

Chapitre III : Bacilles Gram positifs sporulés

1. Famille *Bacillaceae*

Cette famille regroupe des bactéries endosporulées à Gram positif (plus de 120 genres et de 2000 espèces), très répandues dans le sol et les poussières, d'où leur nom de "bactéries telluriques". Elles sont aérobies ou anaérobies facultatives, hétérotrophes. Elles se caractérisent par une grande résistance dans l'environnement, où elles survivent pendant des années, au sec et à l'abri du soleil. Le genre *Bacillus* est le plus important en infectiologie, puisqu'il regroupe des espèces pathogènes pour l'homme ; mais surtout pour les animaux.

1.1 Genre *Bacillus*

Bacillus : n. masc. L. *bacillus*, une baguette et en bactériologie un bacille ; n. masc. N.L. *Bacillus*, nom d'un genre bactérien regroupant des bactéries en forme de bacilles.

Ce genre comprend actuellement plus de 600 espèces et sous-espèces bactériennes, très hétérogènes métaboliquement, biochimiquement et antigéniquement. Elles sont largement distribuées dans la nature, la plupart étant saprophytes et jouent un rôle important dans le cycle de l'azote et du carbone. Certaines espèces sont mésophiles (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*), d'autres thermophiles (*B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. brevis*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. circulans*) ou encore tolérantes au froid (*B. psychrosaccharolyticus*, *B. insolitus*, *B. globisporus*, *B. psychrophilus*).

Plusieurs espèces produisent de grandes quantités d'enzymes, largement utilisées en biotechnologie. La majorité des *Bacillus* sont fréquemment isolés comme germes contaminants ; mais il existe aussi d'autres ayant un fort pouvoir pathogène (agent potentiel de guerre biologique et de bioterrorisme), dont les plus importants sont : *B. anthracis* (agent zoonotique du charbon "anthrax"), *B. cereus* (agent de toxi-infections alimentaires) et *B. thuringiensis* (agent entomopathogène). Des études génomiques ont prouvé que ces trois espèces sont génétiquement proches (leur pouvoir pathogènes et leurs affinités d'hôtes dépendent de leur arsenal génétique porté sur des plasmides).

Suite aux remaniements taxonomiques, ce genre a perdu plusieurs espèces (qui ont rejoint d'autres genres) ; mais aussi a gagné d'autres (appartenant à des genres différents).

Dans ce manuscrit, une attention particulière sera prêtée aux deux espèces *B. anthracis* et *B. cereus*.

(***anthracis*** : n. Gr. *anthraxēs -os*, le charbon ; n. N.L. *anthrax -acis*, l'anthrax (la maladie du charbon) ; n. gén. N.L. *anthracis*, de la maladie du charbon. En latin classique, *anthrax -acis* désigne le minium brut. *B. anthracis* est appelé aussi Bacille de Davaine).

(***cereus*** : adj. L. *cereus -a -um*, de cire, en cire, couleur de cire).

Habitat

Nombreuses espèces de *Bacillus* sont des saprophytes largement distribuées dans l'air, le sol et l'eau, ainsi que dans des produits alimentaires (laits en poudre, produits farineux, épices...).

Certaines espèces sont des pathogènes opportunistes (*B. cereus*, *B. licheniformis*) tandis que *B. anthracis* est considéré comme un agent pathogène obligatoire des animaux domestiques (Bovins, moutons, chèvres, chevaux, porcs) et sauvages, et des humains. Les animaux malades dispersent *B. anthracis* et le sol représente son principal réservoir (champs, près, etc.). Les cadavres et les produits d'origine animale (peaux, laine, poils, os...) contaminent les terrains et transmettent directement ce pathogène à l'homme et aux autres animaux. *B. cereus* est largement présent dans la nature, le sol, l'air et les aliments (souillés par ses spores). Les autres *Bacillus* présents dans l'environnement (sol, air, ...) peuvent être rencontrés au niveau de la peau ou des muqueuses de l'homme et des animaux.

Résistance / sensibilité

La résistance aux désinfectants physico-chimiques est faible pour les formes végétatives. Cependant, la capacité de produire des spores plus résistantes, permet aux *Bacillus* de coloniser et de survivre dans un large éventail d'habitats.

Les spores de *B. anthracis* sont hautement résistantes à la sécheresse, à la chaleur et à la lumière solaire. Pour les détruire, un traitement thermique de 121°C pendant au moins 30 min est nécessaire. Elles sont également résistantes à de nombreux désinfectants ; mais sensibles au glutaraldéhyde à 02%, au formaldéhyde et à la formaline à 05% (avec un temps de contact d'au moins une nuit). Elles persistent (viables en dormance) pendant des dizaines d'années, dans les peaux, le cuir et la laine d'animaux infectés, ainsi que dans le sol et dans l'air contaminés. Leur durée de survie est de 10 ans dans le lait, 41 ans sur du papier filtre séché, jusqu'à 71 ans sur du fil de soie séchée, 02 ans dans de l'eau d'étang et plus de 50 ans dans les sols contaminés.

B. cereus est sensible au glutaraldéhyde, aux oxazolidinones, au rayonnement gamma (02 à 05 kGy) et à la chaleur (100°C pendant 05 min). Cependant ; il persiste bien dans le sol et sur la végétation et il peut survivre aux traitements thermiques des aliments. Ses spores sont sensibles à l'hypochlorite de sodium à 01%, à l'acide peracétique, au peroxyde d'hydrogène, au dioxyde de chlore, au formaldéhyde, aux dérivés iodés, aux acides et aux bases (à de fortes concentrations et avec des temps de contact longs).

Morphologie

Les *Bacillus* sont de grands bâtonnets (03 à 05 µm/01.25 µm) à Gram positif (ou Gram variable), généralement mobiles par ciliature péritriche (sauf *B. anthracis* et *B. mycoïdes* qui sont immobiles), sporogènes, souvent à extrémités carrées et non capsulés (sauf les souches virulentes de *B. anthracis* dans certaines conditions). La spore peut être ovale ou ronde, déformante ou non déformante, à localisation centrale, para-centrale, sub-terminale ou terminale.

Bacillus spp. sont classés selon leur morphologie et la position de leurs spores. Ainsi, sont définis 3 groupes, au sein desquels les espèces et les sous-espèces se discriminent par des particularités morphologiques et physiologiques :

- Groupe 1 : Bacilles Gram positifs, à spores non déformantes, ovales ou rondes, centrales ou terminales. C'est le groupe le plus fréquent. Il peut être subdivisé en deux sous-groupes :

* Sous-groupe Large cell : *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoïdes*, *B. thuringiensis* et *B. megaterium* ;

* Sous-groupe Small cell : *B. pumilus*, *B. subtilis* et *B. licheniformis* ;

- Groupe 2 : Bacilles à Gram variable, à spores déformantes, ovales, centrales : *B. circulans* et *B. coagulans* ;

- Groupe 3 : Bacilles à spores déformantes, rondes, terminales ou sub-terminales : *B. sphaericus*.

Dans les frottis préparés à partir de produits pathologiques, ils se présentent en paires ou en courtes chaînettes ; alors que dans ceux préparés à partir de cultures, ils donnent des formations longues ressemblant parfois aux "cannes de bambou" pour *B. anthracis*.

Dans le cytoplasme de certaines espèces des inclusions parasporales, parfois des cristaux de protéines et des inclusions lipidiques peuvent être observés.

Afin de mieux apprécier les formes, les dimensions et la présence d'inclusions cytoplasmiques (surtout lipidiques), la coloration simple à la fuchsine diluée est la plus préconisée.

Caractères culturels

Suivant les espèces, les *Bacillus* sont aérobies stricts ou anaérobies facultatifs. Ils se développent mieux entre 28 et 33°C qu'à 37°C (beaucoup d'espèces tolèrent d'importantes différences thermiques), pendant 24 à 48h.

Les milieux de culture usuels (gélose nutritive, gélose trypticase soja, gélose au sang (ovin ou bovin) conviennent bien à la culture de la majorité des *Bacillus* et les différentes espèces ont leurs exigences nutritionnelles propres (azote ammoniacal pour certaines, acides aminés pour d'autres, ...). Des milieux sélectifs ont été proposés pour l'isolement de certains *Bacillus* à partir de matrices contaminées : les géloses de Knisely et de Pearce-Powell pour *B. anthracis* et les milieux MEYP, PEMBA et BCM pour *B. cereus*.

Sur géloses, les colonies de *B. cereus* sont très grandes, circulaires ou irrégulières de type R. Elles sont fréquemment mates et granuleuses à surface souvent d'aspect cireux. Sur gélose au sang, les colonies sont entourées de zones de β -hémolyse intense et parfois de α -hémolyse. Sur gélose contenant du jaune d'œuf, les colonies sont entourées d'un halo d'éclaircissement (production de lécithinase).

En bouillon, une turbidité modérée ou intense est observée, avec formation d'un anneau en surface et d'un dépôt abondant au fond facilement homogénéisable.

Sur milieux gélosés (ex : gélose nutritive inclinée), *B. anthracis* forme de grandes colonies irrégulières, rugueuses, opaques (aspect du verre dépoli), non pigmentées, blanches ou grisâtres, de type R. Elles sont moins crémeuses que celles de *B. cereus*. Les bords des colonies ont un aspect caractéristique, ondulé ou "crépu" (vus à la loupe). Souvent, ils présentent des projections ressemblant aux virgules (composées de chaînes de bacilles sortant de la colonie et retournant vers elles), qui donnent aux colonies, un aspect distinctif en "tête de méduse". Sur gélose au sang, les colonies se développent également bien sans hémolyse (occasionnellement, elles sont faiblement hémolytique) et sur gélose au sérum elles sont de type S (production d'une capsule). Généralement, les colonies de *B. anthracis* sont difficiles à prélever car elles s'incrustent (creusent) dans la gélose. La liquéfaction de la gélatine en culot (ensemencée par piqûre) donne lentement un aspect de "sapin renversé".

Dans le bouillon, ce germe se développe en formant un dépôt floconneux qui se dépose au fond du tube, le surnageant restant clair. Le dépôt est facile à homogénéiser et est d'autant plus abondant que les chaînes formées sont longues. Les souches à chaînes courtes produisent un certain degré de turbidité.

Caractères biochimiques

Les *Bacillus* sont des bactéries à métabolisme respiratoire. Elles sont catalase positives, oxydase et nitrates réductase variables. L'acidification du glucose, arabinose et xylose et la production de l'acétoïne sont aussi variable selon les espèces. Cependant, ils sont capables d'hydrolyser l'amidon, la caséine et la gélatine.

B. anthracis est positif aux tests indole, H_2S et nitrates réductase. Il fermente le glucose, le saccharose, le maltose, le tréhalose, le fructose sans produire de gaz. Il ne fermente pas l'arabinose, le xylose et le mannitol. Il réduit le bleu de méthylène dans le lait et il produit de la collagénase, de la protéase, de la lécithinase (faible) et de la transaminase.

En plus des caractères positifs et négatifs chez toutes les espèces du genre (sus-cités), *B. cereus* est hémolytique, produit de l'indole, une lécithinase, des protéases et des phospholipases. Il est inactif sur le mannitol, mais fermente la saliciline.

Structure antigénique

Chez *B. anthracis*, les types d'antigènes suivants ont été identifiés : des antigènes capsulaires de nature polypeptidique, des antigènes somatiques de nature polysaccharidique et des antigènes protéiques et polysaccharidiques exogènes (6 à 9). Certaines souches sont utilisées dans la préparation du vaccin et du sérum hyperimmun charbonneux. Elles présentent une certaine complexité antigénique et sont représentées par : la souche 1190-R Stamatin, la souche 34F2 Sterne, la souche Pasteur II et la souche 55.

Chez *B. cereus*, des antigènes somatiques (O) non spécifiques et des antigènes flagellaires (H) spécifiques ont été identifiés, permettant de définir plusieurs sérovars dont certains sont associés à des manifestations cliniques particulières : H1, H2, H6, H10, H12 et H19 dans le syndrome diarrhéique, et H1, H5, H8, H12 et H19 dans le syndrome des vomissements.

Il existe des parentés antigéniques entre *B. anthracis* et certains autres *Bacillus* : *B. subtilis*, *B. megaterium* et *B. cereus*.

B. anthracis et *B. cereus* sont sensibles à différents bactériophages. Cette sensibilité (lysotypie) peut être utilisée dans leur diagnostic différentiel :

- Phages du groupe A : actifs sur *B. anthracis*, inactifs sur *B. cereus* ;
- Phages du groupe C : inactifs sur *B. anthracis*, actifs sur certains *B. cereus* ;
- Phages du groupe AC : actifs sur *B. anthracis* et *B. cereus*.

Facteurs de virulence

B. anthracis possède deux plasmides de virulence pXO1 et pXO2. Le plasmide pXO1 code 02 toxines LF (lethal Factor, Facteur létal ou Facteur III) et EF (Edema Factor, Facteur I ou Facteur Oedématogène) et leur transporteur PA (Protective Antigen, Facteur II ou Antigène protecteur). Le plasmide pXO2 code l'opéron nécessaire à la germination des spores qui se produit dans le corps du mammifère et il code aussi pour la capsule.

- La capsule : permet à *B. anthracis* de résister à la phagocytose et au complément ce qui facilite la dissémination sanguine des formes végétatives ;
- L'Antigène protecteur : une fois fixé à son récepteur eucaryote forme un pore dans la cellule qui permet le passage des toxines dans le cytosol ;
- Facteur létal : active diverses cytokines (principalement TNF α et IL-1), et a une action synergétique avec le facteur œdématogène ce qui exacerbe les effets de celui-ci ;
- Facteur œdématogène : augmente la concentration d'AMPc et prive la cellule-hôte d'ATP, énergie nécessaire à la phagocytose. Il augmente considérablement la perméabilité capillaire et il inhibe le métabolisme oxydatif des neutrophiles.

En plus, *B. anthracis* produit un sidérophore, proche de l'aérobactine d'*E. coli*, et possède une résistance naturelle au lysozyme.

B. cereus produit une variété de de toxines et d'enzymes, des hémolysines, des protéases, des phospholipases. Il produit également des toxines plus spécifiques au tube digestif :

- Une entérotoxine protéique (toxine diarrhéigène) : agit directement sur le tractus digestif, en modifiant la perméabilité vasculaire et provoquant une accumulation liquidienne dans la lumière intestinale. Elle a une action nécrotique et une action cytotoxique. Elle est thermolabile et ils en existent 05 types ;
- Une toxine émétisante : de nature chimique encore mal connue, elle est thermostable et agit sur les centres nerveux contrôlant le vomissement.

Pouvoir pathogène

Les principales pathologies dues aux bactéries du genre *Bacillus* sont résumées dans le tableau qui suit. Il est à préciser que *B. licheniformis* est devenu un pathogène émergent en médecine vétérinaire.

<i>Bacillus</i> spp.	Hôtes	Pathologies
<i>B. anthracis</i>	Bovins et ovins	Forme septicémique de l'anthrax, fréquemment mort subite.
	Carnivores	Habituellement plus résistant à l'infection. L'ingestion massive de viandes contaminées conduit à des septicémies.
	Chevaux	Contamination par voie orale : septicémie, entérite et coliques.
	Porcs	Anthrax subaiguë : œdème des tissus pharyngiens avec lymphadénites régionales, ou forme intestinale avec un taux de mortalité élevé.
<i>B. cereus</i>	Bovins	Rarement mammites et avortements.
	Chiens et chats	Intoxications alimentaires.
<i>B. licheniformis</i>	Bovins et ovins	Avortements et mammites.
<i>B. subtilis</i>	Bovins et ovins	Avortements chez les ovins et mammites chez les bovins.

Diagnostic

- *B. anthracis* :

Le diagnostic de l'anthrax (charbon) est souvent orienté par l'épidémiologie (région endémique). Il doit être confirmé au plus vite compte tenu de la possibilité de créer des foyers telluriques d'infection.

Les échantillons suivants sont à envoyer au laboratoire :

* À partir de cadavres non ouverts : os longs, un fragment du pavillon auriculaire, des frottis sanguins (sang pris de la veine caudale ou des veines auriculaires) non fixés ou du liquide d'œdème ;

* À partir de cadavres ouverts : os longs, frottis de sang et calques d'organes (rate, foie, ...), fragments d'organes internes (rate, foie, reins).

Des portions de peau (de 10/10 cm) peuvent également être envoyées, fixées sur divers supports solides.

Dans tous les cas, des précautions particulières pour la manipulation sont nécessaires afin d'éviter toute contamination (port des blouses, gants, masques, lunettes et traitement de l'échantillon dans des cabinets à haute sécurité de type NSB3).

Les frottis sanguins et les empreintes d'organes sont colorés par la méthode de Gram pour observer les bactéries et les techniques Giemsa, Wright ou McFadyean (au bleu de méthylène polychromé) pour mettre en évidence la capsule. Les espèces contaminantes de *Bacillus* n'ont pas de capsule et leur aspect est généralement différent de celui de *B. anthracis*. Le recours à des anticorps fluorescents permet une différenciation plus aisée entre elles.

Les prélèvements monomicrobiens peuvent être ensemencés sur milieux usuels et ceux contaminés (polymicrobiens) doivent être cultivés (frais) sur milieux sélectifs. Pour ce type de prélèvements, un traitement thermique (62.5°C pendant 15 mn) permet de détruire tous les contaminants non sporulés, suivi d'un ensemencement sur géloses riches non sélectives. L'aspect des colonies (tête de méduses) et de la croissance en bouillon (dépôts floconneux et milieu limpide) peuvent aider dans l'orientation du diagnostic.

L'identification fera appel à des galeries d'identification miniaturisées (API 20E® et API 50 CHB®) ou des systèmes automatisés (Vitek® avec la carte *Bacillus*). Elle peut être aussi faite par : immuno-chromatographie, techniques d'amplification génique (PCR et PCR en temps réel), MALDI-TOF, électrophorèse sur gel de polyacrylamide, spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), répétition en tandem à nombre variable (VNTR), recherche des facteurs de virulence portés par les deux plasmides pOX1 et pOX2 ou le chromosome, ...

Le lysotypage peut également être effectué.

La scarification sur les flancs de cobaye (de 600g) ou à la base de la queue de la souris, ainsi que l'injection au cobaye en sous cutanée d'une culture de 24h sont fatale en 03 à 04j. Cette technique est rarement pratiquée et doit être effectuée dans une animalerie hautement protégée.

Le diagnostic indirect est possible par méthode d'Ascoli (thermo-précipitation), par précipitation, par ELISA ou encore par fixation du complément.

L'injection intradermique de 0.1 ml d'anthraxine (un extrait thermostable d'un *B. anthracis* non encapsulé) permet de mettre en évidence un état d'allergie (de type retardé) à *B. anthracis* (une réaction locale s'observe au bout de 24h).

- *B. cereus* :

En cas de toxi-infection alimentaire, les prélèvements sont représentés par les selles et l'aliment suspect. En cas de mammites, le lait et en cas d'avortement, le placenta, le contenu de l'estomac, le foie, la rate, les reins et les poumons du fœtus. Aucune précaution particulière n'est à respecter lors du prélèvement, transport ou manipulation de ces échantillons.

Le diagnostic est basé sur des caractères bactériologiques (morphologie, propriétés tinctoriales, type respiratoire), mise en évidence des spores et isolement sur milieux de culture. Une méthode de diagnostic direct a été proposée, basée sur l'identification par ARN, qui permet la détection spécifique de spores bactériennes viables. L'identification est basée sur les propriétés hémolytiques, la présence d'une gélatinase, d'une lécithinase, la résistance à la polymyxine et l'absence d'action sur le mannitol. Les galeries API 20E® et Api 50 CHB®, ainsi que le Vitek® peuvent également être utilisés. La sensibilité/résistance à la pénicilline permet de différencier *B. anthracis* (sensible) de *B. cereus* (résistant).

En cas d'intoxication alimentaire, l'isolement de *B. cereus* dans les selles n'est pas suffisant et il est nécessaire de déterminer le nombre de germes dans l'aliment en utilisant des milieux sélectifs ($>10^5$ /g d'aliment) et l'identification du bacille. La mise en évidence de la production de toxine par des techniques rapides confirme le diagnostic.

Sensibilité aux antibiotiques et prophylaxie

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des *Bacillus* se fait par détermination des CMI en milieu liquide (qui est la méthode de référence) ou par la méthode de dilution en gélose ou par E-tests®.

Historiquement, *B. anthracis* était connu sensible à la pénicilline et d'autres β -lactamines, chose qui les différencie de *B. cereus*. Des publications récentes, ont reporté une résistance à cet antibiotique chez des isolats cliniques et environnementaux de *B. anthracis*.

B. anthracis est normalement sensible aux : gentamicine, érythromycine, chloramphénicol, ciprofloxacine, doxycycline et streptomycine. Il est résistant aux céphalosporines par production d'une β -lactamase constitutive ou inductible.

B. cereus est résistant à la pénicilline et beaucoup d'autres β -lactamines par production d'une β -lactamase chromosomique. Il est sensible aux aminosides, à la ciprofloxacine, à la clindamycine et à la vancomycine.

Les cas suspects d'anthrax doivent être signalés immédiatement aux autorités compétentes. Des programmes de contrôle doivent être conçus en tenant compte de la prévalence de la maladie dans un pays ou une région géographique donnés :

- En régions endémiques :

* Vaccination annuelle, en particulier des bovins et ovins. Vaccin (à base de spores de la souche Sterne par exemple) à administrer environ 1 mois avant les épidémies prévues. Les spores de ce vaccin vivant se transforment en bactéries végétatives non encapsulées avirulentes ;

* Chimio-prophylaxie (en utilisant la pénicilline à action prolongée) : doit être envisagée lorsque des épidémies menacent le bétail précieux ;

* Vaccins tués (à base de l'antigène protecteur) sont disponibles pour les humains susceptibles d'être exposés dans le cadre de leur travail.

- En régions non endémiques suite à une épidémie :

* Mouvements interdits des animaux, de leurs déchets, des aliments et de la litière depuis les locaux affectés et adjacents ;

* Port de vêtements et de chaussures de protection, à désinfecter avant de quitter l'exploitation touchée ;

* Pédiluves contenant un désinfectant sporicide (formol à 0,5% ou acide peracétique à 0,3%), placés aux entrées des exploitations concernées ;

* Scellage des bâtiments contaminés et fumigation de formaldéhyde avant d'enlever la litière. Après le retrait de la litière et des accessoires, fermeture de toutes les ouvertures et pulvérisation de tout le bâtiment avec du formol à 0,5% (à laisser agir au moins 10h avant le lavage final) ;

- * Elimination immédiate des carcasses, de la litière, du fumier, du fourrage et de tout autre matériel contaminé. Incinération des carcasses ou leur enfouissement profondément loin des cours d'eau. Désinfection du matériel contaminé avec du formol à 10% ;
- * Empêchement des animaux charognards à accéder aux carcasses suspectes, ainsi que des insectes par l'application d'insecticides sur et autour des carcasses ;
- * Séparation, confinement (pendant au moins 02 semaines) et surveillance des animaux ayant eu un contact avec des suspects.

Les spores de *B. subtilis* ont été étudiées comme potentiels stimulateurs immunitaires après administration orale chez le porc. Ces spores aussi confèrent une protection contre l'infection par d'autres pathogènes entériques chez le poulet (*Salmonella* Enteritidis et *Clostridium perfringens*). Ceci pourrait résulter d'une régulation à la hausse des lymphocytes T CD4+/CD8+ mémoires.

2. Famille *Clostridiaceae*

Elle est composée de 76 genres avec plus 330 espèces reconnues. Bon nombre des genres de cette famille sont représentés par une seule espèce. De très nombreuses espèces sont saprophytes non pathogènes, d'autres sont hautement pathogènes et provoquent de graves maladies chez l'homme et l'animal, et certaines espèces sont importantes de par leur utilisation dans divers procédés biotechnologiques.

2.1 Genre *Clostridium*

Clostridium : n. Gr. closter, un fuseau ; n. dim. neut. N.L. *Clostridium*, un petit fuseau.

Plus de 300 espèces sont incluses dans ce genre, dont l'espèce type est *C. butyricum*. Ce sont des bactéries strictement anaérobies (avec certaines espèces aérotolérantes), en forme de bâtonnet, principalement mobiles, Gram positives et sporulées (spore déformante centrale, subterminale ou terminale).

Ces microorganismes vivent à l'état saprophyte dans le sol (bactéries telluriques), l'eau ou les sédiments marins. De ces environnements, ils atteignent le tractus gastro-intestinal des humains et des animaux, d'où ils sont éliminés dans les fèces.

Une classification basée sur l'hydrolyse des protéines et la fermentation des glucides permet de classer les *Clostridium* en quatre groupes :

- Groupe I : protéolytique et glucidolytique : *C. botulinum* (A, B, F), *C. sporogenes*, *C. sordellii* ;
- Groupe II : protéolytique : *C. histolyticum* ;
- Groupe III : faiblement ou non protéolytique et glucidolytique : *C. perfringens*, *C. botulinum* (C, D, E, G)... ;
- Groupe IV : ni protéolytique ni glucidolytique : *C. tetani*.

Habitat

- *C. tetani* (**tetani** : n. L. *tetanus* -i, crampe, tétanos ; n. gén. L., *tetani*, du tétanos) est retrouvé à l'état de spores dans le sol, d'où il peut souiller différents objets, l'eau et la nourriture. Il se retrouve également dans le tube digestif de l'homme et de différentes espèces animales (cheval, ...), qui enrichissent les sols en ses bactéries éliminées dans leurs déjections. Les terres où les spores se trouvent en grand nombre et où de nombreux cas de tétanos ont été enregistrés sont nommées "zones tétanigènes". Les spores de *C. tetani* peuvent survivre dans le sol pendant de nombreuses années.

- *C. botulinum* (**botulinum** : n. L. *botulus* -i, boyau d'un animal utilisé en charcuterie et par extension boudin, saucisse et d'une manière générale tous boyaux farcis ; suff. L. -inus -a -um, suffixe marquant l'origine ; adj. neut. N.L. *botulinum*, relatif à un boyau farci : saucisse, boudin...) est très répandu le sol, ainsi que dans les intestins des humains et des animaux (mammifères, oiseaux et poissons). Les spores sont plus fréquentes dans les zones à climat chaud (où le botulisme peut être endémique). Une distribution géographique

variable peut être observée entre les différents types antigéniques de cette bactérie. À partir du sol, *C. botulinum* peut contaminer les aliments (légumes, miels,...), les fourrages et les ensilages; mais la germination des spores ne peut survenir qu'en environnement non halophile et anaérobie. Les insectes (dans toutes leurs phases de développement) peuvent conserver les formes végétatives et les spores, et la toxinogénèse se produit également chez les morts, avec conservation de la toxine pendant des mois.

- *C. chauvoei* (**chauvoei** : n. gen. L. M. *chauvoei*, en l'honneur du bactériologiste J. A. B. Chauveau) est présent dans le sol en spores, qui y persistent pendant de très longues périodes (plus de 11 ans). Le sol est contaminé par les animaux (bovins, ovins,...), leurs cadavres et le fumier, les eaux de surface et souterraines, qui transportent des spores dans les zones basses et inondées. La présence de spores est fréquente dans certaines régions, ce qui confère à la maladie un caractère zonal.

- *C. perfringens* (**perfringens** : adj. L. *perfringens* enfoncé) anciennement appelé *Welchia perfringens* ou *C. welchii*, se trouve dans de nombreux environnements. C'est l'organisme anaérobie le plus fréquemment rencontré dans tous les sols, les eaux courantes, stagnantes ou usées, les berges des rivières, les marais et dans l'eau de mer. Il peut être isolé (sous forme végétative ou sporulée) de nombreux aliments d'origine végétale ou animale (légumes, lait frais ou concentré, fromages, conserves, semi-conserves, viandes, charcuterie, poissons, fruits en conserve,...), ainsi que du contenu intestinal des animaux et des humains.

Résistance / sensibilité

- *C. tetani* : Les spores sont extrêmement résistantes à la chaleur et à la dessiccation. Elles résistent pendant 01h à 100°C et 15 à 20 mn à 120°C. Elles restent viables après 02 mois dans de l'alcool à 90%, 15h dans de l'acide phénique à 05%, 3h dans du sublimé à 01%. Dans le sol et dans les produits pathologiques secs, elles persistent pendant des décennies (plus de 60 ans). Les formes végétatives ne présentent aucune résistance particulière à l'action des agents désinfectants physiques ou chimiques. Elles peuvent être rapidement inactivées par une exposition à la chaleur sèche (160 à 170°C pendant 01 à 02h) ou à la chaleur humide (121°C pendant 15 à 30 mn).

- *C. botulinum* : Les formes végétatives sont sensibles à la chaleur et aux désinfectants comme l'éthanol à 70%, l'hypochlorite de sodium à 0.1% et le NaOH à 0.1 mol/L. Les spores sont très résistantes à la chaleur et à la dessiccation ; ainsi il est recommandé de stériliser à la chaleur sèche (02h à 160°C) ou par autoclavage (20 mn à 121°C, à une pression de 01 atm). La thermorésistance est variable selon les sérotypes, diminuant dans l'ordre suivant C, A, B, D, E. *C. botulinum* sérotype A est l'une des bactéries les plus radiorésistantes. L'irradiation aux rayons gamma seuls ou combinés à la chaleur, semble être actuellement la meilleure méthode de stérilisation des conserves et semi-conserves. Certaines spores peuvent être résistantes aux désinfectants chimiques. Les toxines sont inactivées par une exposition de 20 mn au chlore libre à 03 mg/L, ou par une exposition à la chaleur (85°C) pendant 05 mn. Elles sont éliminées en moins de 12h dans l'air et après 01 à 03h d'exposition à la lumière du soleil.

- *C. chauvoei* : Les spores résistent à 70°C pendant 30 mn. Elles se conservent pendant 08 ans dans les lésions tissulaires charbonneuses séchées, 02 ans dans la viande salée et 06 mois dans les cadavres en décomposition. Elles sont détruites par le formol à 03% en 15 mn. Les formes végétatives sont facilement détruites sous l'action de divers facteurs environnementaux.

- *C. perfringens* : Les formes végétatives ne montrent pas de résistance particulière à l'action des différents agents physiques ou chimiques. Elles sont inactivées à 65°C et par les désinfectants habituels. Les spores de la plupart des biotypes sont détruites à 100°C en 02 à 03 mn, sauf celles du type F qui résistent jusqu'à 02h. En principe, les spores de *C. perfringens* sont de deux types : les souches (de myonécrose) à spores thermosensibles (dont la résistance ne dépasse pas 30 mn à 80°C) et les souches (d'intoxication alimentaire) à spores thermorésistantes (résistent au moins 15 à 30 minutes à 100°C).

Morphologie

- *C. tetani* : est un bacille Gram positif (qui la perd facilement), long et fin, de 02 à 05/0.4 à 0.5 μm , non encapsulé et sporulé. Les spores sont en position terminale et déformantes, ce qui donne aux bactéries un aspect caractéristique d'allumettes, têtes d'épingles ou de baguettes de tambour. Le bacille tétanique est très mobile grâce à de nombreux cils longs et fins disposés autour du corps bactérien.

- *C. botulinum* : est un bacille aux extrémités arrondies, Gram positif, droit, long et épais, de 0.3 à 01/01.5 à 09 μm (des formes allant jusqu'à 22 μm de long ont été décrites). Il est non encapsulé et a une spore ovale, sub-terminale et légèrement déformante, en plus d'une ciliature péritriche. Dans les cultures jeunes, les formes végétatives sont isolées ou disposées par paires, rarement en chaînettes. Dans les cultures âgées, on observe des formes d'involution vacuolaires et des spores.

- *C. chauvoei* : est un bacille Gram positif (coloration inégale, surtout pour les cultures vieilles), de 02 à 04/0.5 à 0.8 μm . Il est cilié, non encapsulé et sporulé. La spore est ovale, sub-terminale ou centrale et déformante.

- *C. perfringens* : est un bacille court et épais, à bords parallèles et aux extrémités carrées à légèrement arrondies, mesurant 03 à 09/01 à 01.3 μm . Il est Gram positif, encapsulé, sporulé et immobile. La capsule se forme dans le corps, mais elle se détache difficilement (observable dans les produits pathologiques par contraste négatif, sous la forme d'un halo clair entourant la forme végétative). La spore est ovoïde, centrale ou sub-terminale, déformante donnant à l'ensemble forme végétative-spore l'apparence d'un citron ou d'un verre de lampe. Dans les frottis, les formes végétative se présentent seules ou en courtes chaînettes.

Caractères cultureux

- *C. tetani* : strictement anaérobie et se développe sur les milieux usuels pour anaérobies (bouillon Kitt-Tarozzi), gélose de Veillon, gélose de Zeissler (au sang) et milieu VF (viande-foie). L'ajout d'agents réducteurs (cystine, thioglycolate, ions métalliques, sulfure disodique et ascorbate de sodium) favorise sa croissance. Cependant, ce bacille est considéré comme difficile à cultiver, et l'isolement d'une souche ne signifie pas qu'elle est toxigène. En milieu liquide, il se développe bien entre 37 et 39°C après 24 à 48h, en produisant une turbidité modérée, avec production de gaz et d'une odeur de corne brûlée. Certaines souches sédimentent avec le milieu restant clair. Sur les milieux solides (à 03% d'agar), cultivés en surface, il forme de grandes colonies de 04 à 06 mm \varnothing , mates, aplaties, de couleur grise, à aspect rhizoïde fin. Étant très mobile, l'aspect "grimant" peut être mis en évidence, s'étalant comme un voile uniforme sur toute la surface du milieu (tendance à essaimer). Sur gélose au sang, certaines souches produisent une hémolyse (due à une toxine, la tétanolysine). Sur la gélose de Veillon, il forme de grandes colonies globuleuses, pelucheuses, avec un centre opaque et une périphérie diffuse (arborescence fine). Sur le milieu de MacConkey, il donne une couleur verdâtre fluorescente.

- *C. botulinum* : pousse bien sur les milieux usuels pour anaérobies, dans des conditions d'anaérobiose stricte et à une température de 26 à 28°C (avec des différences entre les divers groupes métaboliques). En milieux liquides, il donne une turbidité prononcée, avec production de grandes quantités de gaz, formation d'un dépôt gris homogénéisable et dégagement d'une odeur caractéristique de rance. Sur les milieux solides ensemencés en surface, il forme de grosses colonies de 03 à 04 mm, mates, de couleur grise, à bords rhizoïdes. Ensemencé en profondeur (gélose VF en tube), il forme des colonies duveteuses, avec un centre opaque et une forte arborescence en périphérie (colonies épineuses ou en oursins). Sur gélose au sang (cheval), les colonies sont hémolytiques, et sur gélose Nagler ou Willis-Hobbs, elles produisent une opalescence et une couche nacrée. La croissance est stimulée par l'ajout d'hydrates de carbone fermentescibles et est inhibée par le chlorure de sodium (05 à 10%) et la bile (20%).

- *C. chauvoei* : se développe sur les milieux habituels des anaérobies en anaérobiose stricte. En milieu liquide, il donne en 18 à 24h, une turbidité uniforme avec production de gaz et une odeur de beurre rance. Sur milieux solides (gélose au sang, ensemencée en surface), les colonies sont de 01 à 03 mm Ø, rondes ou en forme de feuille de vigne, grises, entourées d'une faible zone d'hémolyse β. Cultivé en profondeur (gélose VF), il forme des colonies duveteuses de différentes tailles.

- *C. perfringens* : bactérie anaérobie stricte, mais aérotole'ante. Elle se développe rapidement dans les milieux de culture usuels pour anaérobies. La croissance est accentuée à une température de 45 à 46°C (culture visible en quelques heures). En milieu liquide. La culture est abondante, avec une turbidité et une intense production de gaz, qui s'accumule en collerette dans la partie supérieure du milieu. En quelques jours, le milieu commence à se clarifier, et un dépôt gris se forme au fond du tube. Dans le lait tournesolé, il présente un aspect caractéristique, appelé caillot alvéolaire (caillot spongieux, dû aux bulles de gaz ou encore stormy clot). En gélose profonde, il donne des colonies lenticulaires, avec une abondante production de gaz, déchirant le milieu de culture. Ensemencé en surface, il forme des colonies grandes (03 à 05 mm Ø) et convexes, à surface lisse, aux bords réguliers parfois rhizoïdes, à centre plus opaque et à périphérie transparente.

Sur gélose au sang, les souches toxigènes donnent de larges zones d'hémolyse (diamètre variable en fonction des souches). Les colonies du type A sont entourées d'une hémolyse β, puis d'une zone d'hémolyse α (qui est synergique avec le CAMP factor de *S. agalactiae*).

Caractères biochimiques

Les *Clostridium* sont des bactéries anaérobies strictes, avec certaines espèces aérotole'antes pouvant (sans sporuler) pousser en présence d'oxygène. Ils sont habituellement dépourvus de catalase, et sont capables de produire des acides organiques et des alcools à partir des hydrates de carbone et des peptones. Les espèces diffèrent entre elles par les caractères métaboliques suivants : la protéolyse, la production d'indole, possession d'une uréase, la fermentation des sucres (glucose, esculine, lactose, saccharose, mannitol...), la production d'acides (caproïque, butyrique, isovalérique, propionique...), des lipides et phospholipides.

- *C. tetani* : a des pouvoirs glycido- et protéolytiques réduits. Il est incapable de fermenter le lactose, le maltose, le fructose, l'arabinose, le mannose, le xylose. Les produits terminaux de fermentation des autres sucres sont les acides (acétique, propionique et butyrique), l'éthanol, le propanol et le butanol. La majorité des souches produisent de l'indole et une minorité de l'H₂S. Il réduit les nitrates en nitrites et possède des peptidases, des désaminases, une gélatinase, une désoxyribonucléase et une tétanolysine (hémolysine soluble oxygénolabile).

- *C. botulinum* : fermente divers sucres en produisant des acides acétique, butyrique (à odeur de beurre rance caractéristique), et une petite quantité d'acide lactique. Les types A, B, E et F fermentent le glucose, le maltose et le saccharose ; les types C et D fermentent le glucose et le maltose et ne fermentent pas le saccharose ; le type G est dépourvu de propriétés glucidolytiques. La protéolyse est plus ou moins marquée selon les types. Tous les types produisent une gélatinase, une lécithinase, de la lipase et de l'H₂S. Les types A et B ont une décarboxylase et une désaminase. C, D et E sont peu protéolytiques et le type B produit une hémolysine. Les types A, B et F présentent un pouvoir lipolytique très marqué ; alors que le pouvoir réducteur est élevé chez le type A et faible chez B, C et E.

- *C. chauvoei* : fermente un certain nombre de sucres (glucose, fructose, lactose, saccharose, galactose, maltose et mannose) avec production d'acides (acétique et butyrique) et de l'alcool butylique. Il est lécithinase positif et indole négatif.

- *C. perfringens* : est un germe à activité biochimique intense. Il fermente de nombreux sucres (glucose, fructose, lactose, galactose, maltose, saccharose, mannose et inositol) avec production de gaz (CO₂ et H₂) intense et d'acides (acétique,

butyrique, caproïque, ...). Il hydrolyse l'amidon, liquéfie la gélatine, coagule le lait tournesolé (acidification, rétraction du caillot) et produit de l'H₂S, mais pas d'indole ni d'uréase. Son pouvoir protéolytique est faible.

Structure antigénique

- *C. tetani* : présente une homogénéité d'antigène somatique (Ag O), mais il est variable dans ses antigènes flagellaires (Ag H), avec 10 sérotypes connus. La toxine est de nature protéique et elle est fortement immunogène.
- *C. botulinum* : possède des facteurs hémolytiques et hémagglutinants (non liés à la toxine), des antigènes somatiques thermostables et des antigènes flagellaires thermolabiles (avec 03 sous-types H pour les souches du type A et 04 pour celles du type B). La toxine produite par cette bactérie est de nature protéique et est immunogène. Ainsi, 07 variants antigéniques de la toxine botulinique (toxino-types) ont été identifiés : A, B, C (1 et 2), D, E, F et G, et qui provoquent tous la même maladie clinique (le botulisme). Il existe des relations antigéniques entre les souches des types A et D, les autres types étant bien différents. Les souches des types A, B, E et F semblent être saprophytes dans le sol, alors que celles des types C et D sont des parasites obligatoires du tube digestif des mammifères et des oiseaux et leur présence dans le sol et l'eau n'est que transitoire.
- *C. chauvoei* : possède des antigènes somatiques O (Ag O), communs à toutes les souches et des antigènes flagellaires H (Ag H) variables.
- *C. perfringens* : possède des antigènes somatiques communs et des antigènes de biotypes spécifiques, permettant la classification des souches en 05 types toxiques : A, B, C, D, E et F. Au sein de certains toxino-types, plusieurs types antigéniques peuvent être identifiés (le biotype A par exemple comprend 08 sérotypes).

Le type A est responsable de pathologies humaines ; les autres types provoquent des entérotoxémies d'origine endogène chez les animaux (ovins et bovins).

Facteurs de virulence

Une classification basée sur le tropisme des toxines produites et le potentiel invasif des clostridium, définit 04 groupes de *Clostridium* :

- *Clostridium* neurotropes: *C. tetani* and *C. botulinum*;
- *Clostridium* histotoxiques: *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi* types A et B, *C. haemolyticum*, *C. sordellii* et *C. perfringens* type A);
- *Clostridium* entéropathogènes : *C. perfringens* types A-E, *C. difficile*, *C. colinum* et *C. spiroforme* ;
- *Clostridium* atypiques : *C. piliforme*.

Les principaux facteurs de virulence rencontrés chez quelques *Clostridium* sont :

- *C. tetani* : *in situ*, produit deux exoprotéines, une hémolysine (tétanolysine) et une neurotoxine puissante (tétanospasmine, responsable du tétanos). Cette dernière se fixe au niveau de certains lipides du tissu nerveux et provoque une paralysie spastique en :

- * Bloquant les influx inhibiteurs exercés sur les motoneurones alpha ;

- * Inhibant la libération de différents médiateurs du système nerveux central (acide gamma-aminobutyrique, glycine...);

- * Induisant une augmentation de la libération de l'acétylcholine et une diminution de l'activité cholinestérasique.

- *C. botulinum* : sécrète une toxine de nature protéique et de poids moléculaire élevé. C'est l'une des toxines biologiques les plus actives. 07 types de toxines botuliniques sont connus. Elles sont thermolabiles (sauf C et D qui sont plus thermorésistantes) et sensibles aux oxydants et à la lumière ; mais elles sont stables au pH acide (résistent à l'action du suc gastrique chez l'homme mais pas chez les animaux charognards). L'action de ces toxines siège au niveau du système

nerveux périphérique, à la différence de la toxine tétanique qui intervient surtout sur le système nerveux central. Elles empêchent la transmission nerveuse au niveau des terminaisons en inhibant la libération de l'acétylcholine. Ceci conduit à une diminution de l'activité du nerf vague, des nerfs de contraction vésicale, des organes sécrétoires, oculomoteurs et des motoneurones.

Selon les capacités de sécrétion des différentes toxines, on distingue quatre groupes de *C. botulinum* :

- * Groupe I : Souches protéolytiques. Types toxiques A, B, F ;
- * Groupe II : Toxine de type E et souches non protéolytiques de type B et F ;
- * Groupe III : Toxines de type C et D, le plus souvent des souches aviaires ;
- * Groupe IV : Toxine de type G. Les souches capables de sécréter cette toxine sont désignées *C. argentinense*.

Il est à signaler que d'autres *Clostridium* (*C. baratii* et *C. butyricum*) sont capables de synthétiser la toxine botulinique.

- *C. chauvoei* : secrète une toxine composée de plusieurs fractions : la fraction *Alpha* (à effet létal, nécrotique, leucocidinique et hémolysant), la fraction *Bêta* (une désoxyribonucléase à action hémolytique), la fraction gamma (une hyaluronidase) et la fraction delta (une hémolysine). À l'endroit où le germe se multiplie et produit la toxine, se développe la tumeur emphysémateuse, caractérisée par la dégradation du glycogène musculaire, avec production de gaz, et fermentation butyrique des lipides (donnant des acides gras volatils, qui dégagent une odeur de beurre rance). Sous l'effet des hémolysines, l'hémoglobine est libérée puis absorbée par les tissus endommagés en leur donnant une couleur noirâtre.

- *C. perfringens* : secrète une variété de toxines :

* Toxines létales-nécrosantes : au nombre de 04 :

. Toxine *Alpha* hémolytique : c'est une phospholipase C produite par tous les types. Elle agit par destruction des membranes des globules rouges et des plaquettes (troubles de la coagulation) et par une inactivation de l'ATPase musculaire (myonécrose) ;

. Toxine *Bêta* non hémolytique : très active chez les animaux. Rencontrée surtout chez les type B et C ;

. Toxine *Epsilon* non hémolytique : provoque des nécroses sous-endocarditiques et du parenchyme rénal (synthétisée par les types B et D) ;

. Toxine *Iota* non hémolytique : augmente la perméabilité vasculaire, surtout chez les animaux (produite par le type E).

* Entérotoxine : produite par les souches de type A. elle se fixe sur les cellules épithéliales de iléon en y provoquant une altération de la perméabilité membranaire avec perte de liquide, d'ions et de petites molécules.

* Facteurs enzymatiques : il s'agit des toxines : *Gamma* (létale), *Delta* (hémolytique *in vitro* et létale), *Eta* (létale), *Thêta* (hémolytique, létale et nécrosante), *Kappa* (pro-collagénase), *Lambda* (protéase), *Mu* (hyaluronidase) et *Nu* (désoxyribonucléase).

Pouvoir pathogène

Le tableau suivant résume les pathologies provoquées par les principales espèces de *Clostridium* :

<i>Clostridium</i> spp.	Hôtes	Pathologies
Neurotropes	<i>C. tetani</i>	Chevaux, ruminants, homme et autres espèces animales
	<i>C. botulinum</i> (types A à F)	Homme et plusieurs espèces animales
	<i>C. argentinense</i>	Homme
Histotoxiques	<i>C. chauvoei</i>	Bovins, ovins et un peu moins porcs
		Bovins, ovins et porcs
	<i>C. septicum</i>	Ovins
		Poulets

Entéropathogènes	<i>C. novyi</i> type A	Ovins	Inflammation et gonflement de la tête ou Big head	
		Ovins et bovins	Gangrène gazeuse	
	<i>C. novyi</i> type B	Ovins et un peu moins les bovins	Maladie noire ou hépatite nécrosante	
	<i>C. sordellii</i>	Bovins, ovins et chevaux	Gangrène gazeuse	
		Ovins	Entérotoxémie, ictère	
		Chiens	Gastroentérite hémorragique	
		Porcs	Entérocolite nécrosante	
	<i>C. perfringens</i> type A	Poulets	Entérite nécrotique	
		<i>C. perfringens</i> type B	Agneaux de moins de 03 semaines d'âge	Dysenterie des agneaux
			Veaux et poulains nouveaux-nés	Entérotoxémie
		<i>C. perfringens</i> type C	Porcelets, agneaux, veaux et poulains	Entérotoxémie hémorragique
	Ovins adultes		Entérotoxémie ou struck	
	<i>C. perfringens</i> type D	Poulets	Entérite nécrotique	
		Ovins (tout âge sauf les nouveaux-nés), caprins et veaux	Maladie du rein pulpeux	
	<i>C. perfringens</i> type E	Veaux	Entérite hémorragique	
Lapins		Entérite		
<i>C. spiroforme</i>	Lapins et cobayes	Diarrhée spontanée ou consécutive à une antibiothérapie		
		Diarrhée spontanée ou consécutive à une antibiothérapie		
	Hommes	Diarrhée consécutive à une antibiothérapie et infections nosocomiales		
<i>C. colinum</i>	Gibiers à plumes, jeunes poulets et dindonneaux	Entérite ulcéralive		
Atypiques	<i>C. piliforme</i>	Poulains, animaux de laboratoire et un peu moins autres espèces animales sauvages et domestiques	Maladie de Tizzer et nécrose hépatique	

Diagnostic

- *C. tetani* : Le diagnostic du tétanos est présomptif basé sur l'aspect clinique le plus souvent caractéristique et l'historique d'un éventuel traumatisme récent chez des animaux non vaccinés (plaie accidentelle ou chirurgicale, et plaie ombilicale pour les nouveau-nés). L'examen en laboratoire est rarement pratiqué. S'il est réalisé, il consiste en :

* La culture anaérobie du bacille à partir des tissus nécrosés des plaies (couramment, sans grand succès) ;

* La détection des gènes codant pour la neurotoxine par PCR ou PCR en temps réel ;

* L'inoculation aux souris du sérum collecté des animaux malades, pour mettre en évidence la neurotoxine circulante.

- *C. botulinum* : Le tableau clinique, corrélé aux données anamnestiques, peut permettre de suspecter la maladie. Des tests de laboratoire sont nécessaires pour la confirmation. Le but est de mettre en évidence la toxine et de déterminer son type (toxintypie). La toxine est recherchée dans le liquide gastrique ou le vomi, le contenu intestinal et le liquide obtenu à partir de l'aliment suspect ou le sérum de l'animal malade. Des souris ou des cobayes seront inoculés avec la toxine obtenue dans les variantes suivantes : toxine non modifiée (en tant que telle), la toxine chauffée à 100°C pendant 15 minutes et la toxine neutralisée avec du sérum polyvalent spécifique ou monovalent si nécessaire. Le test est considéré comme positif lorsque les animaux inoculés avec la toxine non traitée meurent (dans une attitude caractéristique en "taille de guêpe", signe d'une respiration abdominale par paralysie des muscles respiratoire), tandis que ceux inoculés avec la toxine neutralisée et la toxine chauffée survivront. En raison de leur labilité, les toxines botuliniques sont rarement détectées par cette méthode dans le sérum bovin. Chez ces animaux, il est préférable de rechercher les toxines dans le contenu gastro-intestinal (en post mortem).

Grâce à la PCR en temps réel, une détection des gènes et une différenciation rapides des toxines A, B, E et F peuvent être réalisées.

Les méthodes immunologiques utilisant des dosages ELISA ou d'immuno-chimiluminescence sont des procédures sensibles et spécifiques pour la détection des toxines.

Le typage des isolats de *C. botulinum* peut être effectué en utilisant un certain nombre de techniques de typage moléculaire. Ces techniques (MLVA et RAPD) sont généralement réalisées lors d'études épidémiologiques.

- *C. chauvoei* : Des portions des lésions emphysémateuses, des muscles affectés et un os long sont à envoyer au laboratoire. Des frottis sont à préparer à partir des muscles atteints et colorés au Gram, permettant d'observer à la fois des formes végétatives et sporulées (sporulation dans l'organisme). L'ensemencement se fait à la fois à partir des muscles et des os. Les cultures sont positives pour le muscle et négatives pour la moelle osseuse, ce qui différencie le charbon symptomatique du charbon bactérien (à *B. anthracis*). L'infection expérimentale peut également être réalisée sur des cobayes ou des hamsters. L'identification est possible aussi par PCR.

- *C. perfringens* : le diagnostic repose sur l'isolement des souches et leur typage en visant à identifier les toxines surtout, et l'entérotoxine. Le simple isolement de *C. perfringens* ne signifie pas son implication dans la pathologie observée. Dans les infections intestinales (dysenterie, entérotoxémies, intoxications alimentaires), il est nécessaire de réaliser des examens de laboratoire : bactérioscopie suivie d'ensemencement sur milieux appropriés et d'identification basée sur la production de gaz, l'hémolyse (gélose au sang), la production de caillots alvéolaires (lait tournesolé), la production de lécithinase (gélose au jaune d'œuf), les colonies noires (gélose Tryptone Sulfite Néomycine) et le manque de mobilité par rapport aux autres anaérobies. L'identification de la toxine peut se faire par inoculation aux souris, par le test de l'anse intestinale ligaturée de cobayes ou par des tests immunoenzymatiques (ELISA) et d'agglutination au latex. L'association "produire un caillot alvéolaire dans le lait tournesolé, avec l'opacification du milieu au jaune d'œuf (réaction de Nagler), est strictement spécifique à *C. perfringens*, car aucune autre espèce du genre *Clostridium* ou d'autres genres, n'est capable de réaliser les deux réactions à la fois. Des tests de PCR ont été développés afin d'identifier les gènes codant pour les principales quatre toxines (α , β , ϵ et ι) et l'entérotoxine, ainsi que des sondes fluorescentes pour la recherche des gènes codant pour ces toxines directement dans les fèces des bovins malades. Le typage moléculaire des souches est possible par AFLP et PFGE chez la volaille. La technique MLVA est utilisable dans les enquêtes épidémiologiques ; ainsi que les méthodes VNTR, MLVA et PFGE. Une méthode MLST a été aussi développée et elle permet de classer les souches selon la forme clinique et l'infinité pour un hôte particulier.

Sensibilité aux antibiotiques et prophylaxie

La méthode de dilution en gélose telle que décrite par le CLSI, est la méthode de référence pour tester la sensibilité des bactéries anaérobies (les clostridies comprises) aux antibiotiques. La micro-dilution en bouillon est aussi couramment employée. Pour toutes les infections clostridiennes animales, la prévention des maladies (généralement par la vaccination) est la meilleure ligne de conduite.

Les antibiotiques sont généralement utilisés pour la prévention et le traitement des infections clostridiennes en productions animales intensives. Des études récentes suggèrent que bien que les clostridies pathogènes chez les animaux restent largement sensibles à diverses classes d'antimicrobiens, des résistances sont de plus en plus enregistrées. Des souches de *C. perfringens* résistantes à la tétracycline et au métronidazole ont été isolées chez des chiens ; alors que d'autres souches résistantes à la tétracycline, à la bacitracine et à la lincomycine ont été identifiées en élevage de poulet de chair. Chez *C. difficile*, des niveaux de résistance élevés à la ciprofloxacine et faibles à la tétracycline et l'érythromycine ont été décrits en élevages porcins. Une multi-résistance inquiétante a été aussi observée chez des souches de *C. spiroforme* identifiées en élevages cynicoles.

- *C. tetani* : chez les animaux atteints de tétanos, pour neutraliser la toxine non liée, l'antitoxine (sérum antitétanique) doit être administrée rapidement. L'anatoxine peut être administrée pour favoriser une réponse immunitaire active. De fortes doses de pénicilline sont administrées pour tuer les formes végétatives productrices de toxines. Débridement chirurgical des plaies et élimination des corps étrangers, suivi d'un rinçage à l'eau oxygénée. Les animaux affectés doivent être hébergés dans un environnement calme et sombre avec administration de myorelaxants.

La prophylaxie du tétanos repose sur la vaccination (anatoxine) systématique des animaux d'élevage (surtout les chevaux). Une dose de rappel peut être envisagée si un animal subit une blessure profonde. Avant toute intervention chirurgicale, les animaux doivent être immunisés passivement par l'administration d'antitoxine.

- *C. botulinum* : les animaux atteints de botulisme, doivent recevoir, si disponible, un antisérum polyvalent pour neutraliser la toxine non liée au début de l'évolution de la maladie. Cependant son coût et sa disponibilité limitent son utilisation en élevage. L'administration de tétraéthylamide et de chlorhydrate de guanidine, améliore la libération des neurotransmetteurs au niveau des jonctions neuromusculaires.

La vaccination des bovins, des visons et des renards d'élevage avec l'anatoxine est fortement indiquée dans les régions endémiques. Les aliments suspects ne doivent pas être donnés aux animaux domestiques, et dans la mesure du possible, la fourniture d'une alimentation équilibrée prévient le pica chez les herbivores lorsqu'ils passent dans les pâturages pendant les périodes de sécheresse.

- *C. chauvoei* : Le traitement est souvent décevant. La pénicilline par voie intraveineuse suivie de plusieurs doses par voie intramusculaire apporte une amélioration.

Les bovins sont vaccinés contre le charbon symptomatique dans les régions endémiques, et lors d'une épidémie, ils sont tous vaccinés et reçoivent de la pénicilline longue action.

Les brebis gestantes sont vaccinées avant la parturition et les agneaux peuvent nécessiter une vaccination au cours de leur première année.

En raison de la nature infectieuse des maladies causées par cette bactérie, un changement de pâturage est souvent conseillé lorsque des cas sont observés pour la première fois.

- *C. perfringens* : La plupart des cas d'entérotoxémie sont trop aigus pour réussir un traitement. Cependant, chez les chiens atteints de diarrhée, l'administration de métronidazole, de tylosine ou d'ampicilline accélère la guérison, qui peut survenir rapidement même sans traitement.

La meilleure méthode de prévention de l'entérotoxémie est l'immunisation active des mères avec une association de bactérine-anatoxine (de types C et D) avant la mise-bas. Cela assure une immunisation passive des nouveau-nés. Pendant les épidémies, l'antitoxine et l'anatoxine sont parfois administrées.

Les chèvres laitières réagissent mal à l'immunisation avec des vaccins contre la maladie du rein pulpeux (type D). Une antitoxine (antisérum) du type approprié peut être administrée aux malades et aux sujets à risque. Cependant, le coût et l'indisponibilité de l'antisérum, font qu'ils sont remplacés par certains antibiotiques.

Pour les poulains, un autovaccin contre l'entérocologie clostridienne est utilisable aux USA, en plus d'un plasma hyperimmun contre l'entérite nécrosante (causée par les types A, C et D).

En plus des mesures de biosécurité et le bon rationnement des animaux, la supplémentation préventive des aliments en antibiotiques à large spectre, peut réduire l'incidence de l'entérotoxémie chez les ovins et celle de l'entérite nécrotique chez le poulet.