



En raison de son poids et afin de faciliter son téléchargement, le rapport a été découpé en deux fichiers. Pour permettre la navigation entre les fichiers, utilisez la table des matières active (signets) à gauche de l'écran.

Rapport sur le botulisme d'origine aviaire et bovine

SOMMAIRE

Résumé	9
1. Introduction	11
Le botulisme : une toxi-infection alimentaire reconnue depuis près de deux cents ans	11
1. 1 L'évolution de la situation chez l'animal depuis vingt-cinq ans	11
1. 2 L'émergence préoccupante du botulisme de type E en élevage avicole	12
1. 3 Saisine et création du groupe de travail	12
1. 4 Le travail du groupe	14
2. Aspects bactériologiques	15
<i>Š Qu'est-ce que le botulisme et depuis quand cette maladie est-elle connue ?</i>	15
2. 1 Taxinomie	15
<i>Š Quels sont les agents du botulisme et quelles sont les bactéries en cause ?</i>	15
<i>Š Quelles sont les différences entre les toxi-infections et les intoxications ?</i>	16
2. 2 Les toxines botuliques	16
<i>Š Quand est produite la neurotoxine botulique ?</i>	16
<i>Š Quelle est la constitution des toxines botuliques ?</i>	16
<i>Š Comment agissent les neurotoxines botuliques ?</i>	16
<i>Š Quelles sont les différences de pathogénicité des différents toxinotypes pour l'homme ?</i>	17
<i>Š Quelle est la dose de toxine létale pour l'homme ?</i>	17
<i>Š Les neurotoxines botuliques sont-elles stables ?</i>	17
<i>Š Quelles sont les conditions de croissance des bactéries et de production des toxines ?</i>	17
<i>Š Quelle est la répartition des toxinotypes en fonction des conditions environnementales ?</i>	18
2. 3 Les spores botuliques	19
<i>Š Quand les spores sont-elles produites ?</i>	19
<i>Š Quels sont les facteurs requis pour la germination des spores ?</i>	19
<i>Š Quelle est la résistance des spores aux facteurs physico-chimiques ?</i>	19
2. 4 Diagnostic biologique	20
<i>Š Quelles sont les méthodes de diagnostic du botulisme ?</i>	20
<i>Š A quelles conditions le diagnostic du botulisme pourrait-il être décentralisé ?</i>	20

3. Le botulisme chez l'homme	21
3. 1 Epidémiologie descriptive	21
§· <i>Quelle a été, au cours des dernières années, l'évolution du nombre de cas de botulisme humain en France ?</i>	21
§· <i>Quelle a été, au cours de ces dernières années l'évolution du botulisme humain en Europe ?</i>	21
§· <i>Quelle est la proportion de cas de portage asymptomatique ?</i>	23
§· <i>Quel est le taux de létalité (nombre de morts/nombre de malades) ?</i>	23
3. 2 Modes de contamination	23
§· <i>Quelles sont les différentes modalités de contamination de l'homme par le botulisme ?</i>	23
§· <i>Comment l'intoxication peut-elle survenir ?</i>	23
§· <i>Quelles sont les conditions de survenue d'une toxi-infection ?</i>	24
§· <i>Quel est le mécanisme de survenue du botulisme suite à une blessure et quelle est son incidence ?</i>	24
3. 3 Clinique, traitement et prévention	24
§· <i>Quel est le tableau clinique habituel du botulisme humain ?</i>	24
§· <i>Quand et comment suspecter le botulisme humain ?</i>	25
§· <i>Comment confirmer une suspicion clinique ?</i>	25
§· <i>Dans quel contexte le botulisme doit-il être recherché ?</i>	25
§· <i>Peut-on traiter le botulisme humain ?</i>	26
§· <i>Existe-t-il un vaccin contre le botulisme humain ?</i>	26
§· <i>En quoi consiste l'utilisation des toxines botuliques comme agents thérapeutiques ?</i>	26
4. Le botulisme animal	27
4. 1 Le botulisme dans la filière avicole	27
4.1.1 Epidémiologie descriptive	27
§· <i>Quelle a été, au cours des dernières années, l'évolution du nombre de cas de botulisme aviaire en France ?</i>	27
§· <i>Quelle est la proportion de cas de portage asymptomatique ?</i>	29
§· <i>Quels sont les principaux toxinotypes rencontrés chez les volailles domestiques ?</i>	29
§· <i>Au sein d'un troupeau atteint, quels sont les taux de morbidité et de létalité ?</i>	29
4.1.2 Modes de contamination chez les volailles	29
§· <i>Quelles sont les principales modalités de contamination des troupeaux de volailles ?</i>	29
4.1.3 Clinique, traitement et prévention	32
§· <i>Quels sont les critères de suspicion du botulisme aviaire ?</i>	32
§· <i>Le botulisme peut-il être suspecté sur un animal mort ?</i>	33
§· <i>Comment confirmer une suspicion clinique ?</i>	33
§· <i>Dans quel contexte épidémiologique peut-on suspecter des cas cliniques de botulisme ?</i>	34

§	<i>Quelle est la part des toxi-infections et des intoxications chez les volailles domestiques ?</i>	35
§	<i>Quelles sont les indications et les modalités de la vaccination chez les volailles domestiques ?</i>	36
§	<i>Quelles sont les mesures de prévention chez les volailles ?</i>	36
§	<i>Que faire des fumiers et des lisiers de lots de volailles atteints de botulisme ?</i>	37
4. 2	Le botulisme dans la filière bovine	37
§	<i>Quel est l'historique du botulisme bovin ?</i>	37
4.2.1	Epidémiologie descriptive	39
§	<i>Quelle a été, au cours des dernières années, l'évolution du nombre de cas de botulisme bovin en France ?</i>	39
§	<i>Quelle est la proportion de cas de portage asymptomatique ?</i>	40
§	<i>Quels sont les principaux toxinotypes rencontrés chez les bovins ?</i>	40
§	<i>Au sein d'un troupeau atteint quels sont les taux de morbidité et de létalité ?</i>	40
§	<i>Existe-t-il des variations saisonnières dans l'incidence du botulisme bovin ?</i>	41
4.2.2	Modes de contamination chez les bovins	41
§	<i>Quelles sont les principales modalités de contamination des bovins ?</i>	41
4.2.3	Clinique, traitement et prévention	42
§	<i>Quels sont les critères de suspicion du botulisme chez les bovins ?</i>	42
§	<i>Quelles sont les différentes formes cliniques du botulisme bovin ?</i>	42
§	<i>Quelles sont les lésions anatomopathologiques du botulisme chez les bovins ?</i>	45
§	<i>Comment confirmer une suspicion clinique ?</i>	45
§	<i>Dans quel contexte épidémiologique survient le botulisme bovin en France ?</i>	45
§	<i>Quelle est la part des toxi-infections et des intoxications chez les bovins ?</i>	46
§	<i>Quelles sont les indications et les modalités de la vaccination chez les bovins ?</i>	46
§	<i>Quelles sont les mesures de prévention chez les bovins ?</i>	46
4. 3	Le botulisme chez les oiseaux sauvages	47
4.3.1	Epidémiologie descriptive	47
§	<i>Comment est organisée la surveillance du botulisme de la faune sauvage en France ?</i>	47
§	<i>Quelle a été au cours des dernières années l'évolution du nombre de cas de botulisme des espèces sauvages en France ?</i>	47
§	<i>Quelle a été la proportion de cas de portage asymptomatique ?</i>	48
§	<i>Quels sont les principaux toxinotypes rencontrés chez les espèces sauvages ?</i>	48
4.3.2	Mode de contamination chez les animaux sauvages	48
§	<i>Quelles sont les principales modalités de contamination des espèces sauvages ?</i>	48
4.3.3	Clinique, traitement et prévention	48
§	<i>Quand et comment suspecter le botulisme dans les espèces sauvages ?</i>	48
§	<i>Comment confirmer une suspicion clinique ?</i>	49

š	Quelle est la part des toxi-infections et des intoxications chez les espèces sauvages ?	49
š	Quelles sont les indications et les modalités de la vaccination de certaines espèces sauvages ?	49
š	Quelles sont les autres mesures préventives mises en œuvre pour limiter le botulisme des oiseaux sauvages ?	50
5.	Aliments, transformation et risques de transmission du botulisme à l'homme	51
5.1	Aliments destinés aux animaux	51
š	Quels sont la prévalence et le niveau de contamination par <i>Clostridium botulinum</i> des matières premières animales et végétales entrant dans la composition des aliments destinés aux animaux ?	51
š	Les procédés de fabrication permettent-ils de réduire le risque de contamination et d'infection des volailles par <i>Clostridium botulinum</i> et ses toxines ?	51
5.2	Aliments issus de l'élevage et destinés à l'homme	52
š	Quels types d'aliments issus de l'élevage sont susceptibles d'être contaminés par <i>Clostridium botulinum</i> ou par sa neurotoxine ?	52
š	Quelle est la fréquence de contamination des matières premières ?	52
š	Quels sont les principes permettant la maîtrise de la contamination des aliments par <i>Clostridium botulinum</i> ?	53
š	Quelle est l'influence du procédé de fabrication de l'aliment sur sa contamination en <i>Clostridium botulinum</i> ?	53
š	Quelle est l'influence de la composition chimique et des qualités physiques de l'aliment carné sur le développement de <i>Clostridium botulinum</i> (germination des spores, croissance de la bactérie, toxinogénèse), au cours de sa conservation ?	54
š	Quelle est l'influence des additifs alimentaires sur le développement de <i>Clostridium botulinum</i> ?	55
š	Quels sont les autres moyens de maîtrise du développement de <i>Clostridium botulinum</i> dans les aliments ?	56
š	Comment peut-on prévenir la contamination des produits laitiers par <i>Clostridium botulinum</i> ?	57
š	Quel est l'apport de la modélisation dans l'évaluation du risque de développement de <i>Clostridium botulinum</i> ?	57
š	Quelle est l'influence du mode de conservation et du mode d'utilisation de l'aliment ?	58
š	Quel est, parmi tous les facteurs cités, le plus efficace pour limiter le développement de <i>Clostridium botulinum</i> dans les aliments ?	58
š	Quels sont les principaux aliments à risque ?	58
6.	Réglementation et pratiques actuelles	59
š	Des dispositions réglementaires spécifiques en matière de lutte contre le botulisme animal ou de lutte contre l'agent botulique dans les denrées animales ou d'origine animale sont-elles prévues à l'échelle communautaire ?	59
š	Des dispositions réglementaires spécifiques en matière de lutte contre le botulisme animal sont-elles prévues à l'échelon national ?	60
š	Des dispositions réglementaires spécifiques en matière de lutte contre l'agent botulique dans les denrées animales ou d'origine animale sont-elles prévues à l'échelon national ?	60

7. Evaluation du risque global de transmission du botulisme avicole et bovin à l'homme	61
<i>š</i> Existe-t-il un risque de transmission directe du botulisme animal à l'homme ?	61
<i>š</i> Quel est le risque de transmission du botulisme animal à l'homme par voie alimentaire ?	61
<i>š</i> Quel risque pour l'homme représentent les viandes de volailles et les ovoproduits issus d'oiseaux malades ou infectés ?	62
<i>š</i> Quel risque pour l'homme représentent les viandes et les produits laitiers issus des bovins malades ou infectés ?	62
8. Recommandations	67
1. Recommandations concernant la sécurité sanitaire des aliments	67
2. Recommandations concernant le diagnostic et l'épidémiosurveillance de la maladie chez l'homme	68
3. Recommandations concernant le diagnostic et l'épidémiosurveillance de la maladie chez l'animal	69
4. Recommandations concernant les principales thématiques d'études et de recherches	69
5. Recommandations concernant la communication	70
9. Annexes	71
10. Références bibliographiques	73

Résumé

Le botulisme chez les animaux à sang chaud est provoqué par l'action d'une toxine extrêmement puissante, la toxine botulique dont il existe 7 types antigéniques distincts (A à G).

Le botulisme chez l'homme reste une toxi-infection alimentaire très rare en France se traduisant par l'apparition d'un nombre de foyers quasiment constant (moins d'une vingtaine par an) depuis plus de dix ans avec une nette prédominance du type toxinique B.

Les sources alimentaires classiquement décrites comprennent des conserves familiales de légumes (champignons, aubergines, asperges), les saucisses et les jambons salés non cuits. Néanmoins, l'étude des sources alimentaires à l'origine des foyers français montrent une évolution avec régression des sources classiquement connues et une augmentation relative de nouvelles sources (par exemple aliments commerciaux contenant des produits issus de la mer).

Par ailleurs, le développement récent de cas de botulisme de type A et E, où aucune source n'a pu être identifiée attire l'attention sur l'émergence de ces types chez l'homme.

Le botulisme animal cliniquement déclaré reste rare. Des cas chez les bovins et les oiseaux d'élevage, de type C et D, sont régulièrement reconnus depuis la fin des années 80 notamment dans le Grand Ouest. L'apparition de cas de botulisme de type E en filière avicole date de 1997.

Le risque d'apparition de botulisme humain à partir de sources avicole ou bovine reste globalement très faible en France. Néanmoins l'apparition des foyers récents dans d'autres pays comportant un nombre significatif de malades (plusieurs dizaines) et un taux de létalité élevé (plus de 5 %) montre que l'estimation du risque doit tenir compte de l'évolution de la nature des sources associées à ces foyers récents.

Dans ce cadre les recommandations concernent, d'une part, l'amélioration du dépistage et de la caractérisation (toxintypie) des foyers humains et animaux, d'autre part, le renforcement des mesures de surveillance et de contrôle à l'abattoir et dans les ateliers de production.

Des recommandations concernant la communication et les recherches à conduire sont également proposées.

1. Introduction

Le botulisme : une toxi-infection alimentaire reconnue depuis près de deux cents ans

Le botulisme est une toxi-infection alimentaire qui a été identifiée au 18^{ème} siècle. Responsable de cas humains et animaux régulièrement mortels, il reste particulièrement redouté malgré sa rareté. Il atteint le système nerveux en provoquant une paralysie flasque. Il sévit chez l'homme et les animaux, notamment les oiseaux et mammifères, parmi lesquels figurent des espèces animales domestiques dont les productions sont destinées à la consommation humaine (aviculture et élevage bovin), ainsi que des espèces animales sauvages qui peuvent également entrer dans l'alimentation humaine (gibier d'eau, faisans, etc.).

Le botulisme résulte de l'action de neurotoxines bactériennes qui sont classées en sept toxinotypes selon leurs propriétés antigéniques. Ces toxines sont réputées être les plus dangereux poisons biologiques connus.

Le botulisme humain est associé aux types A, B et E, exceptionnellement aux types C et F. Avec 10 à 20 cas annuels déclarés en France au cours du dernier quart de siècle, majoritairement de type B, secondairement de type A ou E, le botulisme humain est une maladie rare mais très grave sur le plan médical. C'est une maladie à déclaration obligatoire en France depuis 1986. Son incidence reste actuellement stable.

En revanche, le botulisme animal, associé aux types A (bovins, équins), type B (porcins, bovins, équins), C (oiseaux d'élevages et sauvages, visons et occasionnellement ovins et bovins), D (bovins, oiseaux d'élevages et sauvages), E (poissons, oiseaux d'élevages et sauvages), ne fait pas l'objet d'une réglementation spécifique en France et il n'y a donc pas de données représentatives de la situation nationale. Néanmoins l'activité du Centre National de Référence de l'Institut Pasteur pour les bactéries anaérobies (CNR), l'existence d'un réseau d'épidémiologie-surveillance en aviculture (Afssa Ploufragan) et la publication de séries d'observations issues du terrain, notamment pour les cas bovins, permettent de disposer d'informations ponctuelles.

1.1. L'évolution de la situation chez l'animal depuis vingt cinq ans.

Jusqu'à la fin des années 1970, des cas sporadiques de botulisme, de type C principalement, ont été signalés chez les équidés et les bovins, le plus souvent associés à la présence de cadavres de petits mammifères (rongeurs et chats notamment) dans le fourrage distribué aux animaux malades. A la fin des années 1970, les premiers foyers bovins de type D sont identifiés dans le Grand Ouest de la France (Bretagne, Basse-Normandie, Pays de Loire), associés le plus souvent à des contaminations d'origine aviaire. En 1989, le Réseau National d'Observations Epidémiologiques en Aviculture (RNOEA) de l'Afssa Ploufragan enregistre les quatre premiers cas de botulisme aviaire en élevage intensif, suivis par d'autres déclarations au cours des années 1990, principalement de types C et D.

Les signalements au RNOEA sont loin d'être exhaustifs parce qu'ils correspondent à des déclarations spontanées de maladies non réglementées par des membres du réseau géré par l'Afssa. Par ailleurs le RNOEA constate que de nombreux foyers de botulisme aviaire, identifiés, ne font pas l'objet de toxinotypage. Actuellement le CNR confirme l'importance du botulisme animal de type C, dominant chez les oiseaux, et D, dominant chez les bovins (Carlier *et al.*, BEH 09/2001, voir tableau I). Globalement, les oiseaux paraissent plus atteints que les bovins.

Tableau I - Botulisme animal détecté par le CNR Anaérobies pendant la période 1998-2000

ESPECES ANIMALES	1998	1999	2000
Bovins	37/94 33(D), 4 (C)	20/51 18(D), 2(C ou D)	6/27 4(D), 1(C), 1(Cou D)
Oiseaux d'élevage	18/71 15(C), 1(D), 2(E)	26/73 15(C), 5(C ou D), 3(D), 2(E), 1 non précisé	17/36 13(C), 4(E)
Oiseaux sauvages	14/56 12(C), 1(D), 1 non précisé	45/110 40(C), 4(Cou D), 1(D)	28/57 26(C), 1(D), 1(CouD)
Chien	4/24 1(C), 3(C ou D)	4/20 1(C), 3(C ou D)	4/24 1(C), 3(C ou D)
Sanglier			1(D)/1
Chevreuril			1(C)/1
Vison		3(C)/3	

La détection est réalisée par la mise en évidence de la toxine botulique dans le sérum des animaux suspects par le test de létalité sur souris et/ou par mise en évidence du *Clostridium* toxigène dans un échantillon de contenu intestinal par culture d'enrichissement et PCR. Les résultats sont exprimés en nombre de cas positifs par rapport au nombre total de cas suspects analysés. La répartition des cas positifs selon les types (lettre entre parenthèse) est présentée dans les lignes inférieures. Chaque cas correspond à un foyer.

L'existence de ces sources d'exposition pour l'homme, malgré sa faible sensibilité reconnue vis-à-vis de ces toxinotypes (C et D), conduit à s'interroger sur le risque qu'elles représentent pour le consommateur.

1.2. L'émergence préoccupante du botulisme de type E en élevage avicole

En 1997, le RNOEA enregistre le premier foyer de type E, suivi d'autres cas en 1998, 1999, tous constatés chez l'espèce *Gallus gallus*.

Cette nouvelle tendance préoccupe les gestionnaires du RNOEA qui, entre fin 1997 et début janvier 2000, enregistrent cinq cas de type E. Ils adressent le 1er février 2000 une note au siège de l'AFSSA posant la question de la possibilité de contaminations humaines à *Clostridium botulinum* de type E. Considérant la gravité du risque que représente le toxinotype E pour l'homme, compte-tenu de sa plus grande sensibilité, ils proposent huit mesures "pour prévenir la transmission d'un botulisme aviaire au consommateur" (Drouin P., Durand B., Dufour B., 1999).

Lors de la réunion annuelle du RNOEA le 9 juin 2000, le bilan des informations collectées par le réseau confirme l'augmentation des cas de botulisme de type E. Il apparaît également que deux autres affections, l'entérocolite nécrotique à *Clostridium perfringens* et la coccidiose, connaissent concomitamment, un développement préoccupant chez les volailles. Les vétérinaires spécialistes présents associent ces phénomènes au retrait de certains additifs antibiotiques de l'alimentation des volailles.

1.3. Saisine et création du groupe de travail

Compte tenu de l'importance de ces problèmes et de leurs éventuelles répercussions sur la santé publique, le Comité d'experts spécialisé « Santé animale », dès sa création à l'automne 2000, a été saisi de ce dossier.

Sur sa proposition, lors de la réunion du 10 janvier 2001, un groupe de travail dénommé «*Clostridium botulinum*» a été créé par décision n°2001-60 du directeur général de l'Afssa, en date du 1^{er} février 2001. Il a été chargé d'évaluer le risque de transmission à l'homme de *Clostridium botulinum* à partir d'animaux infectés, en particulier les oiseaux et les bovins.

L'objectif de ce groupe de travail s'est trouvé renforcé par une note de la DGAl / Sous-Direction de l'hygiène des aliments en date du 8 mars 2001, enregistrée comme saisine 2001-SA-0077 en date du 12 mars 2001, intitulée «Evaluation du risque botulique présenté par la consommation de produits de la filière avicole».

Le groupe de travail de l'Afssa a été composé de membres désignés par les Comités d'experts spécialisés en Santé animale, en Microbiologie et en Alimentation animale, de scientifiques de l'Afssa et de scientifiques extérieurs à l'Agence.

› **Composition du groupe de travail**

Membres du Comité d'experts spécialisé Santé animale

- Jean-Louis Martel (président), Afssa Site de Lyon, Laboratoire d'études et de recherches en pathologie bovine et hygiène des viandes, chef de l'unité Bactériologie antibio-résistance
- Pierre Drouin, Afssa Site de Ploufragan, Laboratoire d'études et de recherches avicoles et porcines, ancien responsable du RNOEA

Membres du Comité d'experts spécialisé Microbiologie

- Martine Poumeyrol, Afssa Site de Maisons-Alfort, Laboratoire d'études et de recherches sur l'hygiène et la qualité des aliments, chef de l'unité Microbiologie des aliments et écologie microbienne
- Roland Leclercq, chef de service au Centre Hospitalo-Universitaire de Caen

Membres du Comité d'experts spécialisé Alimentation animale

- Jean-François Guillot, Professeur à l'Université François Rabelais de Tours, département de génie biologique.

Autres experts et rapporteurs

- Michel Popoff, vétérinaire chef du service des Anaérobies à l'Institut Pasteur de Paris
- Jean-Roch Gaillet, chef de l'unité sanitaire de la faune (USF) et responsable du réseau SAGIR (ONCFS)
- Jean Hars, responsable des maladies partagées entre animaux domestiques et sauvages (ONCFS)
- François Lamarque, chef de la mission des actions internationales (ONCFS)

Le groupe de travail a bénéficié de l'aide, au sein de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments de :

- Barbara Dufour, Afssa Direction de l'évaluation des risques nutritionnels et sanitaires (DERNS), chef de l'Unité d'appui épidémiologique à l'analyse de risque (UAEAR)
- Emmanuelle Espié, Afssa Site de Ploufragan, Unité d'Epidémiologie et qualité en aviculture
- Anne-Marie Hattenberger, Secrétariat scientifique du Comité d'experts spécialisé Santé animale
- Michèle Guittet, Afssa Site de Ploufragan, Laboratoire d'études et de recherches avicoles et porcines, sous-directrice de la filière avicole
- Johann Cailhol, Interne en santé publique, stagiaire à la DERNS (UAEAR)
- Marc Savey, Directeur de la Santé animale et du bien-être des animaux, Afssa

Les membres du groupe de travail ont reçu, ponctuellement et sous leur responsabilité, l'aide d'experts extérieurs sur des points précis :

- Gérard Argenté, Vétérinaire conseil (GDS Côtes d'Armor)

Des représentants de l'administration se sont régulièrement joints au groupe de travail

- DGAL : Yves Cerisier, chargé d'études à la Direction générale de l'alimentation, sous direction de l'hygiène des aliments, bureau des matières premières
- DGCCRF : Céline Thomas, Bureau D 3

1.4. Le travail du groupe

L'objectif général a été de rassembler des données permettant une évaluation du risque sanitaire que représentent ces infections pour la santé publique en France au travers des filières avicole et bovine.

Porteurs asymptomatiques potentiels, les porcs, les moutons et les chèvres, animaux réputés peu sensibles au botulisme, seront exclus de l'étude, par manque de données. Les visons, animaux très sensibles au botulisme, peu dangereux pour l'homme parce que situés en fin de chaîne, ne seront cités qu'anecdotiquement.

Par contre, le groupe a décidé de consacrer un chapitre particulier au botulisme chez les oiseaux sauvages en raison de leur rôle, par l'intermédiaire de l'environnement qu'ils ensemencent massivement.

Un autre chapitre a été également consacré au recensement des sources connues de botulisme humain et en particulier des modes de contamination les plus récemment identifiés qui pourraient éventuellement se développer et interférer avec le domaine de notre étude : botulisme par consommation de miel chez le nourrisson, par contamination trans-cutanée, à l'occasion de prise de drogue par exemple, ainsi que le botulisme iatrogène.

Le botulisme par fait de guerre ou bio-terrorisme a été écarté de l'étude en tant que source d'exposition dans le cadre de ce document.

Les premiers objectifs spécifiques du groupe de travail ont été de faire le point, d'une part, sur nos connaissances épidémiologiques chez l'homme et les animaux d'élevage et, d'autre part, sur les moyens disponibles pour le diagnostic, la surveillance et la prévention de l'infection et de la maladie chez les animaux et les consommateurs exposés à des aliments ayant pu être contaminés.

Le travail a été réparti entre les experts en fonction de leurs domaines de compétence. Cet état des lieux conduit à évaluer les modalités d'actions possibles au niveau des élevages et des filières de transformations. Ce travail d'évaluation a été mené par le groupe et validé lors des réunions successives.

Afin de faciliter la lecture du rapport, les différents chapitres ont été structurés sous forme de questions / réponses.

Le rapport ainsi élaboré a été soumis au Comité d'experts spécialisé Santé animale et au Comité d'experts spécialisé Microbiologie.

2. Aspects bactériologiques

› Qu'est-ce que le botulisme et depuis quand cette maladie est-elle connue ?

Le botulisme est une affection nerveuse commune à l'homme et aux animaux qui est le plus souvent d'origine alimentaire et qui se traduit par des paralysies flasques.

Les intoxications alimentaires sont connues depuis l'antiquité et le terme botulisme a pour origine le mot latin, *botulus*, désignant une saucisse. Le plus ancien document connu sur ce sujet est un texte indien du 15-16^{ème} siècle qui relate la préparation d'un toxique, probablement de la toxine botulique, à partir de contenu intestinal de mouton. Les premiers cas de botulisme semblent avoir été identifiés par des médecins allemands en 1735. Mais la première description détaillée des symptômes du botulisme a été rapportée par l'Allemand Kerner en 1755 et 1789. Le nombre de cas s'accroît à la fin du 18^o-début 19^o siècle, essentiellement à la suite de consommation de saucisses. Entre 1820 et 1822, 150 cas de botulisme ont été rapportés en Allemagne, dont 80 mortels. Les recherches s'orientent vers la présence de toxiques pouvant se former dans les saucisses ou apportés par les épices et les condiments. Dès 1833, il est noté que l'intoxication par les saucisses en Allemagne est similaire à celle causée par des poissons fumés dans certaines régions de la Russie. Puis, de nombreux cas d'intoxications par des poissons ont été signalés, notamment en Allemagne. La nature bactérienne de cette affection ainsi que la toxine botulique ont été identifiées à la fin du 19^{ème} siècle. Van Ermengem isola pour la première fois en 1897 une bactérie anaérobie toxigène d'un jambon, et de l'intestin et de la rate d'une des trois victimes d'un groupe de trente musiciens qui avaient été contaminés. Depuis, de nombreux travaux ont été accomplis et au cours de ces dix dernières années des découvertes majeures ont permis de décrypter le support génétique, la structure et le mode d'action au niveau moléculaire des toxines les plus puissantes connues.

2.1 Taxonomie

› Quels sont les agents du botulisme et quelles sont les bactéries en cause ?

Les agents du botulisme sont les neurotoxines botuliques, qui sont produites par des bactéries du genre *Clostridium*, désignées A, B, C, D, E, F et G selon leurs propriétés antigéniques.

Ce sont des bacilles à coloration de Gram positive, anaérobies stricts et sporulés. L'espèce *Clostridium botulinum* désignait initialement les bactéries productrices d'une toxine induisant une paralysie flasque chez les animaux de laboratoire. Cette espèce est très hétérogène et est divisée en quatre groupes sur la base des propriétés physiologiques, biochimiques et génétiques. En fait, ces quatre groupes correspondent à quatre espèces distinctes sur un plan taxinomique. D'ailleurs, le groupe IV est considéré comme une espèce nouvelle, *Clostridium argentinense*. Il faut noter que chacun des quatre groupes contient des souches non toxigènes indifférenciables des souches toxigènes d'après leurs caractères bactériologiques.

- groupe I : *Clostridium botulinum* A et souches protéolytiques de *Clostridium botulinum* B et F.
- groupe II : *Clostridium botulinum* E et souches glucidolytiques de *Clostridium botulinum* B et F.
- groupe III : *Clostridium botulinum* C et D.
- groupe IV : *Clostridium botulinum* G ou *Clostridium argentinense*.

Mais des souches appartenant à d'autres espèces de *Clostridium* sont également capables de produire une toxine botulique. C'est le cas de certaines souches de *Clostridium butyricum* qui synthétisent une neurotoxine botulique E et de certaines souches de *Clostridium baratii* qui produisent une neurotoxine F. Ces souches neurotoxigènes sont phénotypiquement et génétiquement apparentées aux souches types de *Clostridium butyricum* et *Clostridium baratii* respectivement et non à celles de *Clostridium botulinum*.

› *Quelles sont les différences entre les toxi-infections et les intoxications ?*

Une intoxication se définit comme un botulisme résultant de l'ingestion de neurotoxine botulique préformée dans un aliment, alors qu'une toxi-infection est consécutive à l'ingestion de spores ou de formes végétatives d'un *Clostridium* neurotoxinogène qui s'est multiplié et a synthétisé de la neurotoxine dans la lumière intestinale.

2.2 Les toxines botuliques

› *Quand est produite la neurotoxine botulique ?*

La neurotoxine botulique est synthétisée au cours de la phase exponentielle de croissance. Sa production est indépendante de la phase de sporulation. Les conditions favorables à la croissance de *Clostridium* neurotoxinogènes permettent également la production de neurotoxines botuliques.

› *Quelle est la constitution des toxines botuliques ?*

Les neurotoxines botuliques et tétanique sont synthétisées sous forme d'une seule chaîne protéique de 150 kDa environ qui est peu ou non toxique.

Ces protéines ne possèdent pas de séquence signal et leur sécrétion intervient par un processus encore mal défini d'exfoliation des parois bactériennes ou par lyse de ces parois. L'activation des neurotoxines fait intervenir une protéolyse qui clive la protéine précurseur dans son tiers N-terminal en deux fragments dénommés chaîne légère (environ 50 kDa) et chaîne lourde (environ 100 kDa). Les deux chaînes restent réunies par un pont disulfure. Les souches protéolytiques de *Clostridium botulinum* sécrètent une protéase capable d'activer les neurotoxines à l'extérieur de la bactérie. Certaines souches sont non protéolytiques.

L'activation peut avoir lieu également par des protéases d'origine digestive. La trypsine, par exemple, permet d'activer efficacement les neurotoxines botuliques et tétanique.

Les neurotoxines botuliques sont associées à d'autres protéines non toxiques pour former des complexes de grande taille. Ces protéines comprennent une protéine appelée non toxique, non hémagglutinine (NTNH), qui a une taille proche de celle des neurotoxines (139 kDa) et des protéines qui ont une activité hémagglutinante (HA) dont les tailles sont 34, 17 et 70 kDa chez *Clostridium botulinum* A. La neurotoxine s'associe à NTNH pour former des complexes de taille moyenne (300 kDa) (M) et leur association aux HA est à l'origine des complexes de grande taille (500 kDa) (L). Des complexes de très grande taille (900 kDa) (LL), observés notamment chez *Clostridium botulinum* A, résultent d'une dimérisation des complexes L. Les protéines NTNH sont très conservées au niveau de leur séquence en acides aminés (70-80% d'identité) et elles présentent peu d'homologie avec les neurotoxines botuliques (31-39% d'identité). Toutefois, les 100 premiers acides aminés des protéines NTNH sont les plus apparentés aux acides aminés correspondants des neurotoxines botuliques, ce qui pourrait rendre compte de la liaison NTNH-neurotoxine. Le rôle des complexes est encore mal compris. Ils pourraient protéger les neurotoxines botuliques vis-à-vis des conditions dénaturantes, telles que acidité de l'estomac et protéases digestives. Il est à noter que la toxine tétanique ne s'associe pas à d'autres protéines pour former des complexes et qu'elle n'est pas stable dans le tractus digestif. Les protéines non toxiques pourraient intervenir dans le passage de la barrière intestinale.

› *Comment agissent les neurotoxines botuliques ?*

Les neurotoxines botuliques ingérées ou produites dans le contenu intestinal traversent la barrière intestinale, probablement par un processus de transcytose encore mal connu. Après diffusion par le sang et/ou la lymphe, les neurotoxines botuliques se fixent sur les extrémités démyélinisées des motoneurones.

La nature du récepteur des neurotoxines est encore controversée. De nombreux travaux ont montré que les neurotoxines se lient à des gangliosides tels que G_{D1B}, G_{T1B} et G_{Q1B}. Cependant, cette interaction est de faible affinité et ne rend pas compte de la spécificité de reconnaissance de chaque neurotoxine. Un modèle

de double récepteur, comprenant une glycoprotéine et un ganglioside, a été proposé à partir d'études de liaison des neurotoxines sur cultures cellulaires et d'après la structure du domaine de liaison au récepteur en deux sous-domaines. Les neurotoxines clostridiales ne traversent pas directement la membrane cytoplasmique. Elles sont internalisées par endocytose dans des compartiments intracellulaires acides. L'acidification des vésicules au moyen de l'ATP-ase vésiculaire est une étape indispensable pour la translocation. La baisse de pH induit un changement de conformation d'une forme hydrophile à pH neutre à une forme dont les segments hydrophobes sont exposés en surface à pH acide permettant l'insertion de l'ensemble de la neurotoxine dans la bicouche lipidique. L'acidification induit l'oligomérisation des chaînes lourdes de neurotoxine en tétramères qui s'insèrent dans la bicouche lipidique et forment des canaux ioniques. Ces tétramères résultent de l'association d'hélices amphiphiles localisées dans le domaine N-terminal des chaînes lourdes. Le mécanisme de translocation est encore hypothétique. Selon un premier modèle, la chaîne légère, dépliée à pH acide, passerait à travers le canal formé par les chaînes lourdes oligomérisées. L'exposition au pH neutre dans le cytosol permettrait le repliement de la chaîne légère et sa dissociation de la vésicule par réduction du pont disulfure entre les deux chaînes de neurotoxine.

Les neurotoxines clostridiennes sont des protéases d'une remarquable spécificité. Cette activité est médiée par la chaîne légère qui contient dans sa région centrale un motif conservé (HExxH) qui correspond au site enzymatique. Les substrats des neurotoxines clostridiennes sont trois protéines dénommées protéines SNAREs qui comprennent la VAMP (vesicle associated membrane protein) ou synaptobrevine, SNAP25 et syntaxine. Les neurotoxines clostridiennes agissent en inhibant la sécrétion des neuromédiateurs. Puisque les neurotoxines clostridiennes sont des métalloprotéases dont les substrats sont VAMP, SNAP25 et syntaxine, ces trois protéines ont un rôle essentiel dans la neuroexocytose. Il faut noter que les neurotoxines clivent leurs substrats quand ils sont sous formes monomériques et non quand ils sont associés dans le complexe SNARE. Lorsque VAMP, SNAP25 ou la syntaxine est clivée par une neurotoxine clostridienne, elle peut former des complexes SNAREs, mais ceux-ci ne sont pas fonctionnels. La fusion des vésicules avec la membrane présynaptique n'intervient alors pas et il n'y a pas de libération de neuromédiateur. Les protéines SNAREs ont un rôle essentiel dans la fusion membranaire permettant la neuroexocytose.

› *Quelles sont les différences de pathogénicité des différents toxinotypes pour l'homme ?*

Le botulisme humain est dû aux neurotoxines de type A, B et E produites par *Clostridium botulinum* et *Clostridium butyricum* E, et exceptionnellement aux types C et F (*Clostridium botulinum* F ou *Clostridium baratii* F). Le tableau clinique est dominé par une paralysie neuromusculaire sans anomalie du système nerveux sensitif. Le botulisme de type A est la forme la plus grave, fréquemment mortelle. Le botulisme de type B est moins sévère avec un taux de mortalité nettement plus faible. La forme de botulisme E est intermédiaire.

› *Quelle est la dose de toxine létale pour l'homme ?*

La dose létale de neurotoxine botulique A par voie orale chez l'homme adulte est estimée entre 100 ng et 1 µg.

› *Les neurotoxines botuliques sont-elles stables ?*

Les neurotoxines botuliques, comme la plupart des protéines, sont dénaturées par la chaleur (50°C, 20 min). Il faut noter que contrairement aux spores, les neurotoxines botuliques sont thermolabiles. Elles sont sensibles aux agents chimiques, tels que les oxydants (hypochlorite de sodium, etc.).

› *Quelles sont les conditions de croissance des bactéries et de production des toxines ?*

La toxine botulique est synthétisée au cours de la phase exponentielle de croissance et elle est ensuite libérée dans le milieu de culture.

Les facteurs conditionnant la croissance de *Clostridium botulinum* contrôlent également la production de toxine : nutriments, température, pH, activité de l'eau, oxydoréduction.

- nutriments : *Clostridium botulinum* se développe dans des milieux complexes comprenant la plupart des acides aminés, des facteurs de croissance et des sels minéraux. La croissance est optimale dans les milieux riches en matière organique, tels ceux à base de viande. Il existe des différences entre les souches protéolytiques et non protéolytiques.

- température : *Clostridium botulinum* A et les souches protéolytiques B ont une température optimale de croissance de 37-40°C, une limite inférieure de 10°C et une limite supérieure de 45-50°C. Les souches non protéolytiques de *Clostridium botulinum* B et E ont une température optimum de 30-35°C, une limite inférieure de 3,3°C et une limite supérieure de 40-45°C. Quatre souches de *Clostridium botulinum* E étudiées étaient capables de se multiplier et de produire de la toxine à 3,3°C en 36 jours. Le temps requis pour la croissance et la toxinogénèse est fonction du substrat, de la taille de l'inoculum en spores, des traitements thermiques préalables, de la température d'incubation et des conditions d'anaérobiose.

- pH : le pH optimal se situe autour de 7, avec une limite supérieure à 8-9 et une limite inférieure 4,5-4,8 pour les souches protéolytiques et 5 pour les souches non protéolytiques

- activité de l'eau : la limite inférieure est 0,95

- oxydoréduction : le potentiel d'oxydo-réduction optimal est autour de -350 mV, la limite supérieure est entre 30 et 250 mV. La germination peut intervenir à des potentiels d'oxydoréduction plus élevés, mais elle s'accompagne généralement d'une baisse de ce potentiel redox permettant la croissance bactérienne.

Il existe également des inhibiteurs de croissance de *Clostridium botulinum*.

- nitrites : l'activité inhibitrice des nitrites est fonction du pH et de la concentration en NaCl. Par exemple, la concentration inhibitrice des nitrites vis-à-vis des souches de *Clostridium botulinum* A et B, passe de 300 à 40 µg/g pour des concentrations respectives de NaCl de 1,8 et 3,5%.

- acide sorbique : le sorbate de potassium est inhibiteur à 2,6 g/kg et peut être utilisé à la place des nitrites dans les aliments. L'acide sorbique et les sorbates sont plus efficaces à pH acide (pH<6).

- anti-oxydants phénoliques : ils sont inhibiteurs à des concentrations de 200-400 µg/mL

- polyphosphates : les diphosphates sont plus efficaces que les triphosphates. Ils inhibent la croissance de *Clostridium botulinum* à des concentrations de 1 à 3 g/kg.

- ascorbates : ils augmentent l'activité inhibitrice des nitrates. L'isoascorbate 200 µg/g et le nitrite à 50 µg/g sont aussi efficaces que le nitrite seul à 156 µg/g.

› *Quelle est la répartition des toxinotypes en fonction des conditions environnementales ?*

L'habitat principal des *Clostridium* neurotoxino-gènes, comme des autres espèces de *Clostridium*, est l'environnement.

Grâce à leurs spores, qui sont résistantes aux conditions extrêmes (chaleur, sécheresse, radiation, oxygène, agents chimiques), ces bactéries sont capables de survivre pendant de très longues périodes. Ainsi, les *Clostridium* sont ubiquistes et largement distribués dans l'environnement. Cependant, la germination des spores et la division bactérienne n'ont lieu qu'en conditions anaérobies et en présence suffisante de nutriments. Ceci restreint l'habitat des *Clostridium* à des zones anaérobies ou de faibles tensions en oxygène et contenant des quantités suffisantes de matière organique.

Les différents groupes de *Clostridium botulinum* n'ont pas une répartition géographique identique. L'habitat principal de *Clostridium botulinum* A, B, E, F et G est le sol et les sédiments marins et d'eau douce. Les toxinotypes A et B sont retrouvés plus volontiers dans les échantillons de sol, mais avec des localisations géographiques différentes. *Clostridium botulinum* A est prédominant dans la partie ouest des Etats Unis, en Amérique du Sud et en Chine, tandis que *Clostridium botulinum* B est plus fréquent dans la partie est des Etats Unis et en Europe. *Clostridium botulinum* E qui a la particularité de se multiplier à basse température (2-3°C) est préférentiellement retrouvé dans les sédiments marins et d'eau douce ainsi que dans le contenu intestinal des poissons des régions Nord de l'hémisphère Nord (Alaska, Canada, Scandinavie, régions Nord de l'Europe, de l'Asie et du Japon). *Clostridium botulinum* C et D, dont la température optimale de croissance se situe entre 30 et 40°C, et qui sont exigeants en matière organique, sont localisés essentiellement dans des zones riches en matière

organique des pays chauds (régions tropicales, régions tempérées en saison chaude). Les cadavres d'animaux morts de botulisme ou porteurs de *Clostridium botulinum* dans leur tube digestif, sont les principaux réservoirs de ces micro-organismes (Popoff, 1995 ; Popoff, 1999).

Clostridium butyricum et *Clostridium baratii* sont des bactéries largement répandues dans le sol, les sédiments, la surface de végétaux, les végétaux en décomposition, le contenu intestinal de l'homme et des animaux sains. La distribution des souches neurotoxigènes de ces espèces est mal connue.

2.3 Les spores botuliques

› *Quand les spores sont-elles produites ?*

Le déterminisme et les conditions de culture favorisant la sporulation de *Clostridium botulinum* ne sont pas connus de façon précise. Des milieux de sporulation de *Clostridium botulinum* ont été proposés, tels des milieux complexes contenant des morceaux de viande ou des milieux biphasiques (liquide/solide). Il existe de grandes variations d'une souche à l'autre pour leur capacité à sporuler, certaines souches sporulant facilement, d'autres pas du tout dans les milieux de culture utilisés au laboratoire.

› *Quels sont les facteurs requis pour la germination des spores ?*

Les conditions de la germination des spores de *Clostridium botulinum* sont moins draconiennes que celles requises pour la croissance des formes végétatives.

Les nutriments nécessaires pour la germination sont :

- alanine ou cystéine,
- une source de carbone (lactate, glucose, galactose, inosine ou fructose sont les plus efficaces),
- bicarbonate.

Le potentiel d'oxydo-réduction n'est pas un facteur critique pour la germination qui peut avoir lieu à des potentiels élevés.

Le pH optimum est voisin de 7. La limite inférieure est 4,6 pour *Clostridium botulinum* A et B, 4,8 pour *Clostridium botulinum* E. La limite supérieure est autour de 9.

La température optimale est autour de 37°C, mais *Clostridium botulinum* A est capable de germer à 4°C et *Clostridium botulinum* E au-dessous de 4°C. La germination peut avoir lieu à des températures élevées pour *Clostridium botulinum* A (70°C) et pour *Clostridium botulinum* E (50°C).

L'activité de l'eau doit être supérieure à 0,89.

Les inhibiteurs de la germination sont les nitrites et le NaCl :

- les nitrites inhibent la germination, mais à des concentrations supérieures à celles autorisées dans les aliments ;
- le NaCl à 8% inhibe la germination des spores de *Clostridium botulinum* A pendant 3 h, mais est inefficace sur une plus longue période. La germination des spores de *Clostridium botulinum* E est inhibée avec 5% de NaCl.

› *Quelle est la résistance des spores aux facteurs physico-chimiques ?*

- Les spores peuvent être inactivées par les composés chlorés, l'H₂O₂, la chaleur, ainsi que les radiations.

- l'effet inhibiteur des hypochlorites est variable selon les souches. Ils sont plus efficaces à pH acide. La présence de matières organiques diminue l'effet sporicide des composés chlorés. Pour des concentrations de 4,5 ppm de chlore libre, le temps de réduction décimale des spores de *Clostridium botulinum* A, B et E varie de 2 à 10 min pour des pH de 3,5 à 6,5.

- l'effet sporicide de l'eau oxygénée est obtenu à des concentrations de 35% minimum. Elle est plus efficace à pH 3,5-4.

- la thermorésistance des spores varie selon les souches. La présence de matière organique et de graisse a des effets protecteurs. Les souches de types A et B sont parmi les plus thermorésistantes. A titre d'exemple, ci-dessous le temps requis pour inactiver 90% d'une population de spores :

<i>Clostridium botulinum</i>	Température (°C)	Temps de réduction décimale (min)
type A	110-120	0,4 à 6
type B	110-120	0,15 à 1,36
type E	77-82	0,5 à 4
type C	104	0,02-0,9

- les rayonnements gamma à partir d'une source de cobalt-60, les rayons X et les électrons à partir d'un accélérateur linéaire peuvent être utilisés. La résistance des spores aux radiations est fonction des souches, la teneur en oxygène, la température d'irradiation, la composition du milieu de suspension des spores. Les spores de *Clostridium botulinum* A et B sont les plus résistantes.

La dose de réduction décimale (D) pour inactiver 90% des spores de souches protéolytiques de *Clostridium botulinum* A et B est de 2 à 4,5 kGy. Les souches de type E sont plus sensibles aux radiations. La valeur de D pour ces dernières est de 1 à 2 kGy. La présence d'oxygène ou d'air pendant l'irradiation augmente l'effet sporicide. L'inactivation par rayonnement est plus efficace à haute température qu'à basse température. A titre d'exemple, ci-joint les valeurs pour l'inactivation de spores de *Clostridium botulinum* à différentes températures :

Température	Dose de radiation
+ 20°C	2,68 kGy
- 80°C	3,50 kGy
- 196 °C	4,00 kGy

L'inactivation des spores est plus efficace quand elles sont irradiées en tampon phosphate. Par contre, lorsqu'elles sont dans une matrice alimentaire, elles sont plus résistantes.

- Les spores peuvent également être inactivées par les aldéhydes (glutaraldéhyde et formaldéhyde) qui sont d'excellents sporicides (Sato 1987, Dohms 1997, Tardé *et al.* 1998) ainsi que par les composés iodés dont l'efficacité est reconnue.

2.4 Diagnostic biologique

› Quelles sont les méthodes de diagnostic du botulisme ?

Le diagnostic de botulisme peut être effectué par 2 méthodes :

- recherche directe de toxine dans le sérum ou dans le contenu intestinal. La technique la plus sensible actuellement est le test de létalité sur souris. Le typage est réalisé par séro-protection à l'aide de sérums neutralisants spécifiques de chaque type de toxine botulique.
- recherche de *Clostridium* neurotoxino-gène par culture dans un milieu d'enrichissement et détection de neurotoxine botulique dans le surnageant de culture. La recherche du gène codant pour la neurotoxine par amplification génique (PCR) est aussi très utilisée.

› A quelles conditions le diagnostic du botulisme pourrait-il être décentralisé ?

Pour développer ce type de diagnostic, les laboratoires volontaires devraient suivre une formation particulière et participer à des essais inter-laboratoires. Les échantillons trouvés positifs pourraient être adressés au Centre National de Référence de l'Institut Pasteur pour les bactéries anaérobies, pour confirmation.

Il est nécessaire de rappeler que *Clostridium botulinum* est un agent biologique pathogène de classe II au titre de l'arrêté du 18 juillet 1994 et que pour le manipuler il est nécessaire d'appliquer les mesures édictées par la Directive 2000/54/CE du Parlement Européen et du Conseil du 18 septembre 2000 concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition des agents biologiques au travail.

3. Le botulisme chez l'homme

3.1 Epidémiologie descriptive

› *Quelle a été, au cours des dernières années, l'évolution du nombre de cas de botulisme humain en France ?*

En France, le botulisme est une maladie à déclaration obligatoire de façon indépendante des toxi-infections alimentaires collectives depuis 1986. Le nombre de cas annuels varie de 10 à 27 (Tableau II)

Tableau II. Botulisme humain en France (There, 1999 ; Olivares et Hubert, 1987 ; Sebald, 1996 ; Salomon, Delarocque-Astagneau, Popoff, Carlier, 1998).

Période	Foyers	Cas	Cas/an	Type A	Type B	Type A et B	Type E	Type indéterminé
1970-1995	396	656	25, 2	3	383	2	7	
1978-1986	134	244	27					
1988-1996	64							
1997	8	16	16	2	12	0	2	
1998	14	16	16	1	13	0	2	
1999	19	26	26	2	14	1	2	
2000		14	14	1	12	0	0	1

Le type le plus représenté est le type B : la maladie se produisait traditionnellement à la suite d'une consommation de jambon salé et non cuit (saumurage imparfait, agents inhibiteurs ajoutés en quantité insuffisante) ou de conserves familiales (cuisson insuffisante). Il est à remarquer que le nombre de cas de botulisme reste pratiquement constant au cours de ces trente dernières années, alors que les habitudes alimentaires ont sensiblement changé. La préparation de conserves familiales a régressé au profit d'aliments ou de préparations culinaires d'origine commerciale et de la prise plus fréquente de repas dans des restaurants (restaurants d'entreprise ou autres). L'investigation de l'origine de ces nouvelles formes de botulisme est plus difficile à mettre en oeuvre. Un cas récent de botulisme de type A avait pour origine une soupe industrielle de poisson. L'interrogation des patients révèle de plus en plus souvent qu'ils n'avaient pas consommé de conserves familiales et qu'ils avaient, soit consommé des aliments du commerce sans les avoir stockés sur une longue période, soit qu'ils avaient pris leurs repas dans des restaurants. Les nouvelles modalités d'allongement de la durée de vie commerciale d'aliments (emballage sous vide, aliments frais ou pasteurisés et maintenus réfrigérés à une température supérieure à 3,3°C) peuvent être propices au développement de *Clostridium* neurotoxigènes. Les récents cas de botulisme E n'ont pas été tous élucidés. Dans un cas, il s'agissait d'une marinade de poisson, dans les autres cas les personnes concernées ont affirmé avoir fréquenté des restaurants les jours précédant l'apparition des symptômes.

Il n'y a pas eu de déclaration de botulisme infantile ou par blessure au cours des dix dernières années.

› *Quelle a été, au cours de ces dernières années, l'évolution du botulisme humain en Europe ?*

La situation du botulisme dans les autres pays d'Europe est présentée au tableau III.

Tableau III. Répartition des cas de botulisme en Europe (sauf France) dans la période 1988-1998. Aucun cas n'a été déclaré en Ecosse, Finlande, Grèce et Pays Bas pendant la période considérée. Aucune donnée n'était disponible pour le Portugal et l'Irlande (There, 1999 ; Galazka et Przybylska, 1999).

Pays (Période 1988-1998)	Nombre de cas	Nombre moyen de cas par an
Italie	412	37,4
Allemagne	177	16
Espagne	92	8,4
Royaume Uni	31	2,8
Belgique	10	0,9
Suède	7	0,6
Danemark	3	0,3
Pologne (1960-1998)	12 068	317

Elle varie selon les pays, notamment en fonction des habitudes culinaires, mais aussi selon les moyens mis en oeuvre pour la surveillance de cette maladie.

L'Italie connaît une incidence de botulisme plus élevée que d'autres pays. L'origine serait dans 65% des cas des conserves familiales de légumes (champignons, aubergines, etc.), dans l'huile ou dans l'eau, dans 7% des cas des saucisses et jambons faits maison, dans 14% des cas des produits industriels (thon à l'huile, produits laitiers) et non précisée dans 14% des cas. Les 23 cas (12 foyers) de botulisme liés à des produits industriels étaient de type A (9 cas), B (12 cas) et A et B (1 cas). Un épisode de botulisme de type A à partir d'un fromage industriel à tartiner (mascarpone) a causé 7 décès en 1997-1998. Les conditions favorisant la toxinogénèse dans ces produits industriels étaient une acidification inappropriée, un traitement thermique insuffisant et une température de stockage inadaptée (Aureli, Fenica, Franciosa, 1999). Depuis 1984, 16 cas de botulisme par toxi-infection ont été diagnostiqués chez des nourrissons (13 cas) et chez des adultes (3 cas). Le miel a été reconnu être responsable d'un cas de botulisme infantile. L'origine des autres cas est non précisée. Ces formes de botulisme étaient dues à *Clostridium botulinum* A ou B et à des souches de *Clostridium butyricum* productrices de neurotoxine E. L'écologie de ces dernières souches reste mystérieuse (Aureli, Fenica, Franciosa, 1999). La présence de telles souches a été signalée au bord de certains lacs en Chine qui ont été responsables de botulisme à la suite de consommation de soja fermenté (Meng, Yamakawa, Zou, 1999).

Le premier cas de botulisme infantile aux Pays Bas a été signalé en 2000 suite à une consommation de miel (Wolters, 2000).

En Allemagne et en Espagne, des foyers affectant généralement un nombre limité de personnes ont été signalés. En Allemagne, sur les sept cas recensés en 1997, trois cas de botulisme de type A étaient dus à des conserves familiales de légumes ou de viande et deux cas de botulisme de type E avaient pour origine du poisson fumé ou congelé. En 1998, la consommation de truites saumonées fumées et emballées sous vide d'origine industrielle a occasionné quatre cas de botulisme E. En Espagne, en 1997, sept cas de botulisme ont été identifiés (trois types A et deux types B) dont l'origine était des conserves familiales de légumes et pour trois cas une conserve industrielle d'asperges. En 1998 dans ce même pays, un foyer dont la source était des olives en boîte a atteint sept personnes (There, 1999).

Dans les pays scandinaves, le botulisme est généralement de type E suite à la consommation de poissons fermentés. En Norvège, 23 cas de botulisme E ou B ont été déclarés dans la période 1975-1997 (Kuusi, Hasseltvedt, Aavitsland, 1999). Le portage de *Clostridium botulinum* E par les poissons dans ces régions est très fréquent (10 à 40%) (Hyytia, Hielm, Korreala, 1998).

Le botulisme est peu fréquent au Royaume Uni, probablement du fait de l'utilisation plus généralisée de la congélation pour la conservation des aliments. Le plus important foyer a eu lieu en 1989 où 27 personnes ont été atteintes après consommation d'un yaourt industriel aux noisettes. La purée de

noisettes stockée à température ambiante contenait *Clostridium botulinum*. Par ailleurs, cinq cas de botulisme infantile ont été enregistrés depuis 1988 (Brett, 1999).

L'incidence du botulisme est nettement plus élevée en Pologne, notamment dans les années 1960 à 1990, du fait d'un déficit d'approvisionnement alimentaire lié aux troubles socio-économiques. Le nombre de cas est en régression depuis 1990 et est passé en dessous de 100 par an à partir de 1997. Le type le plus représenté est le type B (80 à 90% selon les années), les types A et E étant beaucoup plus rares, bien que ce dernier soit en recrudescence actuellement. Les aliments en cause sont en majorité des préparations à base de viande (81% en 1990), principalement de porc, et plus rarement à base de légumes (13%) et de poissons (6%). Le plus souvent, il s'agit de conserves de viandes, en bocaux de verre, faites à la maison (74% en 1990) avec chauffage insuffisant et conservation à température ambiante. Dans 26% des cas en 1990, des conserves industrielles de viande et de poisson étaient en cause (Galazka, Przybylska, 1999).

› *Quelle est la proportion de cas de portage asymptomatique ?*

En l'absence de prélèvements réalisés sur des individus asymptomatiques, cette proportion est inconnue.

› *Quel est le taux de létalité (nombre de morts/nombre de malades) ?*

Les enquêtes sont variables d'un pays à l'autre. A titre d'exemple, les foyers récents de botulisme humain (après 1990), sont présentés dans le tableau IV.

Tableau IV. Récents foyers de botulisme humain dans divers pays d'après (Villar et al., 1999 ; Weber et al., 1993 ; Pourshafie et al., 1998 ; Anonymous, 1999).

Pays	Foyers	Cas (décès)	Létalité (%)	Type	Origine
Canada	5	10 (0)	0	E	viande de phoque, poisson fermenté
	1	1 (?)	?	A	botulisme infantile
Egypte	1	91 (18)	19,8	E	poisson salé
Iran	?	27 (1)	3,7	A	fromage
Thaïlande	2	13 (2)	15,4	A	conserves familiale de bambou
Argentine	1	9 (0)	0	A	viande de bœuf
Algérie	2	> 100 (40 à 80)	?	A	saucisse industrielle à base de viande de bœuf
Maroc	?	80 (15)	18,7	B	saucisse à base de viande de poulet

3.2 Modes de contamination

› *Quelles sont les différentes modalités de contamination de l'homme par le botulisme ?*

Selon le mode de contamination, on distingue trois formes de botulisme : l'intoxication, la toxoinfection et le botulisme par blessure.

› *Comment l'intoxication peut-elle survenir ?*

L'intoxication botulique survient après consommation d'aliments dans lesquels un *Clostridium* neurotoxigène s'est développé et a produit des quantités suffisantes de toxine. L'ingestion de toxine préformée dans l'aliment est responsable de l'ensemble des symptômes. C'est la cause la plus commune de botulisme d'origine alimentaire chez l'adulte.

› *Quelles sont les conditions de survenue d'une toxi-infection ?*

L'ingestion de spores ou de formes végétatives de *Clostridium* neurotoxigènes peut, dans certaines circonstances, s'accompagner d'une multiplication bactérienne et de production de toxine dans le contenu intestinal.

Habituellement, la flore digestive résidente prévient la colonisation de l'intestin par une bactérie étrangère apportée par l'alimentation. Chez les jeunes enfants, une flore digestive incomplètement constituée ou incomplètement fonctionnelle, peut permettre l'implantation de *Clostridium* neurotoxigènes dans l'intestin, c'est le botulisme infantile.

Selon diverses enquêtes épidémiologiques, une dizaine de spores de *Clostridium botulinum* est suffisante pour causer la maladie chez un jeune enfant. Les *Clostridium* neurotoxigènes et la toxine sont retrouvés dans le contenu intestinal et la toxine est rarement identifiée dans le sérum, contrairement à l'intoxication botulique où la toxémie est fréquente.

La plupart des souches impliquées dans le botulisme infantile appartiennent au groupe I (*Clostridium botulinum* A et souches protéolytiques de *Clostridium botulinum* B). Les souches de *Clostridium botulinum* A sont divisées en deux sous-groupes dénommés A1 et A2 selon le polymorphisme des profils de restriction d'ADN. Les souches de botulisme infantile isolées au Japon appartiennent au sous-groupe A2, les souches isolées de botulisme chez l'adulte et les nouveau-nés aux Etats Unis se répartissent dans les sous-groupes A1 et A2 (Cordoba, Collins, East, 1995).

La toxi-infection botulique survient aussi chez les adultes. Les facteurs prédisposants tels que chirurgie intestinale, antibiothérapie, inflammation chronique ou lésions chroniques de la muqueuse intestinale permettraient la croissance de *Clostridium* neurotoxigènes dans le tube digestif.

› *Quel est le mécanisme de survenue du botulisme suite à une blessure et quelle est son incidence ?*

Les plaies peuvent être colonisées par *Clostridium botulinum* et provoquer l'apparition d'un botulisme. Ce mode de contamination est analogue à celui du tétanos ou d'une gangrène à *Clostridium*.

Les plaies anfractueuses, profondes et avec une faible ouverture sur l'extérieur sont favorables au développement de bactéries anaérobies. La présence de tissu nécrosé, suite à une contusion par exemple, stimule la croissance des *Clostridium* en apportant les nutriments nécessaires à ces bactéries qui n'envahissent pas les cellules saines. Les *Clostridium botulinum* responsables du botulisme par blessure appartiennent aux toxinotypes A et B du groupe I.

Cependant, l'incidence du botulisme par blessure est beaucoup moins fréquente que celle du tétanos et actuellement cette forme de botulisme est observée essentiellement chez les personnes droguées. Le botulisme par blessure est en recrudescence aux USA chez les toxicomanes, soit par utilisation de matériel contaminé pour les injections, soit par présence de spores de *Clostridium botulinum* dans les drogues (Shapiro, Hatheway, Swerdlow 1998). Cette forme de botulisme sévit également en Europe. Neuf cas ont été rapportés en Suisse entre 1998-2000 (Burnens, 2000), deux cas de type A en Angleterre en 2000 (Brett, 2000 ; Khan, 2000) et quatre cas (trois en 1997 et un en 2000) en Norvège (Blystad, 2000).

3.3 Clinique, traitement et prévention

› *Quel est le tableau clinique habituel du botulisme humain ?*

Habituellement suite à l'ingestion d'aliments contaminés, après une phase d'incubation dont la durée est inversement proportionnelle à la gravité de l'évolution, suivie par une phase d'invasion avec douleurs abdominales, nausées et vomissements remplacés rapidement par une constipation, le tableau clinique typique du botulisme s'installe (Bazin, Dargère, Verdon, 1999).

Il s'agit d'une atteinte neurologique se manifestant par des paralysies motrices sans aucun trouble sensitif. Les paralysies intéressent la motricité oculaire, les muscles de la déglutition et du larynx. Les paralysies s'étendent en descendant aux muscles des membres supérieurs, à ceux impliqués dans la

respiration et éventuellement aux membres inférieurs. Ces paralysies se manifestent par une paralysie de l'accommodation et des dilatations pupillaires. Le patient voit souvent "flou" et a les muqueuses sèches.

Dans une rétrospective de 108 cas recensés dans le Poitou (Roblot *et al.*, 1994), les premiers symptômes sont digestifs dans près de la moitié des cas. C'est dans les formes graves que les paralysies apparaissent rapidement et sont au premier plan des symptômes. La mort est essentiellement liée à la paralysie des muscles respiratoires à l'origine d'arrêts cardio-respiratoires. Le risque de fausse route est important.

La nature de la toxine influe sur la sévérité de l'atteinte botulique. Une étude nord-américaine a analysé 309 dossiers de patients atteints de botulisme entre 1975 et 1988, dû aux toxines A, B et E dans 148, 89 et 72 cas respectivement. La durée d'incubation (délai entre l'ingestion de l'aliment incriminé et début des symptômes) est en général brève, d'une journée (0 à 7 jours pour la toxine A, 0 à 5 jours pour la toxine B et moins de 2 jours pour la toxine E). Pour 1/3 des cas où l'incubation a été inférieure à 24 heures, l'assistance respiratoire a été nécessaire dans 59% des cas contre 44% lorsque l'incubation dépassait 24 heures (Woodruff *et al.*, 1992). Dans cette étude, la toxine A est responsable des formes les plus sévères nécessitant une intubation, la toxine E a la durée d'incubation la plus courte et la toxine B la plus longue.

L'évolution est variable selon la sévérité de l'atteinte initiale avec une hospitalisation de plusieurs semaines et une récupération longue dans les formes sévères.

› *Quand et comment suspecter le botulisme humain ?*

Les premiers signes sont d'ordre visuel : diplopie, défaut d'accommodation. L'affection s'aggrave par des signes de paralysie flasque évoluant sans hyperthermie : sécheresse de la bouche, défaut de déglutition, constipation, fatigue puis faiblesse des membres. Dans les formes avancées, les signes de paralysie sont évidents : paralysie des membres, difficultés respiratoires nécessitant une réanimation.

Le diagnostic de botulisme est clinique. Il permet de mettre le patient en observation dans un service de réanimation médicale et de prendre les mesures thérapeutiques ; il permet aussi de déclencher l'enquête de santé publique.

› *Comment confirmer une suspicion clinique ?*

Les examens à effectuer pour confirmer une suspicion de botulisme sont :

- recherche de toxine botulique dans le sérum (prise de sang sur tube sec, prévoir au minimum 20 mL de façon à obtenir 10 mL de sérum, quantité nécessaire pour une recherche de toxine botulique et son typage),
- éventuellement recherche de toxine botulique et/ou de *Clostridium* neurotoxigène dans les selles (échantillons de selles dans un pot à coproculture).

La recherche de la toxine dans le sérum, les selles et l'aliment suspect reste le seul examen de laboratoire confirmant le diagnostic. La détection de toxine dans le sérum n'est positive que dans 60% des prélèvements sanguins effectués dans les 48 premières heures contre 13 à 28% de ceux faits plus tardivement (Woodruff *et al.*, 1992). Cette constatation est aussi vraie pour la recherche de *Clostridium botulinum* par culture à partir des selles, bien que la positivité de la culture persiste plus longtemps que celle de la toxine.

› *Dans quel contexte le botulisme doit-il être recherché ?*

Le botulisme doit être évoqué devant un tableau de paralysie avec signes oculaires. Les commémoratifs signalant une consommation, dans les jours précédents l'apparition des symptômes, de conserves familiales, de préparations alimentaires ayant subi une maturation ou une phase prolongée de conservation ou pour lesquelles on ne peut pas être certain que la chaîne du froid ait été respectée, sont évocateurs d'un possible botulisme.

› *Peut-on traiter le botulisme humain ?*

Le traitement du botulisme est le plus souvent symptomatique. Il consiste essentiellement dans l'assistance respiratoire, qui dans les cas graves comprend, trachéotomie et réanimation, d'une durée de plusieurs jours à plusieurs semaines.

Le traitement spécifique repose sur la sérothérapie, qui consiste en l'administration d'anticorps préparés chez le cheval contre les toxines de type A, B et E. Ces sérums trivalents ne sont plus actuellement préparés en Europe, et leur obtention auprès du Center of Disease Control and Prevention d'Atlanta reste limitée. L'efficacité de la sérothérapie est discutée et aucune étude prospective n'a été réalisée. L'injection d'anticorps antitoxine botulique a pour effet de neutraliser la toxine botulique circulante, mais elle est inopérante sur celle liée de façon irréversible au tissu nerveux ou qui a été internalisée dans les neurones. La demi-vie des anticorps injectés serait de 5 à 8 jours. De ce fait, la sérothérapie ne peut être efficace que si elle est instaurée précocement après le début des symptômes. Ainsi, dans une analyse de 134 cas de botulisme de type A, la mortalité était de 10% chez les patients ayant reçu une sérothérapie dans les 24 premières heures, de 15% chez ceux traités tardivement et de 46% chez ceux qui n'avaient pas bénéficié de ce traitement. La sérothérapie a pour principal inconvénient d'induire chez certaines personnes (jusqu'à 9%) une réponse allergique. Des immunoglobulines antitoxines botuliques d'origine humaine sont disponibles aux USA depuis 1998, uniquement pour le traitement du botulisme infantile (Shapiro, Hatheway, Swerdlow, 1998).

L'antibiothérapie (notamment pénicillines) est recommandée dans les toxi-infections botuliques comme le botulisme infantile et le botulisme par blessure. Elle est inutile dans le botulisme d'origine alimentaire due à une ingestion de toxine préformée.

Les composés capables de stimuler la libération d'acétylcholine aux jonctions neuromusculaires ont été largement évalués dans le traitement du botulisme. La guanidine, comme les aminopyridines, prolongerait le potentiel d'action au niveau des terminaisons nerveuses en bloquant les canaux potassiques et, par conséquent, en stimulant les canaux calciques et l'entrée du calcium. Ces drogues pourraient aussi avoir un effet sur la mobilité du calcium intracellulaire. La guanidine s'est montrée efficace pour restaurer la transmission nerveuse des préparations *in vitro* nerf-muscles d'animaux expérimentalement intoxiqués par la toxine botulique A. Les effets bénéfiques de la guanidine chez les sujets atteints de botulisme A ou B étaient variables. Certains patients avaient montré une légère amélioration transitoire (Tacket, Rogawski, 1989).

Les aminopyridines, notamment 4-aminopyridine et 3,4-diaminopyridine, sont 20 à 30 fois plus actives que la guanidine. Ces composés restaurent l'activité motrice d'animaux intoxiqués par la toxine botulique A, mais ils ont un faible effet sur les autres types de toxines botuliques. La spécificité des aminopyridines pour le type A n'est pas connue. Il faut noter que ces drogues causent des effets indésirables comme aplasie médullaire, néphrite, arythmie, dysfonctionnement hépatique pour la guanidine et des convulsions pour les aminopyridines (Tacket, Rogawski, 1989).

› *Existe-t-il un vaccin contre le botulisme humain ?*

La vaccination anti-botulique est efficace tout autant que la vaccination anti-tétanique vis-à-vis du tétanos. Elle est fondée sur des anatoxines qui induisent des anticorps neutralisant contre les toxines botuliques. Cette vaccination est limitée aux personnes à risque comme celles travaillant dans des laboratoires ou des militaires menacés par l'utilisation d'armes biologiques. Une vaccination généralisée aurait pour inconvénient de ne pas pouvoir utiliser les toxines botuliques comme agents thérapeutiques.

› *En quoi consiste l'utilisation des toxines botuliques comme agents thérapeutiques ?*

Les toxines botuliques peuvent être utilisées à des doses très faibles pour le traitement des contractures musculaires involontaires localisées (torticolis, blépharospasme, etc.). Le traitement consiste en une injection locale d'une très faible quantité de toxine, généralement de type A. La levée du spasme persiste quelques mois au bout desquels l'injection doit être renouvelée.

4. Le botulisme animal

4.1 Le botulisme dans la filière avicole

4.1.1 Epidémiologie descriptive

› *Quelle a été, au cours des dernières années, l'évolution du nombre de foyers de botulisme aviaire en France ?*

Jusqu'en 1989, le botulisme chez les volailles semblait très peu fréquent. Le Réseau National d'Observations Épidémiologiques en Aviculture (RNOEA) a enregistré ses quatre premiers signalements en 1989. Ensuite, le nombre de signalements a évolué vers une augmentation et, en apparence à partir de 1998, vers une diminution (figure 1).

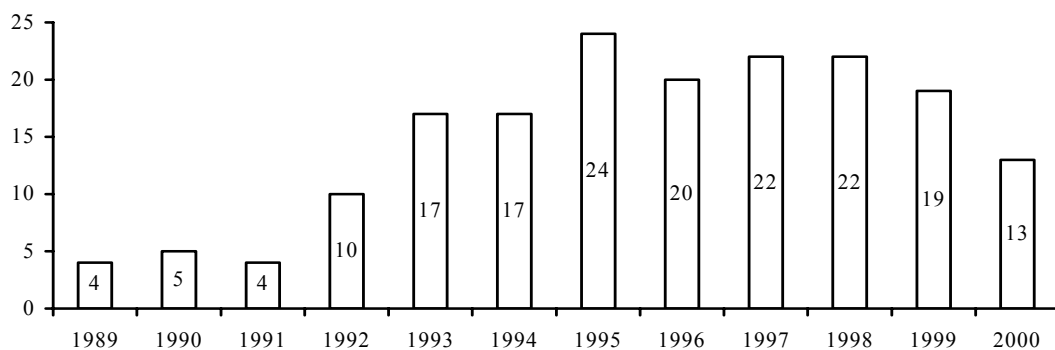


Figure 1 : Données concernant le botulisme chez les volailles
Source : Données RNOEA (P. Drouin - E. Espié - J.Y. Toux) Afssa Ploufragan

Les productions avicoles les plus affectées sont celles de la dinde et du poulet de chair (productions de volailles intensives élevées au sol) et surtout dans des lots en fin de bande. Mais les productions de palmipèdes, pintades peuvent être également affectées (figure 2).

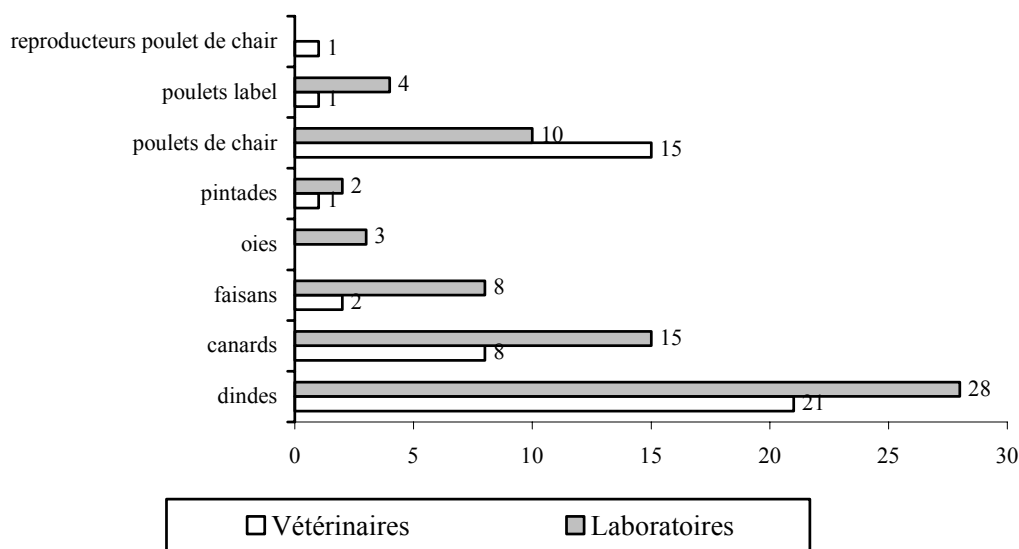


Figure 2 : Répartition des signalements des foyers de botulisme par les correspondants vétérinaires et par les laboratoires en données cumulées de 1995 à 2000
Source : Données RNOEA (P. Drouin - E. Espié - J.Y. Toux) Afssa Ploufragan

La figure 3 montre que la majorité des cas de botulisme aviaire signalés sont de type C et D et qu'en 1997 apparaissent les premiers signalements de botulisme de type E chez les volailles d'élevage.

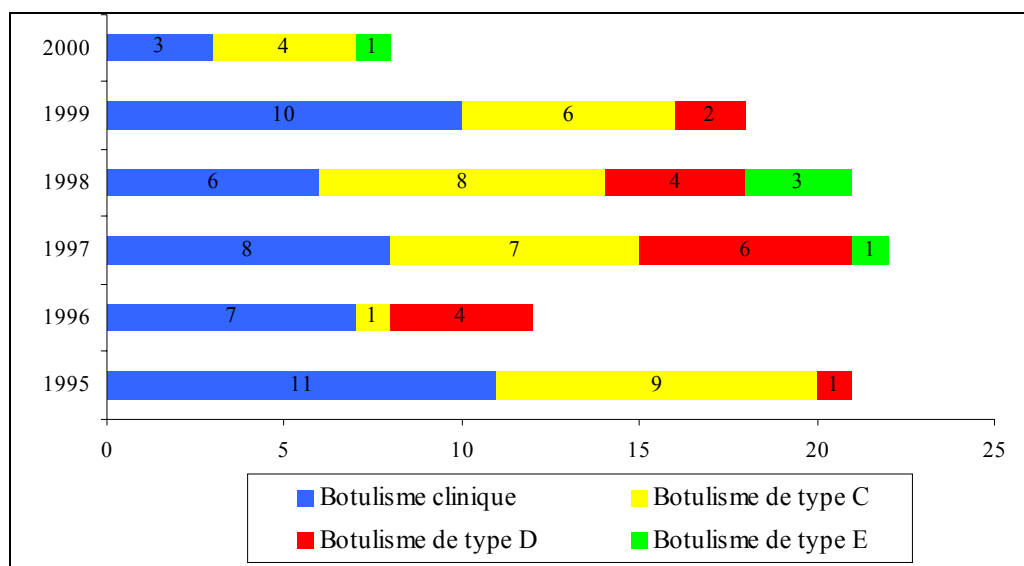


Figure 3 : Répartition des foyers de botulisme (1995-2000), en fonction de la toxine identifiée (données concernant uniquement les volailles d'élevage sauf les canards)
 Source : Données RNOEA (P. Drouin - E. Espié - J.Y. Toux) Afssa Ploufragan

Les régions principalement concernées sont celles de l'Ouest de la France (Bretagne et Pays de Loire) où se réalisent plus des 2/3 de la production avicole, mais les régions Centre, Midi-Pyrénées ou Rhône-Alpes ne sont pas épargnées.

Les signalements au RNOEA sont loin d'être exhaustifs parce qu'ils correspondent à des déclarations libres de correspondants appartenant à des cabinets vétérinaires, des organismes de production ou des laboratoires adhérant spontanément au RNOEA. On constate que la prévalence du botulisme (tableau V) reste quasiment constante et très faible. La comparaison de l'évolution de la prévalence du botulisme aviaire et celle d'une autre clostridiose, l'entérite nécrotique à *Clostridium perfringens* suggère deux hypothèses pour expliquer cette constatation 1) certains cas de botulisme n'ont pas été rapportés compte tenu de possibles conséquences négatives sur la filière, 2) le nombre de cas reste réellement constant dans les limites du RNOEA.

Tableau V : Essai de calcul de la prévalence du botulisme et de l'entérite nécrotique dans les productions de dindes et de poulets de chair à partir des cas signalés – librement – au RNOEA

	1995	1996	1997	1998	1999	2000
DINDES						
Nombre cas - Botulisme	7	2	3	7	7	2
RNOEA - Entérite nécrotique	15	45	65	114	386	451
Nombre de lots estimés/an ^(a)	13 310	13 635	14 170	14 053	13 488	14 503
Prévalence calculée %						
- Botulisme	0,052	0,015	0,021	0,050	0,052	0,014
- Entérite nécrotique	0,112	0,330	0,458	0,811	2,861	3,110
POULETS^(b)						
Nombre cas - Botulisme	3	3	5	6	4	3
RNOEA - Entérite nécrotique	101	89	182	177	361	383
Nombre de lots estimés/an ^(a)	36 185	37 942	38 210	37 626	33 353	33 528
Prévalence calculée %						
- Botulisme	0,008	0,008	0,013	0,016	0,012	0,009
- Entérite nécrotique	0,279	0,234	0,476	0,470	1,082	1,142

(a) : Calculés d'après source ITAVI et SCEES ; (b) : Poulets de chair industriels et sous label

Par ailleurs, le tableau VI nous montre l'existence de variabilités saisonnières dans les signalements du botulisme, 80% survenant pendant le printemps et l'été.

Tableau VI : Répartition des signalements de botulisme en fonction des semestres

Année	Nombre de signalements	Mai à octobre Printemps – Été	Novembre à avril Automne – Hiver
1995	24	21	3
1996	20	14	6
1997	22	19	3
1998	22	14	8
1999	19	17	2
2000	13	12	1
Période 1995 - 2000	120 signalements (100 %)	97 signalements (80,8 %)	23 signalements (19,2 %)

Cependant, l'absence d'une épidémiologie-surveillance réglementée ne permet pas de suivre l'évolution du nombre de cas de botulisme aviaire en France, ni d'obtenir des informations exhaustives et fiables.

› *Quelle est la proportion de cas de portage asymptomatique ?*

Concernant le portage asymptomatique et l'excrétion de *Clostridium botulinum* toxinogène, aucune donnée n'est disponible. Il serait important d'évaluer cette proportion, surtout avant abattage dans les lots traités ou dans les lots ayant manifesté un cas de botulisme.

› *Quels sont les principaux toxinotypes rencontrés chez les volailles domestiques ?*

Les oiseaux sont sensibles aux toxines botuliques B, C, D, E, avec une prédominance des types C et D (Sébal, 1990 ; Sébal, Duchemin, Désenclos, 1997).

Actuellement en France, selon les deux sources d'informations du RNOEA et du CNR des bactéries anaérobies, les cas de botulisme aviaire rencontrés dans les élevages de volailles sont exclusivement de types C et D et plus récemment de type E (Drouin, Toux, 1998, 1999, 2000 ; Carlier, Henry, Lorin, Popoff 2001).

› *Au sein d'un troupeau atteint, quels sont les taux de morbidité et de létalité ?*

Les taux de morbidité et de mortalité varient selon la quantité de toxine ingérée ou assimilée. Par exemple, Smart évoque un cas de botulisme C chez la dinde, où 50% des animaux ont été affectés en 12 heures, avec une mortalité cumulative de 30% (Smart, 1983). Quant aux taux de mortalité, ils s'échelonnent de 4 à 100 %, avec des mortalités fortes décrites dans des élevages de faisans (84%) (Blandford, 1976) et dans les élevages de dindes (100%) (Drouin, 2000).

Quelques guérisons spontanées existent, mais elles sont rares (Dohms, 1997 ; Drouin, 2000).

4.1.2 Modes de contamination des volailles

› *Quelles sont les principales modalités de contamination des troupeaux de volailles ?*

L'existence du botulisme est liée à la présence de la spore de *Clostridium botulinum* et/ou de la toxine provenant de différentes sources virulentes : animaux, déjections, environnement, alimentation et eau (figure 4).

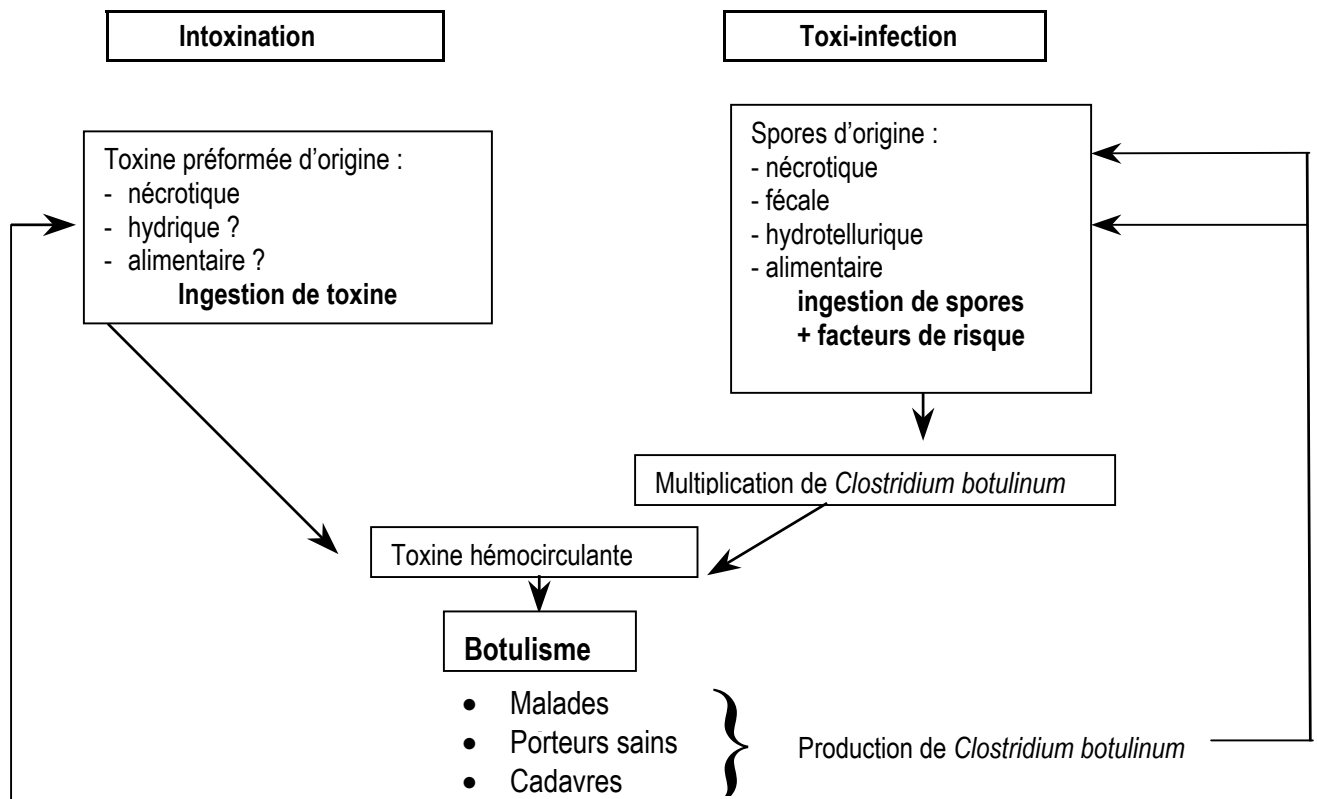


Figure 4 : Cycle du botulisme chez les volailles domestiques (Drouin, 1996)

- les animaux

Les cadavres de volailles constituent un excellent milieu de culture pour *Clostridium botulinum*, du fait des conditions d'anaérobiose intestinale, permettant, une germination des spores, une multiplication bactérienne et une production de toxines. Ces cadavres représentent donc une source potentiellement dangereuse de *Clostridium botulinum* et de neurotoxines botuliques (Popoff, 1989). Des valeurs de toxine de type C supérieures à 2 000 fois la Dose Létale Minimum de souris (DLM) par gramme de muscle ont été retrouvées dans des carcasses de volailles en décomposition (Blandford, Roberts, 1970).

Des cadavres de poulets de chair ont pu être identifiés comme source de toxine dans deux foyers de botulisme aviaire de type C (Blandford, Roberts, 1970 ; Harrigan, 1980).

D'autres mammifères susceptibles de s'introduire dans l'élevage (carnivores domestiques ou sauvages, rongeurs) sont très souvent porteurs de *Clostridium botulinum* intestinal. Ils ne sont pas de leur vivant une source effective de contamination, mais la présence de leurs cadavres peut constituer une source de contamination. Ainsi, en Afrique tropicale et équatoriale, ont été décrits des foyers de botulisme consécutifs à une contamination de points d'eau par des cadavres contaminés de petits mammifères (Doutre, 1982 ; Thiongane, Leforban, Doutre, 1984 ; Popoff *et al.*, 1986). Ces cadavres de vertébrés semblent jouer un rôle prépondérant dans la persistance de *Clostridium botulinum* dans l'environnement, constituant des milieux de prolifération pour la bactérie (Popoff, 1984) et vraisemblablement des réservoirs pour la forme sporulée de la bactérie.

Une contamination par les oiseaux sauvages paraît peu probable dans les élevages hors sol, en claustration et donc sans contact avec d'autres animaux (Popoff *et al.*, 1986). En ce qui concerne les élevages en plein air, ce mode de contamination peut être envisagé. Ainsi suite à des cas de botulisme chez des autruches en Vendée en 1995, l'hypothèse d'une origine de contamination fécale par des oiseaux sauvages (goélands très fréquemment présents dans le parc) a été retenue (Bouisset, 1995). Malgré tout, les foyers de botulisme hydrique observés chez les oiseaux sauvages ne correspondent

pas géographiquement aux bassins de productions avicoles, ce qui rend peu fréquente l'intercontamination (Quillet, 1996).

Les invertébrés, et principalement les insectes, constituent une source de toxines botuliques. Les larves de diptères (asticots), qui se nourrissent de cadavres, ingèrent la toxine présente dans la chair en décomposition et la concentrent à des taux variables de 400 à 100 000 DLM par gramme (Smart, Roberts, Underwood, 1987). Graham a montré qu'un gramme de larve d'asticot pouvait contenir 10^4 DLM de toxine de type C et entre 10^4 et 2×10^5 *Clostridium botulinum* viables (Graham, 1978). Dans des larves de *Calliphoridae*, des doses de 8000 DL50 de toxine de type C par gramme ont été mises en évidence (Hubalek, Halouzka, 1991). L'ingestion de ces asticots peut donc être à l'origine de foyers de botulisme (Dohms, 1997). Par ailleurs, ces invertébrés joueraient également un rôle dans la conversion des souches non toxigéniques de *Clostridium botulinum*, car ils abritent, dans leur cavité générale, des phages TOX+ libres (Hariharan, Mitchell, 1977).

- l'environnement et les déjections

Dans les élevages de volailles touchés par le botulisme, on a pu dénombrer de 100 à 12 500 *Clostridium botulinum* de type C par gramme de litière (Roberts, Collings, 1973 ; Roberts, Thomas, Gilbert, 1973 ; Smart, Roberts, 1977 ; Okamoto *et al.*, 1999), mais sans qu'aucune toxine ne puisse être détectée (Smart, Roberts, 1977). Cependant, une étude récente montre que la présence de neurotoxines botuliques est tout à fait possible dans les composts et fumiers (Böhnel, Lube, 2000). La litière peut être contaminée par la poussière, les fientes d'animaux et les cadavres laissés dans le poulailler. Néanmoins, pour que les spores de *Clostridium botulinum* subsistent dans ce milieu et produisent des toxines, il faut que l'activité spécifique de l'eau soit supérieure à 0,93 (Smart, Roberts, 1977).

Par ailleurs, *Clostridium botulinum* est un germe tellurique, largement répandu, surtout sous la forme de spores dans le sol, l'eau, les sédiments aquatiques (Berche, Gaillard, Simonet, 1988) et les composts organiques (Böhnel, Lube, 2000). Lors de foyer de botulisme, la présence de spores de *Clostridium botulinum* de type C a été mise en évidence dans le sol de poulailler, dans les abords et dans la boue prélevée dans les environs du bâtiment (Blandford, Roberts, 1970 ; Okamoto *et al.*, 1999). Cette contamination des sols est souvent décrite comme un réservoir de *Clostridium botulinum* à l'origine de l'infection des oiseaux sauvages (Blandford, Roberts, Ashton, 1969 ; Borland, Moryson, Smith, 1977 ; Contreras de Vera *et al.*, 1991).

Pour un foyer plus récent en Vendée en 1999, des prélèvements de fumier et de sol se sont avérés positifs pour une recherche de *Clostridium botulinum* de type E, mais négatifs en ce qui concerne la toxine (Drouin, Durand, Dufour, 1999).

Les spores, très résistantes dans le milieu extérieur, peuvent donc persister dans les sols d'un poulailler et de ses abords et être à l'origine de récurrence (Kurazono, Shimozawa, Sakaguchi, 1987 ; Boulianne, 1996). P. Drouin émet l'hypothèse que ces spores pourraient également persister dans les poussières (en grande partie d'origine fécale) présentes dans les circuits d'aération et les rebords intérieurs des poulaillers ; la poussière de ces circuits en fonctionnement serait alors une source de contamination de l'aliment dans les mangeoires et de l'eau dans les abreuvoirs.

Ainsi, à cause de la persistance de la contamination du sol, des abords et des circuits d'aération dans un élevage où a déjà sévi le botulisme, il est fréquent de constater une récurrence sur la bande suivante, dans les mois qui suivent ou même plusieurs années après (Drouin, 2000). Il importe donc d'éviter la dispersion de souches toxigènes (C, D, E) dans l'environnement (Notermans *et al.*, 1985 ; Popoff, Argenté, 1996 ; Böhnel, Lube, 2000). Toutes ces observations conduisent, en toute logique, à la nécessité d'appliquer la démarche HACCP à l'ensemble du site de production (bâtiments, abords, matériel, etc.) pour déterminer les étapes où des opérations de nettoyage et désinfection doivent être conduites. D'autre part, les méthodes d'élevage actuellement préconisées (élevage au sol, en volière, méthodes dites "biologiques" sur parcours) créent des conditions favorables à la persistance de *Clostridium botulinum* dans l'environnement immédiat des animaux et peuvent entraîner une augmentation de l'incidence du botulisme.

- l'alimentation

Pour Popoff en 1984, la contamination par les aliments était une des principales causes de botulisme en Europe du fait de l'utilisation de farines de viande, autorisée à l'époque ; certaines provenaient des équarrissages. Lors de foyers de botulisme aviaire, des analyses sur des échantillons d'aliments industriels pour volailles et de farines de viande ont permis de mettre en évidence *Clostridium botulinum* de types A (Gimenez, Ciccarelli, 1987), C (Dohms, Allen, Rosenberger, 1982) et D (Popoff, 1989). Par contre, la recherche de la toxine donne souvent des résultats négatifs (Dohms, Allen, Rosenberger, 1982 ; Smart, 1983 ; Drouin, 2000). Cependant, il ne faut pas oublier que *Clostridium botulinum* peut avoir également une origine hydrotellurique et fécale. De ce fait des aliments pour volailles, de composition entièrement végétale, peuvent également être vecteurs de spores de *Clostridium botulinum*.

4.1.3 Clinique, traitement et prévention

› *Quels sont les critères de suspicion du botulisme aviaire ?*

Une suspicion de botulisme chez les volailles est fondée sur l'observation de signes cliniques accompagnés d'une absence de lésion significative à l'autopsie.

Les signes cliniques du botulisme chez les volailles sont les mêmes, quelle que soit l'espèce. Ils ont été décrits chez le poulet (Blandford, Roberts, 1970 ; Roberts, Collings, 1973 ; Roberts, Thomas, Gilberts, 1973 ; Page, Fletcher, 1975 ; Harrigan, 1980 ; Dohms, Allen, Rosenberger 1982 ; Pecelunas, Wages, Helm, 1999), la dinde (Smart, 1983), le faisan (Vadlamundi, Lee, Hanson, 1959 ; Fish, Mitchell, Barnum, 1967 ; Borland, Moryson, Smith, 1977 ; Foreyt, Abinanti, 1980) et le canard domestique (Clark, 1987).

Ces symptômes correspondent à une paralysie flasque, d'abord des pattes, qui progresse ensuite vers les ailes, le cou et les paupières (Dohms, 1997). La paralysie bilatérale des pattes entraîne de l'incoordination, de l'ataxie ou des boiteries (Dohms, 1987). Au départ, les animaux affectés se portent sur leurs jarrets ou restent en décubitus sternal et refusent de se déplacer. Les ailes sont tombantes, écartées sur le sol. Le cou est flasque (« cou mou »), le bec repose alors dans la litière ou dans l'eau, avec, pour les palmipèdes, risque de noyade. Les paupières sont tombantes à closes, ce qui donne aux oiseaux un aspect général comateux, somnolent, voire mort. Les oiseaux peuvent aussi présenter des signes de frilosité, un plumage ébouriffé et souvent de la diarrhée avec un excès d'urates dans les fientes. Des difficultés respiratoires (bec ouvert, détresse respiratoire) et des suffocations ont aussi été décrites (Roberts 1973) et observées (Drouin, 2000).(photos 1, 2, 3)

La mort, provoquée par asphyxie, due à une paralysie des muscles abdominaux et cardiaques, ne survient pas immédiatement, mais après une longue période d'agonie (Dohms, 1987 ; Dohms, 1997 ; Drouin, 2000).



Photo 1 : Allure caractéristique de paralysie flasque chez une dinde atteinte de botulisme (photo P. Drouin).



Photo 2 : Paralysie flasque du cou et de la tête. Noter les paupières tombantes et le bec ouvert à cause de la suffocation (photo P. Drouin).



Photo 3 : Putréfaction rapide (photo P. Drouin).

› *Le botulisme peut-il être suspecté sur un animal mort ?*

Les lésions anatomo-pathologiques observées chez les volailles à l'occasion de botulisme ne sont pas caractéristiques de la maladie. La plupart des auteurs rapportent une absence de lésion significative macroscopique ou microscopique (Dohms, 1997) à part, peut-être, un cœur flasque qui peut expliquer un temps de saignement supérieur à la normale (Drouin, 2000). De ce fait, il sera impossible en pratique de repérer et donc de saisir sur la chaîne d'abattage la carcasse d'une volaille atteinte de botulisme.

› *Comment confirmer une suspicion clinique ?*

Une suspicion clinique de botulisme doit se différencier d'une intoxication soit au plomb, soit au sélénium, soit aux ionophores ou encore à l'alphachloralose ainsi que d'une autre infection : la maladie de Newcastle, l'influenza aviaire, la maladie de Marek, l'encéphalomyélite aviaire, une clostridiose à *Clostridium perfringens*, le rouget ou une pasteurellose aiguë (Dohms, 1987 ; Drouin, 2000).

La confirmation du diagnostic d'un botulisme aviaire se fait par mise en évidence et identification de la toxine botulique dans le sang et/ou le contenu intestinal par le test sur souris (Popoff, 1999). La toxine sera d'autant plus facile à mettre en évidence que les prélèvements seront réalisés sur des volailles récemment atteintes (si possible atteintes depuis moins de 48 h). En effet des résultats sérologiques

faussement négatifs ont souvent été constatés sur des dindes atteintes depuis plus de 4 jours (taux de toxine sérique inférieur au seuil de sensibilité du test ?) (Drouin 1996, 2000). La recherche bactériologique aura pour but d'isoler la bactérie toxigène et d'en faire la caractérisation à des fins épidémiologiques (voir tableau VII).

Tableau VII : Plan d'échantillonnage recommandé pour confirmation du diagnostic de botulisme chez les volailles

Nature du prélèvement	Nombre de volailles en état de botulisme depuis	
	moins de 48 heures	plus de 48 heures
Sérum : 5 mL/sujet (ou sang : 10 mL/sujet) en tube sec individuel	2 sujets (A et B)	2 sujets (C et D)
Contenu d'intestin et de cæcum + foie en pots secs individuels	sujets A et B ^(a) euthanasiés	sujets C et D ^(a) euthanasiés

(a) - Éviter les mélanges des sérums ou des contenus du tube digestif.
- Identifier chaque tube ou chaque pot "A", "B", etc. afin de rapprocher les résultats de recherche de toxine des résultats bactériologiques et indiquer les dates d'apparition du botulisme sur les sujets prélevés et la date des prélèvements.

› *Dans quel contexte épidémiologique peut-on suspecter des cas cliniques de botulisme ?*

Il y aura lieu de suspecter le botulisme lorsque l'on observe une augmentation importante de la mortalité sur un lot, surtout en fin de bande (Drouin, 2000), associée à au moins une des circonstances suivantes :

- la réapparition d'une mortalité élevée sur un lot ayant précédemment connu un épisode de botulisme ou faisant suite à un lot qui avait été affecté de botulisme, dans le même bâtiment.

En effet, les spores de *Clostridium botulinum*, très résistantes dans le milieu extérieur, peuvent persister dans l'environnement d'un poulailler et être à l'origine de récurrence (Kurazono, Shimosawa, Sakaguchi, 1987 ; Boulianne, 1996 ; Okamoto *et al.*, 1999).

- une mauvaise conduite d'élevage et un contexte d'hygiène médiocre dont l'insuffisance de ramassage des cadavres (Drouin, 1995). En effet, l'absence de ramassage des cadavres est un point-clé du cycle du botulisme en aviculture, car plus le temps de séjour des cadavres dans le poulailler est élevé, plus le risque de contamination des autres animaux est grand (Drouin, 1995 ; Drouin, Durand, Dufour, 1999),

- une densité élevée de volailles, qui contribue à la propagation du botulisme (Villate, 1997),

- une absence de désinfection préalable des locaux, mauvaises conditions de stockage des aliments (Pellerin, Popoff, Guillet, 1986),

- la présence dans le voisinage d'une quantité importante de cadavres à l'origine d'une multiplication de *Clostridium botulinum*, d'une prolifération d'insectes (mouches) et de larves d'insectes,

- une manifestation de botulisme chez des carnivores domestiques de l'élevage qui auraient consommé des cadavres de volailles d'un lot suspect (Drouin, 2000),

- un gain moyen quotidien supérieur à la moyenne ; en effet le botulisme chez les volailles de chair peut également survenir dans des élevages performants (Drouin, 1999),

- une météorologie chaude et orageuse ; ce facteur paraît fréquemment associé à l'apparition du botulisme chez les volailles (Drouin, 2000). C'est ainsi, qu'au nord des États-Unis, on parle de récurrence annuelle de la maladie chaque été (Mitchell, Rosendal, 1987). Juillet et août sont les mois pendant lesquels les épizooties sont le plus souvent observées, les pics de mortalité étant souvent associés aux années particulièrement chaudes (Haagsma, 1987) ou aux périodes prolongées de forte chaleur. En France, l'épizootie de botulisme hydrique sur les oiseaux sauvages au lac de Grand-Lieu en 1995, en est un exemple (Gourreau, 1995). Les données du Réseau National d'Observations Épidémiologiques en Aviculture, de 1990 à 2000, montrent que la fréquence relative des cas de

botulisme chez les volailles a toujours été plus élevée au printemps et en été (80,8 %) mais qu'elle peut survenir en automne et en hiver (19,2 %) (Tableau VI).

- la proximité d'une étendue d'eau, fréquentée par des oiseaux sauvages (réservoir de botulisme hydrique).

Ces circonstances sont résumées dans l'encadré suivant :

Le botulisme doit être suspecté

lorsqu'un syndrome augmentation de mortalité et paralysie flasque est associé à l'une ou plusieurs des circonstances suivantes :

- épisode antérieur de botulisme sur l'élevage
- mauvaise conduite hygiénique dont ramassage insuffisant des cadavres
- stock de cadavres dans le voisinage
- botulisme chez les carnivores domestiques de l'élevage
- volailles à fort Gain Moyen Quotidien en croissance
- météorologie chaude et orageuse
- proximité d'une étendue d'eau

› *Quelle est la part des toxi-infections et des intoxications chez les volailles domestiques ?*

Le botulisme chez les volailles relèverait plutôt d'une toxi-infection que d'une intoxication.

En effet, lors de toxi-infection, les volailles s'infecteraient par ingestion de spores de *Clostridium botulinum* présentes dans l'environnement (sol, abords, nourriture, eau, litière, poussières) et manifesteraient du botulisme vraisemblablement à l'occasion de circonstances associées. L'ingestion d'une spore n'est cependant pas suffisante pour permettre une prolifération abondante de *Clostridium botulinum* dans le tube digestif. Dans les conditions naturelles, les spores de *Clostridium botulinum* absorbées par voie orale peuvent rester latentes ou se développer dans le tube digestif, le plus souvent en faible nombre (Popoff, 1989). Il a cependant été montré expérimentalement qu'une suspension de spores de *Clostridium botulinum* de type C, administrée par voie orale à des poulets et des cailles, était capable de produire de la toxine *in vivo* (Smith, Turner, 1989) et de reproduire la maladie (Roberts *et al.*, 1972 ; Hyun, Sakaguchi, 1989).

En ce qui concerne l'intoxication, par ingestion de toxine préformée, il faut des quantités assez importantes de toxines par voie orale pour déclencher la maladie chez les volailles ($> 10^4$ DL₅₀ souris) (Gross, Smith, 1971). Or de telles sources de toxine n'ont jamais été retrouvées dans l'environnement des élevages, ni dans l'abreuvement, ni dans l'aliment des volailles parmi lesquelles des cas de botulisme avaient été identifiés (Roberts, 1973 ; Roberts, Thomas, Gilbert, 1973 ; Page, Fletcher, 1975 ; Smart, Roberts, 1977 ; Smart, 1983 ; Drouin, 2000).

On admet donc que l'intoxication n'est possible que par l'ingestion de cadavres (cannibalisme) d'oiseaux morts de botulisme (Blandford, Roberts, 1970 ; Roberts, Collings, 1973) ou par celle de larves d'insectes (*Calliphora*, *Lucilia*, *Musca*, *etc*) proliférant sur ces cadavres et hébergeant de grandes quantités de toxines capables de déclencher la maladie (Smith *et al.*, 1975 ; Borland, Moryson, Smith, 1976 ; Graham, 1978 ; Smart, Roberts, Underwood, 1987 ; Hubalek, Halouzka, 1991). Ces circonstances sont plus rares.

› *Quelles sont les indications et les modalités de la vaccination chez les volailles domestiques ?*

Pour le botulisme de type E, aucun vaccin n'est actuellement disponible.

Pour le vaccin à base d'anatoxines spécifiques de *Clostridium botulinum* de types C et D, compte tenu du coût du vaccin et des difficultés de la vaccination individuelle par injection, il est inenvisageable de vacciner plusieurs milliers de volailles contre le botulisme de type C ou D ; cela représenterait un investissement trop élevé (Dohms, 1997). La vaccination avec le vaccin BotuvaxND uniquement contre le type C, du laboratoire Hoechst, pourrait être mise en œuvre après obtention d'une autorisation temporaire d'utilisation (ATU), surtout dans les élevages à forte valeur économique, comme ceux des autruches et des faisans (Allwright, Wilson, Van Rensburg, 1994 ; Bouisset, 1995).

› *Quelles sont les mesures de prévention chez les volailles ?*

La prophylaxie hygiénique (Drouin, 1996) est résumée dans le tableau VIII.

Par ailleurs, pour les lots partiellement atteints de botulisme, P. Drouin avait préconisé un traitement en quatre points :

- séparer au plus tôt les sujets sains des sujets malades. Pour cela, partager matériellement le poulailler en deux compartiments de surfaces inégales (la surface la plus grande étant réservée aux sujets mobiles), placer les volailles malades du côté où le botulisme a démarré et charger fortement ces compartiments en litière neuve (au moins 20cm), si possible après avoir épandu de la chaux éteinte ;
- traiter les animaux par l'eau de boisson avec des antibiotiques de la famille des bêta-lactamines (amoxicilline, ampicilline, etc), à dose forte et longtemps : 1,5 à 2 fois la dose recommandée pendant au moins 5 jours ;

D'autres traitements antibiotiques, sur prescription, utilisant de la bacitracine (100 g/t d'aliment) (Page, 1975), des pénicillines (Smart, 1983), de la streptomycine (1g/litre d'eau de boisson) ou de la chlortétracycline (Sato, 1987), peuvent aussi réduire la mortalité ;

- fournir un nouvel aliment pauvre en énergie et riche en cellulose (Sato, 1987), et incorporer du sélénite de sodium et des vitamines A, D₃ et E dans l'eau de boisson ;
- retirer les cadavres au moins trois fois par jour.

Tableau VIII : Prophylaxie hygiénique de l'intoxication et/ou de la toxi-infection botulique(s) (Drouin, 1996)

	Intoxication	Toxi-infection
Ramassage biquotidien des cadavres de volailles		
Pas de cadavres dans les fosses, stockage en congélateur	+	+
Qualité de l'eau de boisson		
Absence de cadavres d'animaux (rongeurs, etc.) dans les réservoirs	+	+
Nettoyage – Désinfection des circuits		+
Acidification		+
Qualité de l'aliment		
Absence de cadavres dans les matières premières	+	+
Qualité bactériologique des matières premières		+
Réduction de la valeur énergétique de l'aliment		+
Lutte contre les mouches et asticots	+	+
Lutte contre les rongeurs		+
Conduite d'élevage		
Ordre et propreté		+
Changement de tenue et chaussures (sas sanitaire)		+
Lutte contre les coups de chaleur : aération, abreuvement, etc.)		+
Bétonnage des entrées et sorties et si possible du sol du poulailler		+
Désinfection de l'élevage : indispensable		
Incinération de la litière sous contrôle des pompiers		+
Nettoyage poussé de l'élevage et de ses abords		+
Prévoir une fosse de récupération des eaux de lavage		+
Utilisation de désinfectants sporicides : eau de Javel, aldéhydes (formol, glutaraldéhyde), iodophores		+

> *Que faire des fumiers et des lisiers de lots de volailles atteints de botulisme ?*

Il faut détruire tous les fumiers ou les lisiers de volailles atteintes de botulisme.

- destruction des fumiers de volailles

Sachant que *Clostridium botulinum*, sous forme de spores, peut survivre pendant des décennies dans le milieu extérieur (Smith *et al.*, 1975 ; Notermans *et al.*, 1981, Wobeser *et al.*, 1987), sachant par ailleurs que le compostage ou l'enfouissement peuvent créer des conditions d'anaérobiose et de basses températures (Böhnel, Lube, 2000), la seule solution économique pour détruire un fumier riche en éléments botuliques reste l'incinération. Cette incinération sera réalisée sous contrôle des pompiers. L'expérience montre qu'elle est plus facile à réaliser tout de suite après le retrait du fumier du poulailler. Il faut éviter un entassement qui rend difficile l'incinération (Drouin, 2000).

- destruction des lisiers des élevages de canards

Le retrait du lisier (pour enfouissement en terre ou acheminement vers une station d'épuration) ne semble envisageable qu'après un traitement dans la fosse de l'élevage avec des bases fortes (soude, chaux) ou de l'aldéhyde formique (ces produits étant les moins onéreux) dans des conditions de concentration et de durée d'action qui restent à déterminer (Drouin, 2000).

4.2 Le botulisme dans la filière bovine

> *Quel est l'historique du botulisme bovin ?*

La maladie a été identifiée chez les herbivores domestiques dans des syndromes de paralysies locomotrices, caractéristiques du botulisme de type C et D, les plus fréquents chez les herbivores, observés depuis très longtemps sous forme enzootique dans divers pays à climat chaud et à élevage extensif.

C'est en Afrique du Sud que le botulisme a été décrit chez les bovins pour la première fois en 1919 par A. Theiler (1920) en élucidant la cause d'une maladie enzootique connue depuis bien longtemps sous le nom boer de "lamsiekte" qui signifie "paralysie". A. Theiler associe le botulisme enzootique chez les bovins à une hypophosphorose ou aphosphorose, état pathologique caractérisé par une carence en phosphore qui s'annonce chez les ruminants par un appétit dépravé : les animaux mangent de préférence des os (ostéophagie) et des débris de cadavres (nécrophagie) qu'ils trouvent dans les pâturages. A défaut ils mangent d'autres objets, creusent le sol et mangent de la terre. Cette aphosphorose des ruminants est liée à une déficience en phosphore du sol entraînant une carence de l'herbe d'autant plus marquée que le climat est chaud et sec. C'est particulièrement dans les pays tropicaux en fin de période sèche, dans une région d'élevage extensif où les bovins vivent en permanence à l'extérieur, que cette association de l'aphosphorose avec le botulisme bovin aigu peut ainsi entretenir et amplifier une enzootie de botulisme aigu. Une telle situation est retrouvée en 1963 en Afrique de l'Ouest (au Sénégal et en Mauritanie) par Calvet H. *et al.* (1965) dans une maladie connue sous le nom peuhl "gniedo" qui signifie "mal des membres".



Photo 4 : Nécrophagie en milieu tropical (Sénégal) liée à l'aphosphorose et son rôle dans l'amplification du botulisme de type C ou D (d'après Calvet *et al.*, 1965)

En Australie la première identification a été faite par H.R. Seddon (1926) dans un syndrome de paralysie bulbaire connu sous le nom de "middland cattle disease". Dans la partie méridionale de l'Amérique du Nord, sur la côte du Texas, elle est reconnue sous le nom familier de "loin disease" ou maladie des reins (Abbitt *et al.*, 1984). Au Brésil le botulisme enzootique des bovins est décrit depuis 1960 (Dobereiner, 1992) sous l'appellation portugaise de "doença da vaca caída", maladie de la vache qui tombe ou l'appellation anglo-saxonne de "stiff foreleg disease", faisant allusion à une faiblesse des membres. Toutes ces appellations vernaculaires marquent l'importance des paralysies flasques qui attirent l'attention des éleveurs.

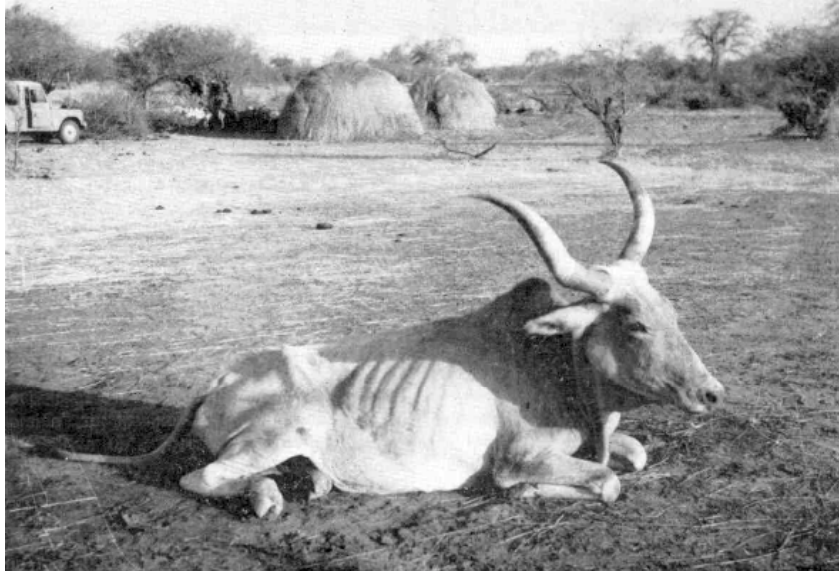


Photo 5 : Bovin atteint de botulisme, en décubitus depuis plus d'une semaine (d'après Calvet *et al.*, 1965)

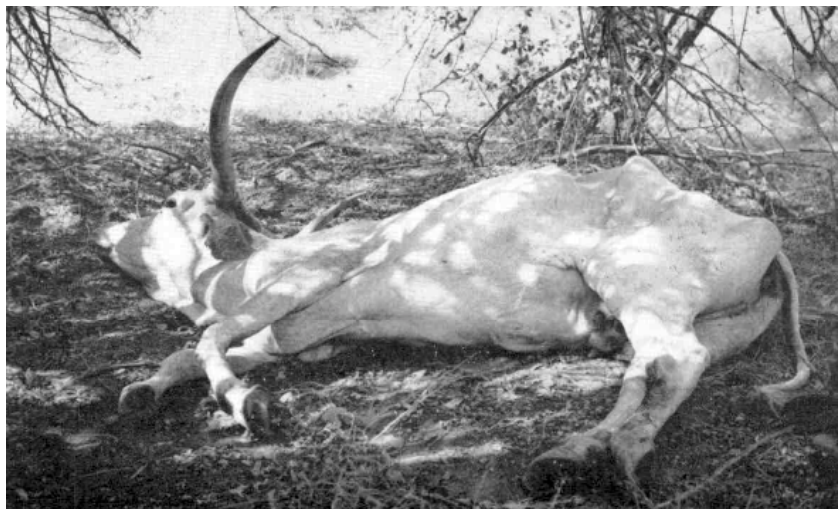


Photo 6 : Bovin atteint du botulisme en phase terminale, décubitus latéral (d'après Calvet *et al.*, 1965)

Dans des régions à climat plus tempéré et où les conditions d'élevage sont intensives, le botulisme bovin intervient de façon plus sporadique. Le botulisme aigu survient sous forme de foyers limités à l'exploitation. Mais à l'intérieur des foyers les pertes par mortalité deviennent rapidement catastrophiques (Abbitt *et al.*, 1984 ; Trueman *et al.*, 1992, Galey *et al.*, 2000, Cobb *et al.*, 2000).

4.2.1 Epidémiologie descriptive

› *Quelle a été, au cours des dernières années, l'évolution du nombre de cas de botulisme bovin en France ?*

La déclaration de cette maladie n'étant pas obligatoire et faute de réseau d'épidémiosurveillance, il n'y a pas de données disponibles au niveau national sur le nombre de cas de botulisme bovin. Depuis les années 1980, le botulisme bovin a été identifié dans plusieurs départements de l'Ouest de la France, probablement en raison de l'importance de l'aviculture, et les pertes enregistrées furent très importantes. Les groupements de défense sanitaire (GDS) se sont mobilisés pour informer les éleveurs et les aider à mettre en œuvre des mesures de prévention. C'est ainsi que nous avons pu obtenir le relevé des cas enregistrés par les groupements de défense sanitaire du département des Côtes d'Armor (FDGDS 22, G. Argenté), d'Ille et Vilaine (FDGDS 35, A. Labrousse), du Finistère (GDS 29, B. Thibert) et de la Manche (GDS 50, J-M. Carbonière) de 1991 à 2000, ainsi que les éléments nécessaires au calcul de l'incidence des foyers au cours de cette période (voir tableaux IX, X, XI et XII).

Les suspicions cliniques sont confirmées par le laboratoire départemental d'analyses qui assure le diagnostic par recherche de la neurotoxine en mettant en œuvre son activité biologique sur la souris. Par contre le typage nécessite d'avoir recours au CNR pour les bactéries anaérobies (Institut Pasteur de Paris).

Les mesures préventives prises dans le département sont d'ordre médical (vaccination dans les foyers) et sanitaire (rappel de tous les moyens de prévention).

Tableau IX : Le botulisme bovin dans le département des Côtes-d'Armor

	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
Nombre de foyers	2	6	8	20	20	12	20	19	10	7
Nombre de cheptels dans le département	13856	13072	12126	11449	10853	10389	9819	9383	9088	8697
Incidence %	0,01	0,04	0,06	0,17	0,18	0,11	0,20	0,20	0,11	0,08
Nombre de bovins morts	13	18	16	56	72	32	68	74	22	23

Tableau X : Le botulisme bovin dans le département d'Ille-et-Vilaine

	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
Nombre de foyers	1	1	2	1	0	0	3	0	0	2
Nombre de cheptels dans le département	15 300	15 203	14 195	13 533	12 822	12 408	11 831	11 302	10 659	10 164
Incidence %	0,007	0,007	0,015	0,008	0	0	0,026	0	0	0,020
Nombre de bovins morts	3	12	22	?	0	0	15	0	0	13 ^(a)

a : signes très évocateurs, mais pour la première fois en Ille-et-Vilaine, la toxine n'a pu être mise en évidence.

Cette remarque est à rapprocher des observations faites en juin 2000 en Grande Bretagne (Cobb et al., 2002) dans un troupeau de 164 vaches laitières dans lequel on a enregistré la perte de 141 vaches laitières. Bien que les animaux atteints présentaient des signes cliniques caractéristiques du botulisme, ni la neurotoxine, ni Clostridium botulinum n'ont pu être détectés chez ces animaux et dans les aliments qu'ils avaient reçus.

Tableau XI : Le botulisme bovin dans le département de la Manche

	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
Nombre de foyers	1	1	1	2	2	0	0	0	0	0
Nombre de cheptels dans le département	20.152	19.337	18.438	17.568	17.279	16.690	16.057	15.183	14.508	13.946
Incidence %	0,005	0,005	0,005	0,011	0,012	0	0	0	0	0
Nombre de bovins morts	2	1	1	12	2	/	/	/	/	/

Tableau XII : Le botulisme bovin dans le département du Finistère

	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
Nombre de foyers	1	2	11	18	20	7	10	10	6	3
Nombre de cheptels dans le département	12.510	11.898	11.309	10.707	9.749	8.950	8.410	8.059	7.484	6.966
Incidence %	0,01	0,02	0,1	0,17	0,21	0,08	0,12	0,12	0,08	0,04
Nombre de bovins morts	1	4	26	36	30	14	35	38	13	3

› *Quelle est la proportion de cas de portage asymptomatique ?*

En l'absence de prélèvement systématique, la fréquence du portage asymptomatique de *Clostridium botulinum* toxinogène est inconnue. Il serait important d'évaluer cette proportion, surtout dans le cas de lots traités ou vaccinés contre le botulisme.

› *Quels sont les principaux toxinotypes rencontrés chez les bovins ?*

Dans l'espèce bovine ce sont les toxinotypes C et D qui sont les plus fréquents, mais on rencontre parfois le toxinotype B, plus rarement le type A.

La première description du botulisme bovin avéré de type C en France remonte au début des années 1950 et fait suite à des manœuvres de dératisation générale de l'exploitation touchée (Prévot *et al.*, 1953). Ces auteurs précisait que le botulisme bovin de type C ressemble cliniquement au botulisme bovin et équin de type D et avaient souligné certaines confusions dans la nomenclature de ces deux toxinotypes en Europe (Prévot *et al.*, 1950) : la variante appelée D en France avant les années 1950 correspondrait au type C sud africain.

Une forme inhabituelle de botulisme de type B ayant frappé une vingtaine de troupeaux bovins a été décrite en 1977-1978 aux Pays-Bas (Haagsma, Ter Laak, 1978 a et b). Les animaux, bovins et éventuellement équidés, ont été contaminés en consommant soit des drêches de brasserie (a), soit de l'ensilage d'herbe (b). La persistance de *Clostridium botulinum* type B dans un élevage a fait l'objet d'une étude approfondie (Notermans *et al.*, 1981).

Beaucoup plus rarement des cas de botulisme bovin de type A ont été identifiés en France au milieu du vingtième siècle par Prévot *et al.* (1950 et 1953).

› *Au sein d'un troupeau atteint, quels sont les taux de morbidité et de létalité ?*

En général l'ensemble d'un troupeau de bovins n'est pas soumis au risque en même temps, mais il s'agit plutôt d'un lot qui est exposé. Dans ce lot, la mortalité varie de 8 à 64%, en fonction du niveau de la

contamination, de la durée d'exposition (donc de la précocité et de la pertinence des mesures sanitaires prises) et, le cas échéant, de la précocité de la vaccination.

Dans un foyer survenu en Grande Bretagne en juin 2000, 141 vaches laitières dans un troupeau de 164 (86%) sont mortes ou ont du être euthanasiées sur une période de 15 jours (Cobb *et al.*, 2002). La soudaineté de l'atteinte des animaux, associée à l'impossibilité de confirmer la suspicion clinique de botulisme (neurotoxine ou *Clostridium botulinum* non détectés chez les animaux ou dans l'aliment), suggère que les animaux ont été exposés très ponctuellement à la contamination. Selon les auteurs, cette contamination a pu même survenir lors d'une seule prise alimentaire, ce qui a rendu possible l'atteinte d'un très grande partie du troupeau en raison de l'utilisation dans l'exploitation d'une remorque mélangeuse pour homogénéiser la ration alimentaire.

› *Existe-t-il des variations saisonnières dans l'incidence du botulisme bovin ?*

Dans l'étude de 18 foyers de botulisme bovin dans les départements du Grand-Ouest de la France (Pellerin, Popoff, Guillet, 1986-1987), une légère prédominance saisonnière semble se dégager pour l'été et l'automne.

Comme Haagsma, Popoff (1989) note qu'après l'apparition des premiers cas de botulisme chez les oiseaux sauvages (Anatidés principalement) aux Pays-Bas au cours de l'été 1970, le nombre de foyers botuliques s'est considérablement accru dans des régions humides au cours des étés chauds de 1975 et 1976, touchant parallèlement les oiseaux sauvages et les animaux domestiques. *Clostridium botulinum* a été retrouvé dans le sol où ont été enregistrés les cas de botulisme dans la faune sauvage. Leur accumulation au sein des substrats organiques (cadavres d'oiseaux) maintenus dans des conditions d'anaérobiose (zones inondées) a créé des conditions favorables pour leur germination et la production de neurotoxine dès que la température s'est élevée. La culture et la toxinogénèse interviennent, pour le type C, à partir d'une température de 20°C.

4.2.2 Modes de contamination des bovins

› *Quelles sont les principales modalités de contamination des bovins ?*

L'existence du botulisme est liée à la présence de la spore de *Clostridium botulinum* et/ou de la toxine provenant de différentes sources virulentes : animaux, déjections, environnement, alimentation et eau.

En pratique il faut distinguer plusieurs voies de contamination qui fondent les bases de la prévention :

- les petits cadavres abandonnés dans la nature par négligence d'un aviculteur ou par accident, par exemple la chute d'une pie dans une tonne à eau, constituent une voie de contamination directe des bovins,
- les mêmes cadavres ignorés ou négligés dans la litière des volailles conduisent à un risque de contamination directe si les bovins ont accès au fumier de volailles qu'ils consomment volontiers,
- l'épandage du fumier de volailles est une source de contamination des bovins lorsqu'il est réalisé sur une parcelle d'herbage destiné aux bovins ou encore lorsqu'il est réalisé au voisinage des bovins (jusqu'à 200 à 300 m) si le fumier est pulvérulent et si l'épandage est réalisé un jour de grand vent. Le fumier, stocké à proximité de pâtures, peut également contenir des cadavres de volailles qui seront disséminés par des prédateurs (renards, pies, corbeaux, etc.) (Tardé, Drouin, Colin, 1998 et 1999).

Clostridium botulinum se retrouve dans les lisiers et les cadavres de volailles. La transmission du botulisme des volailles aux bovins a lieu habituellement à la faveur des épandages des lisiers sur les pâtures. La dissémination des spores par le vent à partir des lisiers desséchés et pulvérulents permet d'expliquer l'apparition de botulisme bovin dans des troupeaux au voisinage d'un foyer aviaire initial (Popoff, 1989 ; Popoff et Argenté, 1996).

4.2.3 Clinique, traitement et prévention

> *Quels sont les critères de suspicion du botulisme chez les bovins ?*

Une suspicion de botulisme chez les bovins est fondée essentiellement sur l'observation d'un syndrome de paralysie flasque évoluant progressivement vers la mort dans un contexte écologique et épidémiologique favorisant l'accès des animaux à des sources de contamination botulique.

> *Quelles sont les différentes formes cliniques du botulisme bovin ?*

Depuis la description de Theiler, on discerne classiquement des formes typiques (suraiguë, aiguë et chronique) ainsi que des formes atypiques.

La période d'incubation est le plus souvent de 2 à 6 jours, mais elle peut varier de quelques heures à plusieurs semaines. Plus elle est brève, plus la maladie est aiguë et plus le pronostic est grave.

Dans la forme suraiguë, l'animal est trouvé mort le matin, alors qu'il était en parfaite santé la veille. Lorsqu'elle est observée, la symptomatologie est très réduite : après une phase où l'animal est trouvé en décubitus latéral et pouvant exécuter des mouvements de pédalage, suit une phase de paralysie et de coma qui précède de peu une mort rapide.

Dans la forme aiguë, on note d'abord des signes non spécifiques qui ne peuvent aider au diagnostic du botulisme lors d'un premier cas dans le troupeau (anorexie, abattement, constipation, dyspnée). Puis s'installent les signes de paralysie bulbaire caractéristiques du syndrome botulique. La paralysie flasque de la langue et des muscles impliqués dans la mastication et la déglutition se traduit par des difficultés de préhension et de mastication des aliments, du mâchonnement à vide, de la gêne à la déglutition. La procidence de la langue paralysée devient très nette. La sécrétion salivaire se tarit, entraînant une sécheresse de la bouche et du mufle. La paralysie glosso-pharyngienne facilite l'examen de la bouche au cours duquel on peut trouver des bouchons de fourrages entre la langue et le palais.



Photo 7 : Bovin atteint de botulisme expérimental : la paralysie bulbaire se manifeste classiquement par la procidence de la langue (Photo P. Belli et J-L. Martel)

Au niveau oculaire, on peut observer un ptôsis (chute des paupières) et une mydriase (dilatation des pupilles).

La tunique abdominale se relâche, le ventre devient pendant, le flanc creux, le rumen plat et dur. On constate l'arrêt de la rumination et on observe souvent de la constipation. La respiration devient courte, de type abdominal.

Au niveau de l'appareil locomoteur une grande faiblesse musculaire s'installe, entraînant une démarche vacillante, puis l'animal finit par chuter et ne peut se relever : le décubitus est d'abord sterno-abdominal et devient latéral en phase terminale.



Photos 8 et 9 : Ces deux photographies de botulisme spontané sur des vaches laitières en France illustrent les deux phases de décubitus. La photographie du haut présente un bovin en décubitus sterno-abdominal, la photographie du bas présente deux bovins, l'un au fond en décubitus sterno-abdominal, l'autre au premier plan, en décubitus latéral. (Photos G. Argenté).

L'évolution est complète en 2 à 3 jours et aboutit presque toujours à la mort de l'animal par asphyxie due à la paralysie respiratoire.

L'absence de fièvre, ainsi que la conservation des réflexes et de la sensibilité cutanée constituent, au milieu d'un syndrome de paralysie flasque, des signes précieux pour le diagnostic différentiel.

La forme subaiguë est aussi caractérisée par un syndrome de paralysie bulbaire mais légèrement atténué. Les paralysies flasques de la langue sont les premiers stades de la maladie.

L'atteinte de l'appareil locomoteur débute en général au niveau des membres postérieurs et suit une progression ascendante aboutissant inéluctablement à la chute et au décubitus permanent.



Photo 10 : Petit ruminant illustrant la paralysie des membres postérieurs (Photo d'après Calvet *et al.*, 1965)

L'évolution vers la mort est complète en 3 à 8 jours.

La guérison est possible mais la convalescence est très longue : elle peut demander plusieurs semaines à quelques mois. La mydriase, constante, peut subsister pendant une semaine : sa disparition constitue un bon signe pronostique.

Des auteurs allemands viennent de décrire pour la première fois (Böhnel *et al.* 2001) une forme chronique de botulisme dont les interactions sur la physiologie digestive des animaux atteints sont complexes mais importantes et conduisent les auteurs à individualiser ce syndrome frustré, pouvant prêter confusion avec une fièvre de lait atypique, comme une nouvelle maladie et à proposer le nom de "botulisme viscéral".

Selon le toxinotype et/ou la souche en cause, des particularités peuvent apparaître et perturber le tableau clinique classique. Popoff (1989) signale une forme inhabituelle de botulisme chez les bovins et les équidés observée avec le type B, ayant frappé une vingtaine de troupeaux bovins en 1977-1978 aux Pays-Bas. Le tableau clinique était dominé par de l'anorexie, une déshydratation, une hypersalivation et une régurgitation des liquides alors que les paralysies locomotrices, caractéristiques du botulisme C et D, n'étaient pas observées.

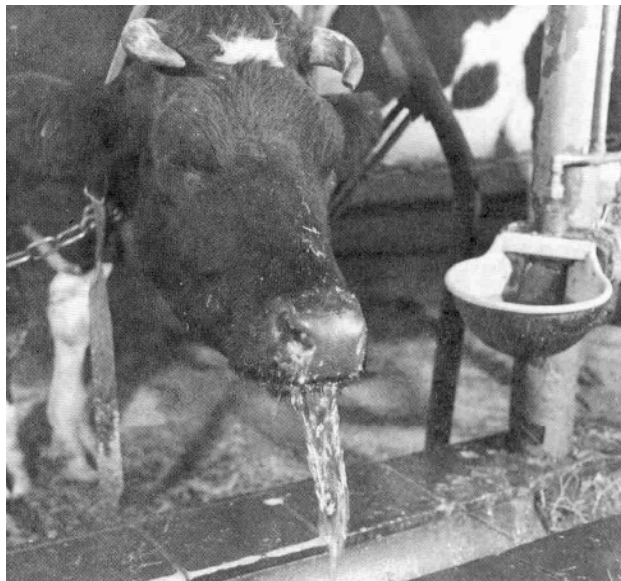


Photo 11 : Paralysie bulbaire entraînant une régurgitation des liquides. Dans ce cas de botulisme de type B survenu après consommation de drèches de brasserie contaminées, cette vache atteinte au niveau bulbaire, reste debout (d'après Haagsma, Ter Laak, 1978).

Dans un mémoire consacré aux problèmes rencontrés dans le diagnostic du botulisme, Prévot et Brygoo (1953) retiennent la production, par certaines souches de type C et D, de poisons multiples, extrêmement différents, dont l'activité biologique se surajoute à celle de la neurotoxine paralysante. Ils détectent notamment une substance convulsivante qui peut se trouver dans des cultures fraîches de certaines souches de type D et qui perturbe la séroneutralisation. Cette substance convulsivante tue rapidement les cobayes qui reçoivent le surnageant de culture contenant le mélange, normalement neutralisé, de neurotoxine et d'antitoxine homologue. Chambron *et al.* (1971) ont été confrontés à ce type de difficulté lors du premier isolement de *Clostridium botulinum* type D au Sénégal. Chez les animaux malades, elle provoque des symptômes supplémentaires qui troublent le tableau classique de paralysies flasques : agitation, excitation nerveuse et musculaire et, chez les animaux en décubitus, des mouvements de pédalage.

Par ailleurs, les souches de type C et D produisent une entérotoxine C2 qui est élaborée au cours de la sporulation et présente une activité entérohémorragique. Elle serait responsable des lésions hémorragiques et de nécrose intestinale similaires à celles observées dans les cas d'entérotoxémie et constituerait un argument lésionnel pour la toxi-infection dans le botulisme C et D chez les herbivores.

› *Quelles sont les lésions anatomopathologiques du botulisme chez les bovins ?*

Les lésions, nullement spécifiques, sont peu marquées en général. Lors d'intoxication pure les intestins sont vides de tout résidu alimentaire et la muqueuse intestinale est recouverte d'un mucus laiteux pouvant être coloré en jaune en particulier au niveau du duodénum. Lors de toxi-infection, on peut observer des phénomènes congestifs ou hémorragiques semblables à ceux rencontrés lors d'entérotoxémie, avec des foyers de nécrose intestinale, souvent localisés à une portion du jéjunum. Ces lésions ne sont pas dues à la neurotoxine botulique mais à l'action de la toxine C2 produite par les souches de type C et D.

› *Comment confirmer une suspicion clinique ?*

Seul le laboratoire apporte un diagnostic de certitude par la mise en évidence et éventuellement l'identification de la toxine. Il peut être complété en cas de toxi-infection par l'isolement et l'identification de la bactérie. De plus, la recherche de la toxine et / ou de la bactérie peut être effectuée à partir d'échantillon d'aliments consommés par les animaux et / ou d'échantillons prélevés dans l'environnement immédiat des animaux.

La toxine botulique est retrouvée régulièrement dans le contenu intestinal des bovins en début de maladie (apparition des symptômes inférieure à 5 jours), par un test d'activité biologique sur souris qui reste la méthode la plus sensible (Dohms, 1997 ; Popoff, 1999). Des résultats faussement négatifs peuvent intervenir parce que la quantité de toxine est inférieure au seuil de sensibilité de la méthode d'autant plus que la distribution de la neurotoxine peut être très hétérogène dans l'organisme. Ainsi Popoff (1989), sur 124 bovins suspects n'a obtenu que 30% de réponses positives. Cette recherche effectuée à partir de prélèvements sanguins ou d'autres organes se révèle très aléatoire chez les bovins. Les prélèvements sur des cadavres putréfiés peuvent conduire à des erreurs par excès.

L'isolement et l'identification de *Clostridium botulinum* doivent être réalisés à partir du contenu intestinal hémorragique, des matières fécales et du foie (animaux euthanasiés ou morts depuis moins de 6 heures).

› *Dans quel contexte épidémiologique survient le botulisme bovin en France ?*

Depuis 1979 le botulisme bovin de type D est régulièrement associé au botulisme aviaire dans le Grand-Ouest de la France. Popoff *et al.* (1984) ont identifié des foyers en Bretagne et dans les départements limitrophes. Une étude de J-L. Pellerin *et al.*, publiée en 1986 / 1987 recense 18 foyers de botulisme bovin, portant sur 185 animaux malades dans les départements 50, 53 et 56. La toxinotypie a été mise en œuvre dans 8 foyers qui s'avèrent tous du type D. L'importance du rôle de la volaille est discutée dans l'étude de Popoff *et al.* (1986) après l'analyse épidémiologique de 3 foyers bovins de type D survenus dans la Manche et où les pertes s'élèvent à 35 bovins. La question du rôle

de la volaille est également abordée dans l'étude de Tardé, Drouin et Colin, réalisée en 1998 en Vendée, département où se côtoient productions avicoles et bovines.

Les oiseaux en général, et la poule plus particulièrement, s'accommodent souvent très bien de la présence de *Clostridium botulinum* dans le tube digestif et ils deviennent des réservoirs et des agents disséminateurs de bactéries dangereux pour les autres espèces animales, notamment pour les bovins, au travers d'une exposition d'origine environnementale, notamment à l'occasion de l'épandage des fumiers et fientes sur les pâturages (Popoff, 1989).

› *Quelle est la part des toxi-infections et des intoxications chez les bovins ?*

Chez les bovins la toxi-infection prédomine. Les lésions d'entérite hémorragique et nécrotique fréquemment observées dans le jéjunum, seraient dues à la sécrétion *in situ* de l'entérotoxine C2 plaidant en faveur d'une toxi-infection.

La plupart des auteurs s'accordent aujourd'hui à penser que l'intoxication pure, dans laquelle la toxine est préformée dans le fourrage (cas du "forage poisoning" par exemple), est exceptionnelle chez les bovins.

› *Quelles sont les indications et les modalités de la vaccination chez les bovins ?*

Le recours à la vaccination est indiqué dès que la suspicion clinique de botulisme est portée dans le troupeau. La mortalité observée au sein du troupeau cesse une dizaine de jours après la vaccination.

Actuellement aucun vaccin ne bénéficie d'une autorisation de mise sur le marché en France. L'autorisation temporaire d'utilisation (A.T.U.) d'un vaccin fabriqué à Onderstepoort (Afrique du Sud), délivrée jusqu'en 2001, n'a pas été reconduite au cours de l'année 2002.

› *Quelles sont les mesures de prévention chez les bovins ?*

Elles sont de deux ordres : des mesures sanitaires visant à mettre les bovins à l'abri des sources de contamination et des mesures médicales de vaccination visant à prémunir les bovins des risques d'expression clinique de la maladie.

Les mesures d'ordre sanitaire ont pour objet principal d'éviter que les aliments et l'eau destinés aux bovins soient pollués soit par des cadavres de petits animaux (volailles, chats, petits rongeurs) ou des matières fécales d'animaux infectés, soit par un défaut dans la conservation des aliments végétaux humides sous forme d'ensilage. A titre d'exemple, on peut citer les mesures prises par la Fédération départementale des groupements de défense sanitaire des animaux des Côtes d'Armor (FGDS22). Cet organisme a édité une vidéocassette en vue de la sensibilisation des aviculteurs aux risques sanitaires liés aux cadavres de volailles. Elle conseille de récolter régulièrement les cadavres et de les stocker dans un congélateur de façon à les conserver dans des conditions hygiéniques en attendant la collecte par l'entreprise d'équarrissage. Pour cela des campagnes d'achats groupés de congélateurs sont organisées par la section avicole de la FGDS22.

De même, les mesures indiquées par M. Popoff (1989) en vue de diminuer l'exposition des volailles à la contamination digestive par des spores de *Clostridium botulinum* permettent par voie de conséquence de réduire l'exposition des bovins.

La vaccination systématique des bovins dans les zones d'enzootie est possible grâce à la mise au point d'anatoxine efficace. Elle a été instaurée avec succès en Afrique du Sud au moyen d'une anatoxine bivalente dès le milieu du vingtième siècle, alors que 50 000 bovins mourraient chaque année de botulisme C ou D (Sterne et Wentzel, 1950). Elle a été utilisée en France, en cas d'urgence, dans les foyers dès qu'une suspicion clinique était fondée.

4.3 Le botulisme chez les oiseaux sauvages

4.3.1 Epidémiologie descriptive

› *Comment est organisée la surveillance du botulisme de la faune sauvage en France ?*

Créé en 1986 par l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage (ONCFS) pour remplacer l'enquête sur la mortalité anormale du gibier initiée en 1972, le réseau SAGIR est un système de surveillance sanitaire de la faune sauvage nationale qui vise particulièrement les maladies qu'elle peut contracter à partir de la faune domestique et réciproquement. Son premier objectif est de mettre en évidence les principales causes de mortalité de la faune sauvage afin de pouvoir proposer des mesures pour les éliminer ou pour réduire leur impact (aménagement du terrain, gestion des populations, recherche). A terme, le réseau SAGIR débouchera sur une meilleure connaissance de la pathologie de la faune sauvage et de son impact sur la dynamique des populations.

Le réseau SAGIR est basé sur un partenariat entre l'ONCFS, l'Afssa Nancy, le Laboratoire de Toxicologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon (ENVL), les Laboratoires Vétérinaires Départementaux (LVD) et les Fédérations Départementales de chasseurs (FDC).

En règle générale, ce sont les chasseurs ou les gardes nationaux de la chasse et de la faune sauvage qui signalent les mortalités anormales constatées sur le terrain. Dans chaque département, un correspondant SAGIR, nommé par le Directeur de l'ONCFS, est chargé de centraliser les prélèvements et de les amener au LVD. Chaque prélèvement est identifié et accompagné par une fiche SAGIR pré-numérotée. Le LVD effectue les analyses nécessaires pour déterminer la (ou les) cause(s) de la mort (autopsie, bactériologie, parasitologie) et en communique les résultats au correspondant et à l'Afssa Nancy, laboratoire responsable de la centralisation de toutes les données relatives à la pathologie de la faune sauvage.

En cas de mortalités massives, le correspondant SAGIR prévient immédiatement l'Unité "Suivi sanitaire de la faune" (USSF) à l'ONCFS qui prend alors les mesures complémentaires appropriées.

› *Quelle a été au cours des dernières années l'évolution du nombre de cas de botulisme des espèces sauvages en France ?*

La première confirmation au laboratoire de l'existence de la maladie en France a été faite en 1984 suite à une mortalité massive observée sur les oiseaux d'eau d'un des bassins du Bois de Boulogne. Cependant, la présence de foyers de botulisme touchant la faune sauvage semble relativement ancienne puisque cette maladie aurait été régulièrement impliquée dans des épisodes de mortalité massive de canards colverts en Sologne depuis 1977 et aurait déjà sévi sur le lac de Grand-Lieu (44) en 1976 (Lett, 1988 ; Marion, 1996).

Les informations relatives à des épizooties de botulisme hydrique sur le territoire français sont peu nombreuses jusqu'en 1993 ; si l'on excepte la Sologne, une vingtaine de foyers distribués sur 14 départements sont recensés jusqu'à cette date.

Depuis 1994, date de réactivation du réseau (SAGIR), les informations sur les foyers de botulisme dans la faune sauvage se sont multipliées. Il est cependant difficile d'analyser cette augmentation et notamment d'apprécier la part due à l'accroissement de la pression d'observation et celle imputable à la progression réelle de la maladie.

La carte de l'annexe 1 met en évidence l'existence de départements concernés régulièrement par le botulisme.

Les cartes figurant en annexe 2 montrent une extension apparente du territoire concerné par la maladie et une variation inter annuelle du nombre de foyers recensés.

La mortalité induite par un épisode de botulisme, difficile à évaluer précisément en raison du nombre de cadavres qui restent inaccessibles, peut être très élevée ; on estime ainsi que le foyer de botulisme C du lac de Grand-Lieu (44) en 1995 a causé la mort de plus de 30 000 oiseaux et que les foyers de botulisme E de la baie de Canche (62), en février et novembre 1996, ont tué plus de 16 000 goélands et mouettes.

› *Quelle est la proportion de cas de portage asymptomatique ?*

Il est difficile de définir la proportion des cas de portage asymptomatique. Toutefois, il paraît assez important. Il semble établi que *Clostridium botulinum* de type C est un parasite obligatoire des oiseaux ainsi que d'autres animaux puisqu'il a été identifié à maintes reprises dans le contenu intestinal de plusieurs espèces animales aquatiques vertébrées et invertébrées. Par ailleurs, il n'est pas rare d'observer des oiseaux porteurs asymptomatiques dans les sites où le botulisme hydrique est fréquent ; 50 % des oiseaux sains fréquentant un site contaminé hébergeraient ainsi des spores botuliques (Reed, Rocke, 1992).

› *Quels sont les principaux toxinotypes rencontrés chez les espèces sauvages ?*

Trois toxinotypes ont été identifiés dans la faune sauvage à l'occasion des épisodes de botulisme recensés par le réseau SAGIR. Le plus fréquemment mis en évidence est le type C que l'on retrouve notamment chez les oiseaux d'eau et secondairement, les ragondins et les poissons lors des épisodes estivaux. Le type E (botulisme "pisciaire") a été isolé chez les Laridés (mouettes et goélands) de la baie de Canche (62) lors des foyers hivernaux de février et novembre 1996. Du botulisme de type D a pu être décelé dans les foyers de type C ; il est cependant difficile de dire s'il s'agit de vrai type D ou si ce résultat est dû au manque de spécificité de la méthode d'analyse.

4.3.2 Modes de contamination des espèces sauvages

› *Quelles sont les principales modalités de contamination des espèces sauvages ?*

Pour le botulisme de type C, les oiseaux se contaminent généralement en ingérant des invertébrés qui hébergent la toxine botulique (cf. supra). Les asticots, se nourrissant sur les cadavres, sont ceux qui concentrent le plus la toxine (Duncan et Jensen, 1976 ; Hubalek et Halouzka, 1991) ; ceci explique que les canards de surface comme les colverts, les souchets et les foulques qui consomment ces asticots sont plus touchés par le botulisme hydrique que les canards plongeurs comme le morillon ou le milouin qui vont chercher leur nourriture en profondeur. D'autres espèces d'invertébrés comme les écrevisses peuvent aussi constituer une source de toxine. Les plantes aquatiques, les particules de vase ou l'eau pourraient également jouer un rôle dans la contamination, mais plus rarement.

La consommation de poissons, de déchets pisciaires ou de coquillages constitue la principale source de contamination pour le botulisme de type E (Dolman, 1957).

Bien que les *Clostridium botulinum* toxinogènes soient largement distribués dans l'environnement, les épizooties de botulisme sont relativement peu fréquentes chez la faune sauvage ; l'apparition d'un foyer nécessite en effet la conjonction de plusieurs conditions environnementales favorables déjà évoquées lors de l'étude du diagnostic de la maladie.

4.3.3 Clinique, traitement et prévention

› *Quand et comment suspecter le botulisme dans les espèces sauvages ?*

En France, ce sont surtout les oiseaux d'eau qui sont victimes du botulisme, à tel point qu'on parle parfois de "botulisme hydrique". Les familles les plus touchées sont les Anatidés (canards, notamment colvert, et oies) et les Laridés (mouettes et goélands)¹. Chez ces espèces, on peut suspecter le

¹ On a pu cependant observer dans certains foyers de botulisme, des cas de mortalité affectant des mammifères, principalement des ragondins (Marion, 1996).

botulisme dès lors que l'on est confronté à une mortalité massive affectant des oiseaux partageant le même plan d'eau, soit en été (botulisme de type C), soit en hiver (botulisme de type E).

Contrairement à ce qui se passe pour les autres maladies de la faune sauvage pour lesquelles la découverte d'un cadavre est souvent le seul signe de passage, la durée et l'ampleur des épisodes de botulisme permettent parfois d'observer des symptômes traduisant divers stades du processus pathologique. On peut ainsi noter : une réduction, voire une absence de la distance de fuite liée à des difficultés d'envol ou de locomotion, un port des ailes anormal (ailes "en toit"), des difficultés à maintenir le cou droit conduisant à des noyades, des difficultés respiratoires, une proclivité du corps clignotant, des diarrhées verdâtres, etc. (Locke et Friend, 1987).

En l'absence de symptôme, les conditions écologiques peuvent aiguiller le diagnostic. Une température élevée de l'eau (Locke et Friend, 1987 ; Rocke, 1993), et surtout de l'interface eau-sédiments (Lamarque, 1995), une pollution (Rocke et Samuel, 1991) et/ou l'eutrophisation du plan d'eau ou encore une baisse récente du niveau de celui-ci (Haagsma, 1991), sont autant de facteurs qui peuvent, en présence d'une mortalité massive, faire penser au botulisme de type C (Jubilo, 1998).

› *Comment confirmer une suspicion clinique ?*

Les symptômes et les contextes écologique et épidémiologique décrits précédemment sont très évocateurs du botulisme pour une personne qui a déjà été confrontée à un épisode de cette maladie. La coexistence de signes cliniques et d'éléments épidémiologiques pathognomoniques équivaut alors à une quasi-certitude quant à l'origine de la mortalité observée (Jubilo, 1998). Une confirmation par la mise en évidence de la toxine et/ou de la bactérie sur quelques individus permet toutefois d'éliminer d'autres causes de mortalité provoquant des symptômes voisins comme l'intoxication par l'alphachloralose et de lever les derniers doutes.

Compte tenu de la taille des oiseaux concernés, le prélèvement de choix reste l'animal entier. Si la collecte et l'acheminement du cadavre ne sont pas possibles, le foie accompagné éventuellement des anses intestinales prélevées au niveau du duodénum ou du jéjunum peuvent convenir. Il est à noter que les prélèvements réalisés sur des cadavres donnent plus souvent des résultats décevants que ceux qui proviennent d'individus malades euthanasiés (Jubilo, 1998).

Des prélèvements de sédiments et d'eau, d'invertébrés ou de végétaux aquatiques peuvent également être effectués, notamment lorsque des cadavres d'oiseau de bonne qualité ne sont pas ou plus disponibles. La mise en évidence de toxine botulique dans ces éléments peut alors permettre de rattacher un épisode de mortalité massive au botulisme.

› *Quelle est la part des toxi-infections et des intoxications chez les espèces sauvages ?*

Chez la faune sauvage, le botulisme aviaire est dû généralement à une intoxication. Il résulte de l'ingestion de toxine botulique préformée notamment à l'occasion de la consommation d'invertébrés comme les asticots. Il est cependant théoriquement possible d'observer des toxi-infections chez les oiseaux sauvages. *Clostridium botulinum* pourrait en effet se multiplier dans le tractus digestif et effectuer *in situ* une toxinogénèse suffisamment intense pour tuer l'animal (Hariharan et Mitchell, 1977 ; Fach *et al.*, 1996).

› *Quelles sont les indications et les modalités de la vaccination de certaines espèces sauvages ?*

Lorsqu'un site d'élevage d'animaux destinés à être relâchés dans la nature est fortement contaminé et, par la suite, régulièrement touché par le botulisme hydrique, la vaccination des oiseaux constitue la meilleure prévention à l'égard de la maladie. En raison de la très forte activité spécifique de la toxine, les doses immunisantes ne peuvent être atteintes avec des toxines natives (H et M 77). Ceci explique que les oiseaux convalescents ne présentent pas d'immunité acquise (Hariharan et Mitchell, 1977).

Des données américaines indiquent qu'au cours d'un épisode de botulisme le taux de mortalité était de 4,7 % pour les oiseaux vaccinés contre 17 % pour les non vaccinés (Jubilo, 1998). En milieu naturel, la

vaccination des oiseaux sauvages s'avère irréalisable. En revanche, la vaccination des canards destinés aux lâchers peut être d'un grand secours. Elle permet non seulement de réduire les pertes économiques, mais aussi, dans une certaine mesure de protéger les oiseaux sauvages en diminuant le nombre de cadavres en cas de crise (Jubilo et Lamarque, 1999 a). Ainsi, en Sologne, le botulisme a complètement disparu sur les étangs où les canards lâchés sont régulièrement vaccinés (Goupille *et al.*, 1988).

En France, on peut trouver deux vaccins importés : l'un est dirigé uniquement contre la toxine de type C, l'autre est actif sur les toxines C et D. Ces deux vaccins, commercialisés pour le vison d'élevage, ne possèdent pas d'autorisation de mise sur le marché pour les oiseaux. Le protocole vaccinal comprend une primo-vaccination avec deux injections à trois semaines d'intervalle. L'immunité conférée par la vaccination aurait une durée minimale comprise entre 8 et 10 mois (Rosen, 1971).

> *Quelles sont les autres mesures préventives mises en œuvres pour limiter le botulisme des oiseaux sauvages ?*

En milieu naturel, compte tenu de la difficulté de mise en œuvre de la vaccination signalée précédemment, la maîtrise du botulisme passe par des actions sur le plan d'eau comme : le maintien d'une hauteur d'eau minimale ou l'assèchement régulier, la modification de la topographie, le curage des sédiments, le faucardage des berges (Locke et Friend, 1987 ; Rosen, 1971; Jubilo, 1998) ou sur les populations animales : retrait des cadavres, effarouchement des oiseaux, maintien des prédateurs, gestion cynégétique raisonnée, surveillance sanitaire soutenue (Reed et Rocke, 1992 ; Cliplef et Wobeser, 1993 ; Wobeser, 1997 ; Jubilo et Lamarque, 1999 b).