatifs et l'animal doit être placé dans un endroit calme et à l'obscurité. En cas de spasmes laryngés, une trachéotomie peut être effectuée et si l'animal est incapable de se nourrir il sera alimenté par l'intermédiaire d'une sonde.

2.4. Clostridia de la gangrène gazeuse

La gangrène gazeuse est une infection grave consécutive à l'introduction dans une plaie de terre ou de matières fécales souillées de spores de Clostridium. Le principal *Clostridium* qui provoque la gangrène gazeuse est *C. perfringens*.

2.4.1. Habitat

Extrêmement répandu, *C. perfringens* est présent dans le sol, dans le tube digestif de l'homme et des animaux.

2.4.2. Pouvoir pathogène naturel

Chez l'animal la bactérie détermine des affections extrêmement fréquentes, essentiellement des entérotoxémies pouvant frapper presque tous les mammifères, mais aussi des hépatites nécrosantes, des mammites, ect... A partir d'une plaie contaminée (par exemple fracture ouverte ou plaie utérine), l'infection s'étend en 1 à 3 jours. Elle réalise : la gangrène gazeuse qui se manifeste comme un phlegmon gazeux avec crépitation et nécrose progressive, fièvre, hémolyse, syndrome toxique, choc, puis la mort survient rapidement. Avant l'apparition des antibiotiques, l'amputation était le seul traitement possible ; des appendicites, des entérites gangréneuses ; des syndromes septicémiques d'origine puerpérale avec ictère hémolytique et anurie.

2.4.3. Caractères bactériologiques

C. perfringens se distingue des autres Clostridia par son immobilité et l'existence d'une capsule.

En culture, il est fortement hémolytique et produit une quantité importante de gaz par fermentation (gangrène gazeuse !). Il secrète une exotoxine protéique qui est une phospholipase (lécithinase) qui désorganise les membranes cellulaires, en particulier musculaires. Cette toxine est aussi une hémolysine. Elle est antigénique. *C. perfringens* secrète également une désoxyribonucléase (DNase), une hyaluronidase et une collagénase dont l'action favorise l'extension de l'infection à *C. perfringens*. Enfin, certaines souches, responsables d'intoxication alimentaire, secrètent une entérotoxine, thermolabile, voisine de l'entérotoxine d'*E. coli*.

2.4.4. Diagnostic

Prélèvements de tissu, de pus et de sérosités au niveau de la plaie. Hémocultures au cours des syndromes septicémiques.

Examen microscopique : la présence de grands bacilles à Gram positif, éventuellement sporulés, est très évocatrice.

Culture sur gélose au sang placée en atmosphère anaérobie et sur bouillon anaérobie. L'hémolyse, la production importante de gaz et l'inhibition de l'effet de la lécithinase (observés lors de culture sur gélose au jaune d'oeuf) par le sérum spécifique rendent le diagnostic bactériologique aisé.

2.4.5. Traitement

Le débridement des plaies souillées, l'excision des tissus dévitalisés et l'administration de pénicilline sont les moyens thérapeutiques spécifiques des infections à *C. perfringens* et aux autres Clostridia des gangrènes gazeuses.

2.5. Clostridium spiroforme

Clostridium spiroforme est un bacille anaérobie stricte, immobile, à Gram positif mais se décolorant rapidement. La mise bout à bout de plusieurs cellules conduit à des formes caractéristiques ayant l'aspect de ressorts. La température optimale de croissance est de 30 à 37 °C. Après 48 heures de croissance sur gélose au sang, les colonies ont un diamètre d'environ 1 mm, elles sont non hémolytiques, lisses, opaques et de couleur blanchâtre ou brunâtre.

Chez le lapin, la maladie ressemble à une entérotoxémie et elle est particulièrement fréquente au sevrage. La mort intervient souvent en moins de 8 heures et fréquemment les animaux sont retrouvés morts sans signe clinique préalable.

Enfin, il existe d'autres clostridia, telles que : *Clostridium piliforme* (pathogène pour les animaux de laboratoire).