

DEVELOPPEMENT D'UN MODELE EXPERIMENTAL DE BOTULISME
AVIAIRE :
OPTIMISATION DES PARAMETRES POUR FAVORISER LA COLONISATION
CAECALE PAR *CLOSTRIDIUM BOTULINUM*

**Sandra Rouxel¹, Typhaine Poezevara¹, Martine Thomas-Hénaff², Michel Amelot³,
Amandine Avouac¹, Jean-Guy Rolland³, Chantal Benoit², Pierre Le Bihannic², Thierry
Le Coq³, Hervé Jaunet⁴, Alassane Keita³, Anne Le Roux⁴, Eric Pagot⁴, Béatrice
Grasland², Marianne Chemaly¹, Jean-Michel Répérant², Caroline Le Maréchal¹**

¹ ANSES, Laboratoire de Ploufragan - Plouzané - Niort, Unité Hygiène et qualité des produits
avicoles et porcins, 22440 Ploufragan, France

² ANSES, Laboratoire de Ploufragan - Plouzané - Niort, Unité Virologie Immunologie
Parasitologie aviaires et cunicoles, 22440 Ploufragan, France

³ ANSES, Laboratoire de Ploufragan - Plouzané - Niort, SELEAC, 22440 Ploufragan, France

⁴ INNOZH 22440 Ploufragan, France

caroline.lemarechal@anses.fr

RÉSUMÉ

Le botulisme se manifeste par une paralysie flasque causée par l'action des toxines botuliques produites par des bactéries du genre *Clostridium*. La pathogénèse du botulisme aviaire est encore méconnue et aucun modèle expérimental de reproduction du botulisme aviaire n'est aujourd'hui disponible en France. Sur la base de quelques études de la littérature, il est admis que la colonisation caecale par *Clostridium botulinum* est un prérequis à l'apparition des signes cliniques chez les volailles. L'objectif de notre étude était d'identifier les conditions expérimentales jouant un rôle sur l'implantation de *C. botulinum* dans les caeca des volailles. Six essais ont été réalisés en animalerie pour évaluer le rôle des modalités de préparation de l'inoculum, de la dose infectieuse, de la co-infection avec différentes doses de coccidies, de l'application d'un traitement antibiotique des animaux, des conditions d'élevage et de l'effet souche.

Malgré une variabilité dans les résultats, ces essais ont permis d'identifier des paramètres influençant l'implantation de la souche de *C. botulinum* comme par exemple la préparation de l'inoculum, l'inoculation devant être réalisée avec une culture et non une suspension de spores. Au contraire, l'application d'un traitement antibiotique en amont de l'inoculation ou la co-infection avec des coccidies à localisation caecale ne semble pas favoriser l'implantation de la bactérie. Les résultats ne montrent pas non plus d'impact des conditions d'élevage sur l'implantation de *C. botulinum* et un effet « souche » a été noté au cours d'un essai mais reste à confirmer.

ABSTRACT

Development of an experimental model of avian botulism: Optimization of parameters to promote cecal colonization by *Clostridium botulinum*.

Botulism is characterized by a flaccid paralysis due to the action of botulinum neurotoxins produced by Clostridia. Pathogenesis of avian botulism is not totally understood and no experimental model is currently available in France to reproduce the disease. Based on a few papers available in the scientific literature, it is considered that cecal colonization by *C. botulinum* is required to get clinical signs in poultry. The objective of our study was to identify the experimental conditions that play a role in the colonization of avian caeca by *C. botulinum*. Six trials were carried out to evaluate the role of inoculum preparation, infectious dose, co-infection with different doses of coccidia, antibiotic treatment of the animals, rearing conditions and avian strain effect.

Despite variability in the results, these trials highlighted parameters influencing the implantation of the *C. botulinum* strain, such as inoculum preparation: inoculation should be carried out with a culture rather than a spore suspension. On the other hand, antibiotic treatment prior to inoculation or co-infection with caecal coccidia does not appear to promote implantation of the bacterium. Results also show no impact of rearing conditions on *C. botulinum* implantation, and a "strain" effect was noted in one trial but remains to be confirmed.

INTRODUCTION

Le botulisme est une maladie neurologique qui concerne à la fois l'homme et les animaux. Le botulisme est dû à l'action des toxines botuliques produites par des bactéries du genre *Clostridium* et se manifeste par une paralysie flasque.

Le botulisme animal en France concerne essentiellement les oiseaux (sauvages et domestiques) et les bovins. Chez les oiseaux, les types toxiques en cause sont C, D, mosaïques C/D et D/C et exceptionnellement le type E. Au niveau national, 30 foyers en volailles et 20 cas en avifaune sont confirmés en moyenne chaque année (Le Bouquin et al. 2022). Une sous-estimation est probable, quelle que soit l'espèce animale envisagée.

Bien que le botulisme soit rapporté et décrit depuis longtemps dans la littérature scientifique, sa pathogénèse est encore mal connue. Il n'existe pas actuellement de modèle expérimental de reproduction de la maladie. Seuls quatre articles disponibles dans la littérature présentent des résultats obtenus via des essais expérimentaux (Hyun and Sakaguchi 1989, Okamoto et al. 1999, Miyazaki and Sakaguchi 1978, Kurazono, Shimozawa, and Sakaguchi 1988). Sur la base des quatre articles, il a été retenu que la présence dans les caeca est indispensable à l'observation des signes cliniques chez les volailles, que la colonisation des caeca et la production *in situ* de la toxine sont nécessaires à l'observation des signes cliniques et que l'accès aux fientes est indispensable.

La colonisation caecale étant rapportée comme indispensable pour l'obtention de signes cliniques, une première étude a été mise en place afin de déterminer les conditions permettant l'implantation de la bactérie au niveau des caeca en vue de développer à terme un modèle expérimental de botulisme aviaire.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Préparation des inocula de la souche non toxique de *C. botulinum*

La souche N17LNRB01 est une souche non toxique qui a été isolée à partir d'un foie de canard positif pour *C. botulinum* de type C/D. Cette souche appartient au groupe *C. novyi sensu lato* (Skarin and Segerman 2014) (lignée IV sur la base de l'analyse génomique de la souche) qui comprend les espèces *C. botulinum* de type C, D, C/D, D/C, *C. haemolyticum* et *C. novyi*. La souche N17LNRB01 est utilisée comme modèle non toxique de *C. botulinum* de type C, D, C/D, D/C. La première étape du processus infectieux étant l'implantation dans les caeca, il a été choisi de travailler dans un premier temps avec une souche non toxique.

Les spores ont été préparées selon le mode opératoire décrit par Hyun et al. 1989 (Hyun and Sakaguchi 1989).

Les cultures ont été préparées à partir de 3 repiquages successifs du lot de spores préparé tel que décrit ci-dessus en bouillon Tryptone Peptone Glucose Yeast (TPGY) (Skarin et al. 2010). L'inoculum correspond au dernier repiquage avec une incubation de 18h en conditions anaérobies.

Le dénombrement des spores ou de la culture a été réalisé par une méthode NPP-PCR. Il n'existe pas en effet de milieu permettant de faire un dénombrement classique sur milieu gélosé. Brièvement, la suspension à dénombrer est diluée en bouillon TPGY selon des dilutions sériées de base 10 en triplicat. Une extraction d'ADN est réalisée pour chaque dilution et la détection d'un gène caractéristique situé sur le chromosome se fait par PCR en temps réel (Woudstra et al. 2015). Le nombre de bactéries est ensuite déduit via un outil statistique (MPN Calculator). Les animaux ont été inoculés avec 5×10^6 NPP (Nombre le Plus Probable) spores ou environ 10^6 NPP bactéries via la culture.

1.2. Préparation des inocula de coccidies

La souche PT5 d'*Eimeria tenella* a été obtenue en 1965 dans un élevage breton et elle est depuis entretenue par inoculation orale d'oocystes sporulés à des poulets deux fois par an. Les oocystes obtenus après chaque remultiplication sont extraits des matières fécales par tamisage puis flottation en eau saturée en chlorure de sodium. Ils sont ensuite placés sur gélose agar agar à 28°C en présence de bichromate de potassium pendant de 2 à 3 jours afin qu'ils sporulent. Le pourcentage de sporulation est estimé, la concentration évaluée et les oocystes sont conservés à +4°C en solution de bichromate de potassium à 2% jusqu'à utilisation. Pour chacun des essais, la dernière remultiplication datait de moins de six mois. L'inoculum a été préparé à partir de la suspension d'oocystes en ajustant et vérifiant la concentration avec une cellule de Neubauer.

1.3. Essais expérimentaux

1.3.1. Comité d'éthique

Une saisine a été déposée au niveau du comité d'éthique (N° de saisine Cometh : APAFIS 2019100710109909 19-060 #22299) pour ce projet. Un avis favorable du comité a été émis le 28/11/2019, l'autorisation du ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation a été délivrée le 07/01/2020.

1.3.2 Présentation des essais.

Six essais expérimentaux ont été mis en œuvre dans le cadre de cette étude (Tableau 1). Il a été choisi de travailler dans cette étude sur un modèle poulet, plus adapté que d'autres modèles aviaires aux conditions rencontrées dans le cadre des essais expérimentaux, telles que les conditions d'hébergement.

Les 5 premiers essais ont été réalisés en cage (1,125 m²) avec des mâles (ISA Brown) en provenance d'un couvoir et le dernier essai sur litière avec deux

souches de poulets : des mâles (ISA Brown) en provenance d'un couvoir et des poulets mâles et femelles Leghorn EOPS élevés dans les animaleries du laboratoire de Ploufragan. Les animaux ont été mis en place à 10 jours d'âge dans les cages et 1 jour d'âge pour les essais sur litière. Des cartons ont été placés sur les deux tiers des surfaces des cages pour favoriser l'exposition des animaux aux fientes. Le nombre d'animaux était compris entre 10 et 20 selon les essais. Les modalités testées sont décrites dans le tableau 1.

1.4. Détection de la souche N17LNRB01 dans les caeca

A 7 jours et/ou 14 jours post-inoculation, les caeca des animaux ont été collectés (les contenus et tissus ont été séparés lors du prélèvement) et congelés avant mise en analyse. Les tissus et le contenu caecal ont été dilués séparément au dixième en TPGY puis incubés pendant 18h en conditions anaérobies à 37°C.

Une extraction d'ADN a ensuite été réalisée à partir de 1 ml de chaque enrichissement avec le kit commercial QiaAmp DNA Mini-kit (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. La détection de la bactérie a été faite ensuite par PCR en temps réel en ciblant le gène 50S ribosomal protein L10 (Woudstra et al. 2015). Un résultat a été considéré comme « détecté » dès lors qu'un signal PCR a été obtenu lors de l'analyse des tissus et/ou contenu caecal provenant d'un même animal.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Comparaison du mode de préparation de l'inoculum de la souche N17LNRB01

Les résultats du premier essai (Figure 1) montrent que l'implantation de la souche N17LNRB01 au niveau des caeca a été plus efficace lorsque la souche est inoculée sous forme de culture que sous forme de spores. Dans les 4 conditions testées, le nombre d'animaux colonisés était systématiquement plus élevé dans les lots inoculés par la culture que dans les lots inoculés par les spores.

Un autre essai (Tableau 1, essai 4) a été mis en œuvre pour évaluer la dose de culture à inoculer. Deux lots de 10 animaux ont été inoculés par la culture non diluée et deux autres par la culture diluée au centième. Les résultats montrent une colonisation de 9 animaux sur 10 dans les deux lots inoculés par la culture non diluée et seulement 4 et 0 animaux dans les deux lots inoculés avec la culture diluée au centième. La suite des essais a donc été réalisée par inoculation des animaux par une culture non diluée.

2.2. Intérêt de l'application d'un traitement antibiotique en amont de l'inoculation

Les traitements antibiotiques peuvent entraîner une dysbiose et potentiellement permettre à certains pathogènes, notamment des clostridies, de s'implanter du fait du déséquilibre de la flore (Burdet et al. 2018,

Alagawany et al. 2018). L'effet de l'application d'un traitement antibiotique en amont de l'inoculation de la souche N17LNRB01 a été testé. Un traitement antibiotique (Colistine) a été appliqué pendant 3 jours en amont de l'inoculation par la souche N17LNRB01. Les résultats (Figure 1) montrent que ce facteur n'est pas favorable à l'implantation de la souche N17LNRB01 puisque le nombre d'animaux colonisés est plus faible que lors de l'inoculation par la souche seule.

2.3. Intérêt de la co-infection avec des coccidies

La co-infection coccidies/*Clostridium perfringens* est utilisée pour reproduire expérimentalement l'entérite nécrotique (Prescott et al. 2016). Nous avons donc testé sur le même principe une co-infection coccidies/souche non toxique de *C. botulinum*, en choisissant une espèce de coccidie à tropisme caecal, *E. tenella*. L'idée est dans un premier temps d'inoculer les animaux avec *E. tenella* à une dose (1000 ou 5000 oocystes par animal) induisant un score lésionnel faible à modéré, pouvant offrir un terrain favorable à l'implantation d'autres pathogènes. Les résultats (Figure 1) montrent que ce facteur ne favorise pas l'implantation de la souche N17LNRB01, le nombre d'animaux colonisés étant plus faible lors de la co-infection que lors de l'inoculation de la souche seule.

2.4. Effet conditions d'élevage, densité et souches d'animaux

Un essai en cage comprenant 4 lots de 10 ou 20 animaux élevés en amont de l'essai dans 2 bâtiments d'élevage différents a été mené pour évaluer l'impact des conditions d'élevage en amont de l'inoculation et de la densité d'animaux sur le succès de colonisation des caeca par la souche. Les résultats obtenus dans les 4 lots sont similaires (entre 80% et 95% des animaux colonisés selon les lots), ne suggérant pas d'impact de ces paramètres.

Un autre essai en cage a été mis en place pour évaluer l'impact de l'aliment sur 2 lots de 10 animaux (deux fournisseurs différents, un aliment standard sous forme de farine et un aliment démarrage premier âge sans antibiotique). De nouveau, la colonisation était identique dans les 2 lots, ne suggérant pas d'impact de l'aliment sur le succès de la colonisation.

Enfin, un dernier essai (Figure 2) a été réalisé pour comparer deux souches de poulets et évaluer et l'élevage sur litière ou en cage. Le nombre d'animaux colonisés était plus important pour les poulets ISA Brown que les Leghorn, suggérant une différence entre les deux souches de poulets quant au succès de la colonisation par la souche N17LNRB01. Ces résultats restent cependant à confirmer compte tenu du faible nombre d'animaux colonisés dans les 4 lots. Les essais 5 (en cage) et 6 (sur litière) donnent des résultats identiques, ne suggérant pas d'effet du mode de logement.

2.5. Variabilité des résultats de colonisation d'un essai à l'autre

Sur l'ensemble des essais menés, trois ont permis d'obtenir un taux de colonisation caecal par la souche N17LNRB01 très élevé (>90 %), deux essais ont donné des résultats mitigés (<40%) et un essai n'a pas permis de colonisation caecale par la bactérie (0 %). Aucune des modalités testées ne semble expliquer ce résultat. En effet, l'essai n'ayant pas permis d'obtenir de colonisation par la souche N17LNRB01 s'est déroulé dans des conditions identiques aux trois essais ayant permis d'obtenir plus de 90% de sujets colonisés.

Différentes hypothèses ont été émises pour expliquer ce résultat. La variabilité inter-lot (au niveau du microbiote caecal ou de l'immunité des animaux) pourrait par exemple jouer un rôle dans le succès de l'implantation de la souche. Une autre piste pourrait être l'inoculum utilisé. Le même protocole de préparation de l'inoculum de la souche N17LNRB01 a été suivi pour tous les essais. Un dénombrement a été effectué à chaque essai et ne semble pas expliquer les différences observées. La proportion de spores dans la culture n'a cependant pas été évaluée. Compte tenu des résultats du premier essai (Figure 1) qui montre que l'inoculation avec des spores n'est pas pertinente, une proportion de spores plus importante dans la culture pourrait expliquer le taux de

colonisation plus faible observé lors des essais 5 et 6 (Figure 2, Tableau 1). Ces pistes seront explorées dans de futurs essais pour consolider le modèle présenté ici.

CONCLUSION

Cette étude a permis d'identifier un certain nombre de paramètres influençant l'implantation de la souche N17LNRB01, tels que l'utilisation d'une culture et non d'une suspension de spores et d'autres paramètres ne semblant pas être pertinents pour reproduire expérimentalement la colonisation caecale des animaux, comme l'application d'un traitement antibiotique en amont ou la co-infection avec des coccidies. L'objectif est de poursuivre le développement de ce modèle en se basant sur les résultats de cette étude pour passer à des essais avec une souche productrice de la toxine botulique pour reproduire expérimentalement les signes cliniques.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les financeurs de ce projet pour leur soutien (le Carnot AgriFood Transition pour le projet CLOSTRICOX et le Conseil Départemental des Côtes d'Armor).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alagawany, M., et al. 2018. "The use of probiotics as eco-friendly alternatives for antibiotics in poultry nutrition." *Environ Sci Pollut Res Int* 25 (11):10611-10618. doi: 10.1007/s11356-018-1687-x.
- Burdet, C., et al. 2018. "Antibiotic-Induced Dysbiosis Predicts Mortality in an Animal Model of *Clostridium difficile* Infection." *Antimicrob Agents Chemother* 62 (10). doi: 10.1128/aac.00925-18.
- Hyun, S. H., et al. The Japanese journal of veterinary science 51 (3):582-586.
- Kurazono, H., et al. 1988. "Experimental botulism in pheasants." In *Avian botulism: an international perspective*, edited by Dowell VR Eklund W, Jr. Charles C Thomas, Springfield, Illinois, USA.
- Le Bouquin, S., et al. 2022. "Human and animal botulism surveillance in France from 2008 to 2019." *Front Public Health* 10:1003917. doi: 10.3389/fpubh.2022.1003917.
- Miyazaki, S., et al. 1978. "Experimental botulism in chickens: the cecum as the site of production and absorption of botulinum toxin." *Jpn J Med Sci Biol* 31 (1):1-15. doi: 10.7883/yoken1952.31.1.
- Okamoto, K., et al. 1999. "Some factors involved in the pathogenesis of chicken botulism." *Journal of the Japan Veterinary Medical Association* 52 (3):159-163.
- Prescott, J. F., et al. 2016. "Experimental reproduction of necrotic enteritis in chickens: a review." *Avian Pathol* 45 (3):317-22. doi: 10.1080/03079457.2016.1141345.
- Skarin, H., et al. 2010. "Molecular characterization and comparison of *Clostridium botulinum* type C avian strains." *Avian Pathol* 39 (6):511-8. doi: 10.1080/03079457.2010.526923.
- Skarin, H., et al. 2014. "Plasmidome interchange between *Clostridium botulinum*, *Clostridium novyi* and *Clostridium haemolyticum* converts strains of independent lineages into distinctly different pathogens." *PLoS One* 9 (9):e107777. doi: 10.1371/journal.pone.0107777.
- Woudstra, C., et al. 2015. "Molecular gene profiling of *Clostridium botulinum* group III and their detection in naturally contaminated samples originating from various European countries." *Appl Environ Microbiol.* doi: 10.1128/aem.03915-14.

Tableau 1: Récapitulatif des essais menés pour étudier les paramètres influençant la colonisation des caeca par une souche non-toxique (N17LNRB01), modèle de *C. botulinum* de type C, D, C/D, D/C.

N° essai	Type de logement	Modalités testées	Nombre d'animaux par lot	Nombre maximal d'animaux positifs détectés dans au moins un des lots de l'essai
Essai 1 (Figure 1)	Cage avec carton	✓ Culture vs spores ✓ Antibiotique ✓ Co-infection coccidies	10	10/10
Essai 2	Cage avec carton	✓ Bâtiment d'élevage en amont de l'essai ✓ Densité des animaux	10 ou 20	19/20
Essai 3	Cage avec carton	✓ Evaluation de la persistance dans les caeca 7 et 14 jours post-infections	20	0/20
Essai 4	Cage avec carton	✓ Effet dose	10	9/10
Essai 5	Cage avec carton	✓ Type d'aliment	10	4/10
Essai 6 (Figure 2)	Sur litière	✓ Souches de poulets ✓ Sur litière	20	8/20

Figure 1. Résultats de détection de la souche N17LNRB01 dans les caeca des poulets en cages avec accès aux fientes, inoculés par les spores (S) ou la culture (C), avec en complément un traitement antibiotique en amont (« Antibio »), une inoculation avec des coccidies (2 doses).

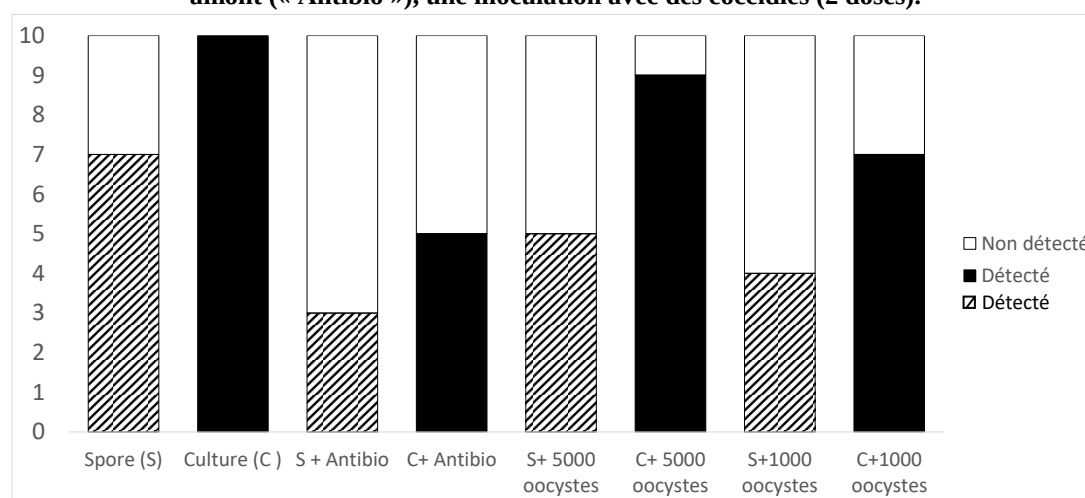


Figure 2. Résultats de détection de la souche N17LNRB01 dans les caeca des poulets (ISA Brown ou Leghorn) sur litière 7 jours ou 14 jours post-inoculation par la souche N17LNRB01.

