



anses

# ***Clostridium botulinum* :** **mise à jour des connaissances** **sur les différentes formes** **des types C, D, mosaïque C/D** **et D/C et E**

Rapport d'expertise collective  
Juin 2021





---

***Clostridium botulinum* :**  
**mise à jour des connaissances**  
**sur les différentes formes des types**  
**C, D, mosaïque C/D et D/C et E**

---

**Saisines**  
**2019-SA-0112 (filiale bovine)**  
**2019-SA-0113 (nettoyage et désinfection)**  
**2019-SA-0114 (filiale avicole)**  
**2019-SA-0115 (faune sauvage)**

**RAPPORT INTERMÉDIAIRE**  
**d'expertise collective**

**Comité d'experts spécialisé « Santé et bien-être des animaux »**  
**Comité d'experts spécialisé « Risque biologique dans les aliments »**

**Groupe de travail « Groupe socle botulisme »**

**Juin 2021**

## Citation suggérée

---

Anses (2021). *Clostridium botulinum* : mise à jour des connaissances sur les différentes formes des types C, D, mosaïque C/D et D/C et E. (saisines 2019-SA-0112 à 2019-SA-0115). Maisons-Alfort : Anses, 170 p.

## Mots clés

---

Botulisme, santé publique, zoonose, bovin, volailles, faune sauvage, nettoyage, désinfection, environnement

Botulism, public health, zoonosis, cattle, poultry, wildlife, cleaning, disinfection, environment

## Présentation des intervenants

**PRÉAMBULE** : Les experts membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

### GROUPE DE TRAVAIL

---

#### Président

M. François MEURENS – Professeur Oniris (Ecole Vétérinaire de Nantes) - microbiologie, immunologie, médecine vétérinaire, vaccins

#### Membres

M. Henri Jean BOULOUIS – Professeur ENVA - bactériologie, diagnostic, vétérinaire

M. Frédéric CARLIN – Directeur de l'UMR408 Sécurité et Qualité des produits d'origine végétale -INRAE – Université d'Avignon - *Clostridium*, produits végétaux, effets des procédés, microbiologie prévisionnelle

M. Michel FEDERIGHI – Professeur Oniris (Ecole Vétérinaire de Nantes) - santé publique, aliments, hygiène, microbiologie, technologie, analyse des dangers, procédés d'inactivation

Mme Maria-Eleni FILIPPITZI – Fonction habituelle *Scientific Institute of Public Health (WIV-ISP)* Sciensano - épidémiologie, maladies infectieuses (animales, zoonotiques), alimentation, analyse des risques

M. Matthieu FOURNIER - Maître de conférences Université de Rouen, UMR CNRS M2C 6143 - hydrogéologie - transfert biotique

M. Philippe FRAVALO - Professeur CNAM - hygiène et microbiologie des produits avicoles et porcins - caractérisation moléculaire des dangers biologiques - analyse métagénomique des écosystèmes complexes (flores contenus digestifs, flores en surface en industries agroalimentaires)

M. Jean-Pierre GANIERE - Retraité, Oniris (Ecole Vétérinaire de Nantes) - Microbiologie, biocides, maladies réglementées, évaluation des risques

M. Lionel GRISOT – Praticien Vétérinaire en Clinique vétérinaire - diagnostic, gestion en élevage, médecine vétérinaire

M. Didier HILAIRE - Adjoint au chef de la division Biologie, Centre d'études du Bouchet - DGA (Direction générale de l'armement) - type de *C. botulinum*, décontamination, aérobiocontamination

Mme Sophie LE BOUQUIN-LENEVEU - Chef d'unité adjointe, unité Épidémiologie, Santé et Bien-être (EPISABE), Laboratoire de Ploufragan/ Plouzané Anses - épidémiologie, analyse de données, santé travail

Mme Caroline LE MARECHAL-CONDY - Anses - Responsable du LNR botulisme aviaire, Ploufragan-Plouzané - botulisme aviaire et bovin, diagnostic

Mme Christelle MAZUET - Responsable CNR Bactéries Anaérobies et Botulisme, Institut Pasteur Paris - CNR botulisme humain, immunologie, microbiologie, surveillance, diagnostic

M. Hervé MORVAN – Retraité, ancien chef de service du laboratoire de bactériologie vétérinaire, Labocéa 22 - Bactériologie, diagnostic de laboratoire - Biologie, laboratoire d'analyse, bactériologie

Mme Michèle TREMBLAY - Médecin conseil en maladies infectieuses et risques biologiques au travail, Direction de santé publique de Montréal - santé travail - risques professionnels - dangers - eaux usées

M Cédric WOUDSTRA - Post-doctorant, Université de Copenhague - bactériologie, biologie moléculaire, *Clostridium botulinum*, méthodes de détection

## **RAPPORTEUR**

---

M. Jean-Pierre VAILLANCOURT - Professeur Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire - épidémiologie ; biosécurité ; zoonoses

## **COMITÉS D'EXPERTS SPÉCIALISÉ**

---

Les travaux, objets du présent rapport ont été suivis et adoptés par les CES suivants :

### ■ CES « Santé et Bien-être de animaux » (SABA)

#### **Président**

M. Gilles MEYER – Professeur, École Nationale Vétérinaire de Toulouse - virologie, immunologie, vaccinologie, maladies des ruminants

#### **Membres**

Mme Catherine BELLOC – Professeur, Oniris (Ecole Vétérinaire de Nantes) - infectiologie, approche intégrée de la santé animale, maladies des monogastriques

M. Stéphane BERTAGNOLI – Professeur, École Nationale Vétérinaire de Toulouse - virologie, immunologie, vaccination, maladies des lagomorphes

M. Alain BOISSY – Directeur de Recherche INRAE Clermont-Ferrand – Theix - bien-être animal

M. Henri-Jean BOULOUIS – Professeur, École Nationale Vétérinaire d'Alfort - bactériologie, diagnostic de laboratoire, immunologie, vaccinologie

M. Éric COLLIN – Vétérinaire libéral - médecine vétérinaire, médicament vétérinaire, maladies vectorielles, maladies à prion, épidémiologie, maladies des ruminants

M. Jean-Claude DESFONTIS – Professeur, Oniris (Ecole Vétérinaire de Nantes) – physiologie animale, bien-être animal, médicament vétérinaire

Mme Maria-Eleni FILIPPITZI – Vétérinaire épidémiologiste, SCIENSANO (B) – épidémiologie quantitative, évaluation de risque

M. David FRETIN – Chef de service de bactériologie vétérinaire. SCIENSANO (B) - bactériologie, zoonoses, diagnostic de laboratoire, LNR tuberculose en Belgique

Mme Emmanuelle GILOT-FROMONT – Professeur, VetAgro Sup – Campus vétérinaire de Lyon – épidémiologie quantitative, évaluation de risque, interface faune sauvage-animaux domestiques, maladies réglementées

M. Étienne GIRAUD – Chargé de recherche, INRAE Toulouse – bactériologie, antibiorésistance, maladies des poissons

M. Lionel GRISOT – Vétérinaire libéral - médecine vétérinaire, médicament vétérinaire, maladies des ruminants

Mme Nadia HADDAD – Professeur, École Nationale Vétérinaire d'Alfort - infectiologie, maladies réglementées, zoonoses

Mme Viviane HENAU – Cheffe d'unité adjointe, Unité Épidémiologie et appui à la surveillance, Anses Lyon – épidémiologie quantitative, évaluation de risque

Mme Elsa JOURDAIN – Chargée de recherche, INRAE Clermont-Ferrand - Theix - zoonoses, épidémiologie, interface faune sauvage-animaux domestiques

Mme Sophie LE BOUQUIN - LENEVEU – Cheffe d'unité adjointe, Unité Épidémiologie, santé et bien-être, Anses Ploufragan-Plouzané-Niort - épidémiologie, évaluation de risque, approche intégrée de la santé animale

Mme Sophie LE PODER – Maître de conférences, École Nationale Vétérinaire d'Alfort - virologie, immunologie, vaccinologie

Mme Élodie MONCHATRE-LEROY – Directrice du Laboratoire de la rage et de la faune sauvage, Anses Nancy - virologie, épidémiologie, évaluation de risques, faune sauvage

Mme Monique L'HOSTIS – Retraitée, Oniris (Ecole Vétérinaire de Nantes) – Parasitologie, santé des abeilles

M. François MEURENS – Professeur, Oniris (Ecole Vétérinaire de Nantes) - virologie, immunologie, vaccinologie, pathologie porcine

Mme Virginie MICHEL – Coordinatrice nationale bien-être animal - Anses - bien-être animal, approche intégrée de la santé animale, épidémiologie, évaluation de risque

M. Pierre MORMEDE – Directeur de recherche émérite INRAE - bien-être animal, stress

M. Hervé MORVAN – Chef de service du laboratoire de bactériologie vétérinaire, Labocéa 22 - bactériologie, diagnostic de laboratoire

Mme Carine PARAUD – Chargée de projet de recherche en parasitologie, Anses Ploufragan-Plouzané-Niort – parasitologie, maladies des ruminants

Mme Ariane PAYNE – Chargée d'étude, ONCFS - épidémiologie, évaluation de risque, interface faune sauvage-animaux domestiques

M. Michel PEPIN – Professeur, VetAgro Sup – Campus vétérinaire de Lyon – infectiologie, immunologie, vaccinologie, maladies des ruminants

Mme Carole PEROZ – Maître de conférences, Oniris (Ecole Vétérinaire de Nantes) - infectiologie, maladies réglementées, approche intégrée de la santé animale

Mme Claire PONSART – Chef de l'unité des zoonoses bactériennes, Laboratoire de Santé Animale, Anses Maisons-Alfort - bactériologie, zoonoses, diagnostic de laboratoire

M. Claude SAEGERMAN – Professeur, Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège - épidémiologie, évaluation de risque

Mme Gaëlle SIMON – Cheffe d'unité adjointe, Unité Virologie immunologie porcines, Anses Ploufragan-Plouzané-Niort - virologie, immunologie, maladies des monogastriques

M. Jean-Pierre VAILLANCOURT – Professeur, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal - épidémiologie, biosécurité, zoonose, évaluation de risque

.....

■ CES « Évaluation des risques biologiques liés aux aliments » (BIORISK)

**Président**

M. Philippe FRAVALO – Conservatoire National des arts et métiers, Professeur. Hygiène et microbiologie des aliments, méthodes de détection, de quantification et de caractérisation des micro-organismes, écologie des écosystèmes microbiens en agro-alimentaire

**Membres**

Frédéric AUVRAY – École nationale vétérinaire de Toulouse, Ingénieur de recherche. Biologie moléculaire, génétique microbienne, bactériologie

M. Frédéric CARLIN – INRAE, Directeur de recherche. Bactéries sporulées, produits végétaux, microbiologie prévisionnelle

Mme Catherine CHUBILLEAU – Centre hospitalier de Niort, Chef de service. Épidémiologie, évaluation des risques sanitaires, hygiène

M. Philippe DANTIGNY (jusqu'en septembre 2020) – LUBEM Brest, Professeur des universités. Moisissures, mycotoxines, génie des procédés.

Mme Florence DUBOIS-BRISSONNET – AgroParisTech, Professeur des universités. Microbiologie des aliments, biofilms, mécanismes d'adaptation des micro-organismes au stress (conservateurs, désinfectants)

M. Steven DURET – Irstea, Ingénieur de recherche. Modélisation, génie des procédés, transfert thermique

M. Michel FEDERIGHI – Oniris (Ecole Vétérinaire de Nantes) - Professeur des universités. Microbiologie, hygiène et qualité des aliments, analyse des dangers

M. Michel GAUTIER – Agrocampus Ouest, Professeur des universités. Microbiologie et hygiène des aliments, biologie moléculaire, bactériophages, aliments fermentés

Mme Malika GOUALI (jusqu'en décembre 2020) – Institut Pasteur, Chargée de mission. Microbiologie de l'eau et des aliments, méthodes de détection, de quantification et de caractérisation des micro-organismes, validation des méthodes

M. Stéphane GUYOT – AgroSup Dijon, Maître de conférences. Procédés de destruction des bactéries pathogènes, mécanismes d'adaptation aux stress environnementaux

Mme Nathalie JOURDAN-DA SILVA – Santé publique France, Chargée de projet scientifique. Épidémiologie des maladies entériques et zoonoses

M. Renaud LAILLER – Anses, Laboratoire de sécurité des aliments, Chef de projet. Surveillance, *Salmonella*, hygiène des aliments

Mme Sandra MARTIN-LATIL – Anses, Laboratoire de sécurité des aliments, Chargée de projet scientifique. Virologie, méthodes de détection

Mme Florence MATHIEU – Toulouse-INP/ENSAT, Professeur des universités. Moisissures et mycotoxines, microbiologie des aliments

Mme Jeanne-Marie MEMBRÉ – INRAE, Ingénieur de recherche. Appréciation quantitative du risque microbiologique, statistiques appliquées.

M. Éric OSWALD – CHU Toulouse, Professeur des universités. Infectiologie clinique, écologie microbienne, *E. coli*

Mme Sabine SCHORR-GALINDO – Université Montpellier, Professeur des universités. Mycologie, écologie microbienne, biotechnologie

Mme Nalini RAMA RAO – INRAE, Directrice de recherche. Microbiologie, interaction hôte/pathogène, microbiote intestinal

Mme Régine TALON – INRAE, Directrice de recherche. Microbiologie des aliments, écologie microbienne, aliments fermentés d'origine animale



Mme Muriel THOMAS – INRAE, Directrice de recherche. Microbiote intestinal et santé humaine, physiologie

Mme Isabelle VILLENA – CHU Reims, Professeur des universités. Parasitologie, infectiologie

## **PARTICIPATION ANSES**

---

### **Coordination scientifique**

Saisine transversale ayant impliqué les unités ci-dessous :

- Direction de l'évaluation des risques (DER)/ Unité d'évaluation des risques liés à la santé, à l'alimentation et au bien-être des animaux (UERSABA)

Mme Karine PETIT, Cheffe de projet scientifique

Mme Elissa KHAMISSE, Cheffe de projet scientifique

Mme Charlotte DUNOYER, Cheffe d'unité

- DER / Unité d'évaluation des risques liés aux aliments (UERALIM)

Mme Nathalie ARNICH, Adjointe au chef d'unité,

Mme Pauline KOOH, Cheffe de projet scientifique

- DER / Unité d'évaluation des risques liés à l'eau (UERE)

Mme Carole CATASTINI, Cheffe de projet scientifique

### **Contribution scientifique**

- Mmes Isabelle ATTIG (Cheffe d'unité) et Nabila HADDACHE (Cheffe de projet scientifique) de la Direction de l'évaluation des produits réglementés (DEPR) / Unité d'Evaluation de l'Efficacité des Biocides (U2EB)

- M. Laurent GUILLIER, Chef de projet scientifique de l'unité d'évaluation des risques liés aux aliments (UERALIM), DER

### **Secrétariat administratif**

Mme Angélique LAURENT – Anses

M. Régis MOLINET – Anses

Mme Isabelle PIERI – Anses

## **AUDITION DE PERSONNALITÉS EXTÉRIEURES**

---

### **Direction Générale de l'Alimentation (DGAL), Mission des Urgences Sanitaires**

Mme Séverine RAUTUREAU – Adjointe à la Chef de la Mission des Urgences Sanitaires

Mme Khadija AKROUT, Chargée d'étude planification et santé animale à la Mission des Urgences Sanitaires

.....

# SOMMAIRE

<b>Présentation des intervenants .....</b>	<b>3</b>
<b>Sigles et abréviations .....</b>	<b>13</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>14</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>15</b>
<b>1 Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise.....</b>	<b>16</b>
1.1 Contexte.....	16
1.2 Objet du rapport intermédiaire .....	16
1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation.....	17
1.4 Prévention des risques de conflits d'intérêts.....	17
<b>2 Introduction générale sur <i>Clostridium botulinum</i> .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 <i>Clostridium botulinum</i> .....</b>	<b>19</b>
2.1.1 Taxonomie.....	19
2.1.2 Gènes de la toxinogénèse.....	22
2.1.3 Caractéristiques microbiologiques .....	22
2.1.3.1 Microscopie, macroscopie et métabolisme.....	22
2.1.3.2 Conditions et mécanismes de croissance, de sporulation et de toxinogénèse.....	23
2.1.3.2.1 Croissance .....	23
2.1.3.2.2 Spore et sporulation .....	23
2.1.3.2.3 Toxinogénèse.....	24
<b>2.2 Les toxines botuliques.....</b>	<b>24</b>
2.2.1 Classification .....	24
2.2.1.1 Sous-types .....	24
2.2.2 Structure .....	25
2.2.2.1 Structure du complexe botulique.....	25
2.2.2.2 Structure de la neurotoxine botulique.....	25
2.2.3 Mécanisme d'action.....	26
2.2.3.1 Fixation sur les récepteurs .....	26
2.2.3.2 Internalisation et translocation.....	26
2.2.3.3 Activité protéolytique .....	27
<b>2.3 Information sur les méthodes analytiques .....</b>	<b>28</b>
<b>2.4 Réglementation .....</b>	<b>29</b>
2.4.1 Réglementation européenne (santé animale et sécurité sanitaire des aliments).....	29
2.4.2 Aspects réglementaires en santé publique en France.....	30
2.4.3 Aspects réglementaires en santé animale en France.....	30
2.4.4 Réglementation du botulisme et analyses biologiques.....	31
<b>3 <i>Clostridium botulinum</i> et environnement.....</b>	<b>33</b>
3.1 Distribution et prévalence de <i>C. botulinum</i> .....	33
3.2 Ecologie de <i>C. botulinum</i> (types C, D, C/D, D/C et E) dans les espaces naturels .....	34

3.2.1	Réservoirs et vecteurs mécaniques impliqués dans le cycle biologique de <i>C. botulinum</i> .....	34
3.2.2	Présence, persistance et croissance de <i>C. botulinum</i> des types C, D et mosaïques C/D, D/C dans l'espace naturel .....	36
3.2.3	Présence, persistance et croissance de <i>C. botulinum</i> de type E dans l'espace naturel .....	38
3.2.4	Facteurs environnementaux et moyens de lutte .....	39
<b>3.3</b>	<b>Ecologie de <i>C. botulinum</i> (types C, D, C/D, D/C et E) dans l'espace agricole.....</b>	<b>40</b>
3.3.1	Présence, persistance et croissance de <i>C. botulinum</i> types C, D, C/D, D/C dans l'espace agricole.....	40
3.3.2	Présence, persistance et croissance de <i>C. botulinum</i> type E dans l'espace agricole .....	42
<b>4</b>	<b>Maladie humaine et aspect zoonotique .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1</b>	<b>Le botulisme en santé humaine .....</b>	<b>44</b>
4.1.1	Épidémiologie et pathogenèse .....	44
4.1.2	Manifestations cliniques .....	45
4.1.3	Diagnostic différentiel .....	47
4.1.4	Confirmation du diagnostic et tests de laboratoire .....	47
4.1.5	Traitement .....	48
4.1.6	Évolution clinique .....	49
<b>4.2</b>	<b>Données de surveillance du botulisme en santé humaine.....</b>	<b>49</b>
4.2.1	Surveillance des cas de botulisme humain en France.....	50
4.2.1.1	Confirmation des cas humains et de leur origine alimentaire sur la période 2008-2018 en France ....	51
4.2.1.2	Cas de botulisme infantile en France .....	53
4.2.2	Situation dans d'autres pays .....	53
4.2.2.1	Analyse des données européennes d'incidence des cas de botulisme humain .....	53
4.2.2.2	Données sur les cas de botulisme issues de la littérature scientifique .....	55
<b>4.3</b>	<b>Doses létales des toxines botuliques chez l'être humain .....</b>	<b>56</b>
<b>4.4</b>	<b>Question du caractère zoonotique des types C, D et mosaïques C /D et D/C : revue de littérature .....</b>	<b>57</b>
4.4.1	Analyse des publications sur les cas humains et chez des primates liés aux types C et D de <i>C. botulinum</i> .....	57
4.4.2	Effet des toxines botuliques de type C et D sur l'être humain .....	61
4.4.3	Conclusion sur le caractère zoonotique des types C et D .....	61
<b>4.5</b>	<b>Les cas de botulisme humain de type E « d'origine pisciaire » .....</b>	<b>62</b>
<b>5</b>	<b>Le botulisme chez l'animal.....</b>	<b>63</b>
<b>5.1</b>	<b>Cycle épidémiologique de <i>Clostridium botulinum</i> dans les élevages de bovins et volailles.....</b>	<b>63</b>
5.1.1	Cycle épidémiologique de <i>Clostridium botulinum</i> dans les élevages de bovins.....	63
5.1.2	Cycle épidémiologique de <i>Clostridium botulinum</i> dans les élevages de volailles .....	65
<b>5.2</b>	<b>Doses toxiques selon l'espèce et méthodes de diagnostic utilisables .....</b>	<b>68</b>
5.2.1	Doses toxiques connues .....	68
5.2.2	Méthodes de diagnostic utilisées au laboratoire et leurs limites .....	73
5.2.2.1	Le test sur souris ou test « biologique » (Mouse bioassay ou MBA) .....	73
5.2.2.2	Les tests ELISA.....	74
5.2.2.3	Le test ENDOPEP-MS .....	74
5.2.2.4	Les tests PCR (Polymerase Chain Reaction).....	74
5.2.2.5	Mise en application pratique du diagnostic de laboratoire.....	75
<b>5.3</b>	<b>Botulisme chez les bovins.....</b>	<b>76</b>
5.3.1	Pathogenèse et signes cliniques.....	77

5.3.1.1	Pathogénèse .....	77
5.3.1.2	Signes cliniques .....	77
5.3.2	Diagnostic.....	78
5.3.3	Présence et concentration des différentes formes de <i>C. botulinum</i> dans les tissus en fonction de l'état d'un animal.....	79
5.3.3.1	Méthodes diagnostiques utilisées et limites .....	79
5.3.3.2	Portage digestif en dehors d'un contexte clinique .....	79
5.3.3.3	Portage asymptomatique au cours et suite à un foyer clinique .....	79
5.3.3.4	Discussion sur l'hypothèse d'un « botulisme viscéral » ou « botulisme chronique » et conclusions sur l'analyse des articles qui y sont liés.....	80
5.3.4	Traitement et prévention .....	81
<b>5.4</b>	<b>Botulisme aviaire.....</b>	<b>82</b>
5.4.1	Pathogénèse et signes cliniques.....	83
5.4.1.1	Pathogénèse .....	83
5.4.1.2	Signes cliniques .....	83
5.4.2	Diagnostic.....	84
5.4.3	Présence et concentration des différentes formes de <i>C. botulinum</i> dans les tissus en fonction de l'état d'un animal.....	84
5.4.3.1	Portage asymptomatique de <i>C. botulinum</i> en dehors du contexte de foyers cliniques .....	85
5.4.3.2	Dans un contexte de foyer clinique .....	85
5.4.3.2.1	<i>Cas des animaux présentant des signes cliniques.....</i>	<i>85</i>
5.4.3.2.2	<i>Cas des animaux ne présentant pas de signes cliniques.....</i>	<i>85</i>
5.4.4	Traitement et prévention .....	86
<b>5.5</b>	<b>Botulisme chez les poissons.....</b>	<b>87</b>
5.5.1	Pathogénèse et signes cliniques.....	87
5.5.1.1	Pathogénèse : contamination botulique des poissons.....	87
5.5.1.2	Signes cliniques .....	88
5.5.2	Diagnostic.....	89
5.5.3	Présence et concentration des différentes formes de <i>C. botulinum</i> dans les tissus en fonction de l'état d'un animal.....	89
5.5.3.1	Méthodes diagnostiques utilisées et limites .....	89
5.5.3.2	Présence et concentration de <i>C. botulinum</i> E chez les poissons .....	89
5.5.4	Traitement et prévention .....	90
<b>5.6</b>	<b>Bases de données de surveillance en santé animale.....</b>	<b>91</b>
5.6.1	Etude des données de surveillance relatives au botulisme chez les animaux en France.....	91
5.6.1.1	Répartition des foyers de botulisme par espèce .....	92
5.6.1.2	Répartition des types de <i>C. botulinum</i> .....	95
5.6.1.3	Étude de la saisonnalité .....	97
5.6.1.4	Répartition géographique.....	98
5.6.1.5	Caractéristiques des élevages de volailles et des oiseaux sauvages atteints.....	99
5.6.1.6	Discussion.....	99
5.6.2	Situation dans les autres pays européens .....	100
5.6.2.1	Répartition des foyers de botulisme par pays .....	101
5.6.2.2	Répartition des foyers de botulisme par espèce .....	101
5.6.2.3	Répartition des foyers de botulisme par types de <i>C. botulinum</i> .....	102
5.6.2.4	Étude de la saisonnalité .....	102
<b>6</b>	<b><i>Clostridium botulinum</i> et denrées alimentaires d'origine animale ...</b>	<b>104</b>
<b>6.1</b>	<b>Données de prévalence dans les denrées alimentaires d'origine animale (Types C, D, mosaïque C/D, D/C et E) .....</b>	<b>104</b>
6.1.1	Méthodes mises en œuvre pour déterminer la prévalence de <i>Clostridium botulinum</i> dans des échantillons alimentaires .....	104
6.1.2	Viandes et produits carnés.....	104
6.1.3	Œufs et ovoproduits .....	105

6.1.4	Lait et produits laitiers .....	105
6.1.5	Poisson (type E) .....	106
<b>6.2</b>	<b>Croissance et production de la neurotoxine botulique de type C, D ou E par <i>Clostridium botulinum</i> dans les denrées alimentaires d'origine animale .....</b>	<b>106</b>
6.2.1	Croissance des souches de <i>Clostridium botulinum</i> du Groupe III dans les aliments .....	106
6.2.2	Croissance des souches de <i>Clostridium botulinum</i> du Groupe II, y compris les souches produisant la neurotoxine de type E .....	107
<b>7</b>	<b>Méthodes, procédés d'inactivation des différentes formes de <i>Clostridium botulinum</i> .....</b>	<b>108</b>
<b>7.1</b>	<b>Maîtrise des <i>C. botulinum</i> dans les denrées alimentaires d'origine animale .....</b>	<b>108</b>
7.1.1	Procédés physiques d'inactivation .....	108
7.1.1.1	Traitement thermique .....	109
7.1.1.1.1	Paramètres d'inactivation - .....	109
7.1.1.1.2	Mode d'action des traitements thermiques .....	109
7.1.1.1.3	Résistance des spores de <i>C. botulinum</i> , en particulier de type C, D et E à la chaleur en milieu humide. ....	109
7.1.1.1.4	Inactivation par la chaleur de <i>C. botulinum</i> dans les DAOA .....	110
7.1.1.2	Autres procédés physiques d'inactivation .....	111
7.1.1.2.1	L'ionisation .....	111
7.1.1.2.2	Les plasmas froids .....	112
7.1.1.2.3	Les Hautes Pressions Hydrostatiques (HPH) .....	112
7.1.1.2.4	Les champs lumineux pulsés – Les ultra-violets .....	113
7.1.2	Procédés chimiques d'inactivation .....	116
7.1.3	Procédés physiques d'élimination .....	116
7.1.3.1	Bactofugation (séparation centrifuge) .....	116
7.1.3.2	Filtration .....	116
7.1.4	Procédés chimiques d'élimination .....	117
7.1.5	Traitements combinés pour la maîtrise des <i>Clostridium botulinum</i> dans les denrées alimentaires d'origine animale .....	117
7.1.6	Conclusion sur les procédés d'inactivation/élimination dans les denrées alimentaires d'origine animale .....	118
<b>7.2</b>	<b>Opération de décontamination dans les élevages, établissements agroalimentaires et milieu naturel .....</b>	<b>119</b>
7.2.1	Description des opérations par secteur .....	119
7.2.1.1	Elevages .....	119
7.2.1.2	Etablissements Agro-Alimentaires (EAA) (abattoir, ateliers de découpes, usines de transformation) .....	120
7.2.1.3	Cas particulier : opérations de décontamination dans un foyer de botulisme en faune sauvage .....	121
7.2.2	Procédés de décontamination physiques et chimiques .....	122
7.2.2.1	Procédés de décontamination physiques .....	122
7.2.2.2	Procédés thermiques .....	122
7.2.2.3	Procédés par rayonnements .....	123
7.2.2.4	Procédés mécaniques .....	123
7.2.3	Procédés chimiques .....	124
7.2.3.1	Les produits détergents .....	124
7.2.3.2	Les produits biocides .....	124
7.2.3.3	Modes d'application et matrices environnementales à désinfecter en élevage atteint de botulisme .....	125
7.2.4	Méthodes d'évaluation de l'efficacité désinfectante des produits biocides dans le cadre d'une autorisation de mise sur le marché .....	125
7.2.4.1	Activité sporicide dans les normes CEN .....	126
7.2.4.2	Revue de l'efficacité des substances actives biocides dans la littérature .....	126
7.2.5	Protocole de désinfection et validation des opérations de décontamination .....	130
7.2.5.1	Protocole de désinfection .....	130

7.2.5.2	Validation des opérations de désinfection .....	131
7.2.5.3	Exemples de cas pratiques en élevage.....	131
<b>8</b>	<b>Synthèse et conclusion du groupe de travail.....</b>	<b>133</b>
<b>9</b>	<b>Bibliographie.....</b>	<b>138</b>
	<b>Annexe 1 : Lettres des saisines 2019-SA-0112 à 2019-SA-0115 .....</b>	<b>155</b>
	<b>Annexe 2 : Description et analyse des publications sur les cas humains recensés de botulisme de type C et D:.....</b>	<b>163</b>
	<b>Annexe 3 : Diversité des milieux utilisés dans les publications, avec composition simplifiée .....</b>	<b>168</b>
	<b>Annexe 4 : Tableau des incertitudes sur les connaissances .....</b>	<b>169</b>

## Sigles et abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ANMV	Agence Nationale du Médicament Vétérinaire
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament
APMS	Arrêté préfectoral de mise sous surveillance
APDI	Arrêté préfectoral de déclaration d'infection
ATU	Autorisation temporaire d'utilisation
BEH	Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire
BoNT	<i>Botulinum Neuro Toxin – Neurotoxine botulique</i>
CNR	Centre National de Référence
DDPP	Direction Départementale de la Protection des Populations
DGAL	Direction Générale de l'Alimentation
DO	Déclaration Obligatoire (législation)
DO	Densité Optique (laboratoire)
DROM	Départements ou Régions français d'Outre-Mer
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FAF	Fabrication d'Aliment à la Ferme
GDS	Groupement de défense sanitaire
IM	Intra Musculaire
IP	Intra Péritonéal
IU	International Units (Unité internationale)
IV	Intra Veineux
LNR	Laboratoire National de Référence
MALDI-TOF MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry</i>
Endopep-MS	<i>Endopeptidase- Mass Spectrometry</i>
MBA	<i>Mouse bio-assay</i>
MLD	<i>Mouse Lethal Dose</i>
MOT	Micro-organismes et Toxines
MRC	Maladie Réputée Contagieuse
MUS	Mission des Urgences Sanitaires
NTNH	Non toxique Non Hémagglutinante
OFB	Office français de la biodiversité
ONCFS	Office National de la chasse et de la Faune sauvage
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
SPF	Santé Publique France
RNOEA	Réseau National d'Observations Épidémiologiques en Aviculture
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment Receptor</i>

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification et caractéristiques physiologiques des <i>C. botulinum</i> et des espèces de <i>Clostridium</i> neurotoxigènes en conditions de laboratoire.....	21
Tableau 2 : <i>C. botulinum</i> et organismes pouvant intervenir comme « vecteurs mécaniques » dans un écosystème d'eau douce (Espelund et Klaveness, 2014) .....	35
Tableau 3 : Spécificité des types de botulisme humain.....	46
Tableau 4 : Toxicité des types de toxine botulique (BoNT) selon le mode d'inoculation chez les primates humains (doses létales extrapolées de l'expérimentation animale) et chez les primates non humains (doses létales expérimentales).....	56
Tableau 5 : Bilan des cas recensés (humains et primates non humains) liés aux types C et D.....	59
Tableau 6 : Présentation par ordre d'importance décroissante des principales sources et véhicules de contamination de <i>C. botulinum</i> (forme sporulée, végétative et toxine) dans un élevage de bovins .....	65
Tableau 7 : Présentation par ordre d'importance décroissante des principales sources et véhicule de contamination de <i>C. botulinum</i> (formes sporulée, végétative et toxine) dans un élevage de volailles .....	67
Tableau 8 : Toxicité des types de toxine botulique (BoNT) chez différentes espèces animales (d'après Rasetti-Escargueil, Lemichez, et Popoff (2020), (Rossetto et Montecucco 2019)) exprimée en multiple de souris LD <sub>50</sub> /kg (injection intrapéritonéale) sauf indication différente.....	69
Tableau 9 : Toxicité des types de toxine botulique (BoNT) selon le mode d'inoculation et l'espèce d'oiseau considérée (d'après Rasetti-Escargueil, Lemichez, et Popoff (2019) exprimée en multiple de souris LD <sub>50</sub> /kg (injection intrapéritonéale) sauf indication différente .....	71
Tableau 10 : Toxicité des types de toxine botulique (BoNT) selon le mode d'inoculation et l'espèce de poisson .....	72
Tableau 11 : structures permettant le diagnostic vétérinaire sur prélèvement animal .....	76
Tableau 12 : Répartition des foyers botuliques par pays (n = 322) .....	101
Tableau 13 : Impact des traitements d'inactivation applicables aux DAOA sur <i>C. botulinum</i> .....	115
Tableau 14 : Familles de désinfectants et mode d'action.....	127
Tableau 15: Exemples de la diversité des milieux utilisés dans les publications, avec composition simplifiée.....	168



## Liste des figures

Figure 1 : Schéma de la structure des neurotoxines botuliques C, D, C/D et D/C.....	20
Figure 2 : Schéma du mode d'action des neurotoxines botuliques dans les neurones (en jaune sur le schéma) (Arnon <i>et al.</i> 2001).....	26
Figure 3 : Interaction des BoNTs avec les SNARES.....	27
Figure 4 : Représentation schématique du cycle de <i>C. botulinum</i> dans un écosystème d'eau douce (Espelund et Klaveness 2014).....	36
Figure 5 : Nombre de foyers et de cas de botulisme humains d'origine alimentaire.....	50
Figure 6 : Répartition des foyers de botulisme d'origine alimentaire (N = 82) et des foyers de botulisme infantile (N = 14) en fonction du type de toxine botulique et de l'identification de l'origine des cas sur la période 2008-2018 en France.....	51
Figure 7 : Répartition des foyers de botulisme alimentaire avec identification de la source alimentaire (N = 41) en fonction du type de préparation, de la nature de l'aliment, de l'origine des aliments et du type de toxine botulique.....	53
Figure 8 : Nombre de cas rapportés (a) et le taux d'incidence annuelle (b) dans l'Union européenne pour la période 2011-2018.....	54
Figure 9 : Moyenne des taux d'incidence nationaux annuels des cas de botulisme sur la période 2011-2018.....	55
Figure 10 : Véhicules d'introduction de <i>C. botulinum</i> (forme sporulée, végétative et toxines) dans un élevage de bovins.....	64
Figure 11 : Véhicules d'introduction de <i>C. botulinum</i> (forme sporulée, végétative et toxines) dans un élevage de volailles.....	66
Figure 12 : Pathogénèse du botulisme chez le poulet de chair.....	83
Figure 13 : Répartition des foyers botuliques recensés de 2009 à 2019 par espèce (n = 592).....	92
Figure 14 : Évolution des foyers botuliques recensés par année de 2009 à 2019 par espèce (n = 592).....	93
Figure 15 : Évolution du nombre de foyers de botulisme pour les oiseaux d'élevage recensés de 2005 à 2019 (n = 247) (Source CNR/LNR).....	93
Figure 16: Évolution du nombre de foyers de botulisme pour les oiseaux sauvages <b>recensés</b> de 2005 à 2019 (n = 212) (Source CNR/LNR).....	94
Figure 17 : Évolution du nombre de foyers de botulisme pour les bovins recensés de 2009 à 2019 (n = 120).....	94
Figure 18: Répartition des toxines botuliques.....	95
Figure 19 : Répartition des types de botulisme.....	96
Figure 20 : Répartition des types de botulisme.....	96
Figure 21 : Répartition par trimestre des foyers recensés sur des oiseaux sauvages (n = 66).....	97
Figure 22 : Répartition par trimestre des foyers recensés sur des oiseaux d'élevage (n = 91).....	97
Figure 23: Répartition des foyers de botulisme recensés sur des oiseaux d'élevage de 2013 à 2019 (Source LNR) (n = 77).....	98
Figure 24 : Répartition des foyers de botulisme bovins recensés de 2017 à 2019.....	98
Figure 25 : Répartition des types de <i>C. botulinum</i> recensés par espèce de volailles (n = 81 foyers).....	99
Figure 26 : Répartition des foyers par espèces et par pays (n = 114).....	102
Figure 27 : Représentation schématique des relations entre la température appliquée et les valeurs du temps de réduction décimale D pour les spores de <i>C. botulinum</i> .....	110
Figure 28 : Coupe transversale d'une enceinte de compression indirecte.....	112
Figure 29 : Les différents procédés de filtration du lait.....	117

# 1 Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise

## 1.1 Contexte

Le botulisme est une maladie neurologique humaine et animale, le plus souvent d'origine alimentaire, provoquée par l'action de neurotoxines bactériennes (toxines botuliques) produites par des bactéries du genre *Clostridium* et qui se manifeste par des paralysies flasques pouvant aller jusqu'à la paralysie respiratoire et l'arrêt cardiaque. Il existe neuf types<sup>1</sup> de toxines botuliques. Les différents types se répartissent en une quarantaine de sous-types.

Chez l'être humain, en France, le botulisme est à déclaration obligatoire depuis 1986. Les cas de botulisme sont majoritairement associés aux types B et A et de manière plus exceptionnelle aux types F et E. Il s'agit d'une maladie rare, avec une incidence en France de 11 à 22 cas/an (période 2013-2016, source Santé Publique France - SPF).

Le botulisme animal en France concerne essentiellement les oiseaux (sauvages et domestiques) et les bovins. Les cas chez les bovins sont dus aux types mosaïque D/C (majoritaire), C, mosaïque C/D et rarement D. Au niveau national, l'incidence sur les 10 dernières années est en moyenne d'une dizaine de foyers par an. 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, l'incidence est d'environ 25 foyers par an (volailles<sup>2</sup> et avifaune confondues), avec cependant des variations annuelles parfois notables, comme en 2007 (121 foyers décelés) et 2008 (102 foyers).

Une sous-estimation est probable, quelle que soit l'espèce animale envisagée, mais surtout pour l'avifaune<sup>3</sup> (sauvage et non captive) où la détection des cadavres d'oiseaux est plus difficile.

Bien qu'il s'agisse d'un danger sanitaire de première catégorie en santé animale, il n'y a pas à l'heure actuelle de mesures de police sanitaire établies par la réglementation, lors de la confirmation d'un foyer de botulisme animal, ce qui conduit à une gestion au cas par cas par les directions départementales de la protection des populations (DDPP) et la Mission des Urgences Sanitaires (MUS) de la Direction générale de l'Alimentation. Ces services peuvent s'appuyer sur deux documents émis par l'AFSSA : le rapport sur le botulisme animal établi en 2002 et l'avis rendu en janvier 2009 sur un projet d'arrêté fixant des mesures techniques et administratives relatives à la lutte contre le botulisme aviaire. Ce projet d'arrêté n'a pas été finalisé par le ministère. Les rapports et avis cités étant relativement anciens, la Direction générale de l'Alimentation a saisi l'Anses à la fin du mois de juin 2019 *via* 4 saisines (saisines 2019-SA-0112 à 2019-SA-0115), dont l'objet est une demande d'actualisation des connaissances et des évaluations de risque pour la santé humaine et/ou animale.

## 1.2 Objet du rapport intermédiaire

Préalablement au traitement de chacune de ces saisines, il est apparu nécessaire d'effectuer un bilan des connaissances sur *Clostridium botulinum* et sur son épidémiologie en relation avec les contaminations constatées. Aussi, afin d'optimiser le temps de travail, il a été convenu de procéder par étape :

- Une première étape réalisée par un groupe essentiellement constitué de spécialistes du botulisme, que ce soit en santé publique ou en santé animale. Ce groupe a été chargé d'établir le cycle épidémiologique et de faire le bilan des connaissances sur

<sup>1</sup> le terme toxinotype peut être utilisé et a la même signification.

<sup>2</sup> le terme « volailles » regroupe les espèces d'oiseaux domestiques et captives,

<sup>3</sup> le terme « avifaune » correspond dans le rapport aux espèces d'oiseaux sauvages et non captives

*Clostridium botulinum* (aspect zoonotique, données de surveillance en santé humaine et en santé animale, concentration de ses différentes formes dans les tissus animaux et résistance en fonction des matrices et des traitements, ...). Ce 1<sup>er</sup> groupe est appelé « groupe socle » dans le reste du document. Les travaux de ce groupe socle sont consignés dans le présent rapport intermédiaire consacré à la mise à jour des connaissances. Transmis à la DGAL, il servira de base pour le traitement des quatre saisines.

- Lors de la 2<sup>nd</sup>e étape, les évaluations de risques demandées seront traitées par un groupe de travail spécifique à chaque saisine, qui sera alimenté, en termes de connaissances, par la production du groupe socle.

### 1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'Anses a confié au groupe de travail « Groupe socle botulisme », rattaché transversalement aux comités d'experts spécialisés SABA et BIORISK, cette mise à jour des connaissances.

Le GT a choisi d'organiser son rapport en fonction des problématiques de la Mission des Urgences sanitaires et des informations nécessaires au traitement des questions d'évaluation de risque des saisines : en particulier les foyers de botulisme animal en élevage bovin et aviaire comme source de contamination humaine (quelle que soit la forme de cette contamination) et la vérification de cette probabilité de contamination en fonction des sérotypes étudiés spécifiquement dans ces saisines, à savoir les sérotypes C, D, mosaïque C/D et D/C, et E.

C'est pourquoi le plan est centré sur la maladie chez les bovins, les volailles et l'avifaune, ainsi que sur l'étude approfondie et critique des cas humains impliquant les sérotypes C, D, mosaïque C/D et D/C qui ont pu être recensés à travers le monde depuis un siècle. Les méthodes d'analyses utilisées pour diagnostiquer le botulisme diffèrent suivant les espèces concernées, les équipes de chercheurs et les pays. Cette variabilité a un impact majeur sur l'analyse des publications et de leurs résultats, d'où des paragraphes spécifiques pour certaines parties du rapport. Enfin, les parties relatives au botulisme humain ont uniquement été développées pour comprendre quels sérotypes sont impliqués chez l'être humain et quelles modalités de contamination pouvaient être en œuvre. Outre ces aspects, le GT s'est attaché à développer dans des chapitres dédiés les particularités de *Clostridium botulinum* et de ses toxines, la réglementation afférente, sa présence dans l'environnement et les particularités du botulisme de type E, tant chez les humains que chez les poissons. Les chapitres relatifs au bilan des connaissances existantes sur *Clostridium botulinum* dans les denrées alimentaires d'origine animale et sur les méthodes et procédés d'inactivation vis-à-vis de cette bactérie complètent le tableau.

Les travaux d'expertise du groupe de travail ont été présentés régulièrement aux CES (tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques) : SABA (04 février, 09 juillet, 08 décembre 2020 et adoptés le 12 janvier 2021) ; BIORISK (26 février, 17 juin, 27 octobre 2020 et adoptés le 07 décembre 2020). Le rapport produit par le groupe de travail tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES.

Ces travaux sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires.

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – prescriptions générales de compétence pour une expertise (mai 2003) »

### 1.4 Prévention des risques de conflits d'intérêts.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'agence ([www.anses.fr](http://www.anses.fr)).

## 2 Introduction générale sur *Clostridium botulinum*

### 2.1 *Clostridium botulinum*

*Clostridium botulinum* est constitué d'un ensemble de souches bactériennes du genre *Clostridium* dont le point commun est la capacité à synthétiser une toxine protéique appelée la toxine botulique. Cette toxine est responsable du botulisme, une affection neurologique qui entraîne des paralysies flasques. Le botulisme a été identifié en Allemagne au milieu du dix-huitième siècle et au début du dix-neuvième siècle. Kermer a mis en évidence la relation entre la maladie et la consommation de saucisses (*botula* en latin) Torrens (1998). L'origine bactérienne de la maladie a été mise en évidence à la fin du dix-neuvième siècle via l'isolement d'une bactérie anaérobie toxigène appelée *Bacillus botulinus* (Ermengem 1896). Les bactéries productrices de toxines botuliques ont ensuite été classées dans le genre *Clostridium* comme cité par Holland en 1920 (Sebald 1982) et dans l'espèce *Clostridium botulinum* (Bergey *et al.* 1923). Il existe plusieurs types de classification de *Clostridium botulinum*<sup>4</sup>. Le GT a choisi de conserver la classification basée sur le type de toxine produite, celle-ci étant la plus communément utilisée.

#### 2.1.1 Taxonomie

*Clostridium botulinum* appartient au genre *Clostridium* qui est affilié à la famille des *Clostridiaceae*, ordre des *Clostridiales*, classe des *Clostridia* et division des *Firmicutes*.

Le genre *Clostridium* est constitué d'environ 200 espèces dont une quinzaine synthétisent des toxines entraînant des maladies chez l'être humain ou l'animal (Poulain et Popoff 2019).

*Clostridium botulinum* présente une grande diversité génétique et est classé actuellement en trois groupes en fonction de leurs caractéristiques biochimiques et protéolytiques. C'est ainsi que le groupe I est protéolytique alors que les groupes II et III sont non protéolytiques. Cette classification initiale de *Clostridium botulinum* a été ensuite confirmée par des études génétiques basées sur la comparaison des séquences d'ADN et de leur niveau d'homologie ainsi que des séquences du gène codant l'ARNr 16S des différentes clostridies. D'autres souches du genre *Clostridium* que *C. botulinum* produisent aussi des toxines botuliques et constituent les groupes IV<sup>5</sup>, V et VI (cf. tableau 1) des *Clostridium* producteurs de toxine botulique. Le groupe IV est protéolytique et les groupes V et VI sont non-protéolytiques.

Les *Clostridium botulinum* sont aussi classés en fonction du type de la toxine produite. Neuf types de toxines botuliques ont été identifiés : A, B, C, D, E, F, G, H et X mais principalement sept (A à G) sont pris en compte pour la classification des *Clostridium botulinum*. Le tableau 1 donne la correspondance entre les groupes et les types toxiniques. Le tableau 1 mentionne également les espèces de *Clostridium* apparentées aux *Clostridium botulinum*. Les espèces apparentées correspondent à des bactéries qui ont un profil biochimique et protéolytique similaire à celui des *Clostridium botulinum* mais qui ne produisent pas de toxine botulique.

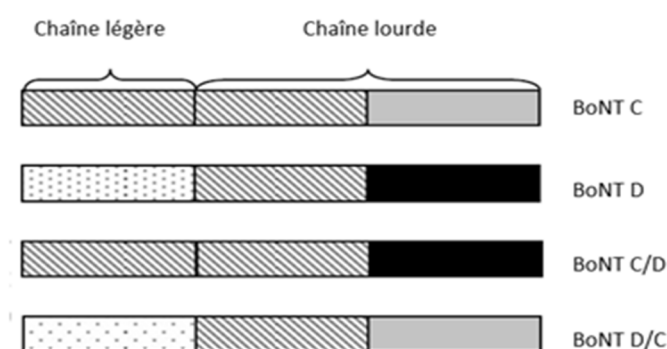
De façon générale, la classification liée au type de la toxine produite est la plus employée. Cette approche prend aussi en compte le fait que différentes souches de *Clostridium botulinum* sont capables de produire simultanément deux ou trois types de toxine botulique, le plus souvent avec des taux de production différents selon les toxines. Le type de la toxine produite majoritairement est indiqué en lettre majuscule et le type de la toxine minoritairement produite est indiqué en minuscule. Sont ainsi classifiées des souches de *Clostridium botulinum* Ba, Bf, Ab, Af, Bx, Bh et autres. Ces souches appartiennent généralement au

<sup>4</sup> <https://psn.dsmz.de/species/clostridium-botulinum>

<sup>5</sup> *Clostridium botulinum* groupe IV a été renommé *C. argentinense*

groupe I des *Clostridium botulinum* (Barash et Arnon 2014, Zhang *et al.* 2018, Poulain et Popoff 2019).

Il existe aussi des souches de *Clostridium botulinum* qui possèdent deux gènes codant chacun une toxine de type différent mais dont l'un des deux gènes est non fonctionnel ou silencieux suite à une ou plusieurs mutations. Ces souches sont référencées en notant en lettre majuscule le type de la toxine produite et en notant en lettre majuscule entre parenthèse le type de la toxine non produite. Il existe ainsi plusieurs souches productrices de toxine de type A référencées A(B) (Dineen, Bradshaw, et Johnson 2003). Il existe des *C. botulinum* dits mosaïques de type C/D et D/C qui, suite à des recombinaisons génétiques (Woudstra *et al.* 2012), synthétisent des neurotoxines botuliques de type C/D ou D/C. Ces toxines sont des hybrides des toxines de type C et D. La toxine mosaïque C/D est ainsi constituée de la chaîne légère de la toxine de type C et de la chaîne lourde de la toxine de type D. La toxine mosaïque D/C est constituée pour sa part de la chaîne légère de la toxine de type D et de la chaîne lourde de la toxine de type C (cf. figure n° 1).



**Figure 1 : Schéma de la structure des neurotoxines botuliques C, D, C/D et D/C.**

Ces dernières années, l'évolution de la biologie moléculaire et en particulier du séquençage a permis une meilleure connaissance des séquences des gènes codant la neurotoxine botulique. Au sein d'un même type, des différences de séquences ont été mises en évidence et ont conduit à une sous-classification en sous-types qui est appliquée à la fois aux toxines et aux souches productrices (Barash et Arnon 2014, Zhang *et al.* 2018, Poulain et Popoff 2019). Le tableau 1 indique les différents sous-types identifiés. Pour éviter une inflation dans la désignation de sous-types, à partir de 2015, la communauté scientifique a proposé qu'un nouveau sous-type ne soit validé que si sa séquence en acides aminés diffère de 2,6 % de celle des autres sous-types du même type (Peck *et al.* 2017).

**Tableau 1: Classification et caractéristiques physiologiques des *C. botulinum* et des espèces de *Clostridium* neurotoxigènes en conditions de laboratoire**(adapté de Peng Chen *et al.* (2012) ; Lund et Peck (2013), Popoff (2017), Moore et Lacey (2019) ; Anses (2020))

Groupe	Groupe I <i>C. botulinum</i> Protéolytique	Groupe II <i>C. botulinum</i> Non protéolytique	Groupe III <i>C. botulinum</i> Non protéolytique	Groupe IV <i>C. argentinense</i> Protéolytique	Groupe V <i>C. butyricum</i> Non protéolytique	Groupe VI <i>C. baratii</i> Non protéolytique
<b>Type de toxines</b>	A, B, F	B, E, F	C, D	G	E	F
Sous types de toxines	A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B8, bivalent B (Ba, Bf, Ab), F1, F2, F3, F4, F5, F8, X	E1, E2, E3, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E12, B4 ou non protéolytique B, F6 ou non protéolytique F	C, C/D, D, D/C	G	E4, E5	F7
<b>Gènes codant les toxines</b>	Chromosome/plasmide	Chromosome/plasmide	Phage	Plasmide	Plasmide	Plasmide
<b>Bactéries apparentées non toxigènes</b>	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. taeniosporum</i>	<i>C. novyi</i> <i>C. haemolyticum</i>	<i>C. subterminale</i> <i>C. proteolyticus</i> <i>C. schimacherense</i>	<i>C. butyricum</i>	<i>C. baratii</i>
<b>Protéolyse</b>	+	-	-	+	-	-
<b>Action saccharolytique</b>	-	+	-	-	+	+
<b>Croissance</b>						
Température optimale (°C)	35-40	25-30	37-40	37	30 -37	30-45
Température minimale (°C)	10	2,5	15	/	12	10
pH minimum	4,6	5	5,1	4,6	4,8	3,7
a <sub>w</sub> minimum	0,94	0,97	0,97	0,94	ND	ND
% NaCl inhibant la croissance	10	5	5	10	ND	8,5

Légende : « + » : présence ; « - » : absence ; ND : non déterminé

## 2.1.2 Gènes de la toxinogénèse

Selon les souches de *Clostridium botulinum*, le locus de la toxine botulique est intégré sur le chromosome bactérien ou est porté par des éléments mobiles non intégrés. Les éléments mobiles classiquement rencontrés sont des plasmides, des phages, des transposons ou encore des fragments d'ADN encadrés par des séquences d'insertion (Zhang *et al.* 2018). Le locus botulique des souches des groupes I et II est généralement localisé sur le chromosome mais peut être aussi porté par des plasmides de tailles variables. Le locus botulique des *Clostridium botulinum* du groupe III est localisé sur un phage non intégré au chromosome. Le locus botulique des souches du groupe IV est porté par un plasmide (Rummel et Binz 2013). La présence de loci botuliques sur des éléments mobiles expliquerait les échanges, les recombinaisons et la diversité des gènes codant les toxines botuliques.

*C. sporogenes* ou les souches de *C. botulinum* du Groupe II non-toxinogènes peuvent respectivement être identifiées comme *C. botulinum* du groupe I et II par insertion d'un élément mobile porteur des gènes codant les toxines botuliques et les protéines associées.

Pour les souches du groupe III, c'est un bactériophage qui véhicule le locus botulique, permettant à *C. novyi* ou *C. haemolyticum* de produire la toxine botulique. *C. butyricum* du groupe V et *C. baratii* du groupe VI sont également capables de produire des toxines botuliques, le locus botulique se situe sur un plasmide.

Certaines souches de *Clostridium botulinum* peuvent perdre l'élément mobile porteur du locus botulique et ne plus avoir la capacité de produire la toxine. Elles ne peuvent dès lors plus être considérées comme des *C. botulinum*.

De nouvelles espèces bactériennes ont récemment été identifiées comme porteuses de gènes apparentés à ceux codant des toxines botuliques (Mansfield et Doxey 2018) :

- *Enterococcus faecium* (qui porte le gène codant la toxine sur un plasmide) (Zhang *et al.* 2018)
- *Weissella oryzae* (Mansfield, Adams, et Doxey 2015)
- *Chryseobacterium piperi* et d'autres Actinobactéries (Mansfield *et al.* 2019, Wentz *et al.* 2017)

La toxicité de ces neurotoxines apparentées n'a cependant pas été démontrée et elles n'ont à l'heure actuelle jamais été rapportées comme étant à l'origine de cas de botulisme humain ou animal.

Des échantillons environnementaux provenant du système digestif de termites se sont montrés positifs pour des gènes bactériens ressemblant à ceux codant les toxines botuliques (Doxey, Mansfield, et Montecucco 2018).

## 2.1.3 Caractéristiques microbiologiques

### 2.1.3.1 Microscopie, macroscopie et métabolisme

Les *Clostridium botulinum* sont des bacilles droits de grande taille pouvant aller jusqu'à 20 µm de long et 0,6 µm de large. Les bactéries sont positives à la coloration de Gram. Les *Clostridium botulinum* ont une ciliature péritriche et sont mobiles. Ils ont la capacité de sporuler, ce qui permet aux souches de résister lorsque les conditions environnementales sont défavorables à la forme végétative. La forme sporulée est résistante vis-à-vis de certaines opérations humaines préventives ou curatives comme le traitement thermique ou la désinfection.

L'aspect macroscopique des colonies sur milieu gélosé est très hétérogène et il n'est pas possible de dégager des caractéristiques générales, d'autant que leurs caractères morphologiques évoluent souvent au cours de la culture. Certaines souches, par ailleurs, ne se développent qu'en milieu liquide.

Le métabolisme des *Clostridium botulinum* est de type chimio-organotrophe fermentaire, les produits terminaux du métabolisme étant des acides généralement de type acétique, butyrique et propionique. Les clostridies ont un type respiratoire anaérobie, certaines souches peuvent néanmoins se développer lorsqu'un faible taux d'oxygène est présent.

Du fait de leurs caractéristiques métaboliques, les espèces de *Clostridium* dont *C. botulinum* participent, dans la nature, à diverses réactions de dégradation de la matière organique. Le rôle physiologique des toxines botuliques n'est pas connu et leur présence n'est pas indispensable à la survie et à la croissance des souches de *Clostridium botulinum* (DasGupta 2006).



### 2.1.3.2 Conditions et mécanismes de croissance, de sporulation et de toxinogénèse

#### 2.1.3.2.1 Croissance

Les souches de *Clostridium botulinum* sont très majoritairement à métabolisme anaérobie stricte. La viabilité des cellules végétatives diminue graduellement en présence d'oxygène, de manière variable selon les souches. Cependant les spores de *C. botulinum* peuvent survivre pendant de longues périodes à l'air et peuvent germer en présence d'oxygène (Lund et Peck 2013). Les autres conditions permettant la croissance, en particulier la température, varient en fonction des groupes de *Clostridium botulinum*. Le tableau 1 (Popoff 2017) indique les températures de croissance pour les différents groupes de *Clostridium botulinum*. Ces températures de croissance sont assez similaires excepté pour le groupe II, dont la température optimale de croissance est plus basse de quelques degrés et dont les souches sont capables de se multiplier au froid, *i.e.* à partir de 3°C. La température de toxinogénèse est généralement similaire à celle de la croissance. Un pH inférieur à 5 inhibe en général la croissance et la toxinogénèse. Une forte concentration en sel (au-dessus de 5 %) inhibe la croissance des *Clostridium botulinum*, et donc la toxinogénèse.

#### 2.1.3.2.2 Spore et sporulation

La formation de spores bactériennes est observée dans de nombreux environnements naturels ou anthropisés (Carlin 2011). La formation en zone humide des spores de *C. botulinum* de type C, D ou E à partir des cadavres d'animaux en décomposition contribue probablement, outre à leur survie, à leur dispersion (Espelund et Klaveness 2014). Les stades de développement et de dormance des bactéries sporulantes, incluant les clostridies, peuvent être représentés sous la forme d'un cycle biologique comprenant la germination d'une spore, sa multiplication sous forme de cellules végétatives dont certaines produisent à leur tour des spores (Dürre 2014). Lors du processus de sporulation, les cellules végétatives se différencient pour donner des (endo)spores. Ces spores possèdent des capacités de résistance à des agents physiques ou chimiques sans commune mesure avec celles des cellules végétatives dont elles sont issues. Les spores bactériennes peuvent rester en dormance et sans activité métabolique pendant de très longues périodes et des durées de survie de plusieurs centaines à plusieurs milliers d'années ont pu être rapportées (Setlow 2014). La sporulation chez les *Clostridiaceae* est déclenchée par un appauvrissement du milieu environnant en nutriments et un signal de densité cellulaire (*quorum sensing*). Le déclenchement du processus de sporulation lui-même, ainsi que son rendement (*i.e.* le nombre et la proportion de cellules végétatives qui formeront une spore), sont variables selon les groupes et les souches et sont sous la dépendance de nombreux facteurs nutritionnels et environnementaux (Gauvry *et al.* 2017). Les mécanismes génétiques et moléculaires de la sporulation ont été abondamment décrits dans de nombreuses publications scientifiques (originales et synthèses), qui ne seront pas reprises ici car sans lien immédiat avec la thématique des saisines. La germination des spores est déclenchée par des stimuli de natures diverses. Cependant, dans les environnements naturels, les inducteurs de germination les plus probables sont généralement des molécules de petite taille, acides aminés, nucléosides, sucres, dont l'action peut être amplifiée par des co-facteurs (lactate, cations Na<sup>+</sup> ou K<sup>+</sup>, ou anions) (Setlow, Wang, et Li 2017). Malgré leurs différences, la sensibilité aux inducteurs de germination et les mécanismes de germination des souches appartenant aux différents groupes toxiques de *C. botulinum* seraient relativement proches (Brunt *et al.* 2016). La germination se traduit par une perte des propriétés de résistance de la spore et un retour à la vie végétative lorsque les conditions favorables à la multiplication des cellules (certaines sont rassemblées dans le tableau 1) sont présentes.

En conclusion, même si l'ensemble des traits et comportements évoqués est documenté de manière disparate pour *Clostridium botulinum* en général, et *a fortiori* pour ses différents types, on peut retenir que :

- La formation des spores de *C. botulinum* est possible dans un grand nombre d'environnements naturels, dont les cadavres d'animaux et est favorisée par des conditions anaérobies et un faible potentiel redox (croissance optimale autour de  $Eh = -350$  mV), des températures relativement élevées (> 20°C), la richesse en matières organiques utilisables comme nutriments et un pH proche du pH optimum de croissance (*i.e.* autour de 7,0).
- *A contrario*, des basses températures, un milieu pauvre en nutriments, ou aéré, fortement alcalin, acide ou à salinité élevée peuvent créer des conditions peu favorables à la formation des spores de *C. botulinum*.

- Même si la formation des spores et leur germination sont des événements importants dans le cycle épidémiologique des *C. botulinum* de tous types, la production de la (des) toxine(s) botulique(s) est l'élément déterminant dans l'apparition des cas de botulisme chez l'être humain ou l'animal.

### 2.1.3.2.3 Toxinogénèse

Les quelques travaux relatifs à la régulation de la synthèse des neurotoxines botuliques ne peuvent donner une vision exhaustive des facteurs modulant la synthèse des neurotoxines de tous les types de *C. botulinum* (Connan et al. 2013). Néanmoins, ils établissent raisonnablement que :

- Même si des facteurs physiques (tels que la température) ou nutritionnels modulent la synthèse des neurotoxines botuliques, celle-ci est possible pour tous les types de *C. botulinum* dans une très large variété de conditions environnementales et est favorisée par les mêmes conditions que celles favorisant la production des spores.

- La synthèse des neurotoxines se produit préférentiellement en fin de phase exponentielle – début de phase stationnaire de la courbe de croissance des cellules végétatives et décline pendant la phase stationnaire

- Même si la co-régulation de la synthèse des neurotoxines avec les mécanismes de sporulation varie selon les types de *C. botulinum*, les neurotoxines sont produites, que le processus de multiplication aboutisse ou non à la sporulation.

## 2.2 Les toxines botuliques

### 2.2.1 Classification

Les toxines botuliques sont des toxines protéiques généralement produites par *Clostridium botulinum*, *Clostridium argentinense* et quelques souches de *Clostridium butyricum* et *Clostridium baratii*. Elles sont produites dans la nature sous la forme de complexes constitués de différentes protéines dont l'activité toxicologique est portée par une neurotoxine botulique (*botulinum neurotoxin*, BoNT).

Les neurotoxines botuliques constituent une famille de toxines qui ont une structure chimique et des propriétés toxicologiques similaires mais qui se distinguent entre elles par leurs caractéristiques immunogéniques. Cette variabilité du pouvoir immunogène a été utilisée pour classifier les neurotoxines botuliques en neuf types ou sérotypes (A à H et X).

Au-delà de ces différences immunologiques, les différents types de neurotoxines botuliques se distinguent aussi par des différences au niveau de :

- La spécificité d'hôtes ;
- Leurs cibles moléculaires ;
- Leur toxicité.

#### 2.2.1.1 Sous-types

Des réponses immunologiques variables à des neurotoxines appartenant au même type ont été mises en évidence et le séquençage des gènes codant les BoNT a montré qu'il existait au sein de certains types des variants, appelés sous-types, se distinguant entre eux par des différences de séquence. En fonction des acides aminés touchés par les mutations, les sous-types peuvent présenter des caractéristiques distinctes au niveau de leur toxicité (p.ex. fixation sur les récepteurs, entrée dans les cellules cibles), de leur mode d'action (p. ex. activité enzymatique de la chaîne légère), de leurs propriétés physico-chimiques (p.ex. stabilité), de leur antigénicité (p.ex. neutralisation par des anticorps à finalité thérapeutique) (Mazuet *et al.* 2016).

## 2.2.2 Structure

### 2.2.2.1 Structure du complexe botulique

Les BoNT sont synthétisées simultanément avec d'autres protéines (NTNH : Non toxique Non Hémagglutinante, Ha : Hémagglutinines et Orf<sup>6</sup>) et forment des complexes protéiques aussi appelés *Progenitor Toxin Complex* (PTC) qui diffèrent selon les types de toxines. Les complexes des types A (sauf certains sous-types A1, A2, A3 et A4) forment des structures de type M (association de la neurotoxine et de la NTNH), de type L (association de la neurotoxine, de la NTNH et des hémagglutinines) et de type LL (dimère de la forme L). Les complexes de types B, C, D et G forment des structures de type M et L. Les complexes de type E, F et X forment des structures de type M. Les formes complexes sont stables à des pH acides mais se dissocient généralement lorsque le pH est neutre ou alcalin pour libérer la BoNT (Anderson *et al.* 2009). Cette propriété permettrait, lors d'une contamination par voie digestive, le transport de la BoNT sous forme de complexe jusqu'à la circulation sanguine (mécanisme encore mal connu) où il se dissocie et libère la BoNT. L'étude de la toxicité de la toxine botulique chez la souris montre le rôle protecteur du complexe *vis-à-vis* des enzymes digestives et de l'acidité de l'estomac. Par voie digestive, la dose létale de la BoNT de type A sous forme libre est 16 fois plus élevée que sous forme de complexe. Cependant, par voie intrapéritonéale, la BoNT libre et la BoNT sous forme de complexe, ont une dose létale identique (Cheng *et al.* 2008). Chez l'être humain, les mécanismes et conditions de passage des toxines botuliques du tube digestif vers la circulation sanguine sont mal connus et il n'existe pas de données bibliographiques pour les toxines de type C et D.

### 2.2.2.2 Structure de la neurotoxine botulique

Quels que soient leurs types, les neurotoxines botuliques sont synthétisées sous la forme d'une chaîne polypeptidique monocaténaire puis sont transformées post-traductionnellement en une molécule double chaîne constituée d'une chaîne dite légère (LC) de 448 acides aminés, d'un poids moléculaire de l'ordre de 50 kD et d'une chaîne dite lourde de 100 kD (HC) de 832 acides aminés. Les deux chaînes sont reliées entre elles par un pont disulfure. La chaîne légère porte l'activité biologique de la neurotoxine. Le clivage du pont disulfure reliant les deux chaînes de la neurotoxine est généré dans les neurones soit par des protéases synthétisées par la bactérie productrice (cas généralement des souches protéolytiques), soit par les protéases ubiquistes de l'hôte contaminé. Les neurotoxines ont un poids moléculaire de l'ordre de 150 kD avec quelques variations en fonction de leur séquence en acides aminés.

Les BoNT sont structurées en 4 domaines :

- Le domaine L-terminal qui correspond à la chaîne légère (enzyme endopeptidase de type métalloprotéase zinc dépendante) ;
- Le domaine de translocation (H<sub>N</sub>) ;
- Le domaine « *belt region* » dont le rôle supposé est d'assurer une protection de la neurotoxine contre des clivages non spécifiques ;
- Le domaine de liaison aux récepteurs (H<sub>C</sub>).

Les structures primaire et tertiaire des neurotoxines botuliques vont influencer sur les propriétés des neurotoxines, en particulier sur leur toxicité, leur spécificité d'hôtes et leurs caractéristiques immunologiques.

<sup>6</sup> Les protéines Orf (1 à 3) sont synthétisées par les souches productrices de toxines BoNT/E et F et de certaines neurotoxines de sous-types A (A1Ha-, A2, A3, A4). Le rôle physiologique de ces protéines est inconnu mais il est supposé qu'elles pourraient jouer un rôle dans l'expression, le transport et la régulation de la BoNT (Hill *et al.* 2009). La possibilité de l'association des protéines Orf avec la BoNT et la NTNH pour former un complexe botulique est discutée. Kalb *et al.* (2017) ont démontré la présence des protéines Orf dans un complexe de type E mais il semblerait que la liaison des protéines Orf à la BoNT et à la NTNH soit moins forte que celles des protéines HA.

### 2.2.3 Mécanisme d'action

Quel que soit le type ou le sous-type, les neurotoxines botuliques ont le même mécanisme d'action qui conduit à l'inhibition de la libération de l'acétylcholine (Tehran et Pirazzini 2018, Lindström et Korkeala 2006). Le mode d'action des neurotoxines botuliques se décline en quatre étapes (cf. figure 2) : fixation sur les récepteurs localisés sur la terminaison du neurone cible, internalisation dans la terminaison nerveuse sous la forme d'un complexe BoNT/récepteur *via* une vésicule d'endocytose, translocation de la chaîne légère du compartiment vésiculaire vers le cytosol après rupture du pont disulfure et action protéolytique de la chaîne légère sur sa protéine cible du complexe SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment receptor*). Les protéines SNARE forment des complexes hétérodimériques déclencheurs de la fusion membranaire et de la libération des neurotransmetteurs. Selon son type, chaque BoNT a comme substrat un SNARE spécifique et un site de clivage propre.

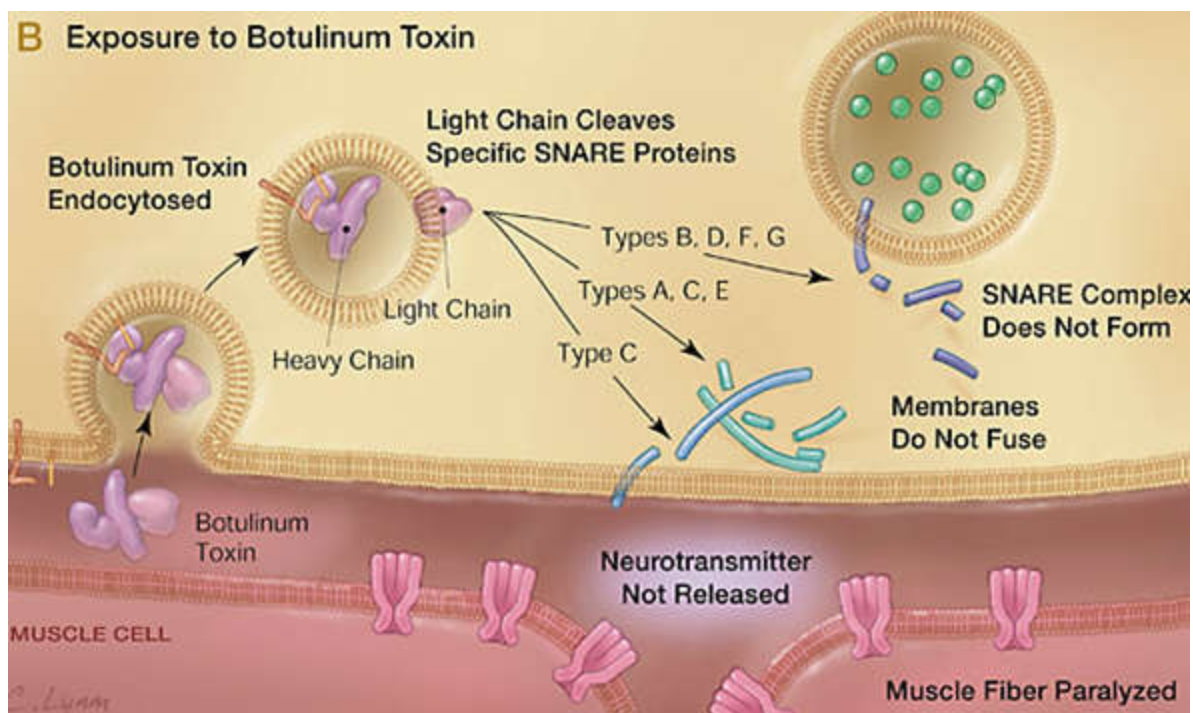


Figure 2 : Schéma du mode d'action des neurotoxines botuliques dans les neurones (en jaune sur le schéma) (Arnon *et al.* 2001)

#### 2.2.3.1 Fixation sur les récepteurs

La partie C-terminale de la BoNT assure la liaison aux récepteurs qui sont des gangliosides (un type de glycosphingolipides) et une protéine membranaire des vésicules synaptiques. La protéine vésiculaire varie selon le type de BoNT. À titre d'exemple, le type A a pour récepteur la protéine SV2 et le type B la protéine synaptotagmine (Poulain *et al.* 2009). La neurotoxine se fixe d'abord sur le ganglioside puis sur la protéine vésiculaire.

#### 2.2.3.2 Internalisation et translocation

La neurotoxine est internalisée dans le cytoplasme cellulaire via les vésicules synaptiques. La partie N-terminale va ensuite permettre la translocation de la chaîne légère de l'endosome vers le cytosol. La translocation est précédée d'une rupture du pont disulfure entre la chaîne lourde et la chaîne légère, seule la chaîne légère sort de la membrane vésiculaire.

### 2.2.3.3 Activité protéolytique

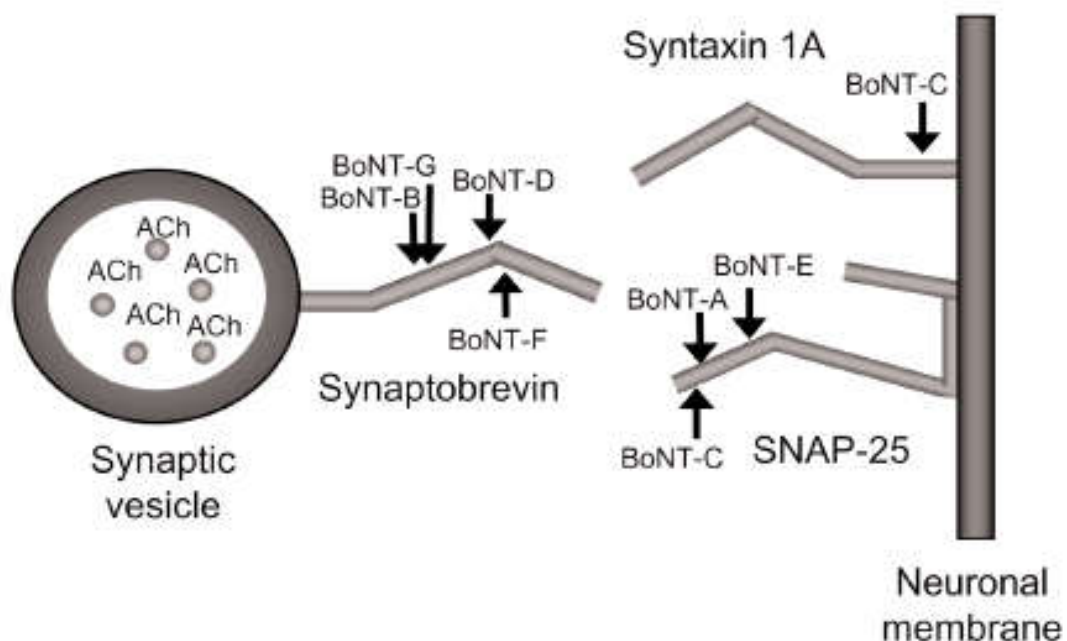
La chaîne légère a une activité enzymatique endoprotéasique de type métalloprotéase zinc dépendante qui cible des protéines de la famille des SNARE. Les protéines SNARE forment des complexes hétérodimériques déclencheurs de la fusion membranaire et de la libération des neurotransmetteurs comme l'acétylcholine. Selon son type, chaque BoNT a comme substrat un SNARE spécifique et/ou un site de clivage propre (cf. figure 2).

Les BoNTs A et E clivent la SNAP-25 (*Synaptosomal-Associated Protein-25*, protéine de 206 acides aminés associée aux membranes lipidiques via des cystéines), un des constituants du complexe SNARE. La BoNT A clive la SNAP25 après un résidu glutamique (en position 197) et la BoNT E la clive après un résidu arginine en position 190.

Les BoNTs de type B, D, F, G, H clivent la VAMP2 (*Vesicle-associated membrane protein 2*, encore appelée synaptobrevine) au niveau des résidus glutamine 76 (BoNT B), glutamine 58 (BoNT F), lysine 59 (BoNT D), alanine 81 (BoNT G), leucine 54 (BoNT H). Néanmoins certains sous-types peuvent cliver la protéine cible au niveau d'un résidu différent : c'est le cas du sous-type F5 qui ne clive pas la VAMP2 au niveau de la glutamine 58 mais au niveau de la leucine 54 (Kalb *et al.* 2015).

La BoNT C est à la fois capable de cliver la SNAP25 (résidu arginine en position 188) et la syntaxine (résidu lysine 253).

Le clivage des SNARE par les BoNTs se traduit physiologiquement par l'inactivation des protéines impliquées dans la libération du neurotransmetteur acétylcholine. L'acétylcholine intervient dans la contraction des muscles. La diminution du taux d'acétylcholine libérée se traduit par une baisse de la contraction musculaire et l'apparition d'une paralysie flasque.



**Figure 3 : Interaction des BoNTs avec les SNARES**

(Barr *et al.* 2005).

La diversité des sites de clivage selon les types de toxines pourrait expliquer les différences observées en termes de nature, délai d'apparition et de durée des signes cliniques.

*Clostridium botulinum* est constitué d'un ensemble de souches bactériennes du genre *Clostridium* dont le point commun est la capacité à synthétiser de la toxine botulique. Les souches de *Clostridium* productrices de toxines botuliques sont classées aujourd'hui en six groupes (groupes I à VI) en fonction de leurs caractéristiques biochimiques (notamment protéolytiques) et génétiques.

Les souches sont aussi classées en fonction du type de toxine produite. Les toxines botuliques se divisent en neuf types (A à H et X) selon leurs propriétés immunologiques. Les neurotoxines botuliques conduisent toutes à l'inhibition de la libération synaptique de l'acétylcholine avec des mécanismes d'action qui leur sont propres. Les différents types de neurotoxines botuliques se distinguent par des différences au niveau de la spécificité d'hôte, de leurs cibles moléculaires et de leur toxicité. La diversité des sites de clivage selon les types de toxines pourrait expliquer les différences observées en termes de nature, de délai d'apparition et de durée des signes cliniques.

Les *Clostridium botulinum* se présentent dans l'environnement sous forme végétative ou sporulée. La capacité à sporuler leur confère une résistance lorsque les conditions environnementales sont défavorables à la forme végétative. La forme sporulée est en particulier résistante vis-à-vis de certaines opérations préventives ou curatives comme le traitement thermique ou la désinfection. La formation des spores de *C. botulinum* est possible dans un grand nombre d'environnements naturels, dont les cadavres d'animaux, et est favorisée par des conditions anaérobies et un faible potentiel redox, des températures relativement élevées (> 20°C), la richesse en matières organiques et un pH proche du pH optimum de croissance (*i.e.* autour de 7,0). *A contrario*, des basses températures et un milieu pauvre en nutriments, ou aéré, fortement alcalin, acide ou à salinité élevée peuvent créer des conditions peu favorables à la formation des spores de *C. botulinum*.

La synthèse des neurotoxines de tous les types de *C. botulinum* est possible dans une très large variété de conditions environnementales et est favorisée par les mêmes conditions que celles favorisant la multiplication des cellules et *in fine* la production des spores.

## 2.3 Information sur les méthodes analytiques

La suspicion clinique de botulisme est confirmée par la détection et l'identification d'une toxine botulique dans le sérum, dans les sécrétions gastriques, les selles, les vomissements ou les sources alimentaires, ou encore par la détection de la bactérie *C. botulinum* dans les selles, les échantillons de plaies ou les sources alimentaires.

En médecine vétérinaire, la toxine botulique est recherchée dans le sérum directement ou après culture anaérobie et enrichissement à partir des fèces, des contenus digestifs, de l'estomac ou des pré-estomacs chez les ruminants et des organes internes comme le foie. La source peut être recherchée dans les aliments, les silos, l'environnement.

Hobbs *et al.* (2019) donnent quelques exemples :

- Culture : réalisée le plus souvent sous forme d'un enrichissement en bouillon en condition anaérobie : recherche de la toxine dans les surnageants de culture et isolement à partir du culot. Un choc thermique peut être réalisé préalablement pour éliminer les formes végétatives. Il n'y a pas de norme internationale : les temps et la température du choc thermique sont variables suivant les études. Les milieux d'isolement ne sont ni sélectifs, ni ne permettent d'obtenir des colonies caractéristiques.

- MBA (*Mouse Bio assay* - détection et typage de la toxine) : pour réduire le nombre de souris, les injections intrapéritonéales sont réalisées sur deux souris seulement par étape (détection, titration, neutralisation) et les dilutions le plus souvent de dix en dix seulement. Elle reste la méthode de référence.

- PCR (détection des gènes codant les différents types de toxines) : réalisable sur différentes matrices, le plus souvent sur un bouillon d'enrichissement (*cf.* culture), en temps réel.

- Techniques immunologiques directes :

- ELISA : les techniques sont très variables suivant les publications et en pratique elles ne sont pas utilisées en routine en France. Elles servent à mettre en évidence la toxine à partir de prélèvements ou de surnageant de culture.

- Envers les toxines, sont principalement utilisées des ELISA sandwich : il est nécessaire de faire une gamme dans chaque série et d'y insérer des témoins. Ces dispositifs ne sont pas toujours commercialisés et ont été développés en interne aux laboratoires. La qualité des anticorps et la validation sont des points critiques.
- *Immunochromatography assay* : ELISA sur puce (*on chip*) ou sur colonne
- D'autres méthodes (*Lateral flow assay*, cytométrie de flux, *electrochemical impedance spectroscopy* utilisation de *biosensors*) sont citées mais non disponibles en général dans les laboratoires.

- Mise en évidence de l'activité endopeptidasique de la neurotoxine botulique. Les protéines cibles (SNAP, VAMP) généralement sous forme recombinante ou des peptides mimant les protéines cibles sont utilisés comme substrat. Les produits de clivage témoins d'une activité endopeptidasique peuvent être mis en évidence par des techniques immunologiques ou de spectrométrie de masse (Maldi-TOF ou LC/MS/MS) ou par fluorescence (peptides marqués par un composé fluorescent). Cette méthode est prometteuse et au moins aussi sensible que le MBA (Rosen *et al.* 2015).

- Sérologie ELISA : démonstration de la présence d'anticorps chez des animaux présentant des signes cliniques (approche théorique peu utilisée en pratique) ou pour contrôler l'efficacité d'une vaccination.

Dans le cadre européen, et en raison de la faible fréquence des foyers de botulisme (marché étroit), des techniques spécifiques nécessitant des outils parfois onéreux (animalerie, automates, MALDI-TOF), d'une réglementation rigoureuse, la France a opté pour une stratégie (distincte de celle des autres Etats membres), centrée sur le CNR, le LNR et un laboratoire vétérinaire pour le diagnostic des cas chez les animaux d'élevage ou la faune sauvage.

Ces différentes méthodes seront décrites et développées dans les chapitres suivants, l'approche pour la médecine humaine (cf. 4.1.4 « Confirmation du diagnostic et tests de laboratoire »), la médecine vétérinaire (cf. 5.2.2 « Méthodes de diagnostic utilisées au laboratoire et leurs limites »), les denrées (cf. 6.1.1 « Méthodes mises en œuvre pour déterminer la prévalence de *Clostridium botulinum* dans des échantillons alimentaires ») et l'environnement (cf. 7.2.4 « Méthodes d'évaluation de l'efficacité désinfectante des produits biocides dans le cadre d'une autorisation de mise sur le marché » et 7.2.5 « Protocole de désinfection et validation des opérations de décontamination ») pouvant différer.

## 2.4 Réglementation

### 2.4.1 Réglementation européenne (santé animale et sécurité sanitaire des aliments)

Le botulisme animal n'est pas retenu, dans le cadre de l'*Animal Health Law* (AHL-règlement UE 2016/429 du parlement et du conseil) dans la réglementation européenne, parmi les maladies animales vis-à-vis desquelles s'appliqueront en 2021 des mesures de surveillance, de prévention et/ou de lutte.

En revanche, le « botulisme et agents responsables » figurent dans la liste des zoonoses et agents zoonotiques à surveiller en fonction de la situation épidémiologique, figurant dans l'annexe I-B de la Directive 2003/99/CE du Parlement européen et modifiée par le Conseil du 17 novembre 2003. Cette directive établit pour chaque État la nécessité de recueillir des informations pertinentes permettant, au niveau de la production primaire et/ou aux autres stades de la production alimentaire, d'identifier et caractériser les dangers, d'évaluer l'exposition et de définir les risques liés aux zoonoses et aux agents zoonotiques. Un rapport sur ces maladies est transmis annuellement à la Commission.

Il n'existe pas, par ailleurs, de critère microbiologique dans la réglementation européenne pour la détection de *C. botulinum* dans les aliments. Toutefois, selon l'article 14 du Règlement (CE) 178/2002, aucune denrée alimentaire n'est mise sur le marché si elle est préjudiciable à la santé ou impropre à la consommation humaine. La recherche de *C. botulinum* dans les aliments n'est pas pratiquée en routine, car la recherche de la toxine ne peut se faire que dans des conditions de sécurité particulières (cf. *infra*).

## 2.4.2 Aspects réglementaires en santé publique en France

En France, le botulisme humain est une maladie à déclaration obligatoire de catégorie 1, ie maladie qui nécessite une intervention urgente locale, nationale ou internationale et une surveillance pour la conduite et l'évaluation des politiques publiques au sens de l'article L 3113-1 du code de la santé publique. Sa déclaration est individualisée de celle des autres toxi-infections alimentaires collectives depuis 1986. Le diagnostic clinique d'un seul cas, même en l'absence de confirmation biologique, doit donner lieu à un signalement immédiat qui permet aux autorités sanitaires (Santé Publique France, Agences régionales de santé et Directions départementales de la protection des populations) de réaliser des investigations épidémiologiques et vétérinaires afin d'identifier l'origine de la contamination et de prévenir la survenue d'autres cas par la mise en œuvre de mesures de contrôle et de prévention adaptées (retrait d'un aliment contaminé de production familiale, artisanale ou industrielle). Depuis 1998, le CNR des bactéries anaérobies et du botulisme participe à la surveillance du botulisme humain en signalant les cas confirmés biologiquement à Santé Publique France.

(<https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-infectieuses-d-origine-alimentaire/botulisme/notre-action/#tabs>).

## 2.4.3 Aspects réglementaires en santé animale en France

Le botulisme animal est réglementé en France depuis 2006, année pour laquelle le botulisme chez les volailles, notamment en raison de l'émergence récente et jugée préoccupante de foyers de type E, a été inclus dans la liste des maladies réputées contagieuses (décret 2006-178 du 17/02/2006 portant création d'une liste de maladies réputées contagieuses et modifiant le code rural (art. D.223-21)). Cette disposition a été complétée par l'inscription du botulisme chez les oiseaux sauvages et du botulisme chez les bovins dans la liste des maladies animales à déclaration obligatoire (décret 2006-179 du 17-02-2006 portant création d'une liste de maladies à déclaration obligatoire et modifiant le code rural (art. D.223-1)). La forte hausse du nombre de foyers déclarés dans les élevages de volailles a justifié, par ailleurs, la mise en place en 2012 d'un laboratoire national de référence (LNR) pour le botulisme aviaire à l'Anses -Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, site de Ploufragan (arrêté du 29/12/2009).

La réglementation a été renforcée en 2013, suite aux États Généraux du Sanitaire et à la catégorisation des dangers sanitaires en santé animale : le botulisme y a été pris en compte quelle que soit l'espèce animale atteinte. En application des articles L. 201-1 et D. 201-1 à D. 201-4 du code rural et de la pêche maritime créant une liste de dangers sanitaires, le botulisme a en effet été inscrit comme danger sanitaire de première catégorie chez « toutes les espèces sensibles » (arrêté du 29/07/2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces animales).

En rendant obligatoire la déclaration de toute suspicion de botulisme quelle que soit l'espèce animale atteinte (domestique ou sauvage), cette disposition a facilité la surveillance épidémiologique de la maladie. En revanche, bien qu'un projet d'arrêté ministériel fixant les mesures techniques et administratives relatives à la lutte contre le botulisme aviaire (chez les volailles) ait été transmis pour avis à l'AFSSA (saisine 2008-SA-0282), aucun arrêté fixant des mesures de lutte à appliquer en cas de suspicion et de confirmation du botulisme chez les volailles n'a été publié. Rien n'a été défini non plus, réglementairement, pour gérer les foyers de botulisme chez les oiseaux sauvages, les bovins ou les autres espèces animales sensibles visées dans l'arrêté du 29/07/2013. En cas de déclaration, le Préfet a néanmoins la prérogative de décider, en fonction de la situation et sur la base de conseils fournis par la DGAL, de prendre un Arrêté préfectoral de mise sous surveillance (APMS), remplacé par un Arrêté préfectoral de déclaration d'infection (APDI) en cas de confirmation, fixant les mesures à appliquer dans les élevages atteints.

La vaccination des animaux contre le botulisme ne fait l'objet d'aucune réglementation spécifique, et elle reste possible en élevage à la demande des éleveurs ou sur proposition du vétérinaire traitant. Aucun vaccin ne disposant d'une AMM en France, le choix doit se porter sur des vaccins bénéficiant d'une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) délivrée par l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire (ANMV). Un seul vaccin bénéficiant actuellement d'une ATU (ATU 90005) est indiqué pour l'immunisation des bovins et des ovins contre le botulisme C et D.



#### 2.4.4 Règlements du botulisme et analyses biologiques

*Clostridium botulinum* et les toxines botuliques sont classés dans l'annexe 2 de la liste des « micro-organismes et les toxines (MOT) dont l'emploi serait de nature à présenter un risque pour la santé publique » prévue à l'article L. 5139-1 du code de la santé publique et figurant dans l'arrêté du 30 avril 2012. À cet égard, selon l'article R. 5139-1 du code de la santé publique, toute opération de production, de fabrication, de transport, d'importation, d'exportation, de détention, d'offre, de cession, d'acquisition et d'emploi portant sur les MOT et sur les produits en contenant est soumise à une autorisation délivrée par le directeur général de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM). Cette réglementation s'applique à tous les laboratoires d'analyse médicale (LABM), vétérinaire, d'enseignement, de recherche, producteurs de médicament, de réactif ....

Néanmoins, afin de permettre la réalisation des analyses de diagnostic, des dérogations sont précisées à l'article 2 et pour les laboratoires au 3° paragraphe :

« Art.R. 5139-2. Sont dispensées de l'autorisation mentionnée à l'article R. 5139-1 en particulier 3° Les opérations autres que la cession, l'importation et l'exportation réalisées par les établissements recevant des échantillons biologiques aux seules fins d'analyse de biologie médicale ou vétérinaire. Cette dispense vaut seulement pour les échantillons biologiques conservés moins de trente jours au sein de ces établissements, sauf décision contraire du ministre chargé de la santé, du juge administratif ou du juge judiciaire ».

Concernant le botulisme animal, tous les prélèvements autres que ceux relevant des analyses de biologie vétérinaire (tels que les aliments ou les échantillons environnementaux) ne rentrent pas dans le cadre de ces dérogations et ne peuvent donc être analysés que par des laboratoires détenant les autorisations délivrées par l'ANSM. Seuls le CNR, le LNR et quelques laboratoires vétérinaires sont concernés pour le diagnostic de botulisme (humain ou animal, selon leurs agréments).

Il faut signaler, cependant, que la liste actuelle des MOT est en cours de réévaluation par l'ANSM<sup>7</sup>, et il est envisagé d'en retirer les types botuliques peu ou pas pathogènes pour l'être humain (les types C et D et leurs mosaïques seraient pressentis). Cette modification réglementaire aurait pour conséquence un allègement des contraintes pour les laboratoires concernés et une simplification des analyses dans le domaine vétérinaire, en particulier pour les analyses d'échantillons qui ne sont actuellement pas incluses dans la dérogation (aliments, échantillons d'environnement...).

Par ailleurs, *C. botulinum* est classé dans le groupe 2 des agents pathogènes (Arrêté du 18 juillet 1994 fixant la liste des agents pathogènes, modifié en dernier lieu le 16 février 2018), impliquant un confinement de classe L2 et les mesures de protection de ce niveau. Les arrêtés du 16 juillet 2007 fixent les mesures de protection des travailleurs dans les établissements où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques.

À l'échelon européen (UE), le botulisme n'est spécifiquement pris en compte que dans le cadre des dispositions encadrant la surveillance des zoonoses et des agents zoonotiques (Directive 2003/99/CE) et la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail (Directive 2000/54/CE).

À l'échelon national, le botulisme est une maladie à déclaration obligatoire, tant chez l'être humain que chez l'animal (quelle que soit l'espèce atteinte). Dans ce cadre, toute suspicion de botulisme humain implique (article L3113-1 du code de la santé publique) sa déclaration à l'agence régionale de santé (ARS) et sa confirmation biologique par le CNR des bactéries anaérobies et du botulisme (Institut Pasteur de Paris). Pour les animaux, chez lesquels *Clostridium botulinum* est classé comme danger sanitaire de 1<sup>ère</sup> catégorie (article L201-1 du code rural et de la pêche maritime), toute suspicion implique un signalement à la direction départementale en charge de la protection des populations (DDPP) et sa confirmation biologique par le LNR (Anses / Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort - site de Ploufragan) et le CNR). À l'échelle nationale, les mesures de gestion à appliquer dans les élevages atteints ne sont pas actuellement définies réglementairement. En cas de foyer, les DDPP s'appuient entre autres sur les anciens avis de l'AFSSA. Placées sous l'autorité des préfets, elles interviennent également à la demande de l'ARS pour effectuer les investigations épidémiologiques nécessaires pour identifier les aliments contaminés dans les foyers de botulisme humain.

<sup>7</sup> Le processus de réévaluation par l'ANSM est consultable sur leur site : [https://www.ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/a957](https://www.ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/a957) (consulté le 12/01/2021)

La réalisation des analyses biologiques nécessaires au diagnostic du botulisme humain et animal, qui relève des dispositions sur la protection des travailleurs (article R4421-3 du code du travail), est aussi soumise à la réglementation des « micro-organismes et toxines » (MOT) (article L5139-1 du code de la santé publique). À cet égard, on notera que la liste actuelle des MOT est en cours de réévaluation afin d'en retirer les types botuliques peu ou pas pathogènes pour l'être humain (les types C et D et leurs mosaïques seraient pressentis), ce qui devrait faciliter, dans le domaine vétérinaire, les contraintes du LNR et des laboratoires ayant à analyser les échantillons biologiques provenant des animaux suspects, comme les échantillons environnementaux.

## 3 *Clostridium botulinum* et environnement

### 3.1 Distribution et prévalence de *C. botulinum*

Comme Dodds (1992), Espelund et Klaveness (2014) ont souligné l'omniprésence de *C. botulinum* sur tous les continents dans les sols, poussières, sédiments marins et lacustres, zones humides, rivières et lacs.

Les études font cependant ressortir une certaine variabilité en fonction des pays, régions et environnements. Les différences observées tiennent sans doute aux caractéristiques des différentes souches et espèces de *C. botulinum* qui y sont détectées et de leur possibilité de croissance et de survie en fonction des facteurs biotiques et abiotiques caractérisant les différents écosystèmes qui y sont rencontrés. Cette variabilité peut aussi résulter de l'origine des données, issues, soit de la détection des foyers de botulisme humain et/ou animal, soit, de la recherche de la bactérie et sa quantification dans les sols et sédiments. Dans ce dernier cas, les résultats sont généralement exprimés qualitativement en termes de « présence/absence » et en pourcentages de positifs parmi les échantillons prélevés, ce pourcentage traduisant la prévalence observée dans les zones étudiées ; il faut tenir compte, cependant, du choix des sites d'études (découlant souvent des observations d'épisodes de botulisme), du nombre d'échantillons analysés et de la sensibilité et de la spécificité des méthodes de détection utilisées, les spores étant en général présentes en faible quantité dans les sols (Le Maréchal *et al.* 2018, Williamson, Rocke, et Aiken 1999).

Les experts résumant les informations relatives aux variations dans la distribution géographique des types de *C. botulinum* qui ont été bien documentées par Espelund et Klaveness (2014), nous nous contenterons d'en résumer les grandes lignes. Les types A et B sont les plus largement détectés dans le monde, mais avec une prévalence variable selon le continent et la zone géographique, comme c'est le cas en Amérique du Nord où le type A est plus fréquemment détecté dans la partie Ouest, alors que le type B domine dans les sols de la partie Est (Shapiro, Hatheway, et Swerdlow 1998, Smith 1975), et le type E est surtout présent dans la région des Grands Lacs et celle du Pacifique nord. En Europe, en revanche, le type B prédomine dans les sols, contrairement au type A qui est assez rarement détecté (Smith 1978, Smith et Young 1980). A l'exception de l'isolement d'une souche en Argentine signalé par Raphael (Raphael *et al.* 2012), le type E est détecté seulement dans les zones septentrionales de l'hémisphère nord, où il prédomine dans les sédiments des zones côtières, des estuaires et des lacs, alors qu'il devient plus rare à l'intérieur des terres où prédomine le type B, comme l'ont montré Huss (Huss 1980) au Danemark.

Les données de distribution géographique des *Clostridium* du groupe 3 sont généralement limitées aux types C et D, car elles sont issues d'études anciennes reposant sur l'identification de la toxine et ne permettent pas la caractérisation des types mosaïques C/D ou D/C. Ces études montrent que les types C et D (ce dernier étant moins commun) sont détectés dans l'environnement naturel (zones humides) dans au moins une trentaine de pays sur tous les continents (à l'exception de l'Antarctique) où ils sont révélés par des épisodes de botulisme dans l'avifaune sauvage.

Tous les types botuliques sont présents en Europe. Il n'existe pas d'historique sur leur distribution et leur prévalence en France. Néanmoins les premiers résultats d'une étude en cours (Le Maréchal *et al.* 2020) soulignent la large prédominance du type B (34 % dans 88 échantillons de sol analysés) par rapport aux autres types détectés.

Dans le contexte de la saisine ayant initié le présent rapport, les prochains chapitres seront focalisés sur le botulisme dû aux types C, D, C/D, D/C et E, en présentant successivement leur place dans les espaces naturels et dans les espaces agricoles.

## 3.2 Ecologie de *C. botulinum* (types C, D, C/D, D/C et E) dans les espaces naturels

### 3.2.1 Réservoirs et vecteurs mécaniques<sup>8</sup> impliqués dans le cycle biologique de *C. botulinum*

*C. botulinum* est naturellement présent dans l'environnement, où il peut être retrouvé sous formes sporulée et végétative, de même que ses toxines. Les spores, qui assurent sa pérennité dans le milieu extérieur, sont détectées dans une grande variété de milieux naturels, au sein desquels les sols et sédiments apparaissent comme le réservoir (réservoir tellurique) et la source primaire de contamination pour les nombreuses espèces animales sensibles ou non au botulisme. Pour les types C, D et mosaïques, le réservoir tellurique est principalement représenté par les sédiments des zones humides (marais, lacs, étangs). Le type E est principalement inféodé à des écosystèmes aquatiques (marins ou d'eau douce) dans des régions plus froides.

La germination des spores présentes dans les sols et la multiplication des formes bactériennes végétatives associée à la production de toxine sont conditionnées par les effets conjugués, en certains sites, de différents facteurs abiotiques et biotiques (Palmer *et al.* 2019). Ces facteurs incluent la température, le pH, la disponibilité en eau et le potentiel redox, la salinité (la tolérance au NaCl est plus faible pour les types C et D que pour les types A, B ou E), le taux d'oxygène (dont la réduction est favorisée par l'eutrophisation des plans d'eau) qui doit être suffisamment bas et la quantité de matières organiques disponibles. Les types C et D sont exigeants en matière organique et l'accumulation de ces matières contribue en outre à accentuer les conditions d'anoxie du milieu (Anza *et al.* 2014, Espelund et Klaveness 2014, Roberts et Gibson 1979, Vidal *et al.* 2013). Les éléments organiques sont apportés par les végétaux en décomposition (au sein desquels il peut y avoir multiplication et production de toxine), mais l'apport de matières organiques animales (déjections et surtout les cadavres d'animaux) aurait un rôle facilitant primordial pour ce groupe bactérien (Roberts et Gibson 1979). Il faut aussi tenir compte des compétitions bactériennes, comme semble l'indiquer l'observation, dans des sédiments de marais, d'un effet inhibiteur par d'autres bactéries comme *Bacillus licheniformis*, *Bacillus mycoides / cereus*, *Streptococcus* spp. et *Clostridium* spp. sur *C. botulinum* de type C (Sandler, Rocke, et Yuill 1998, Smith 1975). De plus, la dégradation de la toxine botulique préformée par des bactéries aérobies a été démontrée expérimentalement (Quortrup et Holt 1941).

Dans ces environnements, *C. botulinum* peut être aussi associé à divers organismes vivants, végétaux et animaux. Ces organismes, que nous qualifions ici de « vecteurs mécaniques », interviennent en assurant le transfert de la bactérie et sa toxine entre le réservoir et les animaux vertébrés sensibles. Il s'agit d'abord, comme le montrent Espelund et Klaveness (Espelund et Klaveness 2014) au travers d'exemples tirés de la littérature scientifique (reproduits dans le tableau 2), de certains végétaux (algues en particulier) et invertébrés.

<sup>8</sup> Ce terme inclut ici non seulement des arthropodes mais aussi d'autres espèces (par exemple des animaux vertébrés, algues...), qui peuvent transporter de manière interne ou externe les bactéries ou les spores de *C. botulinum*

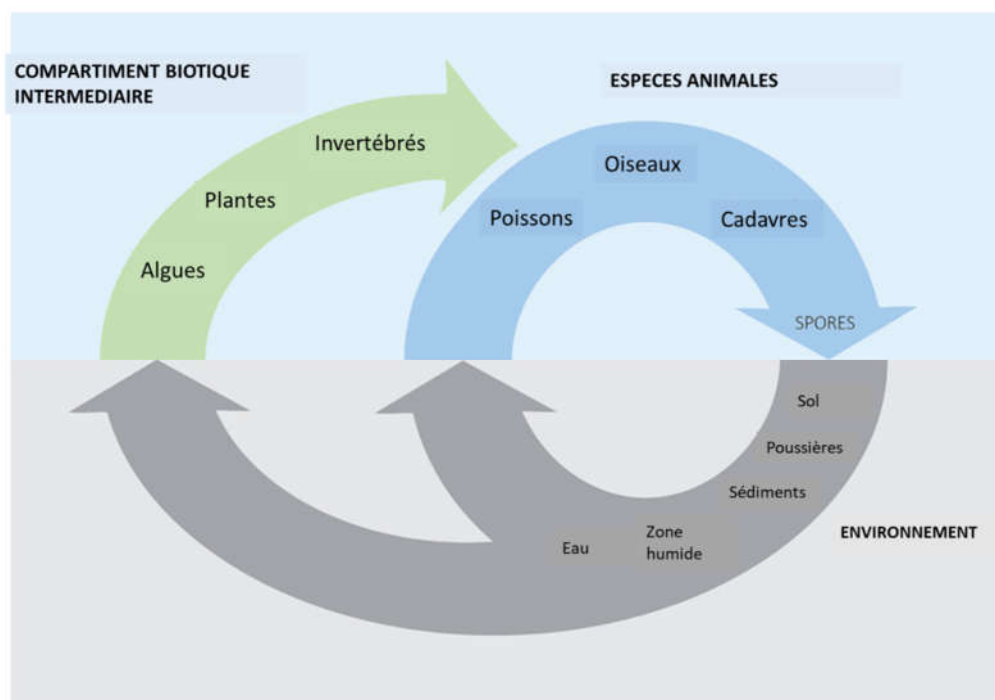
**Tableau 2** : *C. botulinum* et organismes pouvant intervenir comme « vecteurs mécaniques » dans un écosystème d'eau douce (Espelund et Klaveness, 2014)

Environnement	« Vecteurs mécaniques »	Classification	Type toxinique	Zone géographique	Références
Eau douce	Plantes	<i>Ceratophyllum</i>	C	Norvège (Oslo)	(Skulberg et Holt 1987)
Eau douce	Plantes	<i>Phragmites</i> , <i>Schoenoplectus</i>	n.d.	Allemagne (estuaire de l'Elbe)	(Heckman 1986)
Eau douce	Invertébrés	<i>Gammarus</i> (crustacés), <i>Oligochaeta</i> (annélides), <i>Chironomidae</i> (insectes), <i>Ephemeroptera</i> (insectes), <i>Dreissenidae</i> (mollusques)	E	USA (Grands Lacs)	(Pérez-Fuentetaja <i>et al.</i> 2006, Pérez-Fuentetaja <i>et al.</i> 2011)
Eau douce	Algues Invertébrés	<i>Cladophora</i> (chlorophycées)	E	USA (Grands Lacs)	(Byappanahalli et Whitman 2009, Chun <i>et al.</i> 2013)
Zones humides	Invertébrés	<i>Calliophoridae</i> (insectes), <i>Ptychopteridae</i> (insectes), <i>Hirudineae</i> (annélides), <i>Isopoda</i> (crustacés)	C	République Tchèque (Moravie)	(Hubálek et Halouzka 1991)
Zones humides	Invertébrés	<i>Chironomidae</i> (insectes), <i>Corixidae</i> (insectes), <i>Sarcophagidae</i> (insectes), <i>Calliophoridae</i> (insectes),	C/D	Espagne (centre)	(Vidal <i>et al.</i> 2013)
Zones humides	Invertébrés	<i>Calliophoridae</i> (insectes), <i>Coleoptera</i> (insectes)	C	USA (Utah)	(Duncan et Jensen 1976)

- Parmi les végétaux, les études ont surtout porté sur des algues vertes du genre *Cladophora* dans les Grands lacs nord-américains, qui montrent la présence de *C. botulinum* de type E au sein de la flore épiphyte (microalgues et bactéries) présente à leur surface (Chun *et al.* 2013, Zulkifly *et al.* 2012). Une fois détachées, ces algues contribuent au transport de la bactérie et après leur mort, lors de la décomposition anaérobie, elles peuvent représenter un substrat favorable à la germination des spores et à la production de toxine (Byappanahalli et Whitman 2009, Heckman 1986, Quortrup et Holt 1941). En outre, les débris végétaux, qu'il s'agisse d'algues ou de plantes, peuvent contribuer, par leur accumulation et l'eutrophisation des plans d'eau, à l'anoxie favorable au développement bactérien (Quortrup et Holt 1941). Diverses espèces d'invertébrés, qu'il s'agisse de petits crustacés, de mollusques ou d'insectes aquatiques (notamment leurs stades larvaires, comme les larves d'éphémères ou de chironomes) ou terrestres (larves nécrophages de mouches présentes dans les cadavres d'oiseaux et mammifères) peuvent absorber bactéries (formes végétatives ou sporulées) et toxines présentes dans le milieu naturel ou les cadavres d'animaux. Insensibles aux toxines botuliques, ces invertébrés interviennent notamment en véhiculant les spores dans leur tube digestif et/ou en concentrant la toxine (cas des asticots dans les cadavres) absorbée dans leurs tissus (Duncan et Jensen 1976). Par exemple, Vidal *et al.* (2013) détectent la bactérie dans 18,2 % (4/22) des pools d'invertébrés aquatiques et 33,3 % (6/18) des pools d'invertébrés nécrophages collectés dans des marais en Espagne durant des épisodes de botulisme de type C/D. De plus, spores et toxine ingérées par certains invertébrés, comme les larves et pupes des insectes nécrophages, peuvent être encore présentes plusieurs mois plus tard (Hubálek et Halouzka 1991), faisant d'eux des réservoirs biotiques potentiels. Les invertébrés contaminés peuvent constituer selon certains chercheurs un chaînon important dans le transfert de la bactérie et de sa toxine, notamment vers les oiseaux (Rocke, Euliss, et Samuel 1999).
- *C. botulinum* est enfin détecté, comme cela a été étudié dans les Grands lacs nord-américains (Bott *et al.* 1968) dans l'intestin de poissons et d'oiseaux vivant dans ces écosystèmes. Ces vertébrés peuvent être contaminés en consommant des végétaux et surtout des invertébrés hébergeant la bactérie et sa toxine. Qu'ils développent ou non le botulisme (selon leur sensibilité à la toxine, propre à l'espèce, et la quantité absorbée ou produite en cas de multiplication de la bactérie dans leur tube digestif), leurs fèces et surtout leurs cadavres contribuent à alimenter en bactéries le réservoir tellurique.

Il s'avère au final que le développement du botulisme de type C, D, C/D, D/C ou E dans les milieux naturels relève de mécanismes complexes qui permettent le transfert de la bactérie et de sa toxine vers les organismes sensibles. Les étapes de ce développement ont été résumées par Espelund et Klaveness (2014) en un schéma global (Figure 4) qui retrace le cycle de *C. botulinum* dans un

écosystème d'eau douce, mais dont on peut admettre qu'il s'applique aussi (avec quelques variantes et adaptations) à d'autres écosystèmes.



**Figure 4 :** Représentation schématique du cycle de *C. botulinum* dans un écosystème d'eau douce (Espelund et Klaveness 2014)

Cette représentation schématique met en exergue les trois compartiments intervenant dans la persistance et la croissance de *C. botulinum* :

- l'environnement (réservoir tellurique) dans lequel les spores peuvent persister de nombreuses années.
- certaines espèces animales chez lesquelles les spores peuvent germer et les formes végétatives se multiplier et produire la neurotoxine, en l'occurrence les poissons et les oiseaux dont les cadavres en décomposition constituent un substrat idéal pour la prolifération de cette bactérie et assurent l'enrichissement en spores du réservoir tellurique. Ce processus survient, que les animaux soient morts du botulisme ou pour d'autres raisons, alors qu'ils hébergent des spores dans leur tube digestif.
- un compartiment biotique intermédiaire représenté, d'une part, par les algues et autres végétaux, d'autre part, par différents organismes invertébrés. Ils peuvent, selon les modalités précédemment évoquées, intervenir dans la contamination des poissons et oiseaux qui les consomment dans les écosystèmes contaminés.

Les caractéristiques et spécificités de ces cycles biologiques pour *C. botulinum* de types C, D ou mosaïques et pour *C. botulinum* de type E sont respectivement développées ci-après.

### 3.2.2 Présence, persistance et croissance de *C. botulinum* des types C, D et mosaïques C/D, D/C dans l'espace naturel

Les types C, D, C/D et D/C sont, dans les régions précédemment définies, particulièrement présentes dans des sols humides riches en matières organiques en décomposition, notamment les boues et sédiments des zones humides naturelles et dans les eaux qui y stagnent (marais, lacs, étangs, canaux...), y compris dans des environnements aquatiques marins (Wobeser, Marsden, et MacFarlane 1987).

Nonobstant des variations inhérentes aux méthodes d'analyses (Zechmeister *et al.* 2005), les résultats, exprimés en général en pourcentage d'échantillons positifs (prévalence), varient selon le pays testé, le

site étudié (particularités physico-chimiques des sols), l'année (notamment en fonction des températures et de la pluviométrie), la saison et l'importance de la fréquentation par les oiseaux.

Cette prévalence dans les zones humides s'étale, par exemple, de 1,7 % à 18 % dans différentes zones humides d'Espagne (Vidal *et al.* 2013), de 10 à 64 % dans différents marais en Californie aux Etats Unis (Sandler *et al.* 1993), et peut atteindre des valeurs plus élevées, comme celles atteignant 85 % signalées dans certains sites en Autriche (Zechmeister *et al.* 2005). A titre de comparaison, la prévalence détectée dans le site du lac de Grand Lieu en France était de 17,6 % en 2001 (été sans mortalité due au botulisme dans l'avifaune) et de 48 % en 2003 (période associée à des cas de botulisme) (Le Dréan-Quenec'hdu, Marion, et Popoff 2005). Bien que ce ne soit pas toujours le cas (Sandler *et al.* 1993), les valeurs les plus élevées sont souvent associées à des antécédents d'atteinte botulique de l'avifaune locale. C'est ce qu'indique, par exemple, l'étude de Wobeser, Marsden, et MacFarlane (1987) au Canada, avec plus de la moitié des échantillons à résultats positifs (116/196, 59,2 %) lorsqu'ils sont issus de sites avec un historique de botulisme dans l'avifaune contre seulement 6,2 % (8/130) dans des zones sans historique de botulisme. Cette augmentation de prévalence dans les sédiments va généralement de pair avec une augmentation du taux de portage digestif parmi les oiseaux vivant dans ces sites. C'est ce que montrent Anza *et al.* (2016) en Espagne, qui détectent, chez les oiseaux aquatiques (rallidés, laridés et anatisés) un taux de portage de 0,8 % (365 échantillons analysés) en l'absence d'épizootie et de 16,3 % (153 échantillons analysés) en période d'épizootie.

Des variations de la prévalence bactérienne sont parfois décrites, par exemple une réduction associée à des températures plus fraîches en hiver (Marion *et al.* 1983) ou à un sol plus sec dans le cas de marais transitoirement asséchés (Wobeser, Marsden, et MacFarlane 1987) ; mais elle peut aussi rester assez stable, par exemple dans les marais permanents alimentés en eau toute l'année (Sandler *et al.* 1993).

Les événements météorologiques, en particulier les températures et la pluviométrie, sont particulièrement incriminés comme cause de perturbations des équilibres microbiens dans le sol, susceptibles de stimuler la germination et la multiplication bactérienne qui précèdent le développement de flambées de botulisme de type C, D, C/D ou D/C dans l'avifaune sauvage (Barras et Kadlec 2000, Rocke, Euliss, et Samuel 1999). De fortes chaleurs, souvent en été ou en automne, provoquant une élévation de la température de l'eau et des sédiments, sont associées à l'augmentation de la mortalité due au botulisme chez les oiseaux (Vidal *et al.* 2013, Woo *et al.* 2010, Work *et al.* 2010). Un déficit des précipitations peut aussi intervenir en favorisant la baisse du niveau d'eau dans les marais, l'augmentation de la turbidité et la concentration en matières organiques (végétaux en décomposition, cadavres d'invertébrés...) (Rocke, Euliss, et Samuel 1999, Wobeser, Marsden, et MacFarlane 1987) et en favorisant le rassemblement des oiseaux autour des points d'eau disponibles (Work *et al.* 2010). A l'inverse, des pluies excessives, en inondant les vasières ou en favorisant l'accumulation des débris végétaux arrachés, peuvent favoriser indirectement la multiplication bactérienne (Quortrup et Holt 1941, Rocke, Euliss, et Samuel 1999). C'est aussi ce que constatent Barras et Kadlec (2000) en décrivant le rôle de fortes précipitations de printemps et d'un fort débit des eaux en été dans l'initiation d'épisodes de botulisme dans le delta de la rivière Bear dans l'Utah. L'apport d'eau chargée en matières organiques et nutriments, issus par exemple du traitement des usines de traitement des eaux usées, a été aussi incriminé comme cause d'eutrophisation des zones humides favorisant le développement de *C. botulinum* (Anza *et al.* 2014, Vidal *et al.* 2013).

Ces événements, en accélérant la multiplication de *C. botulinum* et la production de toxine dans les sédiments, favorisent leur transfert aux oiseaux aquatiques, directement lorsqu'ils ingèrent des sédiments (oiseaux fousseurs) ou par l'intermédiaire des invertébrés aquatiques vivant à l'interface eau-sédiment qu'ils consomment (Anza *et al.* 2016, Rocke, Euliss, et Samuel 1999). L'atteinte botulique des premiers oiseaux, voire toute autre cause de mortalité affectant des oiseaux hébergeant des spores dans leur tube digestif, génère autant de cadavres dont la décomposition est favorisée par les fortes chaleurs, et qui constituent un substrat favorable à la croissance bactérienne et la production de toxine. Ces cadavres sont rapidement investis par les larves de mouches s'en nourrissant, chez lesquelles les concentrations de toxine peuvent atteindre jusqu'à  $10^5$  à  $10^6$  MLD50 /g ( $5 \times 10^3$  à  $5 \times 10^4$  MLD50 étant suffisantes pour tuer un canard adulte) (Hubálek et Halouzka 1991). Le processus peut alors s'auto-amplifier dans un cycle « cadavre-asticot » tel que décrit par Wobeser (1997) et initier le développement des flambées de botulisme dans l'avifaune (Soos et Wobeser 2006), notamment en cas de densité importante des oiseaux sur le site (Work *et al.* 2010).

Il apparaît ainsi que l'avifaune sauvage, tout en payant parfois un lourd tribut au botulisme C et D de par les mortalités importantes (par exemple, selon Vidal *et al.* (2013), 20 000 oiseaux de 50 espèces et 18 familles, morts de botulisme au cours de 13 épisodes de botulisme rapportés dans des zones

humides du centre de l'Espagne entre 1978 et 2008), joue un rôle majeur en contribuant, par les fientes et surtout les cadavres, à la persistance et l'enrichissement bactériens dans les zones humides. En outre, comme précédemment souligné, le rôle des cadavres d'oiseaux dans les zones humides à risque, lorsque les conditions météorologiques (notamment des températures propices à la présence de mouches) le permettent, est reconnu comme un facteur prépondérant dans l'initiation des flambées de botulisme de type C, D ou mosaïques dans l'avifaune sauvage (Reed et Rocke 1992). A cet égard, les oiseaux et mammifères opportunistes et nécrophages<sup>9</sup> peuvent, comme le suggèrent Inger *et al.* (2016), avoir un rôle dans la prévention du botulisme (1) en éliminant les cadavres d'animaux avant leur putréfaction, et (2) en prévenant la production de toxine botulique et (3) la colonisation des cadavres d'animaux par les invertébrés nécrophages. Cependant, on ne dispose pas de donnée sur leur influence potentielle dans les milieux humides propices à l'émergence de cette maladie.

### 3.2.3 Présence, persistance et croissance de *C. botulinum* de type E dans l'espace naturel

*Clostridium botulinum* de type E est principalement rencontré dans les régions les plus septentrionales de l'hémisphère Nord, dans les zones marines côtières d'une part, et en eau douce d'autre part, comme dans la région des Grands Lacs d'Amérique du Nord.

Sa présence, prépondérante dans ces régions, peut avoir trois types de conséquences : l'atteinte de certains poissons (sauvages ou d'élevage) et de mammifères marins, des mortalités dans l'avifaune (et parfois en élevage avicole) et des cas de botulisme humain consécutifs en majorité à la consommation de poissons et autres produits de la mer contaminés par les spores (« botulisme pisciaire »).

*C. botulinum* de type E est une bactérie dont la particularité est d'être étroitement associée, dans les régions précédemment indiquées, aux écosystèmes aquatiques (mers, lacs et rivières) au sein desquels il est communément isolé dans les sédiments et le tube digestif des poissons (Dolman 1957, Espelund et Klaveness 2014, Haagsma 1991, Palmer *et al.* 2019). *C. botulinum* de type E se singularise, en outre, par ses propriétés psychrotrophes, lui permettant de se multiplier à partir d'une température de 2,5 °C, son optimum de croissance se situant (dans une gamme de pH de 5 à 9) entre 8 et 30 °C (Palmer *et al.* 2019).

En milieu marin, les principales données émanent des investigations dans le nord de l'Europe, notamment en mer Baltique, où jusqu'à 100 % des échantillons de sédiments prélevés en certains sites sur les côtes de Finlande contiennent des spores de *C. botulinum* de type E, avec des concentrations moyennes (nombre le plus probable) de 410 (30 à 11 000) spores par kg (Hielm, Björkroth, *et al.* 1998). Cette situation va de pair avec les fortes prévalences de portage (cutané et intestinal) chez les poissons qui y sont pêchés (Hyytiä, Hielm, et Korkeala 1998), notamment des espèces comme les harengs (*Clupea harengus*) qui peuvent aisément se contaminer à partir des sédiments en consommant notamment des mollusques, crustacés et larves diverses, et chez lesquels la distribution de *C. botulinum* de type E montre une forte corrélation avec celle observée dans l'environnement (Hielm, Björkroth, *et al.* 1998). Ces poissons sont secondairement une source de contamination pour les espèces prédatrices comme les truites et saumons. Les données disponibles indiquent par ailleurs que la présence de fermes aquacoles (Hielm, Hyytiä, *et al.* 1998) est un facteur contribuant à l'enrichissement de l'environnement en spores botuliques, soulignant l'importance des effluents d'élevages dans leur dispersion. En milieu marin, la présence de *C. botulinum* de type E dans les sédiments et les eaux et la consommation de poissons explique aussi la contamination des mammifères marins, tels que des pinnipèdes ou des cétacés, qui peuvent héberger des spores dans leur tube digestif et sur leur peau. Une étude en Alaska montre que les aires le long des côtes dévolues à l'éviscération des phoques sont fortement contaminées par des spores (Leclair *et al.* 2013).

Les données les plus abondantes sur le développement de *C. botulinum* de type E dans l'espace naturel ont cependant été obtenues lors des investigations menées dans l'écosystème particulier des Grands Lacs d'Amérique du Nord (Bott *et al.* 1966, Chun *et al.* 2015, Chun *et al.* 2013, Hannett *et al.* 2011, Pérez-Fuentetaja *et al.* 2006, Pérez-Fuentetaja *et al.* 2011, Wijesinghe *et al.* 2015, Yule, Austin, *et al.* 2006, Yule, Barker, *et al.* 2006, Yule, LePage, *et al.* 2006, Zulkifly *et al.* 2012). Sa prévalence dans les sédiments, variable selon le site et l'année des prélèvements, peut y être particulièrement élevée, jusqu'à 88 % sur les bords du lac Erié dans l'étude de Hannett *et al.* (2011). *C. botulinum* de type E est également présent dans le contenu digestif de poissons d'espèces variées pêchés dans les

<sup>9</sup> Pour exemple : corvidés, renard



lacs, avec des taux de positivité variant, dans l'étude de Bott *et al.* (1966), de 1 à 9 %, et atteignant en certains sites près de 60% (Bott *et al.* 1968). La présence de la bactérie dans les sédiments est aussi associée à la contamination de différents organismes benthiques (vers aquatiques, crustacés, moules et larves aquatiques d'insectes, certains de ces invertébrés pouvant héberger parfois des quantités de spores plus élevées par unité de poids que les sédiments sur lesquels ils évoluent (Pérez-Fuentetaja *et al.* 2011). *C. botulinum* de type E peut être aussi présent à la surface de certaines algues (notamment *Cladophora* spp.) (Chun *et al.* 2013, Wijesinghe *et al.* 2015) et microalgues associées (Zulkifly *et al.* 2012), être transportée dans les débris flottants et se retrouver à des concentrations relativement importantes dans les amas d'algues en décomposition échouées sur les plages (Hannett *et al.* 2011). Toutes ces observations mettent l'accent sur les possibilités de contamination des poissons, notamment des poissons démersaux et/ou se nourrissant de petits invertébrés comme les gobies à tâches noires (*Neogobius melanostomus*) présents dans les Grands Lacs (Getchell *et al.* 2006, Hannett *et al.* 2011, Yule, LePage, *et al.* 2006), et secondairement aux poissons prédateurs.

Les cadavres de poissons en décomposition se déposant sur les fonds contribuent à accroître la contamination de sédiments, que la bactérie présente dans le contenu intestinal s'y multiplie après leur mort (quelle qu'en soit la cause) ou que les poissons soient morts de botulisme. Les poissons malades ou moribonds atteints de botulisme sont par ailleurs des proies plus faciles pour les poissons prédateurs et aussi pour les oiseaux piscivores, générant dans certaines situations des épizooties au sein de l'avifaune aquatique contaminée. Les mortalités d'oiseaux dues à *C. botulinum* de type E peuvent en effet se chiffrer, comme dans les Grands Lacs en Amérique du Nord, par dizaines de milliers (approximativement 96 900 morts estimées entre 1963 et 2007) (EPA 2012)

L'émergence d'épizooties de botulisme de type E chez les poissons et l'avifaune locale est facilitée par le développement de conditions favorables à la croissance botulique, comme ont pu le constater Pérez-Fuentetaja *et al.* (2006), (Pérez-Fuentetaja *et al.* 2011) en comparant différents paramètres mesurés dans le lac Erié en 2002, année associée à la survenue d'une importante épizootie, et 2003, marquée par une faible mortalité : selon les observations effectuées, les conditions qui auraient facilité le développement de l'épizootie en 2002 associaient un réchauffement du lac (la température estivale étant en moyenne de 2°C plus élevée qu'en 2003) avec une diminution de l'oxygène dissous, du potentiel redox et du pH dans les sédiments.

### 3.2.4 Facteurs environnementaux et moyens de lutte

Diverses études destinées à identifier les facteurs environnementaux intervenant dans l'initiation et le développement des flambées épizootiques affectant l'avifaune dans l'environnement naturel ont été précédemment citées.

Quelques-unes ont montré l'impact des années sèches et des températures élevées dans la survenue des foyers, prédisant une augmentation des épizooties en lien avec les effets du changement climatique (Lafrancois *et al.* 2011). De même, le niveau d'eau semble avoir un impact sur les types toxiques. Ainsi, le type C semble moins répandu dans les marais inondés de façon saisonnière que dans ceux inondés de façon permanente (Sandler *et al.* 1993).

Rocke, Euliss, et Samuel (1999) ont étudié l'occurrence du botulisme aviaire chez des canards morts dans des zones humides californiennes, dont les paramètres environnementaux ont été suivis. Ils ont montré que la diminution du potentiel redox, l'augmentation de la température, un taux plus élevé de matière organique dans les sédiments, augmentent le risque de survenue d'une épizootie. Ils ont proposé des modèles prévoyant une augmentation du risque de botulisme lorsque le pH est compris entre 7,5 et 9, un potentiel redox négatif et une température supérieure à 20°C (Rocke, Euliss, et Samuel 1999). La salinité semble limiter l'émergence du botulisme (Segner et Schmidt 1971, Webb *et al.* 2007), ce qui pourrait expliquer que les oiseaux des zones humides sous influence de la marée soient moins touchés que ceux des zones humides à l'intérieur des terres (Contreras de Vera *et al.* 1991, Vidal *et al.* 2013). Un autre facteur environnemental limitant le risque de botulisme est la richesse des populations bactériennes présentes, par compétition ou même par un effet inhibiteur plus spécifique (Girardin *et al.* 2002, Smith 1975).

Barras et Kadlec (2000) ont construit un modèle de régression logistique utilisant des variables météorologiques et des débits sur 28 ans pour calculer la probabilité annuelle de survenue d'une épizootie de botulisme aviaire dans le delta de la rivière Bear dans l'Utah aux USA). Les quantités de précipitations hivernales-estivales et le débit des cours d'eau en été étaient des prédicteurs significatifs ( $P < 0,001$ ) de la probabilité de survenue d'une flambée épizootique : ainsi, ces épisodes étaient plus susceptibles de se produire pendant les années de fortes précipitations hiver-été et en présence des

débites élevés de la rivière Bear en été, car associées à un drainage des zones humides adjacentes constituant les réservoirs de *C. botulinum*.

Ces diverses observations témoignent de la variété des facteurs, souvent propres à un site donné, dont les effets conjugués favorisent le développement bactérien et le transfert de la bactérie et sa toxine vers les espèces sensibles, conduisant aux épizooties. Leur identification peut permettre parfois d'anticiper la survenue d'un épisode de botulisme et de proposer des mesures destinées à les prévenir.

Quelques-unes sont assez générales et adaptées à de nombreux écosystèmes : c'est le cas des mesures visant à gérer le niveau des eaux dans les sites à risque afin de favoriser l'inertie thermique en cas de fortes chaleurs (Barras et Kadlec 2000), et à réduire le nombre de sites pauvres en oxygène par élimination des algues flottantes (Quortrup et Holt 1941) et autres végétaux contribuant à l'eutrophisation. Des tentatives sont également faites pour réduire l'ampleur des épizooties de botulisme en collectant les cadavres d'animaux et éviter qu'ils ne deviennent des sources de toxine pour les autres oiseaux consommant les larves de mouches qu'ils contiennent. Cette démarche semble améliorer la survie de l'avifaune (Anatidés) par rapport aux zones à densité de cadavres plus élevée (Evelsizer, Clark, et Bollinger 2010). A cet égard, il a été suggéré qu'une gestion intégrée des écosystèmes, favorisant la présence d'espèces sauvages nécrophages qui ingèrent les cadavres d'animaux avant que ceux-ci n'entrent en état de putréfaction (Inger *et al.* 2016), pourrait réduire les risques de survenue de foyers sauvages de botulisme.

### 3.3 Ecologie de *C. botulinum* (types C, D, C/D, D/C et E) dans l'espace agricole

Les types C, D, C/D, D/C et E de *C. botulinum* sont identifiés dans l'espace agricole, à proximité ou non des sites naturels précédemment étudiés où ils évoluent principalement. La présence des types C, D, C/D, D/C dans ces espaces peut s'exprimer par le développement de foyers, notamment dans les élevages de volailles et dans les élevages bovins. Des foyers dus au type E ont été décrits dans des piscicultures, et très rarement en aviculture.

#### 3.3.1 Présence, persistance et croissance de *C. botulinum* types C, D, C/D, D/C dans l'espace agricole

Les études portant sur la recherche de spores botuliques de *C. botulinum* types C, D, C/D, D/C dans les sols des espaces agricoles montrent que si elles sont largement distribuées, elles le sont souvent avec une prévalence limitée (Gessler et Böhnelt 2006). En Europe, en dehors des zones les plus septentrionales où domine le type E (Huss 1980), le type B apparaît le plus fréquent, contrairement aux types C et D qui sont plus rarement isolés. Leur présence dans le sol est notamment en relation avec la présence des animaux d'élevage, comme l'illustre l'observation par Smith et Milligan (1979) de la présence de spores botuliques dans 25 % des échantillons de sol d'un ancien marché aux bestiaux de Londres fermé depuis 1939, avec dans cet exemple surtout du type B, mais aussi C, D et C/D. Ces résultats contrastent avec ceux observés dans les échantillons issus d'autres zones de Grande Bretagne, dont seulement 5,7 % contiennent des spores (Smith et Young 1980). Dans l'étude en cours mise en place en France précédemment rapportée (Le Maréchal *et al.* 2020), le groupe III ne représentait que 1% des souches détectées dans les échantillons de sol.

En fait, actuellement, les études portent surtout sur la persistance de la bactérie dans les locaux d'élevage et leur environnement proche à la suite de foyers de botulisme de type C, D ou mosaïque en élevages aviaire et bovin, et sur le rôle des effluents d'élevages (litières, fumiers, lisiers) dans leur dissémination et leur accumulation dans les milieux. Les animaux, notamment les volailles, contribuent, en effet, par leurs déjections, d'une part, à l'enrichissement du sol en matières organiques nécessaires à la bactérie dans l'environnement (Palmer *et al.* 2019), d'autre part, à la circulation de l'agent pathogène et la contamination des sols (Popoff 1989).

Peu de données portent sur les élevages bovins. Elles relèvent essentiellement d'observations ou d'investigations en relation avec des contaminations d'origine aviaire (Souillard, Le Maréchal, Ballan, Rouxel, *et al.* 2017, Souillard *et al.* 2015) révélant la détection de spores (types C/D ou D/C) dans les pâturages, les bâtiments d'élevages (stalles) et le fumier.

Les données les plus nombreuses concernent les foyers de botulisme aviaire. Les zones de litières humides et riches en matières fécales (contaminées par les cadavres d'animaux s'ils ne sont pas

rapidement éliminés et les fientes des volailles malades ou porteuses asymptomatiques) autour des abreuvoirs sont considérées comme des sites de multiplication bactérienne, auxquels s'ajoutent les cadavres. Ces foyers (Souillard, Le Maréchal, Ballan, Mahé, *et al.* 2017, Souillard, Le Maréchal, Ballan, Rouxel, *et al.* 2017, Souillard *et al.* 2014) s'accompagnent d'une large contamination des bâtiments d'élevage (sol et litières, murs, poussières, circuits de ventilation, circuits de distribution d'eau, locaux de conditionnement des œufs, bacs à cadavres d'animaux ...). Les ténébrions (*Alphitobius diaperinus*), des insectes proliférant dans les locaux et l'environnement proche (abords des bâtiments) peuvent contribuer à la dissémination. Un suivi longitudinal dans un élevage de poules pondeuses (Souillard, Le Maréchal, Ballan, Mahé, *et al.* 2017) montre qu'en l'absence de décontamination, des spores sont retrouvées quatre mois après le foyer de botulisme au niveau des circuits d'air et cinq mois après chez les ténébrions, sur les murs, les pondoirs, les tapis de ponte et à la surface des œufs pondus (cela, bien que la bactérie ne soit pas retrouvée dans les fientes des poules et les écouvillons cloacaux). Ces observations soulignent les possibilités de résurgence du botulisme dans des élevages ayant déjà été atteints.

Mais, outre la contamination des locaux d'élevage liée à la présence des animaux d'élevage porteurs asymptomatiques et atteints, il apparaît que le principal apport de spores botuliques dans les pâturages, prairies et terres agricoles tient, indépendamment du rôle des cadavres d'animaux, au devenir des litières, fumiers et lisiers ou eaux résiduaires contaminées et à l'usage qui en est fait dans le cadre des pratiques agricoles.

- Les cadavres (et fragments de cadavres) de volailles sont considérés comme un point clef du cycle du botulisme de type C, D ou mosaïques en aviculture, en contribuant notamment à la contamination des litières et des effluents d'élevage (Smart *et al.* 1987) qui constituent des véhicules de *C. botulinum* pour les ruminants domestiques (y compris pour les types D ou D/C dont les poules peuvent être porteuses asymptomatiques) (Popoff 1989, Souillard, Le Maréchal, Ballan, Rouxel, *et al.* 2017, Souillard *et al.* 2015).  
A défaut de respect des règles de biosécurité imposant aux éleveurs la collecte quotidienne des cadavres de volailles et leur dépôt dans les bacs d'équarrissage, les cadavres ou parties de cadavres évacués avec les litières et déposés sur les tas de fumier ou laissés sur les parcours peuvent être accessibles à diverses espèces animales. Le déplacement des cadavres de volaille, notamment par des chiens, dans des prairies avoisinantes a été incriminé dans la contamination d'élevages bovins (Popoff 1989).
- La présence en quantité importante de *C. botulinum* de type C, D ou mosaïque et leur persistance dans les effluents d'élevage est démontrée en particulier par les investigations portant sur les fumiers de volailles. C'est le cas dans l'étude rapportée par Souillard *et al.* en 2020 et portant sur 10 élevages (poulets de chair, poules pondeuses ou dindes) touchés par un épisode de botulisme aviaire C/D ou D/C, dans lesquels deux séries de prélèvements ont pu être collectées à deux mois d'intervalle (la première série étant effectuée deux semaines après l'enlèvement des litières des bâtiments contaminés) sur les tas de fumiers stockés en extérieur. Les analyses (PCR en temps réel après enrichissement) ont montré la présence de spores dans 56,5 % (161/285) des échantillons prélevés sur les deux périodes. *C. botulinum* a été en outre détecté significativement plus fréquemment à la seconde visite (65,8 % vs 49,7 %,  $P < 0,01$ ) et en surface des tas (63,1 % vs 50 %,  $P = 0,025$ ). Ces données soulignent la persistance de la contamination durant ce temps de stockage. Elles complètent les observations épidémiologiques identifiant le fumier de volaille (issu de lots atteints ou non de botulisme) comme l'une des principales sources de contamination à l'origine des foyers de botulisme bovin de type C ou D (Payne *et al.* 2011, Popoff 1989, Relun *et al.* 2017, Souillard, Le Maréchal, Ballan, Mahé, *et al.* 2017), et attestent de l'importance des effluents d'élevage dans la dispersion des spores et la contamination de l'espace agricole.
- Très peu d'études portent, en revanche, sur le devenir des spores retrouvées dans les sols et prairies (Souillard, Le Maréchal, Ballan, Rouxel, *et al.* 2017) sur lesquels ont été stockés ou épandus (dans le cadre des pratiques agricoles) les effluents d'élevage. Une étude (Gessler et Böhnelt 2006) indique que les spores de *C. botulinum* de type D sont encore détectables au-delà de 2,5 ans dans un sol expérimentalement contaminé en surface (apport, dans cette étude, de  $3 \times 10^8$  spores, incorporées dans un compost, par  $m^2$ ), mais il faut rappeler que le devenir de la bactérie en termes de croissance et de survie est fortement dépendant des caractéristiques des sols et de l'effet des différents facteurs abiotiques et biotiques qu'elle y rencontre (Palmer *et al.* 2019). À ce propos, la forte association entre la présence des spores de type C ou D et les teneurs élevées en matières organiques doit être rappelée (Espelund et Klaveness 2014).
- La présence de spores botuliques dans le sol peut s'accompagner d'une contamination des végétaux qui y sont récoltés. La possibilité, pour *C. botulinum* de pénétrer dans certaines plantes

a été aussi envisagée. Ainsi, Zeiller *et al.* (2015) en plantant du trèfle dans du compost stérilisé inoculé avec des spores de type D, constate des concentrations importantes dans la rhizosphère des plantes, notamment en surface radiculaire, mais aussi la présence de bactéries dans l'espace intercellulaire de la partie corticale de la racine et des jeunes pousses. D'autres études sont cependant nécessaires pour confirmer ces données et les conséquences épidémiologiques éventuelles.

### 3.3.2 Présence, persistance et croissance de *C. botulinum* type E dans l'espace agricole

Bien que *C. botulinum* de type E soit étroitement associé aux écosystèmes aquatiques, il est aussi présent dans les sols terrestres (Hielm, Björkroth, *et al.* 1998, Huss 1980, Johannsen 1963, Leclair *et al.* 2013), comme l'illustre par exemple la mise en évidence de spores sur des pelures de pommes de terre rapportée par Johannsen (1963) en Suède. Néanmoins sa prévalence, élevée dans les environnements aquatiques, se réduit lorsqu'on s'éloigne des côtes, lacs et rivières contaminées, et devient faible ou nulle dans les sols secs. Ces données ressortent, par exemple, des investigations de Huss (1980) au Danemark où *C. botulinum* de type E, trouvé dans 90 % des échantillons issus de l'environnement aquatique, n'est plus (ou rarement) retrouvé dans les sols cultivés et terres boisées (alors que *C. botulinum* de type B est fréquemment retrouvé dans ces environnements). Des constatations analogues sont faites par Bott *et al.* (1968) dans la région des Grands Lacs nord-américains.

Dans ces régions, *C. botulinum* de type E est aussi identifié dans les prélèvements fécaux d'animaux d'élevages n'ayant jamais présenté d'épisode de botulisme, mais habituellement avec une faible prévalence, inférieure à 5 % (contrastant avec la proportion plus élevée, atteignant 73 %, pour *C. botulinum* de type B), et généralement avec des concentrations très faibles (estimées, par exemple dans une étude de Dahlenborg, Borch, et Rådström (2003) portant sur des fèces collectées sur 60 bovins dans trois abattoirs en Suède, à quelques spores par gramme dans deux tiers des échantillons).

Les foyers de botulisme E décrits en aquaculture d'eau douce, sont notamment associés à l'accumulation des sédiments dans le fond des bassins d'élevage qui, progressivement enrichis par les matières organiques liées à l'élevage (fèces des poissons, aliments) et surtout les cadavres des poissons morts, peuvent s'avérer propices à la multiplication de la bactérie naturellement présente dans l'écosystème aquatique local ou lorsqu'elle est introduite dans l'élevage (introduction d'œufs et alevins contaminés, aliments contaminés, oiseaux sauvages...). Favorisée par des augmentations de température notamment en été, la prolifération bactérienne, amplifiée par les effets du cannibalisme dans les élevages de truites et de saumons pour de telles espèces, peut conduire à des flambées de botulisme caractérisées par une mortalité importante (Eklund *et al.* 1984).

Les caractéristiques propres au développement des foyers en élevages et les moyens de lutte envisageables sont traitées dans le chapitre 5.5.

*Clostridium botulinum* est une bactérie sporulée tellurique anaérobie présente sur tous les continents, dans la terre, l'eau et les sédiments marins et d'eau douce. La répartition géographique et la prévalence des différents types toxiques varient selon les écosystèmes, plus ou moins propices à leur développement, et au sein desquels ils peuvent contaminer les nombreux organismes qui y vivent.

Pour les types C, D, C/D ou D/C et le type E, certains végétaux (notamment des algues) et invertébrés (mollusques et larves d'insectes qui, insensibles à la toxine botulique, peuvent la stocker, ainsi que la bactérie, dans leurs tissus), peuvent être identifiés comme « vecteurs mécaniques ». Ensuite, des poissons et des oiseaux peuvent héberger ou multiplier la bactérie dans leur tube digestif, et, en fonction de leur sensibilité, développer cliniquement le botulisme. La décomposition des espèces végétales ou des cadavres d'animaux contaminés (tels que poissons, oiseaux, mammifères) représente un terrain optimal pour le développement bactérien et la production de toxines. Se dessinent ainsi des chaînes de transmission permettant à la bactérie d'atteindre des espèces cibles sensibles à la toxine, tels les animaux de rente (volailles, bovins) et l'espèce humaine consommant des produits contaminés.

Les types C, D et mosaïques C/D ou D/C sont, dans l'espace naturel, étroitement associés aux zones humides riches en sédiments (marais, étangs et lacs) propices à leur développement. La contamination d'oiseaux sensibles et l'initiation d'un cycle amplificateur « cadavre-asticots » peut aboutir au développement de flambées de botulisme dans l'avifaune. Le type E, essentiellement identifié dans les régions les plus septentrionales de l'hémisphère nord, est étroitement associé aux écosystèmes aquatiques, marins ou d'eau douce, et se démarque par le rôle central des poissons dans l'épidémiologie de la maladie. Il s'agit le plus souvent d'un portage intestinal, mais la contamination peut aboutir, chez certaines espèces piscicoles plus sensibles à la toxine E, à des mortalités. La maladie peut en outre s'étendre à l'avifaune aquatique ou côtière (oiseaux piscivores en particulier) provoquant parfois la mort de dizaines de milliers d'oiseaux.

L'association étroite entre *C. botulinum* et les milieux naturels dans lesquels la bactérie survit ou évolue ne permet pas d'envisager son élimination. Il ressort néanmoins que les flambées délétères de botulisme affectant épisodiquement l'avifaune exposée aux types C, D, C/D ou D/C et E résultent de l'intervention de facteurs très variés (facteurs climatiques, pollutions organiques générées par les activités humaines...) qui contribuent au dérèglement des écosystèmes et les rendent plus propices à leur développement. La connaissance de ces facteurs peut permettre d'identifier et de mettre en place des mesures de gestion (notamment la collecte et la destruction des cadavres d'animaux dans les zones à risque) pour tenter d'en maîtriser les effets ou de les prévenir.

En revanche, la prévalence de ces types toxiques dans l'espace agricole semble assez faible si on s'en tient aux rares données sur le portage digestif chez les animaux de rente et la présence de spores dans l'environnement des élevages (herbages, terres cultivées) éloignés des zones humides pour les types C, D, C/D ou D/C, ou des côtes, lacs et rivières contaminées pour le type E. Bien que relativement peu fréquents (voire rares pour le type E), les cas de développement du botulisme en élevage (dont la contamination relève souvent de la distribution d'aliments ou d'eau contaminés) n'en sont pas moins préoccupants, d'une part, du fait de la persistance de la bactérie dans des locaux d'élevage et leurs abords (qui favorise les résurgences dans les élevages déjà contaminés), d'autre part, en raison du risque d'accumulation et de dissémination de ces types toxiques dans l'espace agricole par la dispersion éventuelle des cadavres d'animaux (cas des volailles) et surtout par l'épandage des fumiers et lisiers dans lesquels les spores subsistent à des concentrations parfois élevées.

## 4 Maladie humaine et aspect zoonotique

### 4.1 Le botulisme en santé humaine

Le botulisme humain est une maladie grave et potentiellement létale. C'est une maladie beaucoup plus rare que le botulisme animal. Il n'y a aucune transmission interhumaine.

Le botulisme humain est traité dans le présent rapport, à cause de sa gravité et des questions posées dans les saisines concernant les risques encourus suite à la consommation de produits (animaux et végétaux) contaminés ou possiblement contaminés par la toxine et/ou la bactérie, ou suite à diverses activités professionnelles et récréatives. Une attention particulière a été portée aux cas de botulisme survenant chez des nourrissons ou chez des personnes présentant des facteurs de risque liés à leur état de santé.

Les doses létales des toxines botuliques (plus particulièrement pour la toxine botulique A) via les différentes voies d'exposition sont très basses et sont détaillées dans la section 5.2.

#### 4.1.1 Épidémiologie et pathogenèse

La toxine botulique est la toxine bactérienne la plus puissante et, peut-être, le poison connu le plus puissant (Arnon *et al.* 2001, Pegram et Stone 2020).

Le botulisme est présent dans le monde entier, mais le nombre de cas signalés varie selon les pays et les régions. Cette variation peut être due, non seulement à des différences réelles dans l'incidence, mais aussi à une sous-déclaration. Cette sous-déclaration peut survenir dans un pays à cause :

- Du manque de connaissances des formes cliniques,
- De l'absence de laboratoires aptes à confirmer le botulisme,
- De différences dans les exigences concernant la déclaration des maladies par les médecins aux organismes de santé publique,
- De l'absence de surveillance officielle du botulisme.

Quelle que soit la manière dont l'exposition se produit, la neurotoxine botulique pénètre dans le système vasculaire et atteint les terminaisons nerveuses cholinergiques périphériques, y compris les jonctions neuromusculaires, les terminaisons des nerfs parasympathiques post-ganglionnaires et les ganglions périphériques. Il n'y a aucune atteinte du système nerveux central. Le mécanisme d'action des toxines botuliques est détaillé dans la section 2.1.2.3.

Plusieurs types de botulisme sont décrits, selon le mode de contamination et d'exposition à la toxine :

- Botulisme alimentaire (intoxication)

Le botulisme alimentaire est la principale cause de botulisme humain. Il résulte d'une intoxication par voie digestive due suite à la présence de la toxine préformée dans l'aliment.

Il est présent sur tous les continents et est d'incidence variable.

En Europe, ce sont surtout les préparations domestiques de produits carnés, transformés ou non, qui sont impliquées.

L'épidémiologie du botulisme alimentaire en France est décrite dans la section 4.2.

Les aliments concernés sont surtout des salaisons, des charcuteries (le porc est souvent impliqué) ou encore des conserves familiales. Dans quelques cas, plus rares, des aliments du commerce ou des repas au restaurant ont été impliqués.

Après ingestion, la toxine est principalement absorbée par le duodénum et le jéjunum et passe ensuite dans la circulation sanguine. Elle résiste à l'acidité gastrique et aux enzymes digestives.

Les sérotypes A, B et E sont associés clairement au botulisme alimentaire.

- Botulisme infantile (toxi-infection)

Cette toxi-infection survient lorsque des spores de *C. botulinum*, provenant de l'environnement (poussière, terre), sont ingérées. Ensuite, les bactéries germent, se multiplient dans le tractus gastro-

intestinal et libèrent la toxine (de type A, B ou F) produite *in situ*. Ce botulisme survient chez l'enfant âgé de six jours à 12 mois, mais surtout chez des nourrissons de deux à huit mois. Une faible dose de 10 à 100 spores de *C. botulinum* suffit à induire la colonisation intestinale et la production de toxine. Le microbiote intestinal qui, normalement, a un effet inhibiteur sur la croissance de *C. botulinum* dans le tractus digestif, pourrait ne pas être suffisamment développé ou ne pas jouer son rôle inhibiteur chez les bébés de moins d'un an (Popoff 2018).

Le miel a aussi été à l'origine de cas de botulisme infantile aux États-Unis. Son implication dans le botulisme infantile serait cependant peu importante (Pegram et Stone 2020).

De rares cas de botulisme infantile ont été associés à *Clostridium baratii* ou *Clostridium butyricum* (Birch et Bleck 2019).

- Botulisme infectieux de l'adulte (colonisation intestinale) (toxi-infection)

Cette forme rare et mal comprise est similaire au botulisme du nourrisson, mais survient chez un adulte. Il n'existe pas de critères clairs pour distinguer ces cas de toxi-infections des autres cas de botulisme chez l'adulte. Elle implique généralement les toxines de type A, mais les toxines de type B et F ont quelquefois été mises en cause. Chez ces patients, des spores, bactéries et toxines sont retrouvées dans les selles et des spores peuvent aussi être retrouvées dans les restes d'aliments consommés, mais aucune toxine préformée n'y est retrouvée.

Une dysbiose est suggérée mais les causes exactes de cette altération du microbiote intestinal restent inconnues. Le microbiote intestinal, normalement bien établi et pleinement fonctionnel après la petite enfance, prévient la colonisation du tube digestif par la bactérie.

Il est possible qu'un déséquilibre du microbiote (dépression immunitaire, utilisation prolongée d'antibiotiques ou chirurgie intestinale) soit en cause. Lorsque la toxine F a été impliquée, la maladie a été causée par *C. baratti* (Birch et Bleck 2019).

- Botulisme par blessure (d'inoculation)

Les spores de *C. botulinum* peuvent contaminer les plaies. En situation d'anaérobiose, la bactérie peut s'y développer et y produire de la neurotoxine (majoritairement de type A ou B). Cette forme de botulisme, beaucoup plus rare que le tétanos (Popoff 2018), est, depuis les années 1980, presque exclusivement liée à l'utilisation de drogues injectables, en particulier l'héroïne. Auparavant, les cas de botulisme de plaie (Austin, communication personnelle) survenaient suite à des fractures ouvertes, des plaies traumatiques profondes ou des plaies punctiformes contaminées par des corps étrangers. Il est essentiel que la blessure, contaminée par du *C. botulinum* soit suffisamment profonde pour créer des conditions d'anaérobiose permettant la germination de spores de *C. botulinum* et la production de toxine.

- Botulisme d'inhalation

Le botulisme par inhalation est très rare (Popoff 2018, Rao et Maslanka 2018). Quelques cas ont été signalés chez des employés de laboratoire qui préparaient de la toxine botulique concentrée par centrifugation continue (travailleurs de laboratoire en Allemagne, qui manipulaient une grande quantité de toxines (Holzer 1962)) et chez quelques personnes, à la suite de l'utilisation intranasale de cocaïne contaminée (MacDonald *et al.* 1985, Kudrow *et al.* 1988), dont des cas en France en 2005 (sérototype B) (Roblot *et al.* 2006, Popoff *et al.* 2013). La présence d'une sinusite à *C. botulinum* ou une absorption directe à travers une muqueuse nasale ont été suggérées comme hypothèses étiologiques.

L'inhalation pourrait également être l'une des voies potentielles d'attaque bioterroriste avec la toxine botulique, mais cet aspect ne sera pas discuté ici.

- Botulisme iatrogène : non discuté ici (rare)

#### 4.1.2 Manifestations cliniques

La suspicion clinique et le diagnostic présumé sont établis sur la base des signes cliniques et des informations épidémiologiques.

Le botulisme doit être suspecté chez un patient non fébrile, avec l'apparition aiguë de signes et symptômes d'une atteinte bilatérale des nerfs crâniens, suivie d'une paralysie flasque bilatérale

descendante des muscles volontaires, qui peut évoluer vers des troubles respiratoires critiques et même la mort.

Chez les nourrissons, le botulisme est suspecté s'il y a apparition aiguë d'une diminution de la succion, de l'apparition d'une ptose, d'inactivité et de constipation.

Le diagnostic présomptif peut être établi sur la base des seules observations cliniques.

Le Tableau 3 suivant décrit les délais d'incubation et les présentations cliniques spécifiques aux différents types de botulisme.

**Tableau 3 : Spécificité des types de botulisme humain**

	Incubation	Présentation clinique	Commentaires
Botulisme alimentaire	12-36 heures après ingestion (minimum six heures) peut aller jusqu'à 10 jours. Plus l'incubation est courte, plus l'évolution de la maladie est défavorable.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1ers symptômes : Nausées, vomissements, douleurs abdominales, diarrhée (seraient dus à la présence d'autres micro-organismes ou toxines présents dans les aliments mal conservés et ensuite ingérés)</li> <li>• Par la suite, atteinte des nerfs crâniens et paralysie descendante</li> <li>• Taux de létalité inférieur à 4 % (Pegram et Stone 2020)</li> </ul>	L'incubation, la durée et la gravité des symptômes (allant de manifestations mineures jusqu'au décès) dépendent de la dose absorbée mais peuvent aussi varier, à dose égale, en fonction du type ou du sous-type de la toxine. Une hospitalisation d'une durée d'un à trois mois peut être nécessaire (Pegram et Stone 2020)
Botulisme infantile	Non déterminée précisément, mais peut être courte (moins de trois jours).	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Constipation au début, suivie par une apparence léthargique, difficultés d'alimentation (i.e. : capacité réduite à sucer et à avaler), hypotonie descendante ou généralisée, anorexie, irritabilité, voix affaiblie (dont altération des pleurs)</li> <li>• Dans les formes graves : paralysie musculaire, dont celle des muscles respiratoires</li> <li>• Taux de létalité inférieur à 1 % aux USA (Pegram et Stone 2020)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Présentation et gravité de la maladie variable : à cause des variations de quantité d'inoculum bactérien et de la sensibilité de l'enfant</li> <li>• Progression des signes et symptômes une à deux semaines puis, stabilisation deux à trois semaines puis, guérison</li> <li>• Rechutes possibles</li> </ul>
Botulisme par blessure	Quatre à 17 jours après blessure accidentelle. Difficile à estimer chez les utilisateurs de drogues injectables (injections quotidiennes)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aucun symptôme gastro intestinal</li> <li>• Présence de signes et symptômes liés aux atteintes des nerfs crâniens et paralysie musculaire descendante</li> <li>• Taux de létalité établi entre 5 à 10 % (Institut Pasteur 2019)</li> </ul>	Seul type de botulisme s'accompagnant généralement de fièvre et de leucocytose (causées probablement par l'infection bactérienne de la plaie par des espèces autres que <i>C. botulinum</i> )

Faute de données, le botulisme par inhalation n'a pu être ajouté à ce tableau.



### 4.1.3 Diagnostic différentiel

L'atteinte précoce des nerfs crâniens caractéristique du botulisme est un élément essentiel du diagnostic différentiel et de la rapidité du diagnostic clinique qui sera établi.

Le diagnostic différentiel du botulisme d'origine alimentaire, par blessure et par colonisation intestinale de l'adulte comprend :

- La myasthénie grave,
- Le syndrome de Guillain-Barré,
- L'accident vasculaire cérébral,
- Le syndrome myasthénique de Lambert-Eaton (SMDL),
- La poliomyélite,
- La paralysie à tiques (hors Europe essentiellement).

### 4.1.4 Confirmation du diagnostic et tests de laboratoire

Le diagnostic de botulisme est confirmé par la détection et l'identification de la toxine botulique dans le sérum, dans les sécrétions gastriques, les selles, les vomissures ou les sources alimentaires, ou encore par la détection de la bactérie *C. botulinum* dans les selles, les échantillons de plaies ou les sources alimentaires.

La méthode universellement acceptée pour la confirmation de botulisme est le test biologique sur souris. Il faut noter la possibilité d'un résultat faussement négatif. En effet, en raison de l'extrême puissance de la toxine botulique chez l'être humain, la présence de la toxine dans le sérum en dessous du seuil de détection peut quand même provoquer une maladie chez un patient testé négatif. De plus, la toxine botulique n'est présente dans la circulation sanguine que de façon transitoire et rarement au-delà de huit jours après le début des symptômes ; la recherche doit donc être effectuée sur du sérum prélevé au début de la maladie. Le botulisme étant une affection méconnue des cliniciens, cette condition pré analytique capitale n'est pas toujours respectée. Dans ces conditions, l'analyse n'est pas concluante et n'exclut pas le botulisme.

Il n'y a actuellement aucun test rapide disponible dans les hôpitaux ou autre laboratoire clinique qui puisse permettre la détection rapide de la toxine botulique ou la bactérie *C. botulinum*.

Des cultures anaérobies de selles et des aliments concernés (si disponibles) peuvent aider à confirmer le diagnostic. Cependant, les cultures peuvent demeurer négatives, car des conditions anaérobies strictes sont requises pour la croissance de *C. botulinum* et les micro-organismes fécaux présents dans les échantillons peuvent entrer en compétition et rendre la recherche difficile.

La détection de la toxine demande un délai de 24 à 48 heures et celle de la bactérie jusqu'à six jours. Compte tenu de la gravité de la maladie, la décision d'administrer l'antitoxine doit se baser sur l'histoire et la présentation clinique présumant du botulisme. La déclaration aux autorités de santé doit également être faite sans attendre la confirmation biologique afin de déclencher au plus tôt une enquête alimentaire et éviter ainsi l'apparition d'autres cas.

Les modalités attendues d'identification de la toxine ou de *C. botulinum* dans différents échantillons varient selon les différents types de botulisme.

- Botulisme alimentaire (intoxication) :  
Compte tenu du délai entre l'ingestion et le début des symptômes, la toxine botulique peut être détectée dans le sérum au grand maximum 12 jours après l'ingestion, sa présence confirmant le diagnostic. La toxine peut également être présente dans les selles, les vomissures et/ou les aliments suspects. Il est difficile de quantifier les toxines dans les matrices alimentaires (section 2.2.1).  
La confirmation en laboratoire n'est pas nécessaire chez un patient présentant des signes cliniques évocateurs et ayant partagé le même aliment qu'un cas confirmé en laboratoire.
- Botulisme infantile ou infectieux de l'adulte (toxi-infection) :  
Le botulisme est fortement soupçonné s'il y a isolement de spores de *C. botulinum* et présence de toxine botulique dans les selles. Les résultats de la recherche de toxine botulique dans le

sérum de patients en cas de suspicion de botulisme infantile sont souvent négatifs. *C. botulinum* peut être cultivé à partir de restes d'aliments, mais ceux-ci fournissent souvent un résultat négatif pour la toxine.

- Botulisme par blessure :  
L'isolement de *C. botulinum* au niveau de la plaie confirme le diagnostic. Les résultats des tests de dépistage de la toxine dans le sérum sont souvent négatifs.

#### 4.1.5 Traitement

Le traitement est prioritairement symptomatique.

Les éléments importants du traitement sont (Rao et Maslanka 2018, Pegram et Stone 2020):

- D'abord et avant tout, une surveillance continue des signes cliniques et des divers paramètres pour réagir rapidement et éviter une insuffisance respiratoire qui est la principale cause de décès chez les patients. L'intubation rapide et une ventilation mécanique réduiront considérablement le risque de mortalité. En cas de ventilation mécanique prolongée, les soins de soutien doivent inclure une alimentation naso-gastrique continue de faible volume (pour minimiser le risque d'aspiration). En cas d'iléus grave, une hyper alimentation parentérale peut être nécessaire.

- L'administration rapide d'une antitoxine

L'administration d'antitoxine étant plus bénéfique au début de la maladie clinique, elle peut être effectuée dès que la suspicion clinique de botulisme est élevée et d'autant plus si les symptômes progressent. Elle doit être administrée, pour les cas sévères, dans les 24 heures après le début des symptômes (Institut Pasteur 2019) et ce, avant même d'avoir écarté les autres causes possibles des signes cliniques constatés et avant la confirmation ou non du botulisme par le laboratoire.

L'antitoxine botulique se lie aux toxines circulantes et empêche leur liaison à la jonction neuromusculaire, mais elle ne peut inverser la paralysie.

Les données sur l'efficacité de l'antitoxine botulique sont limitées et non contrôlées, mais elles démontrent un bénéfice (Pegram et Stone 2020). De plus, son administration précoce (par exemple, dans les 48 à 96 heures après l'apparition des signes et symptômes) est associée à une réduction de la mortalité par rapport à une administration ultérieure (Pegram et Stone 2020).

Diverses formes de thérapies à base d'antitoxine botulique sont disponibles dans le monde. Il existe deux thérapies antitoxines botuliques en France :

- L'antitoxine botulique heptavalente équine est utilisée pour traiter les enfants de plus d'un an ainsi que les adultes. Elle contient des anticorps contre sept des neuf types de toxines botuliques connus (A à H + X). L'antitoxine botulique équine peut provoquer une sensibilisation et une anaphylaxie, avec un taux d'anaphylaxie estimé à 1 à 2 % (Pegram et Stone 2020).

Cette antitoxine heptavalente ne dispose pas d'AMM en France et n'est disponible que dans le cadre d'une Autorisation Temporaire d'Utilisation (ATU) nominative délivrée par l'ANSM.

Comme pour d'autres formulations d'antitoxines, les données humaines relatives à l'efficacité sont limitées.

- L'immunoglobuline antitoxine botulique d'origine humaine (appelée BIG-IV ou BabyBIG) dirigée contre les types A et B est également disponible pour une utilisation intraveineuse chez les nourrissons de moins d'un an chez qui le botulisme infantile a été diagnostiqué. Elle est disponible dans le cadre d'une ATU et doit être administrée le plus tôt possible après l'apparition des symptômes.

- Compléments de traitements spécifiques au type de botulisme :

- Botulisme alimentaire

Des laxatifs, des lavements ou autres cathartiques peuvent être administrés, à condition qu'il n'y ait pas d'iléus important.

- Botulisme infantile

Les antibiotiques ne doivent pas être prescrits pour le botulisme infantile, sauf s'ils sont indiqués pour une infection concomitante (Pediatrics 2018) ; on craint théoriquement que la lyse du *C. botulinum* intraluminal n'augmente la quantité de toxine disponible pour l'absorption (Hodowanec et Bleck 2015, Pegram et Stone 2020).

- Botulisme par blessure

Il doit y avoir débridement important de la plaie, même si elle semble bien se cicatriser. La protection adéquate contre le tétanos est aussi à prioriser. Pour le botulisme par blessure, des antibiotiques sont aussi nécessaires, en plus du débridement.

L'efficacité de l'antibiothérapie n'a pas été démontrée, mais elle est largement utilisée et recommandée pour le botulisme par blessure après l'administration d'une antitoxine. La pénicilline G possède une efficacité démontrée contre les clostridies et est fréquemment utilisée. Le métronidazole est une alternative possible pour les patients allergiques à la pénicilline. Cependant, les aminoglycosides, la tétracycline et les polymyxines ne doivent pas être utilisés chez les patients atteints de botulisme connu ou suspecté car ils peuvent induire un blocage neuromusculaire, accentuant les effets de la toxine.

Pour les patients atteints de botulisme par blessure qui présentent une leucocytose, de la fièvre, un abcès ou de la cellulite, un antibiotique à plus large spectre est recommandé en raison du risque d'infection par plusieurs micro-organismes.

La durée du traitement antimicrobien dépendra de l'étendue de la plaie.

#### 4.1.6 Évolution clinique

La majorité des patients, rapidement diagnostiqués et pris en charge, guérit sans séquelles. Cependant, selon la gravité de l'atteinte, la guérison peut survenir après plusieurs mois. La rémission complète peut ne subvenir qu'un an après l'apparition des signes et symptômes. L'amélioration clinique est liée à l'apparition de nouvelles terminaisons nerveuses.

Les patients ayant eu besoin d'une ventilation mécanique sont sevrés après 58 jours (toxine de type A) et 26 jours (toxine de type B) en moyenne (Hughes *et al.* 1981).

Actuellement, avec un diagnostic et des soins de support rapides, le taux de mortalité du botulisme est faible, moins de 1% pour le botulisme infantile et moins de 10% pour les autres formes. (Pegram et Stone 2020).

Le botulisme humain est une maladie grave et létale.

Il existe plusieurs formes de botulisme, selon le mode de contamination et d'exposition à la toxine : alimentaire et infantile (les plus fréquents), infectieux de l'adulte et par blessure.

La suspicion clinique et le diagnostic présumé sont établis sur la base des signes cliniques et des informations épidémiologiques : atteinte des nerfs crâniens, suivie d'une paralysie flasque bilatérale des muscles volontaires pouvant causer une insuffisance respiratoire grave et le décès.

Le diagnostic est confirmé par la détection et l'identification de la toxine botulique ou de la bactérie dans des spécimens cliniques et, s'il y a lieu, dans les aliments.

Le traitement est, au début, symptomatique (prévention d'une insuffisance respiratoire) et peut être complété le plus rapidement possible, par l'administration d'une antitoxine heptavalente.

Actuellement, avec un diagnostic et un traitement rapides, la guérison est sans séquelles. La létalité est faible, moins de 1 % pour le botulisme infantile et moins de 10 % pour les autres formes.

## 4.2 Données de surveillance du botulisme en santé humaine

Préalablement à l'analyse des données de surveillance, le GT souligne la différence de définition existant en santé humaine et en santé animale entre les termes « cas » et « foyer » de botulisme.

En santé humaine, le « cas de botulisme » désigne un seul individu, tandis que le « foyer de botulisme » désigne un ou plusieurs individus.

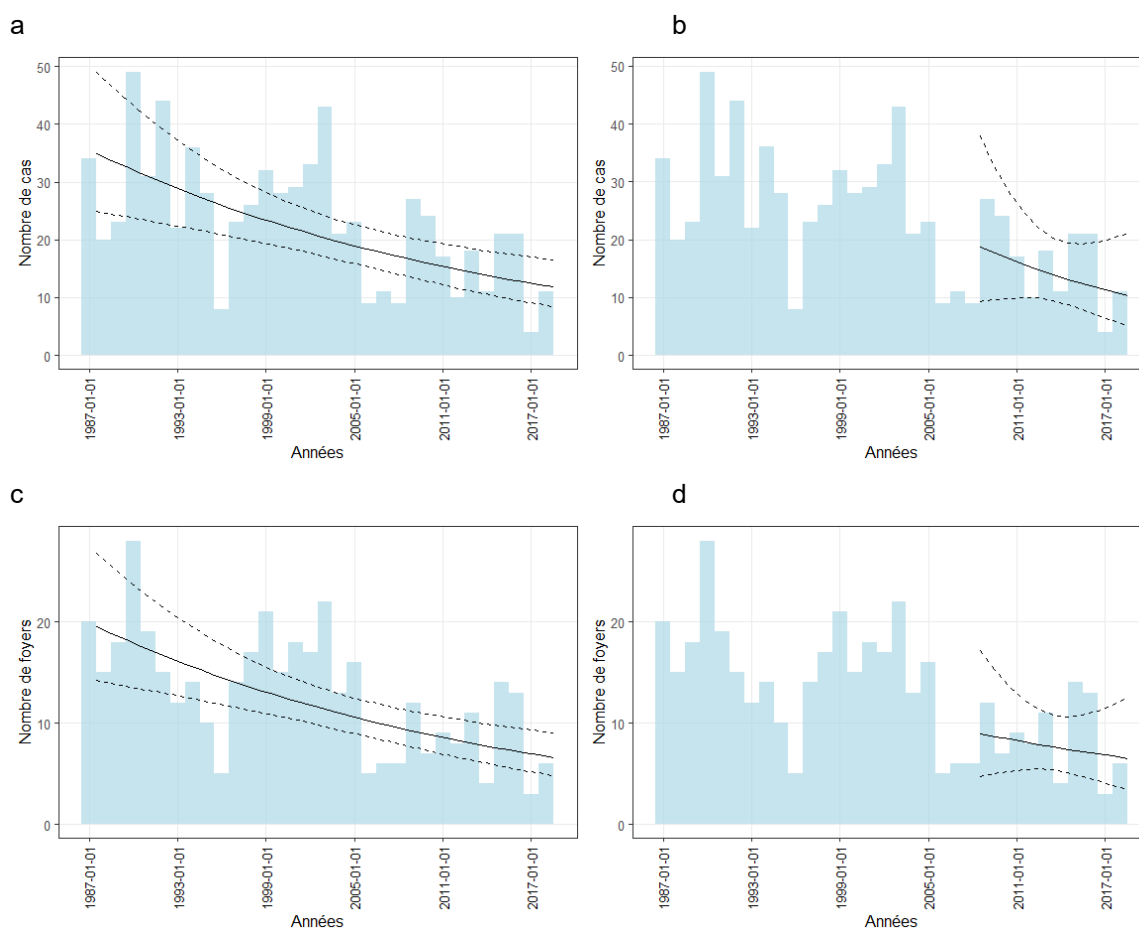
A titre d'information, en santé animale, les termes « cas » et « foyers » désignent deux populations animales différentes, quel que soit le nombre d'animaux concernés : le terme « cas » est uniquement utilisé pour des infections en faune sauvage (et peut concerner un ou plusieurs animaux) alors que le terme « foyer » est uniquement utilisé pour des infections en faune domestique.

#### 4.2.1 Surveillance des cas de botulisme humain en France

Bien que le botulisme humain soit une maladie rare, il est régulièrement observé en France et fait l'objet d'une surveillance attentive par les autorités de santé grâce à la mise en place du Centre National de Référence du botulisme depuis 1978 et à la déclaration obligatoire de la maladie à SPF depuis 1986.

Ce bilan présente la situation du botulisme humain<sup>10</sup> en France à partir des données épidémiologiques de SPF et des investigations biologiques du CNR et révèle que le botulisme d'origine alimentaire est celui qui est très majoritairement observé sur notre territoire : ainsi, parmi les 100 foyers de botulisme humain recensés sur la période 2008-2018, 82 % des foyers (89,8 % des cas) étaient d'origine alimentaire, 17 % (9,6 % cas) des foyers de botulisme infantile et 1 % (0,6 % des cas) de botulisme par blessure, observé en 2008 à la suite d'une fracture ouverte de la jambe, chez un accidenté de la route. Le botulisme par inhalation est extrêmement rare en France : un unique foyer (deux cas) a été rapporté sur la période 1987-2019 par inhalation de cocaïne.

Le nombre de foyers comme le nombre de cas de botulisme humain d'origine alimentaire a significativement diminué au cours de la période 1987-2018 (Figure 5 a et c). Le nombre de foyers et de cas est disponible avant cette période mais la différence du système de surveillance rend toute comparaison difficile. En considérant uniquement la période de 2008 à 2018 le nombre de cas et de foyers reste stable (Figure 5b et d). Au cours des dix dernières années, on observe de trois à 13 foyers (incidence annuelle de 7,5 foyers/an) et quatre à 25 cas (incidence annuelle de 14,5 cas/an) de botulisme humain d'origine alimentaire en France.

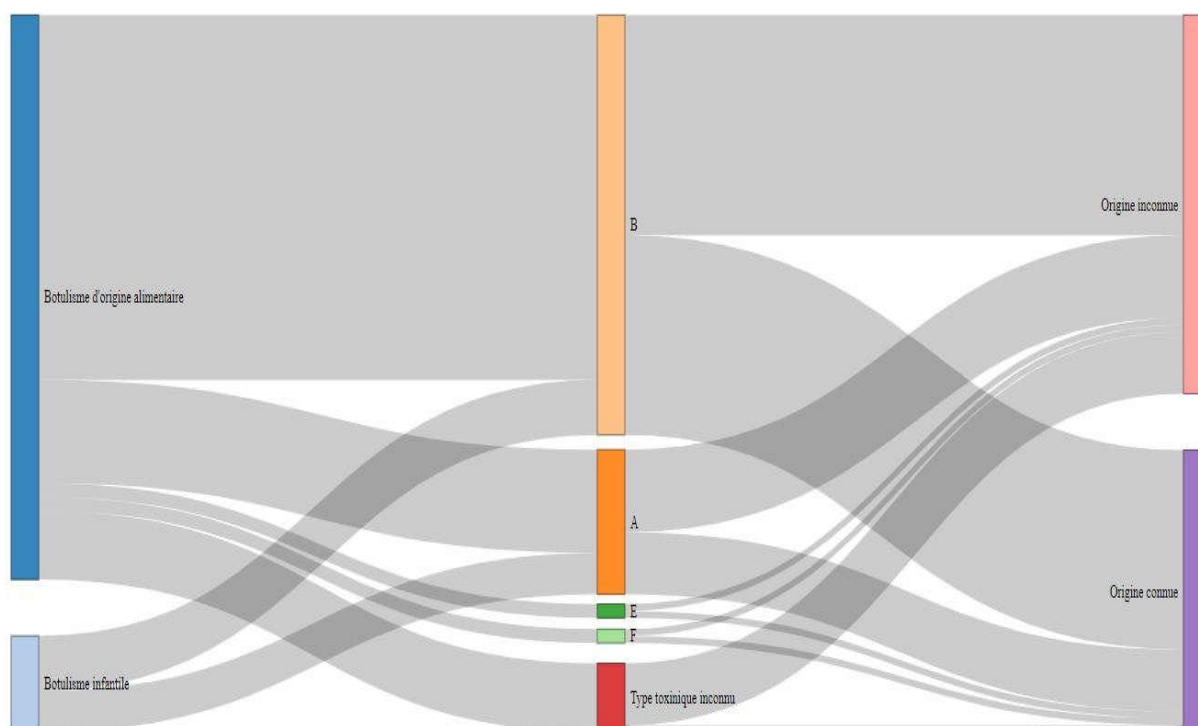


**Figure 5 : Nombre de foyers et de cas de botulisme humains d'origine alimentaire**

(Légende : les courbes représentent une analyse de tendance sur la période 1987-2018 (a et c) et sur la période 2008-2018 (panel b et d). L'analyse de tendance a été réalisée à l'aide du package R incidence (Kamvar *et al.* 2019)

#### 4.2.1.1 Confirmation des cas humains et de leur origine alimentaire sur la période 2008-2018 en France

Au cours de la période 2008-2018, 82 foyers de botulisme humain d'origine alimentaire ont été recensés en France (cf. Figure 6). Ces 82 foyers représentent un total de 159 cas (le nombre maximal de personnes impliquées dans un foyer est de 6 personnes). Le type B est responsable de 53 foyers (et 106 cas) soit 64 % des foyers et 67 % des cas, le type A de 15 foyers (30 cas) soit 18 % des foyers et 19 % des cas. Les types E (deux foyers) et F (deux foyers) (Mazuet *et al.* 2017) sont à l'origine de quatre foyers impliquant quatre et cinq cas respectivement. Enfin, pour 10 foyers (14 cas) il n'a pas été possible de déterminer le type toxinique à l'origine des foyers ou des cas (prélèvements biologiques absents, insuffisants ou trop tardifs, aliment non identifié ou indisponible). Faute d'absence de restes alimentaires disponibles pour analyse, l'aliment responsable n'a pu être identifié que dans 41 foyers (soit 50 %).



**Figure 6 : Répartition des foyers de botulisme d'origine alimentaire (N = 82) et des foyers de botulisme infantile (N = 14) en fonction du type de toxine botulique et de l'identification de l'origine des cas sur la période 2008-2018 en France**

d'après BEH (Mazuet *et al.* 2011, Mazuet *et al.* 2018, Mazuet *et al.* 2014)

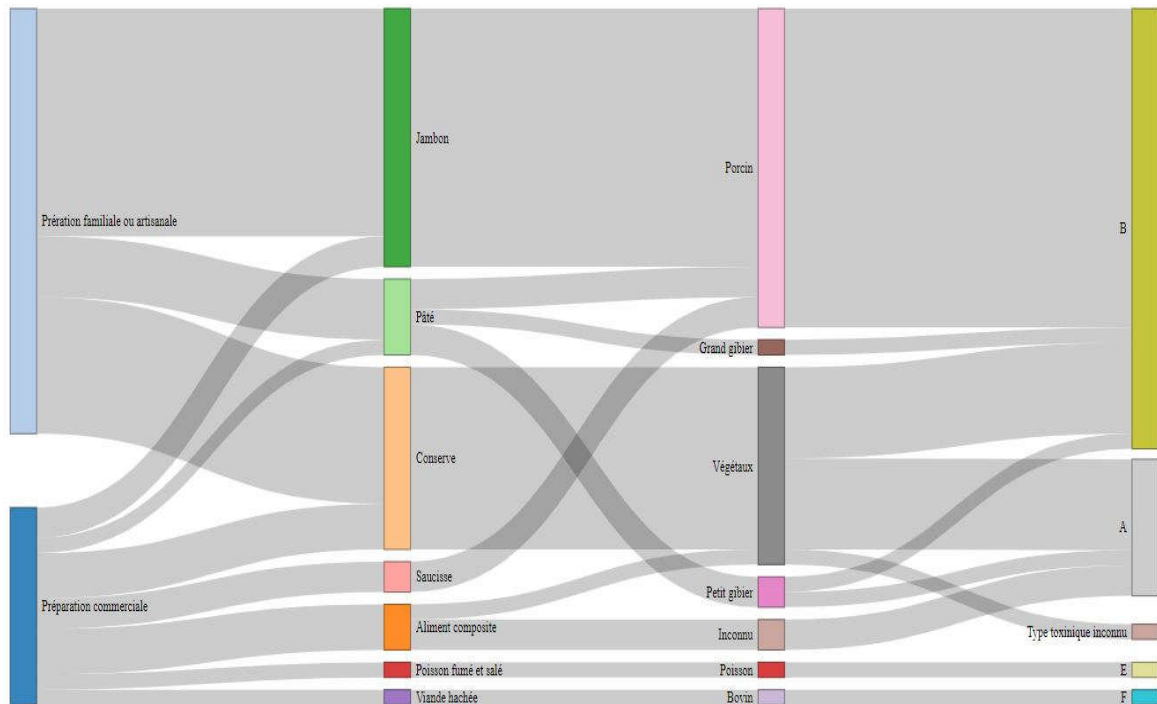
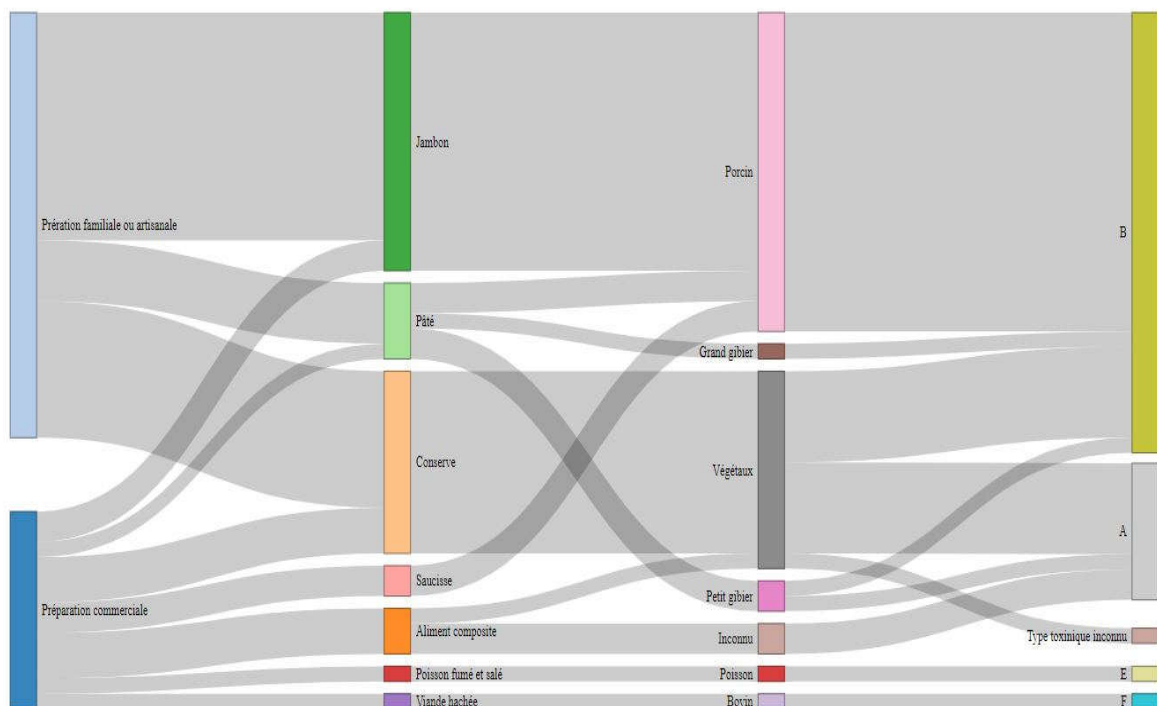


Figure 7 présente les caractéristiques des foyers de botulisme humain sur la période 2008-2018 pour lesquels la source alimentaire a été identifiée. Parmi les 41 foyers, 28 foyers ont pour origine des préparations familiales et 13 des préparations commerciales (King 2008) et/ou artisanales (Pigeon *et al.* 2011). Les deux sources principales d'aliment sont le jambon cru (N=17) ainsi que les conserves de légumes (N=12). D'autres produits de charcuterie sont impliqués (N=7). Enfin trois aliments composites, un poisson fumé et salé (King *et al.* 2009) et de la viande hachée ont également été à l'origine de foyers de botulisme.

Les types A et B restent largement majoritaires et aucun foyer/cas de botulisme humain de type C, D ou mosaïque C/D et D/C n'a été recensé en France durant cette période.



**Figure 7 : Répartition des foyers de botulisme alimentaire avec identification de la source alimentaire (N = 41) en fonction du type de préparation, de la nature de l'aliment, de l'origine des aliments et du type de toxine botulique**

D'après BEH (Mazuet *et al.* 2011, Mazuet *et al.* 2018)

#### 4.2.1.2 Cas de botulisme infantile en France

Le premier cas de botulisme infantile a été identifié en France en 2004 (King *et al.* 2010). Au cours de la période 2004-2018, 17 cas de botulisme infantile et deux cas de botulisme par colonisation intestinale à l'âge de 12 et 18 mois des nourrissons ont été signalés. Neuf étaient atteints de botulisme de type A et dix de type B. Tous les échantillons d'aliments éventuellement impliqués ont fourni un résultat négatif (y compris les six échantillons de miel). Une contamination environnementale a été suspectée dans deux cas (Bernardor *et al.* 2018). En conclusion, l'origine des cas de botulisme infantile en France sur la période 2004-2018 reste inexplicite.

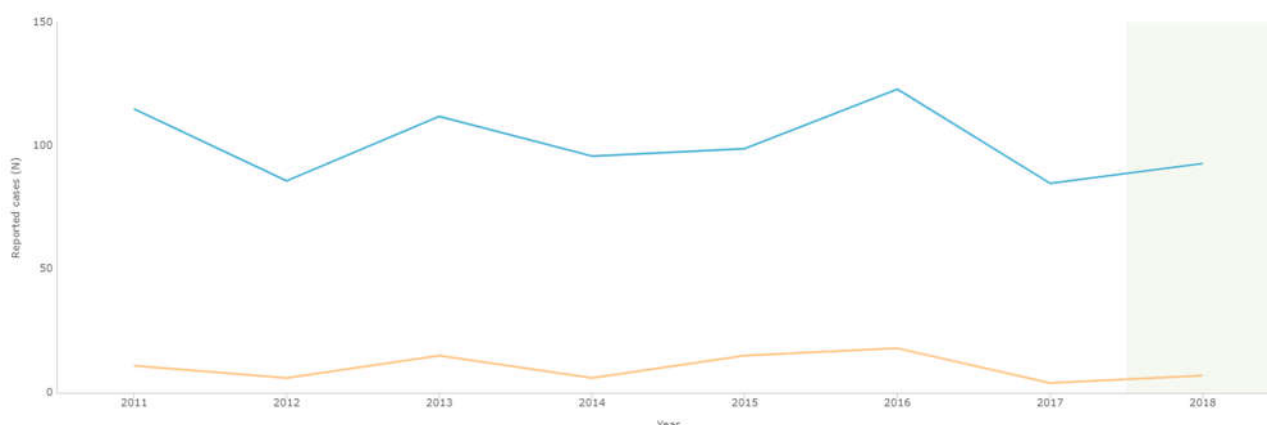
Il n'y a pas de situation particulière dans les DROM nécessitant un paragraphe distinct.

#### 4.2.2 Situation dans d'autres pays

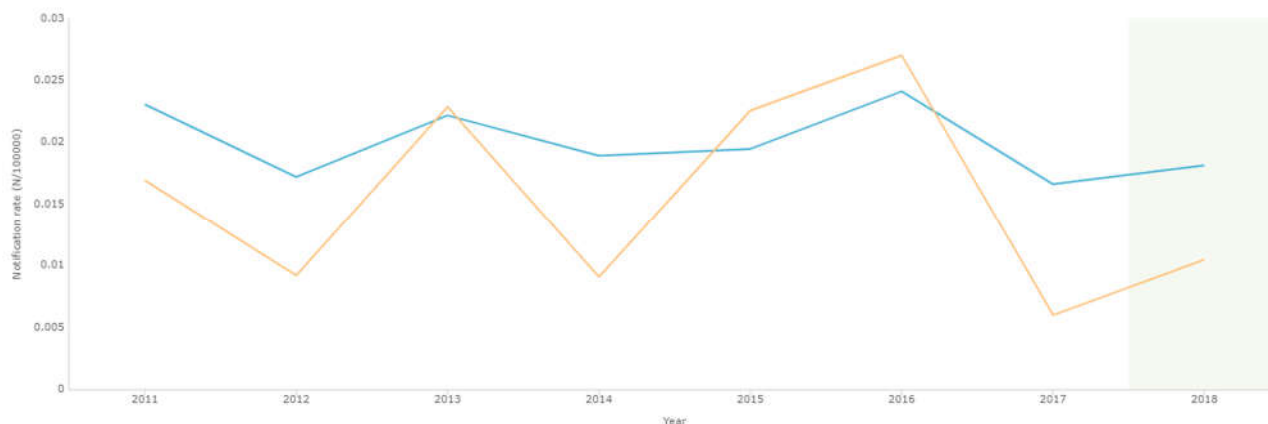
##### 4.2.2.1 Analyse des données européennes d'incidence des cas de botulisme humain

Les données disponibles pour les cas de botulisme au niveau européen sont recensées par l'ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*). La majeure partie des données concernent des cas de botulisme alimentaire. Il existe quelques cas associés à du botulisme par injection notamment au Royaume-Uni et en Norvège (ECDC 2018). Les données remontant des différents pays européens proviennent de systèmes équivalents au système français de déclaration obligatoire (ECDC 2019, Therre 1999). Ces systèmes de surveillance peuvent être considérés comme exhaustifs pour la détection des formes graves de botulisme.

Le nombre de cas confirmés sur la période 2011-2018 est relativement stable avec une centaine de cas rapportés par an (Figure 8a). L'incidence en Europe (Figure 8b) est de l'ordre de 0,02 cas pour 100 000 habitants. Cette incidence est similaire à l'incidence en France. Les pays qui ont enregistré le plus grand nombre de cas confirmés sont l'Italie, le Royaume-Uni, la Pologne, la Roumanie et la France.



b

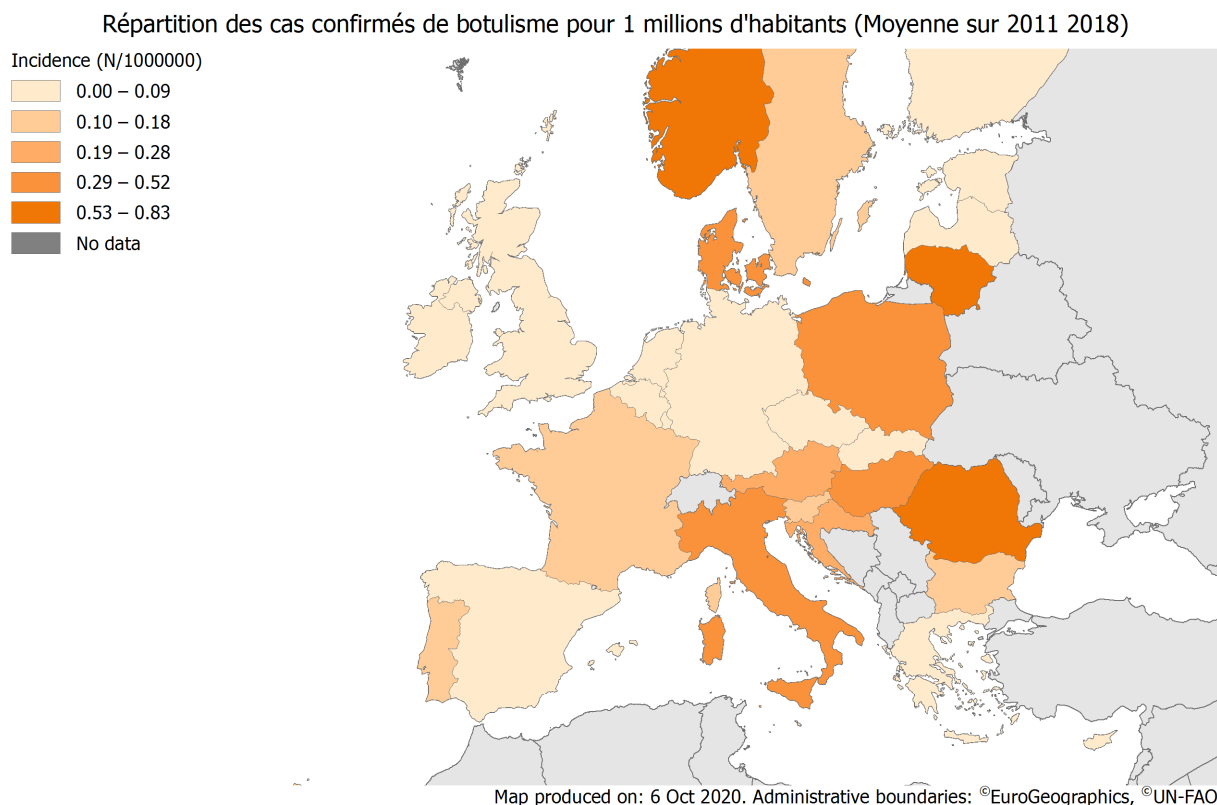


**Figure 8 : Nombre de cas rapportés (a) et le taux d'incidence annuelle (b) dans l'Union européenne pour la période 2011-2018**

Dans l'Union européenne (courbe bleue) incluant les données françaises (courbe orange). D'après les données de (ECDC 2020)

La Figure 9 rapporte l'hétérogénéité des taux d'incidence. Les pays présentant les plus fortes incidences sont la Norvège, la Roumanie et la Lituanie. Le Danemark, l'Italie, la Pologne, la Slovaquie présentent également des incidences supérieures à la moyenne. L'ECDC ne note pas d'évolution significative de l'incidence entre 2011 et 2015 (ECDC 2018).

Les données concernant les types de toxines sont également disponibles depuis 2013 (ECDC 2020). Les toxines botuliques de type B représentent 82 % des cas confirmés, contre 4 % pour les toxines botuliques de type A et E et 1 % pour celles du type F.





### Figure 9 : Moyenne des taux d'incidence nationaux annuels des cas de botulisme sur la période 2011-2018.

D'après les données de surveillance européenne (ECDC, 2020)

#### 4.2.2.2 Données sur les cas de botulisme issues de la littérature scientifique

Plusieurs revues de la littérature pour des synthèses nationales sur les cas de botulisme ont été publiées (Anniballi *et al.* 2017, Czerwiński, Czarkowski, et Kondej 2018, Fleck-Derderian *et al.* 2017, Karsen *et al.* 2019). Elles concernent notamment les pays européens présentant la plus forte incidence. Ces publications permettent de disposer d'information sur les types de toxine, les aliments et les pratiques de préparation alimentaires à l'origine des cas de botulisme.

En Pologne, les aliments à l'origine des foyers de botulisme sont principalement des préparations familiales (Galazka et Przybylska 1999, Czerwiński, Czarkowski, et Kondej 2018). L'incidence a été divisée par quatre entre 1997 et 2015. Près de 73 % des cas peuvent être reliés à des conserves familiales de viandes ou de légumes ainsi qu'à des charcuteries (Galazka et Przybylska 1999). Le type B est le plus fréquent (15/18 cas soit 83 % en 2016).

En Italie, de 1986 à 2015, 466 cas de botulisme ont été recensés dont 93 % sont des cas alimentaires (Anniballi *et al.* 2017). Le botulisme infantile ne représente que 6 % des cas et le botulisme par plaie 1 % (de 1986 à 2015, six cas ont été signalés). À l'exception d'un cas impliquant un consommateur de drogue, tous les autres cas étaient dus à des blessures traumatiques (chutes accidentelles lors d'activités sportives ou accidents du travail dont un menuisier et un agriculteur tombé dans son champ). Les six cas étaient de type B. Pour les foyers alimentaires, la plupart (81 % des foyers) sont liés à des conserves familiales. Les légumes en conserve ou conservés dans l'huile et la saumure ont été associés à 72% des foyers. Les autres aliments impliqués étaient les produits de la mer (7,6%), le jambon et les charcuteries (11,7 %), la viande en conserve (5,9 %), le fromage (2,5%) et le tofu et le seitan (1,7 %). La toxine botulique de type B était impliquée dans 79,1 % (261/330), suivie de la toxine de type A (9,7 %, 32/330), les types F, Ab et Bf, représentant respectivement 0,3 % (1/330), 1,5 % (5/330) et 0,6 % (2/330) du total des incidents.

En Turquie entre 1983 et 2017, 95 cas de botulisme ont été recensés. La catégorie d'aliment principalement à l'origine des cas était les conserves de légumes. Tous les aliments identifiés étaient des conserves familiales (Karsen *et al.* 2019). Les suspicions cliniques sont rarement confirmées biologiquement.

En Ukraine, entre 1955 et 2018, 8614 cas de botulisme ont été recensés causés majoritairement par les types B (59,64%), E (25,47%) et A (7,97%) (Semenko *et al.* 2020). Les cas liés aux type C sont très minoritaires (13 cas - 0,56%) et ne sont que suspectés, les conserves familiales de viande et de poisson sont les principaux aliments impliqués.

En plus de ces synthèses par pays, une méta-analyse des foyers a été récemment conduite (Fleck-Derderian *et al.* 2017). Cette méta-analyse a permis d'inclure 197 foyers de botulisme alimentaire (dont près de la moitié concernait des foyers aux USA). Le nombre médian de cas par foyer était de 3 (le plus grand épisode de botulisme comprend 97 cas). Les types de toxines A, B, E et F ont été identifiés comme l'agent causal dans respectivement 34 %, 16 %, 17 % et 1 % des foyers. Un total de 81% des foyers correspondaient à des préparations familiales.

Le botulisme infantile est la forme la plus fréquente aux États-Unis (Institut Pasteur 2019) et représente 80 % des cas de botulisme infantile signalés dans le monde depuis que cette forme de la maladie a été reconnue pour la première fois en 1976 (Rao et Maslanka 2018). Le botulisme infantile, aux États Unis, a une incidence moyenne annuelle de 2,1 cas pour 100 000 nouveaux-nés vivants (Birch et Bleck 2019). Il est surtout causé par les sérotypes A et B (Rao et Maslanka 2018, Popoff 2018). Une revue récente couvrant la période 1976-2016 recense 1345 cas (6,5 cas / 100000 naissances vivantes / an) causés par les types A, B, Ba, Bf et F en Californie (Panditrao *et al.* 2020).

Les premiers cas de botulisme par blessure ont été signalés aux États-Unis dans les années 1990 et, en Europe, au début des années 2000. Des cas groupés ont été observés, particulièrement en Allemagne et au Royaume Uni (Institut Pasteur 2019). Tous ces cas de botulisme par blessure étaient liés à la consommation de drogues injectables.

En Amérique du Nord, les foyers de botulisme alimentaire ont pour origine des légumes (mis en conserve à domicile), mais surtout (toxine de type E) des poissons ou des mammifères marins en raison

de la préparation traditionnelle dans les communautés autochtones (ex. : fermentation du poisson) (Birch et Bleck 2019). Le même constat est fait en Asie dans différents pays (Rao Vemula, Naveen Kumar, et Polasa 2012, Montazer Khorasan *et al.* 2020, Kenri *et al.* 2014) : les cas sont le plus souvent attribués aux produits de la pêche ou à des végétaux.

En conclusion, l'analyse des données de surveillance du botulisme humain dans le monde sur la période 1976-2018 indique que :

- la forme de botulisme la plus fréquente est le botulisme alimentaire (ingestion de toxine préformée). Le botulisme infantile est majoritaire parmi les autres formes de botulisme.
- les types de toxines botuliques à l'origine de cas humains sont les types A et B puis E, occasionnellement F.

### 4.3 Doses létales des toxines botuliques chez l'être humain

Les doses létales chez l'être humain ont été extrapolées à partir de l'expérimentation animale et plus particulièrement à partir des travaux effectués chez les primates en 1967 sur 101 singes Rhésus (*Macaca mulatta*) et 28 singes écureuil (*Saimiri sciureus*) (Herrero *et al.* 1967) et en 1993 sur 23 singes Rhésus (Franz *et al.* 1993). Les données sont présentées dans le Tableau 4. En ce qui concerne le botulisme alimentaire, il est difficile d'évaluer la quantité de toxine ingérée par les victimes du fait de la difficulté de quantifier les toxines dans les matrices alimentaires en raison :

- de la complexité des toxines botuliques ;
- du faible taux de toxine présente dans les aliments ;
- de l'hétérogénéité de la répartition de la toxine dans la matrice alimentaire ;
- du manque de disponibilité d'une technique de quantification sans biais ;
- du fait que souvent, il ne reste plus suffisamment de l'aliment suspecté pour conduire les analyses post-intoxinations.

Il n'y a pas de doses létales précises chez l'être humain pour les toxines botuliques B, E, F et G compte tenu de la rareté des cas. Les toxines botuliques B, E, F et G sont considérées en général comme moins toxiques que la toxine botulique A. La rareté des cas de botulisme humain de type C ou D ne permet pas de déterminer quelle pourrait être la dose létale pour l'être humain.

**Tableau 4 : Toxicité des types de toxine botulique (BoNT) selon le mode d'inoculation chez les primates humains (doses létales extrapolées de l'expérimentation animale) et chez les primates non humains (doses létales expérimentales)**

Les préparations pharmaceutiques commerciales de toxine botulique A à quantité égale ont une activité 50 à 100 fois supérieure chez l'être humain que les préparations de toxine botulique B (Walker et Dayan 2014). Les données sont difficilement comparables d'une publication à l'autre et le GT souligne qu'il est surtout important de retenir les ordres de grandeur.

Être humain ( <i>Homo sapiens</i> )	Doses létales par kg		
	Voie digestive	Voie parentérale	Voie inhalée
	-LD <sub>50</sub> Type A <sup>1</sup> : 1 µg -LD <sub>50</sub> type B <sup>2 11</sup> : 30000 MLD <sub>50</sub> -Dose minimale pour provoquer la maladie Type A <sup>2</sup> : 30 à 100 ng	-LD <sub>50</sub> Type A <sup>1</sup> : 1 à 2 ng	-LD <sub>50</sub> Type A <sup>1</sup> : 10 à 15 ng -LD <sub>100</sub> Type A <sup>2</sup> : 100 ng

<sup>11</sup> Valeur établie à partir d'une seule publication

Singes	Voie d'administration et espèce de singe non précisée Type A : 0,5 à 0,7 ng <sup>3</sup> Type C : 0,4 ng <sup>3</sup> Type D : 40 ng <sup>3</sup> Type E : 1,1 ng <sup>3</sup>		
	Rhésus ( <i>Macaca mulatta</i> ) Type A LD <sub>50</sub> : 30500 MU <sup>4</sup>	Singe-écureuil ( <i>Saimiri sciureus</i> ) Type A LD <sub>50</sub> : 66 MU <sup>4</sup> <u>Rhésus</u> Type A LD <sub>50</sub> : 40 MU <sup>4</sup> <u>Espèce non spécifiée</u> Type A LD <sub>50</sub> <sup>6</sup> : 39 U et signes cliniques à partir de 33 U	Rhésus ( <i>Macaca mulatta</i> ) Type A LD <sub>50</sub> <sup>5</sup> : 30 (0 à 400 MIPLD <sub>50</sub> ) Type A LD <sub>50</sub> <sup>7</sup> : 550 MLD <sub>50</sub> Type B LD <sub>50</sub> <sup>7</sup> : 21 600 MLD <sub>50</sub>

(1) Arnon *et al.* (2001). LD Lethal Dose

(2) Peck (2009). MLD<sup>12</sup> : Mouse Lethal Dose

(3) Gill (1982)

(4) Herrero *et al.* (1967). D'après les informations fournies dans la publication, 1 MU (Mouse Unit) correspondrait à 30 pg de toxine de type A.

(5) Franz *et al.* (1993). MIPLD : *Mouse IntraPeritoneal Letal Dose*

(6) Scott et Suzuki (1988). D'après les informations fournies dans la publication une unité U correspondrait à une dose létale souris soit 0,25 ng de toxine botulique de type A sous forme de complexe.

(7) Sanford *et al.* (2010)

#### 4.4 Question du caractère zoonotique des types C, D et mosaïques C /D et D/C : revue de littérature

D'un point de vue génomique, *C. botulinum* du groupe III est différent de *C. botulinum* des groupe I et II. Le support des gènes impliqués dans la toxinogenèse est également différent. Les gènes BoNT C et BoNT D sont localisés sur des phages non intégrés au chromosome. La lysogénie est instable et le phage peut être perdu au cours de la culture.

Le caractère zoonotique des *Clostridium* du groupe III (types toxines C, D et mosaïques C/D et D/C) a été évalué par le Groupe Socle, par l'examen des données épidémiologiques internationales (cas de botulisme humain liés à ces toxines) et des résultats d'essais *in vivo* et *in vitro* sur l'effet des toxines sur l'être humain.

##### 4.4.1 Analyse des publications sur les cas humains et chez des primates liés aux types C et D de *C. botulinum*

Neuf publications ont été identifiées sur la base d'une revue récente (Rasetti-Escargueil, Lemichez, et Popoff 2019) et analysées, puis classées en foyers suspects ou confirmés selon les critères actuellement utilisés par le CNR et Santé Publique France. Deux publications portant sur des cas survenus chez des primates ont également été examinées. Une publication récente (Semenko *et al.* 2020) fait mention de foyers suspects de botulisme de type C, mais elle n'a pas fait l'objet d'une analyse par le GT du fait de l'absence de précisions sur la définition des cas.

<sup>12</sup> *Mouse Lethal Dose* : dose de toxine entraînant la mort chez une souris par injection intra-péritonéale. Cette dose peut varier en fonction du type et sous-type de toxine injectée.

L'analyse critique des publications sur les cas humains a conduit à identifier, au niveau international, entre 1950 et 2006 (Cf. Tableau 5) :

- Deux foyers de botulisme de type C confirmés (cinq cas dont un décès ; France, Japon)
- Quatre suspicions cliniques de botulisme de type C (sept cas dont deux décès ; USA, ex URSS, France)
- Un foyer de botulisme de type D suspecté (deux cas ; Tchad)
- Six foyers sans confirmation du type (B ou C) (14 cas dont quatre décès ; ex Rhodésie, Sénégal, France)

Par ailleurs, deux foyers de botulisme de type C ont été décrits chez des primates.

### **Incertitudes :**

Les principales incertitudes identifiées au cours de cette analyse sont liées à la méthode de diagnostic. Avant 1970, le diagnostic de botulisme humain est essentiellement confirmé biologiquement par la mise en évidence d'une toxine préformée présente dans l'aliment suspect. Le diagnostic sur sérum du malade n'était pas réalisé en France avant 1970. L'hypothèse que des cas de botulisme C ou D aient ainsi pu échapper au diagnostic peut donc être émise.

La mise à disposition de méthodes performantes de typage des toxines et de criblage des gènes est plus récente. Mais, elle correspond à une période où l'incidence du botulisme est plus faible. L'existence de telles méthodes à une période où l'incidence était plus élevée aurait peut-être permis de révéler d'éventuels cas de botulisme C et D.

De manière générale, une certaine hétérogénéité quant aux méthodes mises en œuvre en ce qui concerne les paramètres suivants peut être constatée : le poids recommandé des souris, le volume injecté, le titrage de la toxine avant la séro-neutralisation, les temps d'incubation, le titre des sérums anti-toxines. Cette variabilité selon les laboratoires et études publiées constitue également une source d'incertitude.

1

Tableau 5 : Bilan des cas recensés (humains et primates non humains) liés aux types C et D

Pays	Année	Foyer	Nombre de cas * (Décès)	Prélèvements biologiques analysés et résultats	Source suspectée ou confirmée Prélèvements alimentaires ou environnementaux analysés	Reference
USA	1950	Suspicion clinique	4 (1)	Liquide stomacal : BoNT/C et C. botulinum type C	Aliment ?	Meyer (1953)
France	1955	Botulisme alimentaire Type indéterminé	2 (0)	aucun	Paté de campagne (préparation familiale) <b>Absence de toxine botulique/Présence (fortuite ?) de C. botulinum de type C</b>	Prevot et al. (1955)
Tchad	1958	Botulisme alimentaire Type D suspecté	2 (0)	aucun	Jambon cru salé (Préparation familiale) <b>Présence de toxine botulique et de Clostridium botulinum type D</b>	Demarchi et al. (1958)
Rhodésie	1960	Botulisme alimentaire Type indéterminé	4 (?)	aucun ?	Paté (préparation familiale) Absence de toxine botulique/ <b>Présence de C. botulinum type B ou C</b>	Fleming (1960)
Sénégal	1961	Botulisme alimentaire Type indéterminé	3 (1)	aucun	Nététou** : absence de toxine botulique/ <b>C. botu B</b> Poissons de marigot : absence de toxine botulique/ <b>C. botulinum B ou C</b>	Rey et al. (1964)
	1961	Botulisme alimentaire Type indéterminé	2 (1)	aucun	Poissons de mer: absence de toxine botulique et de C. botulinum Graisse de bœuf: absence de toxine botulique et de C. botulinum Tiges de nénuphar du marigot : absence de toxine botulique et de C. botulinum Epizootie concomitante : mort suspecte de vaches et poulets et <b>notion de consommation de poulet (bouilli) mort spontanément 4 jours avant DDS pour foyer (2)</b>	
	1963	Botulisme alimentaire Type indéterminé	2 (1)	foie à l'autopsie : absence de toxine botulique	Nététou : absence de toxine botulique/ <b>C. botulinum B</b> Poissons de marigot : absence de toxine botulique/ <b>C. botulinum B ou C</b> Poissons de mer : absence de toxine botulique et de C. botulinum Graisse de bœuf: absence de toxine botulique et de C. botulinum Tiges de nénuphar du marigot : absence de toxine botulique et de C. botulinum	
	1963	Botulisme alimentaire Type indéterminé	1 (1)	Contenu gastrique à l'autopsie : absence de toxine botulique et de bacille		
URSS	1965	Suspicion de Botulisme alimentaire de type C	1 (1)	Contenu gastrique : C. botulinum type C	Source suspectée : poisson	Matveev et al. (1966)
	1966		1(0)	1 Pas d'information	Source suspectée : conserve familiale de concombres	

Pays	Année	Foyer	Nombre de cas * (Décès)	Prélèvements biologiques analysés et résultats	Source suspectée ou confirmée Prélèvements alimentaires ou environnementaux analysés	Reference
France	1972	Botulisme alimentaire Type C	4 (1)	Sérums : <b>Présence de toxine botulique de type C chez 2/4.</b>	<b>Poulet fumé suspecté</b> (non analysé)	Maupas et al. (1976)
Japon	1990	Botulisme infantile Type C	1 (0)	Selles : <b>2000 MLD/g de toxine botulique type C</b>	Environnement (pas de prélèvements analysés)	Oguma et al. (1990)
France	2006	Suspicion clinique	1 (0)	Sérum : négatif Selles : absence de toxine botulique et de <i>C. botulinum</i>	<b>Poulets malades</b> consommés 24h avant début des symptômes Diagnostic de botulisme de type C ou D établi à partir de sérums d'animaux et de contenus intestinaux	Martrenchar et al. (2019)
<b>BILAN HUMAIN</b>	<b>1950-2006</b>	<b>2 foyers de type C confirmés (alimentaire (1)/ infantile (1))</b>  <b>11 foyers suspects</b>	<b>5 cas type C confirmés dont 1 décès</b>  <b>23 cas suspects dont 6 décès</b>		<b>Notion de consommation de poulet suspecté pour 3 foyers dont 1 confirmé</b>  <b>Notion de consommation de produits de charcuterie dans 3 foyers dont 1 confirmé</b>	
<b>PRIMATES NON HUMAINS</b>						
Royaume Uni	1979	Primates en captivité (Zoo) Botulisme alimentaire Type C	14 (14)	Sérum : Toxine botulique type C (9/12 analysés)	<b>Poulets</b> décongelés la veille brièvement bouillis : <b>Présence de toxine botulique et de <i>C. botulinum</i> type C</b>	Smart et al. (1980)
Brésil	2017	Poulets Chiens Ouistiti Botulisme alimentaire Type C	17 (10) 5 (4) 1 (1)	Sérum et contenus gastriques Toxine botulique type C (6/6 analysés : 2 poulets et 1 chien)	<b>Carcasses d'oiseaux ou eau d'abreuvement contaminée par carcasses d'oiseaux</b>	Silva et al. (2018)

\*cas : ayant présenté au moins un signe caractéristique de botulisme: diplopie<sup>13</sup>, mydriase, problème de déglutition, sécheresse de la bouche, troubles élocution, paralysie, constipation....(vomissement et diarrhée ne sont pas spécifiques du botulisme mais commun aux TIACS)

\*\*Nététou= fermentation prolongée de graines de néré

<sup>13</sup> La diplopie est la perception simultanée de deux images (vision double) d'un objet unique

#### 4.4.2 Effet des toxines botuliques de type C et D sur l'être humain

Deux types d'essais ont été réalisés pour connaître l'action des toxines botuliques de type C et D sur l'être humain.

- Des essais *in vitro* sur des cultures de cellules nerveuses ou sur des muscles squelettiques isolés,
- Des essais *in vivo* par injection dans des muscles squelettiques chez des volontaires.

L'effet *in vitro* sur préparation de muscle humain isolé est mesuré par la diminution de paramètres électrophysiologiques. L'effet sur un muscle de la paroi abdominale de la toxine de type C ( $10^8$  M) est voisin de celui de la toxine de type A prise comme référence alors que la toxine de type D n'a aucun effet, même aux fortes doses (Coffield *et al.* 1997). Cependant, un effet de la toxine de type D peut être décrit sur d'autres préparations musculaires (muscle intercostal) (Anderson *et al.* 2009). L'effet de la toxine de type D sur les cultures de cellules nerveuses (2 systèmes humains et 3 systèmes murins (rat et souris) d'explantations primaires) montre des différences importantes d'activité (clivage de la cible ; EC 50<sup>14</sup> obtenu avec 50 IU pour la toxine type D ; valeur 150 fois inférieure à celle obtenue avec le type A1) (Pellett *et al.* 2015). Ces différences suggèrent des modes de pénétration et d'action différents entre toxine de type D et toxines de type A (Pellett *et al.* 2015).

Les essais *in vivo* chez l'être humain ont été réalisés soit sur des volontaires soit sur des patients.

L'effet des toxines de type C ou D a été comparé à celui de la toxine de type A sur les muscles des extenseurs de doigts de pieds de volontaires. L'effet de la toxine de type C est très voisin de celui obtenu avec la toxine de type A. Ce test sur 15 volontaires a été suivi par un test thérapeutique sur trois patients (deux patients avec spasme de la face et un patient avec blépharospasme) avec des résultats rapides et prolongés (12 semaines) (Eleopra *et al.* 1997). Au contraire, l'effet de la toxine de type D est nul à faible dose (3 IU) et très modéré à forte dose (10 IU) comparé aux effets du même type toxinique sur rat ou sur souris (Eleopra *et al.* 2013). Néanmoins, la toxine de type D a un effet inhibiteur sur les synapses cholinergiques autonomes. Cet effet est démontré par un test de sueur<sup>15</sup> sur quatre volontaires. L'effet est proportionnel aux doses administrées pour les deux toxines A et D, mais inférieur de moitié pour la toxine de type D comparé à celui obtenu avec la toxine de type A (Dressler *et al.* 2019).

#### 4.4.3 Conclusion sur le caractère zoonotique des types C et D

L'analyse critique des publications sur les cas humains a conduit à identifier entre 1950 et 2006 au niveau mondial : deux foyers de botulisme de type C confirmés (cinq cas dont un décès ; France, Japon) et 11 foyers suspects (C, D ou indéterminé).

Les essais *in vitro* et *in vivo* (par injection intradermique) réalisés pour évaluer les effets des toxines C et D sur des cellules musculaires ou nerveuses humaines montrent que :

- La toxine C présente un effet similaire à celui de la toxine A ;
- L'effet de la toxine de type D est nul à faible dose et très modéré à forte dose.

Les données épidémiologiques disponibles permettent d'établir une relation causale entre l'exposition à la toxine botulique et/ou *Clostridium botulinum* de type C et la survenue de cas de botulisme humain (deux foyers confirmés). Néanmoins, les sources de contamination n'ont pas été formellement confirmées et une incertitude faible demeure sur l'origine zoonotique de ces cas.

S'agissant du type D, un seul foyer de botulisme alimentaire a été identifié dans le monde sur la période étudiée pour lequel l'exposition à la toxine botulique de type D a été suspectée.

Les cas de botulisme humain C et D sont rarissimes comparativement aux types A, B, E, F. Plusieurs hypothèses sont émises pour expliquer la quasi-absence de cas liés aux types C, D, C/D, D/C : faible sensibilité de l'hôte, faible exposition humaine, défaut de surveillance.

- La faible sensibilité de l'hôte aux toxines est l'hypothèse privilégiée. Plus précisément, les essais *in vivo* réalisés par injections intradermiques montrant l'efficacité de la toxine (particulièrement la C), la faible sensibilité correspondrait à une faible absorption intestinale des toxines. Par ailleurs, les résultats d'essais sur la toxine D suggèrent des modes de pénétration et d'action différents de ceux de la toxine A.
- L'exposition aux spores et aux toxines sera abordée dans les sections suivantes. L'hypothèse d'une faible exposition au type C et D est difficile à justifier d'après les données disponibles aux niveaux des élevages

<sup>14</sup> Concentration efficace médiane

<sup>15</sup> Test de sueur : test de l'effet de la toxine injectée par voie intradermique sur la sécrétion de sueur

d'animaux de production. Ces données montrent la présence des spores dans les réservoirs. En revanche, les données relatives à l'écophysiologie des types C et D montrent qu'il est plus facile de contrôler la croissance et la toxinogénèse de ces types dans les aliments par rapport aux types A, B, E et F (paragraphe 7.1). Les spores C et D sont toutefois présentes dans l'environnement et la question de la fréquence d'exposition se pose pour le botulisme infantile.

- La sensibilité du système de surveillance ne semble pas être en cause. Les méthodes de diagnostic permettent de détecter l'ensemble des toxines. Toutefois, la faible toxicité des types C et D pourrait être à l'origine de formes frustes qui ne seraient pas détectées par les systèmes de surveillance.

Les données épidémiologiques disponibles permettent d'établir une relation causale entre l'exposition à la toxine botulique et/ou *Clostridium botulinum* de type C et la survenue de cas de botulisme humain (deux foyers confirmés). Néanmoins, les sources de contamination n'ont pas été formellement confirmées et une incertitude faible demeure sur l'origine zoonotique de ces cas. S'agissant du type D, un seul foyer de botulisme alimentaire a été identifié dans le monde sur la période étudiée pour lequel l'exposition à la toxine botulique de type D est suspectée. La faible sensibilité de l'être humain aux toxines C, D et mosaïque est l'hypothèse privilégiée pour expliquer la quasi-absence de cas liés aux types C, D, C/D, D/C.

#### 4.5 Les cas de botulisme humain de type E « d'origine pisciaire »

Actuellement, les cas humains dus à *Clostridium botulinum* de type E autres qu'infantiles (Aureli *et al.* 1986) sont majoritairement d'origine pisciaire. Ce type de *Clostridium botulinum* supporte des températures descendant jusqu'à 3,5°C contrairement aux autres types et peut se développer et produire sa toxine à des pH  $\geq 4,5$  et une concentration de NaCl  $< 5\%$ , conditions retrouvées dans les produits de la mer (Horowitz 2010).

Ces cas résultent la plupart du temps de la consommation de produits alimentaires issus de la pêche mais aussi de la chasse de mammifères marins (phoques, cétacés en régions arctique et nord de l'Amérique). Les modes de préparation des aliments ont souvent recours à la fermentation ou à la maturation à température ambiante pendant plusieurs jours à plusieurs semaines, voire au séchage /salage, et l'absence ou l'insuffisance de la cuisson permet la survie des spores et leur germination puis la production de toxine. Les préparations alimentaires sont souvent traditionnelles à base de poisson (saumon, poisson blanc, thon) souvent non vidés, fumés, séchés ou salés ou de leurs œufs (fermentés) et conservés dans des enceintes anaérobies (sacs plastiques). Ces préparations traditionnelles (Nord du Canada, territoire inuit) concernent aussi la viande fermentée ou maturée à température ambiante de mammifères marins, telles que les nageoires de beluga, peau et gras de baleine (Muktuk), viande (Igunak) et huile de phoque (Bryan 1980, Gauthier 2015, Hauschild et Gauvreau 1985, Kobayashi *et al.* 2016, Leclair *et al.* 2013, Meyer 1956, Tavakoli *et al.* 2009, Wallace *et al.* 1999, Walton *et al.* 2014, Weber *et al.* 1993).

Une enquête rétrospective aux USA (1899-1978) montre que les intoxications par la toxine de type E représentent, durant cette période, la majorité des causes de botulisme (34/73 foyers) (Bryan 1980).

Une enquête rétrospective au Canada (1971-1984) montre que sur 121 cas de botulisme, 114 étaient dus au type E répartis dans 51 foyers sur 53 (Hauschild et Gauvreau 1985). Les sources incriminées étaient : mammifères marins crus ou étuvés (32/51), fermentés (4/51), poisson cru, séché ou étuvé (3), poisson fermenté (2) et œufs de saumon (7). Cette étude rétrospective souligne aussi la répartition des foyers entre mai et octobre avec un pic en juillet.

La revue de Horowitz (2010) répertorie, par grandes zones géographiques, les cas de botulisme de type E. Si les régions arctiques et les pays proches (Canada, États-Unis, pays nordiques, Russie) présentent un pourcentage prédominant de type E par rapport aux autres types de botulisme, elles ne sont pas les seules. En Asie (Chine, Japon et Inde entre autres), des cas de botulisme de type E ont été décrits suite à l'ingestion de lait de soja fermenté et de bœuf cru séché, mais aussi d'œufs, de viande et de poisson. Au Moyen-Orient, c'est le poisson faisandé (fermenté à température ambiante) qui est à l'origine des cas.

Cette répartition géographique est partiellement liée à la contamination des poissons par *C. botulinum* de type E : par exemple jusqu'à 65 % de résultats sont positifs pour les poissons de la mer baltique contre 17 % pour les poissons du nord de la France (Rasetti-Escargueil, Lemichez, et Popoff 2019).

Le botulisme humain de type E est majoritairement d'origine pisciaire (poissons et produits de mammifères marins fermentés ou maturés). Ce type de botulisme prédomine dans les zones arctiques et pays proches.



## 5 Le botulisme chez l'animal

Le botulisme animal est classé comme un danger sanitaire de première catégorie pour toutes les espèces sensibles depuis 2013 (Arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces animales).

Différents types de toxines botuliques sont associés au botulisme animal. Ce chapitre détaille les connaissances actuellement disponibles sur le botulisme animal, en ciblant en particulier les types C, D, mosaïque C/D et D/C et E pour les bovins, volailles et poissons.

Compte tenu des sources multiples de contamination et de recontamination d'un animal ou d'un élevage, il est important d'établir le cycle épidémiologique de *Clostridium botulinum*. Cette partie est uniquement détaillée pour les bovins et les volailles. Compte tenu de l'absence de foyers de botulisme dans les élevages de poissons en France, le cycle épidémiologique ne sera pas étudié chez ces espèces.

La grande variabilité de la sensibilité de chaque espèce par rapport aux types toxiques se traduit par des doses létales très différentes d'une espèce à l'autre. Cela nécessite une adaptation des méthodes de diagnostic à chaque espèce. Ces éléments sont détaillés avant d'aborder les aspects cliniques, de diagnostic et de traitement liés à la maladie pour chacune de ces espèces.

Pour rappel, en santé animale, les termes « cas » et « foyers » désignent deux populations animales différentes, quel que soit le nombre d'animaux concernés : le terme « cas » est uniquement utilisé pour des infections en faune sauvage et le terme « foyer » est uniquement utilisé pour des infections des animaux domestiques.

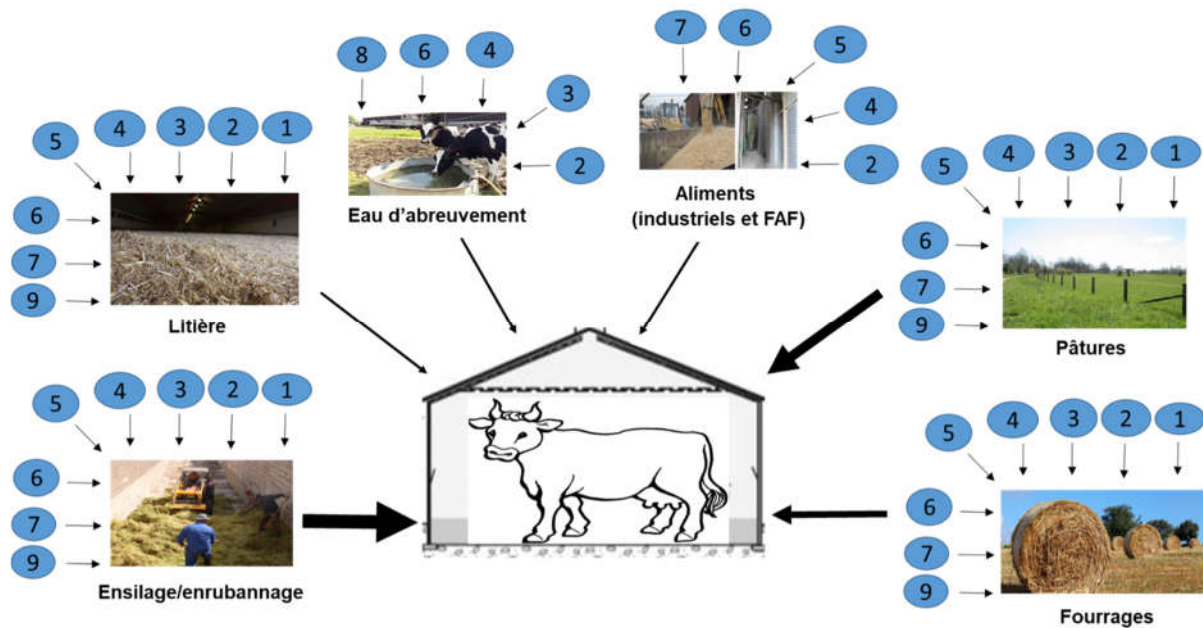
### 5.1 Cycle épidémiologique de *Clostridium botulinum* dans les élevages de bovins et volailles

*C. botulinum* est une bactérie présente, à la fois, dans le tractus digestif des animaux et dans l'environnement (sol, eau, sédiments, etc.). Le caractère ubiquitaire de cette bactérie rend donc ses voies d'entrée multiples dans un élevage de bovins et de volailles.

#### 5.1.1 Cycle épidémiologique de *Clostridium botulinum* dans les élevages de bovins

Les signes cliniques observés chez les bovins sont dus à l'ingestion de toxines botuliques et/ou de la bactérie par les animaux *via* l'eau d'abreuvement (Doutre 1969) ou les aliments (pâtures (Popoff 1989), fourrages (Bano *et al.* 2015) et aliments fabriqués à la ferme (Le Maréchal *et al.* 2019), ensilage (Guizelini *et al.* 2019, Myllykoski *et al.* 2009) ou enrubannage (Relun *et al.* 2017)) contaminés préalablement par *C. botulinum*. Deux sources majoritaires de contamination à l'origine des foyers de botulisme bovin sont identifiées : les cadavres d'animaux commensaux (domestiques et sauvages) qui constituent un substrat de développement de *C. botulinum* favorable à la production de la toxine botulique (Le Maréchal *et al.* 2019) et le fumier de volailles, les volailles pouvant être porteuses asymptomatiques de la bactérie (Souillard, Le Maréchal, Ballan, Mahé, *et al.* 2017). La contamination des aliments ou de l'eau par ces deux sources peut se faire directement (présence du cadavre ou du fumier dans l'eau ou l'aliment), mais également de manière indirecte *via* le matériel souillé (godet de tracteur par exemple), *via* la tenue du personnel (éleveur, technicien, vétérinaire (Souillard, Le Maréchal, Ballan, Mahé, *et al.* 2017)) ou par voie aéroportée (Hogg, Livesey, et Payne 2008). Le sol et les fèces d'animaux, non seulement d'élevage mais aussi commensaux<sup>16</sup> (portage intestinal) peuvent également constituer une source de contamination (cf. figure 10).

<sup>16</sup> Ce terme désigne les chiens, chats, mais aussi les rongeurs, insectes, oiseaux et autres animaux sauvages présents de manière occasionnelle ou non, sur l'élevage



- 1 **Epandage ou manipulation de fumier de volailles**
- 2 **Cadavres d'animaux commensaux (ex : chiens, chats, rongeurs, insectes, oiseaux et autres animaux sauvages)**
- 3 **Bovins excréteurs**
- 4 **Matériel : désigne celui affecté à la gestion des cadavres de bovins ou de toute autre matrice contaminée**
- 5 **Opérateur : bottes et tenue de l'éleveur après avoir été en contact avec des cadavres de bovins ou toute autre matrice contaminée**
- 6 **Fèces d'animaux commensaux**
- 7 **Aérocontamination : manipulation/transport stockage des cadavres de bovins et des fumiers ; poussières d'un bâtiment de volailles contaminé ; camion équarrissage (roues, bennes, etc.)**
- 8 **Contamination via l'abreuvoir, forages, rampes ou traitement de l'eau**
- 9 **Sol**

**Figure 10 : Véhicules d'introduction de *C. botulinum* (forme sporulée, végétative et toxines) dans un élevage de bovins**

(les véhicules les plus fréquents sont indiqués en gras, la largeur des flèches est proportionnelle à l'importance de l'introduction)

Le Tableau 6 présente la hiérarchisation (sur la base des articles de la littérature puis de l'avis des experts) des principales sources et véhicules de contamination de *C. botulinum* (forme sporulée, végétative et toxines) dans un élevage de bovins, par ordre d'importance décroissante. Ainsi, le fumier de volailles contaminé apparaît comme étant le principal véhicule de contamination de *C. botulinum*, avec l'existence d'un lien (direct ou indirect) entre l'élevage bovin et un atelier de volailles à proximité. La source de contamination du fumier est constituée par les volailles (symptomatiques ou non) de *C. botulinum* qui l'excrètent dans la litière. La contamination de l'eau ou d'un aliment par un cadavre d'animal constitue également une source majeure de contamination à l'origine des épisodes de botulisme bovin. Concernant les aliments industriels, l'eau d'abreuvement ainsi que la litière des bovins, ces véhicules de contamination apparaissent être de moindre importance, en raison des bonnes pratiques agricoles (gestion du fumier et des cadavres, conditions de stockage, nettoyage du matériel, pas d'apport de litières de volailles...) qui permettent leur maîtrise.

**Tableau 6 : Présentation par ordre d'importance décroissante des principales sources et véhicules de contamination de *C. botulinum* (forme sporulée, végétative et toxine) dans un élevage de bovins**

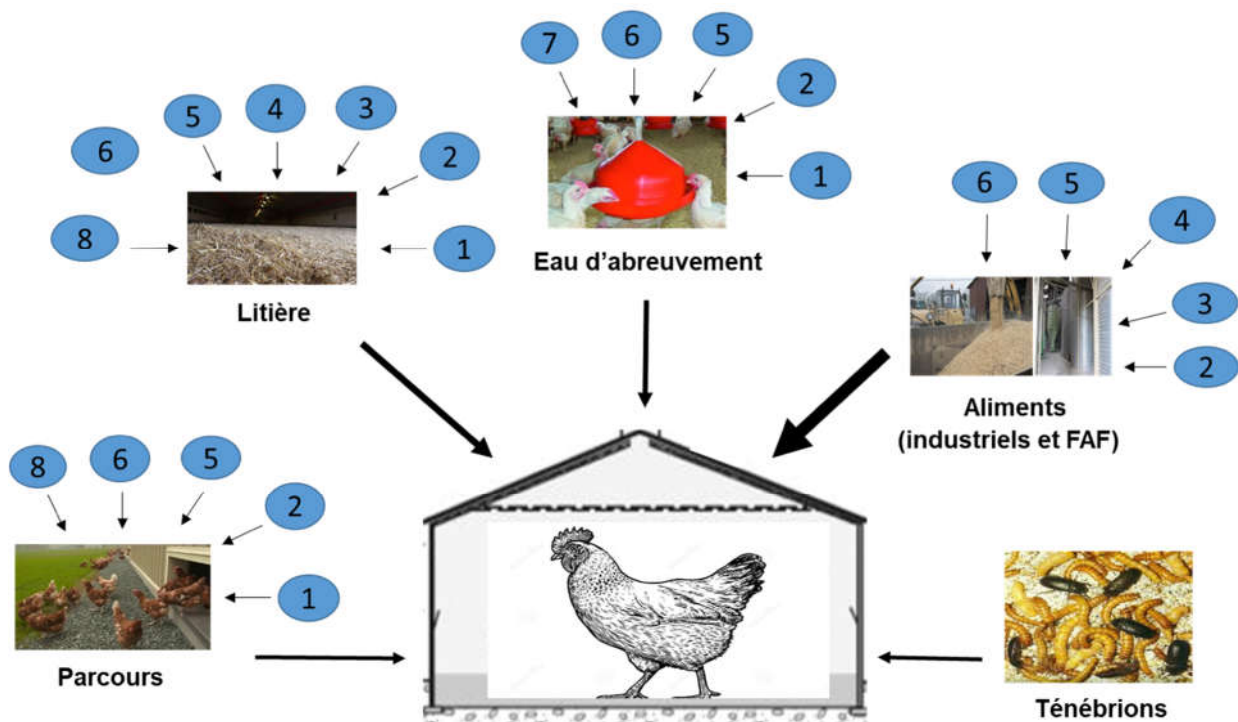
Source de contamination	Véhicule de contamination	Argumentaire de hiérarchisation
Volailles (symptomatiques ou non) excrétrices dans les effluents	Fumier de volailles	Importance quantitative de cette source de contamination en France avec l'existence d'un lien (direct ou indirect) entre l'élevage de bovins et un atelier de volailles excrétrices à proximité
Cadavres d'animaux commensaux	Ensilage ou enrubannage contaminé	Inclusion d'un animal lors de la récolte
Matériel		Double rôle du matériel : - Contamination de l'ensilage s'il n'est pas nettoyé. - Répartition de manière homogène dans toute la ration de la contamination ponctuelle (avec une désileuse mélangeuse par exemple)
Fèces d'animaux commensaux, opérateurs, aérocontamination		De moindre importance par rapport aux cadavres d'animaux et au matériel
Épandage de fumier de volailles	Pâtures	Contamination des bovins si épandage de fumier de volailles contaminés sur les pâtures (ingestion directe) ou présence d'un cadavre d'animal
Cadavres d'animaux commensaux		
Cadavres d'animaux commensaux	Autres fourrages/FAF <sup>17</sup>	Contamination de l'aliment si présence d'un cadavre d'animal ou d'une matière première contaminée
Matières premières contaminées		

### 5.1.2 Cycle épidémiologique de *Clostridium botulinum* dans les élevages de volailles

Chez la volaille, les foyers de botulisme sont principalement associés à la présence d'oiseaux porteurs de *C. botulinum* (Dohms 2008) et à tout animal extérieur à l'élevage s'y introduisant et qui contaminerait la litière et/ou l'aliment via ses fèces ou son cadavre (rongeurs, oiseaux sauvages et autres, JP. Vaillancourt, communication personnelle) (cf. Figure 11 et Tableau 7). Les vêtements et bottes des opérateurs (par exemple les ramasseurs qui interviennent dans les bâtiments) ainsi que le matériel utilisé, ont été également rapportés comme sources possibles de contamination<sup>18</sup>.

<sup>17</sup> FAF : fabrication d'aliment à la ferme

<sup>18</sup> Celle-ci peut avoir lieu dès le départ vers l'élevage via les chariots du couvoir lors de la livraison des poussins et dindonneaux.



- 1 **Volailles de l'élevage (excréteurs ou cadavres)**
- 2 **Cadavres d'animaux commensaux (ex : chiens, chats, rongeurs, insectes, oiseaux et autres animaux sauvages)**
- 3 *Matériel : désigne celui affecté à la gestion des cadavres de volailles ou de toute autre matrice contaminée*
- 4 *Opérateur : bottes et tenue de l'éleveur après avoir été en contact avec une matière contaminée (ex : cadavres de volailles)*
- 5 *Fèces d'animaux commensaux*
- 6 *Aérocontamination : manipulation/transport stockage des cadavres de volailles ; camion équarrissage (roues, bennes, etc.)*
- 7 *Contamination via l'abreuvoir, forages, rampes ou traitement de l'eau*
- 8 *Sol*

**Figure 11 : Véhicules d'introduction de *C. botulinum* (forme sporulée, végétative et toxines) dans un élevage de volailles**

(les véhicules les plus fréquents sont indiqués en gras, la largeur des flèches est proportionnelle à l'importance de l'introduction)

Le Tableau 7 présente la hiérarchisation des différentes sources et véhicules de contamination de *C. botulinum* (forme sporulée, végétative et toxines) dans un élevage de volailles, par ordre d'importance décroissante. L'aliment apparaît comme étant le véhicule de contamination principal de *C. botulinum* dans ces élevages. En effet, cette matrice peut se contaminer suite à l'inclusion d'un cadavre d'animal lors de la récolte ou du stockage de l'aliment dans le silo. Dans le cas où l'éleveur produit son propre aliment, le matériel utilisé lors de la récolte peut également constituer un véhicule de contamination (par exemple, même remorque pour du fumier et pour la récolte). Pour les aliments industriels, les bonnes pratiques agricoles sont très importantes à suivre et permettent de maîtriser ces véhicules de contamination (Anniballi, Fiore, *et al.* 2013). La litière, apparaît comme étant également un véhicule de contamination de *C. botulinum* dans un élevage de volailles (Bano *et al.* 2013). Si elle n'est pas protégée, elle peut être contaminée par les fèces des oiseaux, notamment de ceux qui sont porteurs asymptomatiques de *C. botulinum* (prévalence inconnue).

**Tableau 7 : Présentation par ordre d'importance décroissante des principales sources et véhicule de contamination de *C. botulinum* (formes sporulée, végétative et toxine) dans un élevage de volailles**

Source de contamination	Véhicule de contamination	Argumentaire de hiérarchisation
Cadavre d'animaux commensaux	Aliments	Inclusion d'un cadavre d'animal lors de la récolte ou du stockage de l'aliment dans le silo
Matériel		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Si le camion d'aliment est contaminé, cela peut constituer une source.</li> <li>- Si l'éleveur produit son propre aliment, le matériel utilisé lors de la récolte peut constituer un véhicule de contamination (par exemple, même remorque pour du fumier et pour la récolte sans précaution sanitaire).</li> </ul> <p>Pour les aliments industriels, les bonnes pratiques agricoles (suivi des recommandations pour optimiser les conditions de récolte, de stockage...) sont très importantes à suivre.</p>
Fèces d'animaux commensaux		En retrait par rapport aux cadavres d'animaux commensaux et/ou autres animaux et au matériel
Animaux excréteurs dans le troupeau	Litières	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contamination de la litière par les fèces</li> <li>- Portage asymptomatiques de <i>C. botulinum</i> chez les volailles (prévalence inconnue)</li> </ul>
Matériel contaminé		Si les équipements utilisés pour manipuler la litière sont contaminés, il y a un risque de contamination et d'introduction dans le bâtiment.
Cadavre d'animaux commensaux et/ou volailles		Inclusion d'un cadavre d'animal commensal lors de la récolte
Cadavre d'animaux commensaux et/ou volailles	Eau d'abreuvement	Contamination de l'eau d'abreuvement par un cadavre
Matériel		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Le matériel, s'il est contaminé ou s'il n'est pas nettoyé, peut contaminer l'eau d'abreuvement.</li> <li>- Le matériel réparti de manière homogène dans l'eau, la contamination ponctuelle.</li> </ul>
Fèces d'animaux commensaux		En retrait par rapport aux cadavres d'animaux commensaux et/ou matériel

Les véhicules de contamination des bovins et des volailles à l'origine des épisodes de botulisme en élevages sont l'aliment et l'eau. Ceux-ci peuvent être contaminés par deux sources prépondérantes : les cadavres d'animaux commensaux et les volailles (via l'excrétion ou la présence de cadavres dans le cas du botulisme chez les volailles et via le fumier de volaille chez les bovins) puis dans une moindre mesure via le matériel, l'opérateur, les fèces des animaux commensaux, la contamination aéroportée, le sol.

## **5.2 Doses toxiques selon l'espèce et méthodes de diagnostic utilisables**

### **5.2.1 Doses toxiques connues**

Les tableaux ci-dessous (Tableau 8, Tableau 9, Tableau 10) reprennent les données disponibles dans la littérature, relatives aux doses létales des toxines botuliques vis à vis des différentes espèces animales.

Tableau 8 : Toxicité des types de toxine botulique (BoNT) chez différentes espèces animales (d'après Rasetti-Escargueil, Lemichez, et Popoff (2020), (Rossetto et Montecucco 2019)) exprimée en multiple de souris LD<sub>50</sub>/kg<sup>19</sup>(injection intrapéritonéale) sauf indication différente

Type toxinique	Souris ( <i>Mus musculus</i> )	Rat ( <i>Rattus norvegicus</i> )	Cochon d'Inde ( <i>Cavia porcellus</i> )	Lapin ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	Chien ( <i>Canis lupus familiaris</i> )	Chat ( <i>Felis silvestris catus</i> )	Singe ( <i>Macaca mulatta</i> )	Bovin ( <i>Bos taurus</i> )	Cheval ( <i>Equus caballus</i> )	Cochon ( <i>Sus scrofa</i> )
A	1 LD <sub>50</sub> =7,0 pg (Weisemann <i>et al.</i> 2015)	2,5	0,5	0,3 à 0,8			0,78 (IM) 0,5 (IV) 11 (INH)		1 800 MLD/kg (SC)	20 000 MLD/kg (IV)
B	1 LD <sub>50</sub> =20,2 pg (Weisemann <i>et al.</i> 2015)	1000	0,2 à 1	0,1 (IM)			432 (INH) 150 (INH)			180 MLD/kg (IV) 3 000 000 MLD/kg (voie orale)
C	1	6	1	0,1	1 000	800	0,3	3,88 MLD/kg (IV)	> 8 000 MLD/kg (SC)	>18 000 MLD/kg (IV) >300 000 MLD/kg (voie orale)
D	1	320	0,2	0,2	100 000	15 000	100	2,2 MLD/kg (SC) 22,5 MLD/kg (par voie orale)	20 000 MLD/kg (voie orale)	>67 000 MLD/kg (IV) >780 000 MLD/kg (voie orale)
E	1 LD <sub>50</sub> =24,5 pg (Weisemann <i>et al.</i> 2015)	40	0,5	1	100	400	1			14 000 MLD/kg IV 1 400 000 MLD/kg (par voie orale)
F	1 LD <sub>50</sub> =48,2 pg (Weisemann <i>et al.</i> 2015)						0,5 (SC)			4 000 MLD/kg IV 170 000 MLD/kg (Par voie orale)

Légende : IM : intramusculaire ; IV : intraveineux ; SC : sous-cutané ; INH : inhalation ; IC : intracelomatique

<sup>19</sup> Les titres de toxicité sont exprimés en doses létales souris (DLS ou MLD - *Mouse Lethal Dose*- en anglais) par voie intrapéritonéale et par kg de poids corporel de l'espèce considérée, ou comme indiqué si la voie d'administration est différente, d'après Rasetti-Escargueil, Lemichez, et Popoff (2019) (références disponibles dans la revue).

La définition des doses toxiques est variable suivant les auteurs. Dans la littérature plusieurs appellations sont reprises :

MTD<sub>50</sub> : *Median Toxic Dose* : dose nécessaire pour tuer une souris de 20 g (Moeller *et al.* 2003) ; MLD : *Mouse Lethal Dose* (Rasetti-Escargueil, Lemichez, et Popoff 2019, Smart *et al.* 1980) ; mLD : *mouse Lethal Dose* (Gross) ; MLD : *Median Lethal Dose* (Galey 2001) ; LD<sub>50</sub> : *Lethal Dose 50* (Weisemann *et al.* 2015) ; MLD : *Minimal Lethal Dose* (Lindström et Korkeala 2006, Oguma *et al.* 1990) ; MLD<sub>50</sub> : *Minimal Lethal Dose 50* (que Lindström note comme équivalent à sa MLD)

Cette variation dans l'expression des doses toxiques avec des unités différentes complexifie la comparaison des études. Néanmoins, les ordres de grandeur sont très instructifs. Deux autres facteurs majeurs sont également à prendre en compte : le degré de la purification de la toxine qui peut se trouver sous forme purifiée ou sous forme de complexe et le sous-type utilisé.

Une spécificité d'hôte est à noter. Les espèces présentent en effet des sensibilités variables en fonction du type toxinique. Alors que la dose toxique de la toxine C serait de 100 000 MLD / kg par voie orale chez les primates, elle est estimée à 3,88 MLD / kg en IV pour les bovins.

D'une manière générale, les bovins sont extrêmement sensibles à la toxine botulique. Sur la base d'une étude expérimentale réalisée sur sept vaches laitières, Moeller a calculé que la dose médiane toxique pour un bovin de la neurotoxine de type C (sous forme de complexe) par voie intra-veineuse serait de 0,388 ng/kg. Il a été estimé qu'une quantité équivalant à 1 g de toxine pure pourrait provoquer la mort de 400 000 bovins adultes (Galey *et al.* 2000). En ce qui concerne la toxine de type D, une dose de 22,5 MLD/kg par voie orale induit la maladie chez les bovins (Rasetti-Escargueil, Lemichez, et Popoff 2020).



**Tableau 9** : Toxicité des types de toxine botulique (BoNT) selon le mode d'inoculation et l'espèce d'oiseau considérée (d'après Rasetti-Escargueil, Lemichez, et Popoff (2019) exprimée en multiple de souris LD<sub>50</sub>/kg (injection intrapéritonéale) sauf indication différente

Type BoNT	A	B	C	C/D	D/C	D	E	F
Poulet ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	10 (IV) 1 million/kg (par voie orale)	20 000 (IV)	16 000 (IV) 26 000 (IV)/animal	5 600 (IV)/animal		>320 000 (IV) 80 millions (IV)/animal	100 (IV)	640 000 (IV)
Canard ( <i>Anas platyrhynchos</i> )		15 000 (IV)/animal >10 millions/animal (par voie orale)	500- 76 000 45- 80 000 (par voie orale) 19 000-320 000 (par voie orale/oiseau) 96 000 (IP)/animal 320 000/kg (par voie orale)				2,5 millions (IV)/animal 200 000/animal (par voie orale)	
Paon ( <i>Pavo cristatus</i> )	170 (IV)	33 000 (IV)	2 700 (IV)			>320 000 (IV)	170 (IV)	640 000 (IV)
Faisan ( <i>Phasianus colchicus</i> )	44-170 (IV) 440 000/kg (par voie orale)	88 000 (IV)	70 (IV)			>320 000 (IV)	440 (IV) 440 000/kg (par voie orale)	640 000 (IV)
Dinde ( <i>Meleagris gallopavo domesticus</i> )	20 (IV) 200 000/kg (par voie orale)	40 000 (IV)	320 (IV)			>320 000 (IV)	200 (IV) 200 000/kg (par voie orale)	640 000 (IV)

**Tableau 10** : Toxicité des types de toxine botulique (BoNT) selon le mode d'inoculation et l'espèce de poisson(d'après Eklund *et al.* (2004), (Eklund *et al.* 1984)- Pour anguille et carpe: d'après Haagsma (1975)**Les titres de toxicité sont exprimés en doses létales de souris (MLD) par kg de poids corporel de l'espèce considérée.**

Type BoNT	A	B	C	C/D	D/C	D	E	F
Saumon argenté juvénile ( <i>Oncorhynchus kisutch</i> ) Poids : 12-15 g Température de l'eau : 15°C (ou 1°C)	200 MLD par voie IP à 15°C > 2000 MLD par voie digestive à 15°C	200 MLD par voie IP à 15°C > 2000 MLD / poisson par voie digestive à 15°C	2000 MLD / poisson par voie IP à 15°C > 2000 MLD / poisson par voie digestive à 15°C			200 MLD / par voie IP à 15°C > 20000 MLD / poisson par voie digestive à 15°C (toxicité non démontrée)	0,5 MLD par voie IP à 15°C et 1°C 90 MLD par voie digestive à 15°C et 450 à 1°C	20 MLD par voie IP à 15°C 2000 MLD par voie digestive à 15°C
Carpe ( <i>Cyprinus carpio</i> ) Poids : 108 à 390 g Température de l'eau : 13 à 20°C			457 000 MLD <sub>50</sub> /kg par voie digestive				236 à 638 MLD <sub>50</sub> /kg par voie digestive	
Anguille ( <i>Anguilla anguilla</i> ) Poids : 140 à 180 g Température de l'eau : 15 à 19°C			> 25 000 000 MLD <sub>50</sub> /kg par voie digestive (toxicité non démontrée)				27 500 MLD <sub>50</sub> /kg par voie digestive	

Les doses toxiques sont habituellement exprimées en multiples de la DL<sub>50</sub> déterminée pour la souris (MLD). Elles sont variables en fonction des types de BoNT et de l'espèce animale. La DL<sub>50</sub> chez la souris a été calculée pour les types habituellement pathogènes pour l'être humain. Malgré la variabilité des résultats selon les études, il est possible de dresser une comparaison de la sensibilité des espèces animales (par ordre décroissant) : bovin > dinde~faisan > poulets > carnivores > porc. Le porc est considéré comme particulièrement résistant aux différents types de toxines. Par ailleurs, et pour les espèces qui intéressent le GT pour le traitement des saisines, il peut être constaté que :

- les bovins sont très sensibles aux types mosaïques D/C et C/D, avec surtout une sensibilité à D/C
- Les poulets sont beaucoup plus résistants à la BoNT D qu'à la BoNT C.
- Les faisans et les dindes sont quant à eux plus sensibles que les poulets à la BoNT C.

Les poissons sont également assez résistants aux toxines testées, sauf à la BoNT E, avec cependant des différences de sensibilité très importantes selon l'espèce considérée.

D'une manière générale, ces résultats obtenus lors d'études expérimentales, sont cohérents avec les cas observés en milieu naturel.

## 5.2.2 Méthodes de diagnostic utilisées au laboratoire et leurs limites

Bien que le diagnostic du botulisme soit principalement un diagnostic basé sur la clinique et que les signes cliniques observables puissent être évocateurs du botulisme, ils ne peuvent pas être considérés comme pathognomoniques<sup>20</sup>, surtout en début d'évolution. De plus, les conséquences induites par la maladie en termes de santé publique peuvent s'avérer importantes. Par conséquent, une confirmation par le laboratoire est nécessaire pour un diagnostic de certitude et est obtenue par la mise en évidence, en complément de signes cliniques sur les animaux, d'un ou plusieurs des éléments (Anniballi, Fiore, *et al.* 2013) :

- La présence de BoNT dans les sérums, les organes, le contenu intestinal et/ou les fèces, voire les plaies. Trois approches sont possibles : les tests par injection à des souris (test originellement de référence), les tests ELISA et les tests basés sur l'endopeptidase dont l'Endopep-MS ;
- La présence de souches de clostridies capables de produire de la BoNT dans les mêmes organes et matrices de prélèvement (mise en évidence par PCR après une phase d'enrichissement) ;
- La présence de BoNT ou de souches de clostridies produisant de la BoNT dans les aliments distribués aux animaux et/ou la litière de volailles (par PCR après enrichissement, tests sur souris, ELISA ou Endopep-MS).
- Démonstration de la présence d'anticorps chez des animaux présentant des signes cliniques (approche théorique peu utilisée en pratique).

La méthode à utiliser est à choisir en fonction de la matrice à analyser et de l'espèce animale considérée.

Chaque méthode, lorsqu'elle est appliquée séparément, a ses limites. De façon à limiter l'impact des biais des différentes méthodes analytiques, l'utilisation combinée de plusieurs d'entre elles peut constituer un bon compromis. Il faut toutefois souligner que la multiplication des analyses a un impact financier important et nécessite un délai plus important pour l'obtention des résultats, ce qui n'est pas toujours compatible avec la réalité et les besoins du terrain. De plus, selon la sensibilité et la spécificité de chaque méthode particulière utilisée, les résultats peuvent s'avérer peu concordants. Chacune des méthodes de diagnostic au laboratoire est, dans une certaine mesure, susceptible de fournir des résultats faussement négatifs ou faussement positifs, comme détaillé ci-dessous.

### 5.2.2.1 Le test sur souris ou test « biologique » (Mouse bioassay ou MBA)

Dans l'esprit des praticiens, la confirmation diagnostique passe inévitablement par la mise en évidence de la présence de la toxine botulique (responsable des signes cliniques observés) chez l'individu présentant des signes cliniques. Le test de séroneutralisation sur souris reste donc considéré comme la méthode de référence, relativement sensible (jusqu'à 10 pg/mL). Néanmoins, le taux de confirmation du botulisme aviaire *via* l'analyse des sérums par le test de séroneutralisation varie de 64 % (Quinn et Crinion 1984), à 69 % (Neimanis *et al.* 2007), voire 79 % (Rocke, Smith, et Nashold 1998). Ceci peut s'expliquer par la présence d'une trop faible quantité de toxines dans le prélèvement. Il a ainsi été montré dans une étude qu'une concentration préalable des sérums provenant d'oiseaux sauvages permettait d'augmenter de 27 % le taux de confirmation (Haagsma, 1973). Le bovin étant par ailleurs environ 13 fois plus sensible à la toxine de type C que la souris (Moeller *et al.* 2003), ceci entraîne *de facto* un taux élevé de faux négatifs.

Dans le cas de la mise en œuvre du test sur souris, d'autres composés toxiques, des médicaments, des auto-anticorps pourraient être présents dans l'échantillon clinique et être mortels pour la souris elle-même, entraînant ainsi un résultat faussement positif (notamment avec des ionophores). Cependant, la réalisation en parallèle de tests de neutralisation du sérum par les anticorps ciblant les toxines minimise le risque de résultats faux positifs lors de la réalisation du test biologique. Il permet donc non seulement d'identifier le type de BoNT, mais aussi de différencier la présence de BoNT d'autres composés toxiques thermolabiles (dans ce dernier cas, les sérums ciblant les toxines ne seront pas protecteurs).

Limites du test :

- Il nécessite 48h de délai, sans compter l'acheminement du prélèvement au CNR.
- Les sérums contenant les anticorps ciblant les différentes toxines ne sont disponibles qu'au CNR.
- D'un point de vue éthique, les tests sur animaux vivants sont remis en question et nécessitent à l'heure actuelle des autorisations d'expérimentation animale.

<sup>20</sup> On dit d'un signe clinique ou d'un symptôme qu'il est pathognomonique lorsqu'il caractérise spécifiquement une maladie unique et permet donc, à lui seul, d'en établir le diagnostic de certitude lorsqu'il est présent.

### 5.2.2.2 Les tests ELISA

Différents types de tests ELISA sont décrits et utilisés soit pour détecter la toxine, les produits de dégradation de l'endopeptidase et/ou les anticorps ciblant la toxine, soit plus rarement la bactérie elle-même. Par ailleurs, il est nécessaire de vérifier les caractéristiques de chacun de ces tests et selon quel protocole il a été validé. Ainsi, Lindström et Korkeala (2006) notent plusieurs éléments limitants : les anticorps de haute qualité ne sont pas toujours disponibles : les extraits de fèces font baisser fortement la sensibilité des tests, il n'y a pas systématiquement d'information sur le protocole de validation des tests, les anticorps monoclonaux ne reconnaissent pas toutes les BoNT pour lesquelles le test a été a priori conçu.

Par ailleurs, lorsque le test utilisé dans une étude expérimentale a été spécifiquement développé pour les besoins de cette étude, d'autres biais peuvent être observés : c'est le cas de (Rulff *et al.* 2015), qui n'a pas de témoins positif et négatif dans chaque plaque. Les résultats obtenus sont donc empreints d'une grande d'incertitude.

Limites des tests ELISA :

- Les sensibilités et spécificités sont variables, dépendantes du lot et de la qualité des composants, de leur assemblage, du fabricant,
- Les rapports de validation du test ne sont pas toujours accessibles (peu de tests ELISA validés selon un protocole officiel sont disponibles dans le commerce - (Worbs *et al.* 2015)),
- Les tests ELISA mentionnés dans les publications peuvent avoir été spécialement développés par l'équipe à l'origine de la publication, ce qui ne permet absolument pas de les comparer aux tests commercialisés auprès des laboratoires. Il faut en particulier vérifier quelle méthode de validation du test ELISA a été utilisée, car cette validation n'est pas systématiquement réalisée selon des normes standardisées (Norme Afnor, manuel de l'OIE par exemple).

La difficulté de l'interprétation d'un test ELISA nécessite là aussi, comme pour le MBA, une confirmation à l'aide d'autres méthodes plus spécifiques

### 5.2.2.3 Le test ENDOPEP-MS

La détection de l'endopeptidase est basée sur les propriétés enzymatiques des toxines botuliques. Les produits de dégradation du substrat (un peptide synthétique spécifique pour chaque type toxinique) permettent la détection et le typage de la toxine (cf. 2.1.2.3). La possibilité de détecter ces produits par spectrométrie de masse (HPLC-ESI/MS/MS et MALDI-TOF/MS) a été démontrée : à chaque type de toxine correspond un peptide « substrat » et la spécificité est assurée par le point de clivage du peptide et la masse connue des produits attendus (Barr *et al.* 2005). Récemment, un foyer de botulisme bovin où la toxine A a été mise en évidence dans le rumen par MALDI-TOF/MS a été décrit (Frye *et al.* 2020). Ces appareils sont apparus dans les laboratoires médicaux et vétérinaires en 2009 et équipent actuellement de nombreux laboratoires de bactériologie. Ne demandant pas de compétences spécifiques en spectroscopie de masse et protéomique, cette technique est rapide (après toutefois 4 ou 16 h d'incubation pour que le substrat réactionnel soit dégradé), plus sensible que le MBA et réalisable en série. Cette méthode n'est cependant pas encore utilisée en France en routine.

### 5.2.2.4 Les tests PCR (Polymerase Chain Reaction)

La détection des souches de *C. botulinum* couramment rencontrées dans le botulisme animal (par exemple *C. botulinum* du groupe III) par PCR conforte la suspicion clinique initiale de botulisme. Toutefois, il faut garder à l'esprit que certains échantillons issus d'animaux sains (en particulier le contenu intestinal des bovins) pourraient néanmoins fournir un résultat positif par PCR après enrichissement. Bien qu'une analyse PCR ne constitue pas à elle-seule une preuve définitive, elle représente sans aucun doute l'approche la plus adéquate pour obtenir un diagnostic rapide. Ainsi, dans le cas d'un tableau clinique très évocateur, la détection par PCR est considérée suffisante pour confirmer le diagnostic de botulisme avec une forte probabilité. En outre, la PCR est actuellement la méthode la plus rapide pour évaluer le sérotype impliqué dans le foyer, ce qui constitue un élément essentiel pour pouvoir confirmer la présence de BoNTs responsables de botulisme humain. La faible prévalence des échantillons prélevés sur des animaux asymptomatiques et fournissant des résultats positifs par PCR (Dahlenborg, Borch, et Rådström 2003, Fohler *et al.* 2016) par rapport à la forte prévalence détectée chez des sujets présentant des signes de paralysie (Bano *et al.* 2017), fait de la PCR un outil de diagnostic précieux, en particulier pour celui du botulisme chez les bovins.

Le tableau clinique, les enquêtes épidémiologiques et les résultats de la PCR sont les éléments qui doivent être pris en compte dans leur ensemble pour être en mesure de poser un diagnostic définitif.

Contraintes du test : il nécessite un enrichissement<sup>21</sup> préalable de 24 à 48 h, précédé ou non d'un choc thermique pour éliminer la flore annexe. Lindström *et al.* (2010) constate une diversité des protocoles utilisés, ce qui en rend l'interprétation délicate. Cette diversité inclut des variations en ce qui concerne le choc thermique, les milieux d'enrichissement et de culture anaérobie, la température et le temps d'incubation etc. Ces paramètres impactent la croissance et la production de BoNT et varient entre les groupes I, II et III et parfois au sein d'un même groupe. Une méthode basée sur la PCR a été validée par le LNR botulisme aviaire selon la Norme NFU 47-600 pour la détection de *C. botulinum* de type C, D, C/D, D/C et E dans les foies d'origine aviaire.

#### 5.2.2.5 Mise en application pratique du diagnostic de laboratoire

Selon l'espèce animale concernée, certaines méthodes sont peu sensibles ; par exemple, les échantillons de sérum fournissent très souvent des résultats négatifs pour les BoNT chez les bovins (Bano 2019), les dindes (Le Maréchal *et al.* 2016) et les chevaux (Johnson, McAdams-Gallagher, et Aceto 2015). Aussi l'analyse d'autres matrices (exemple : fèces, contenu digestif, organe interne comme le foie) que le sérum par une méthode PCR, ou une combinaison de méthodes qui détectent à la fois la toxine et les clostridies productrices de BoNT, est recommandée en particulier pour ces espèces animales.

En outre, l'inscription de la toxine et de la bactérie sur la liste des MOT implique en France l'obtention d'autorisations spécifiques de la part de l'ANSM, ce qui limite le nombre de laboratoires susceptibles de réaliser les analyses.

Soulignons par ailleurs que l'identification de *C. botulinum* est complexe. En effet, *C. botulinum* du groupe III ne se différencie pas du cluster *C. novyi* et *C. haemolyticum* (taxospecies), que ce soit par leurs caractères génétiques (Sasaki *et al.* 2001, Skarin *et al.* 2011), phénotypiques (Doutre et Chambron 1966, Rasetti-Escargueil, Lemichez, et Popoff 2019) ou leurs profils protéomiques (Bano *et al.* 2017).

Il n'y a pas de milieu sélectif spécifique permettant de distinguer les colonies des autres *Clostridium* ou de certaines autres bactéries anaérobies comme celles qui peuvent être retrouvés dans les fèces, le rumen, ou même les cadavres d'animaux retrouvés dans les silos et ensilages.

Après la phase d'enrichissement en bouillon de culture anaérobie ou à partir d'une colonie isolée, la détection de *C. botulinum* nécessite un test par tube de culture ou par colonie, ce qui la rend chronophage et coûteuse.

Par ailleurs, les experts rappellent que les limites associées aux méthodes diagnostiques utilisées dans certaines études expérimentales ont fortement limité l'analyse objective de ces publications. Ces limites ne sont pas sans conséquence sur l'interprétation de leurs résultats. Bohnel et Gessler (2013) en déduit qu'il serait nécessaire d'établir une procédure bactériologique au niveau international.

Outre ces difficultés, certains *C. botulinum* du groupe III sont considérés comme peu ou pas pathogènes pour l'espèce humaine, ce qui explique qu'il n'existe que peu de données et d'études les concernant.

<sup>21</sup> Le bouillon d'enrichissement (1 à 7 jours suivant les auteurs) permet de multiplier les bactéries et ainsi la quantité de toxine produite durant ce temps.

Il n'existe pas de norme pour le diagnostic du botulisme animal.

Plusieurs méthodes d'analyses de laboratoire sont décrites que ce soit pour le diagnostic de botulisme animal ou l'analyse des aliments du bétail et l'environnement des élevages. Ces différentes méthodes comportent également de nombreuses variantes dans leurs protocoles selon les équipes.

Elles visent à détecter la toxine botulique ou la bactérie capable de produire la toxine botulique, les types recherchés en priorité étant ceux impliqués dans le botulisme animal (C, D, C/D et D/C).

La détection de la toxine botulique peut se faire par le test sur souris, des tests ELISA ou par la détection de l'endopeptidase. Le test sur souris n'est plus utilisé chez les bovins pour l'analyse des sérums (la fenêtre pour réaliser le prélèvement est courte : la toxine doit en effet être circulante au moment du prélèvement pour qu'elle puisse être détectée ensuite par le test sur souris). Les tests ELISA sont de qualité variable et ne sont pas disponibles en pratique pour les types C, D et mosaïques.

Le test de l'endopeptidase-MS, en raison de l'équipement en spectromètres de masse de type MALDI-TOF dans plusieurs laboratoires de bactériologie, est une technique intéressante pour remplacer le test sur souris : plus rapide, elle est également présentée comme au moins aussi sensible. Elle n'est pas encore utilisée en France en routine.

La détection de *C. botulinum* se fait en général par PCR. La PCR sur fèces, contenu digestif et organes après enrichissement en bouillon anaérobie est validée et utilisée en routine pour les types C, D et mosaïques.

En France, les analyses peuvent être mises en œuvre par différentes structures. Le tableau 11 ci-dessous récapitule les analyses disponibles dans chacune d'entre elles.

Le diagnostic vétérinaire sur prélèvement animal peut être réalisé par les 3 structures, l'analyse des autres échantillons (aliment, environnement...) nécessite de détenir des autorisations spécifiques et ne peut donc être mis en œuvre que par le CNR et le LNR.

**Tableau 11 : structures permettant le diagnostic vétérinaire sur prélèvement animal**

Tests	CNR des bactéries anaérobies et du botulisme	LNR botulisme aviaire	Laboratoires d'analyses vétérinaires
Test souris	X		
Bactériologie, souche	X	X	
PCR	X	X	X <sup>22</sup>
Séquençage <sup>23</sup>	X	X	

### 5.3 Botulisme chez les bovins

Le botulisme bovin est associé aux toxines C, D et leurs mosaïques C/D et D/C. De très rares cas ont été rapportés avec les toxines de type A, au milieu du vingtième siècle en France (Prévoit et al, 1950 et 1953 cités par l'AFSSA (2002)), sur des zébus (*Bos indicus*) au Brésil (Schocken-Iturrino, Avila, et Berchielli 1990), sur des vaches laitières en Egypte en 1976 (Rasetti-Escargueil *et al.*, 2019) et très récemment dans l'état de New-York aux Etats-Unis (Frye *et al.* 2020). Des foyers de type B sont aussi décrits dans la littérature sur des cheptels laitiers : aux Etats-Unis en 1984, 1992 et 2001 et en Israël en 2000 (Kelch *et al.*, 2000, Yeruham *et al.*, 2003, Wilson *et al.*, 1995, Divers *et al.*, 1986), dans une trentaine de troupeaux laitiers en 1976 et 1977 aux Pays-Bas en lien avec l'incorporation de drèches de brasserie contaminées dans la ration alimentaire (Notermans *et al.*, 1981). À l'heure actuelle en Europe, les toxines de type D/C sont à l'origine de la majorité des cas bovins et il est constaté que la mosaïque D/C est plus fortement toxique que les types C ou D.

<sup>22</sup> Actuellement uniquement réalisées sur C, D et mosaïque C/D et D/C

<sup>23</sup> Séquençage non disponible ou non réalisé dans les laboratoires en question. Le séquençage est utilisé pour l'épidémiologie et la recherche, pas pour le diagnostic.

En France, comme en Europe, seuls les types D/C et C ont été identifiés au cours des dernières années dans les foyers de botulisme bovin. Au LNR (janvier 2017 à janvier 2020), ils se répartissent de la manière suivante : type D/C pour 88 % et type C pour 12 % des 32 foyers confirmés sur les 70 suspicions analysées. Aucun cas de type D n'a été confirmé en élevage bovin en France ces dernières années.

Le botulisme bovin est une maladie plutôt rare (en moyenne entre 10 et 20 foyers confirmés par an entre le LNR et le CNR) et d'évolution sporadique. Sur la base des foyers analysés par le CNR et le LNR et des rapports de cas publiés dans la littérature, il apparaît que le botulisme est plus fréquemment rapporté chez les vaches laitières qu'en élevage allaitant.

En France, la réglementation impose sa déclaration dès le stade de la suspicion clinique, s'agissant d'un danger de catégorie 1.

## 5.3.1 Pathogénèse et signes cliniques

### 5.3.1.1 Pathogénèse

Sur la base des connaissances actuelles disponibles, l'intoxication est le mode de contamination principal des bovins à l'origine des signes cliniques. C'est donc l'ingestion de toxines préformées au niveau de l'aliment, de l'eau ou de toute substance contaminée qui est à ce jour considérée comme la cause de survenue du botulisme. À l'origine de la contamination sont le plus souvent retrouvés des cadavres d'animaux, du fumier de volailles, des aliments mal conservés (défaut d'acidification des fourrages fermentés et/ou défaut d'hygiène par exemple), qui, dans des conditions d'anaérobiose propices à la croissance de ces bactéries, peuvent permettre la prolifération de *C. botulinum* et la production de la toxine botulique.

Le rôle exact joué par la bactérie dans la pathogénèse chez le bovin reste cependant à préciser. En effet, le diagnostic du botulisme bovin est essentiellement réalisé en laboratoire *via* la détection par PCR de *C. botulinum* dans les prélèvements issus d'organes, ou de contenu d'organes (foie, rumen, contenus intestinaux) provenant d'animaux présentant des signes cliniques. De plus, il n'est pas rare lors d'un foyer de botulisme d'observer une distribution biphasique de la mortalité des bovins (Le Maréchal *et al.* 2019, Neill, McLoughlin, et McIlroy 1989). Une première vague de mortalité est observée dans les premiers jours du foyer, liée à l'intoxication, puis une seconde vague environ deux semaines plus tard. L'origine de cette seconde vague reste jusqu'à présent inexplicite, mais pourrait être liée à une toxi-infection. Cette hypothèse pourrait expliquer la présence de formes végétatives de la bactérie mises en évidence dans le foie de bovins morts de botulisme (Le Maréchal *et al.* 2019). Des investigations complémentaires sont nécessaires pour étayer cette hypothèse.

### 5.3.1.2 Signes cliniques

- Description clinique

La neurotoxine botulique bloquant la libération de l'acétylcholine au niveau de la jonction neuromusculaire, le botulisme se caractérise par une paralysie flasque d'évolution plus ou moins rapide et généralement ascendante, depuis le train postérieur et la queue vers la tête (Bano 2019, Kummel *et al.* 2012), mais pouvant parfois commencer au contraire par la tête (Braun *et al.* 2005). Lors de l'évolution clinique, il n'est pas observé d'hyperthermie et la sensibilité cutanée est conservée.

La période d'incubation peut varier de quelques heures à environ deux semaines, voire 25 jours (C. Le Maréchal, communication personnelle). Trois formes, dont la paralysie flasque est la caractéristique commune, sont le plus souvent décrites (Le Maréchal, Woudstra, et Fach 2016, ENVA 2019)

- Une forme suraiguë, pour laquelle l'animal paralysé se retrouve rapidement en décubitus latéral et meurt en quelques heures ;
- Une forme aiguë, associant une chute brutale de la production laitière à d'autres signes cliniques peu spécifiques, tels que de l'apathie, une difficulté à se déplacer, des désordres digestifs (constipation, diarrhée ou coliques (Kummel *et al.* 2012)), une dysphagie, une faiblesse musculaire généralement plus marquée au niveau du train postérieur et de la queue. Ces signes cliniques sont suivis par l'apparition d'une paralysie des muscles de la tête (Galey *et al.* 2000, Kummel *et al.* 2012, Le Maréchal *et al.* 2019, Myllykoski *et al.* 2009, Relun *et al.* 2017) : difficultés de mastication et de déglutition, dysphagie et flaccidité de la langue, chute de nourriture par la bouche et écoulement de salive, diminution des contractions ruminales, mydriase. La paralysie se généralise ensuite aux muscles abdominaux et locomoteurs (démarche hésitante en traînant les pieds) pour évoluer vers le décubitus sterno-abdominal. La tête est souvent positionnée en auto-auscultation voire en appui sur le sol. La mort intervient en deux à trois jours par asphyxie ou fausse déglutition ;

- Une forme subaiguë, atténuée et plus lente que la précédente tout en retrouvant le même tableau clinique. La paralysie ascendante débute par le train postérieur et l'évolution peut être favorable (guérison en quelques semaines) ou non (mort en huit jours environ).

Au sein d'un élevage, les atteintes cliniques présentent souvent une distribution biphasique (Bano, 2019) : des signes cliniques aigus associés à une mort très rapide sont observés sur les premiers animaux malades 3 à 4 jours après l'exposition, puis les autres animaux atteints peuvent présenter des signes cliniques 14 à 21 jours après le début de la maladie (Bano 2019, Galey *et al.* 2000, Le Maréchal *et al.* 2019, Myllykoski *et al.* 2009, Neill, McLoughlin, et McIlroy 1989, Relun *et al.* 2017). Dans le cas de foyers de type C, certains animaux peuvent récupérer (Bano *et al.* 2015, Le Maréchal *et al.* 2019).

D'autres signes cliniques, tels que des difficultés respiratoires, peuvent être observés et sont susceptibles d'orienter le diagnostic vers d'autres affections (Braun *et al.* 2005, Galey *et al.* 2000, Joubert, Chirol, et Beaureau 1969, Kummel *et al.* 2012, Myllykoski *et al.* 2009, Prevot *et al.* 1955). Une respiration de type abdominal chez les animaux gravement atteints a également été décrite (Fjolstad et Klund 1969, Galey *et al.* 2000).

En règle générale, le botulisme bovin se traduit par une forte mortalité.

Le cas particulier du portage asymptomatique de *C. botulinum* chez les bovins est traité dans les parties 5.3.3.2 (Portage digestif en dehors d'un contexte clinique) et 5.3.3.3 (portage asymptomatique au cours et suite à un foyer clinique), notamment en raison des conséquences qu'il peut avoir sur l'interprétation des résultats d'identification dans les tissus animaux.

- Aspects méconnus de la maladie et non couverts :

Il convient de faire état d'un certain nombre d'aspects méconnus du botulisme bovin :

- La distribution biphasique des atteintes cliniques chez les bovins, décrite lors des foyers de botulisme, reste inexpliquée. Des hypothèses sont cependant émises dont celle d'une toxi-infection avec production de la toxine botulique *in vivo*. Des études complémentaires sont toutefois nécessaires pour mieux comprendre cette observation, ainsi que l'éventuel rôle que pourrait avoir la colonisation des différents organes par la bactérie dans la pathogénèse du botulisme bovin ;
- La sensibilité et la réceptivité des bovins à chaque type toxinique (C, D, C/D et D/C) ne sont pas connues de manière exhaustive ;
- Des interrogations demeurent quant à l'existence de formes frustes ;
- L'analyse des sérums chez les bovins se révèle souvent négative par le test de létalité sur souris. Ceci peut paraître surprenant compte tenu du fait qu'il a été démontré que la toxine D/C est celle qui montre la plus forte toxicité chez la souris parmi les différentes toxines botuliques (Nakamura *et al.* 2010). Une des hypothèses pour expliquer ce résultat négatif serait que la toxine n'est plus circulante au moment de la réalisation du prélèvement de sang et ne peut donc pas être mise en évidence lors du test sur souris. De plus, la méconnaissance du mécanisme exact et de l'efficacité du passage de la toxine botulique au travers de la barrière intestinale ne permet pas à ce jour d'expliquer cette observation.

### 5.3.2 Diagnostic

Le diagnostic différentiel doit être fait avec l'ensemble des affections accompagnées d'une parésie ou d'une paralysie, voire d'atteintes du fonctionnement neuromusculaire : hypocalcémie, associée ou non à une hypophosphorémie, certaines formes d'entérotaxémies, listériose, rage paralytique, intoxication aux organophosphorés ou au plomb, etc. (Dorchies and Leze, 2017).

En complément des signes cliniques évocateurs, le diagnostic s'appuie sur le contexte épidémiologique qui peut fournir des éléments particulièrement importants sur l'origine possible de la contamination des animaux. En effet, dans une large majorité des cas (Le Maréchal, Woudstra, et Fach 2016), la contamination des ruminants se fait par le biais d'aliments, de denrées alimentaires ou d'eau contaminés par un cadavre ou du fumier de volaille.

Le diagnostic doit être confirmé par la détection de la neurotoxine botulique de *C. botulinum* ou la présence d'une souche bactérienne produisant la toxine à partir d'au moins un des prélèvements réalisés (foie, contenu du rumen, fèces, contenu intestinal, aliment suspecté, prélèvement environnemental ...).



### 5.3.3 Présence et concentration des différentes formes de *C. botulinum* dans les tissus en fonction de l'état d'un animal

#### 5.3.3.1 Méthodes diagnostiques utilisées et limites

Les tests de létalité ou de séroneutralisation sur souris ne sont plus mis en œuvre en raison de leur faible sensibilité.

Pour parvenir à la confirmation de la présence de *C. botulinum* chez les bovins, l'utilisation de la PCR est par conséquent fortement recommandée sur différentes matrices, dont *a minima* le contenu ruminal, le foie et les fèces. En outre, il n'est pas rare qu'il soit nécessaire d'analyser une série de prélèvements collectés sur plusieurs animaux atteints avant de pouvoir mettre en évidence la bactérie ou sa toxine.

Par ailleurs, il n'y a pas de méthode normalisée pour détecter *C. botulinum* ou la toxine botulique dans les tissus animaux, notamment en ce qui concerne les conditions de culture et d'enrichissement, ce qui explique que les méthodes utilisées varient d'une étude à l'autre (cf. annexe I) et qu'il soit très compliqué de dresser une synthèse des résultats, comme de déterminer avec certitude les niveaux de contamination.

Enfin les experts soulignent l'absence d'information détaillée sur les modalités de réalisation des prélèvements à l'équarrissage dans certaines études. D'après Smith et Sugiyama (1988), *C. botulinum* ne serait pas invasif, ni à l'occasion d'une mammite, ni par translocation après la mort. Le transport à l'équarrissage ne semblerait pas avoir d'influence sur la prolifération bactérienne. Il est néanmoins permis de se questionner à propos des prélèvements réalisés sur le site du clos d'équarrissage (délais *post mortem*, conditions de prélèvements, température ambiante selon les climats et la météo, multiplication bactérienne, etc.) et des conséquences que cela peut avoir quant à l'isolement et au développement des germes anaérobies.

#### 5.3.3.2 Portage digestif en dehors d'un contexte clinique

Les animaux peuvent être porteurs asymptomatiques de *C. botulinum*, soit parce qu'ils sont naturellement résistants à certains types toxiques, soit du fait d'un portage de faible ampleur dans leur tube digestif. *C. botulinum* est susceptible de se développer dans l'intestin d'animaux porteurs asymptomatiques mais à un niveau potentiellement insuffisant pour permettre la production de toxines. Ces animaux peuvent donc représenter un réservoir de *C. botulinum* et contribuer à sa dissémination dans l'environnement par les fèces (Rasetti-Escargueil, Lemichez, et Popoff 2019).

Pour rappel, la réalité de la contamination du sol par des animaux asymptomatiques peut être illustrée par l'observation de Smith et Milligan (1979) qui ont mis en évidence la présence de spores botuliques dans des échantillons de sol d'un ancien marché à bestiaux de Londres fermé depuis 1939, avec dans cet exemple surtout du type B, mais aussi des types C, D.

Dans les études disponibles, issues d'équipes allemandes ou suédoises, les prévalences de portage asymptomatique déterminées à partir de l'analyse PCR des fèces sont :

- 109 échantillons, soit 7,4 % de l'échantillonnage total, avec résultats positifs pour *C. botulinum* et aucun pour les BoNT sur les 1 389 analysés (prélèvements en élevages), dont 79 % de type A, 7,3 % de type B, 8,2 % de type D, 0,9 % de type E et 4,6 % de type F (Fohler *et al.* 2016) (Seyboldt *et al.* 2015) ;
- 73 % d'échantillons avec résultats positifs pour *C. botulinum* de type B et aucun pour les types E et F sur 60 vaches analysées (Dahlenborg, Borch, et Rådström 2003). Pour 64 % de ces échantillons avec résultats positifs, la concentration en spores était considérée inférieure à quatre spores par gramme (évaluation *via* une méthode statistique). Cette étude rapporte un effet de saisonnalité, avec une prévalence plus élevée en hiver qu'en été ;
- Aucun échantillon avec résultat positif pour *C. botulinum* (types A, B, C, D, E et F) sur 382 fèces prélevées en élevages et analysés, suggérant l'absence de portage détectable par la méthode mise en œuvre (Schmid *et al.* 2013) ;
- 1 échantillon avec résultat positif pour *C. botulinum* sur 25 fèces prélevées en abattoir et analysés par MBA (Klarmann 1989).

Ces résultats montrent qu'un portage digestif existe en dehors de tout contexte clinique, mais à un niveau réduit et sans production de toxine. Cette faible contamination, la plupart du temps en limite de détection des méthodes de laboratoire, explique probablement les disparités observées entre les études. Vis-à-vis des type C et D, seul le portage de type D a pu être mis en évidence selon les publications citées précédemment.

#### 5.3.3.3 Portage asymptomatique au cours et suite à un foyer clinique

Bien que ce soit en faibles quantités, la présence de spores de type C/D a pu être détectée de manière transitoire et/ou intermittente dans des échantillons de fèces issus de bovins dans des cheptels restés indemnes, mais situés

à proximité d'élevages de volailles atteints de botulisme C/D, démontrant ainsi que la bactérie peut être présente dans le contenu fécal de bovins sans signes cliniques et sans historique de botulisme (Souillard *et al.* 2015, Souillard *et al.* 2014). Dans une étude, il a été montré que 3 fèces sur 32 prélevées sur des bovins étaient positives lors de la 1<sup>ère</sup> visite, puis aucune fèces de ces mêmes 32 bovins lors de la visite suivante, réalisée 2 mois plus tard (Souillard *et al.* 2015).

Une étude récente (Le Maréchal *et al.* 2019) a permis de mettre en évidence le portage de *Clostridium botulinum* de type C, un mois environ après l'apparition des signes cliniques, chez 4 animaux convalescents d'un élevage bovin touché par le botulisme du même type toxinique, ce qui incline à penser que les animaux convalescents porteurs sont susceptibles de représenter une source de contamination environnementale et de dissémination lors de foyer botulique.

Par ailleurs, une étude menée aux Pays-Bas plus de 8 semaines après l'arrêt de la distribution d'aliment contaminé (drèches de brasserie) à l'origine d'un foyer clinique et pendant une à cinq années successives suivant les élevages, a permis de détecter *C. botulinum* de type B dans 106 des 470 échantillons de fèces prélevées (prise d'essai de 1g) via le test de séroneutralisation sur souris (Notermans *et al.* 1985). Dans chacun des 18 élevages participant à l'étude, des prélèvements fécaux étaient réalisés sur 10 animaux au hasard et, au total, 47 visites ont été effectuées lors des saisons hivernales alors que les animaux se trouvaient à l'étable.

#### 5.3.3.4 Discussion sur l'hypothèse d'un « botulisme viscéral » ou « botulisme chronique » et conclusions sur l'analyse des articles qui y sont liés

Lors de la recherche bibliographique portant sur la présence de *C. botulinum* du Groupe III chez les animaux, les experts ont été amenés à évaluer la pertinence scientifique de certains travaux publiés il y a une vingtaine d'années concernant une forme de botulisme dit « chronique », encore appelée « forme viscérale », qui serait caractérisée par une symptomatologie peu précise (baisse du niveau de production laitière, relative apathie et perte d'appétit, diminution de la rumination, démarche hésitante) évoluant vers la guérison en quelques semaines à quelques mois. En effet, il est apparu que des articles provenant de deux équipes d'origine allemande, celles de Helge Böhnelt et de Monika Krüger, présentaient des résultats atypiques. Leur travail se place dans un contexte de forte mortalité bovine enregistrée au début des années 2000 en Allemagne avec, pour postulat original, la possibilité que cette augmentation de la mortalité, observée dans les élevages concernés, était due à une forme particulière de botulisme, qu'elles ont nommée « botulisme viscéral ou chronique ». Selon cette hypothèse, formulée par H. Böhnelt dans son article de 2001, les animaux investigués présentaient une forme chronique de botulisme. Ce botulisme chronique s'expliquerait par l'ingestion de spores de la bactérie provenant de l'environnement, suivie de leur germination au sein du tractus digestif des animaux et par la colonisation de la partie basse de l'intestin ; ce développement bactérien occasionnant ainsi la production de toxine *in situ*. La toxine produite *in situ* serait ainsi responsable de la paralysie partielle du rumen et de l'intestin, provoquant une réduction de l'ingestion, une déshydratation, un amaigrissement, une diminution de la production de lait, une démarche raide et un abdomen contracté. M. Krüger, dans ses articles de 2012 et 2014, décrira des signes cliniques plus ou moins similaires (troubles locomoteurs, articulations enflées, suppuration des plaies cutanées, salive visqueuse, régurgitations et crachats de nourriture, ainsi qu'un port tombant de la tête et de la queue) lors d'investigations de fermes laitières situées en Allemagne, dans la région de Schleswig Holstein et de l'État libre de Saxe. L'analyse approfondie de l'ensemble des articles liés à la description du « botulisme viscéral » chez les bovins, publiés par ces deux équipes, a amené les experts aux conclusions suivantes :

- Le test biologique sur souris utilisé, en mélangeant les anticorps reconnaissant les toxines A, B et E d'une part et C et D d'autre part, dans le but d'économiser les souris pour raison éthique (Böhnelt, Schwagerick, et Gessler 2001), n'a pas été validé sur des témoins de contrôle, ce qui ne permet pas de s'assurer de l'absence de réaction croisée des anticorps entre eux, ni de la perte de sensibilité, ni de la possibilité de résultats faussement positifs ;
- Les échantillons testés positifs vis-à-vis de la présence de la toxine botulique ou de spores de *C. botulinum*, provenant d'animaux morts depuis un temps indéterminé (en Allemagne, les prélèvements pathologiques effectués directement à l'exploitation ne sont pas autorisés, Böhnelt et Gessler (2013)), ne peuvent pas permettre de conclure à la présence de la toxine ou de la forme végétative chez l'animal vivant, et donc à une forme chronique de botulisme. En effet, les spores de *C. botulinum* étant naturellement présentes dans l'environnement, il est possible que ces spores aient germé et produit de la toxine après la mort de l'animal ;
- La méthode ELISA décrite est une méthode interne réalisée avec des réactifs pour lesquels le mode de préparation n'est pas détaillé et abouti à une incertitude quant aux résultats obtenus ;
- La validation de la méthode ELISA a été effectuée par les auteurs eux-mêmes et ceux-ci indiquent que leur méthode est à la fois spécifique et sensible à 100%. Cependant les tests de validation n'ont été menés que

sur un nombre restreint de souches, limitant ainsi les possibilités de résultats négatifs et il n'y a pas eu de test sur un panel de référence ;

- Les résultats de l'ELISA sont exprimés en « unités relatives », mais en l'absence de contrôle positif et de témoin quantitatif (courbe standard), ces résultats ne peuvent pas être considérés comme fiables ;
- Les résultats atypiques obtenus n'ont pas fait l'objet d'une confirmation par une autre méthode conventionnelle ;
- L'absence quasi systématique de contrôles positif (toxine purifiée) et négatif dans l'ensemble des analyses effectuées ne permet pas de tirer les conclusions avancées par les auteurs.

Ainsi, l'étude approfondie de l'ensemble des articles liés à la thématique du « botulisme viscéral ou chronique » en Allemagne a amené les experts du Groupe Socle à conclure que les résultats obtenus par les auteurs ne peuvent pas être considérés comme fiables. Cette conclusion a déjà été partagée par la communauté scientifique allemande, comme en témoigne la publication d'études épidémiologiques de type « cas-témoin » (Fohler *et al.* 2016, Seyboldt *et al.* 2015) et qui n'ont pas pu démontrer la réalité du « botulisme viscéral » chez les bovins. Compte tenu de ces éléments, ces articles ne seront pas utilisés dans le cadre de ce travail sur le botulisme animal.

### 5.3.4 Traitement et prévention

Il n'existe aucun traitement curatif considéré comme efficace chez les ruminants.

Chez les bovins, la vaccination à l'aide d'anatoxine(s) peut être utilisée avec des vaccins dirigés contre les toxines de type C et/ou D. En France, en fonction du contexte épidémiologique, elle peut être utilisée dans un foyer après une suspicion clinique ou après la confirmation du cas, de manière à prévenir la suite de l'expression clinique, ou en prévention afin de réduire les risques de récurrence après un foyer clinique. Aucune autorisation de mise sur le marché (AMM) n'existe en France pour ces vaccins, mais depuis 2011 l'utilisation d'un vaccin bivalent (anatoxines C et D) est possible dans le cadre réglementaire d'une Autorisation temporaire d'utilisation (ATU). L'efficacité de ce vaccin bivalent n'a pas été formellement démontrée contre le botulisme de type mosaïque D/C, mais il est néanmoins utilisé sur le terrain avec, semble-t-il, des résultats satisfaisants permettant aux élevages concernés de ne pas être confrontés à de nouveaux cas cliniques. La protection vaccinale ne commence à être effective qu'un mois après la première injection et un rappel annuel est nécessaire pour garantir la protection des animaux. Si en théorie le recours à un auto-vaccin est envisageable, cette éventualité se heurte à des impossibilités réglementaires qui la rendent inconcevable, notamment en raison de la réglementation des MOT qui s'applique à *C. botulinum*.

En termes de prévention, il est important de rappeler à ce stade l'importance de la mise en œuvre et du respect des Bonnes Pratiques au sens large (bonnes pratiques d'élevage, bonnes pratiques d'hygiène en alimentation animale). La présence de cadavres d'animaux dans l'alimentation (fourrage ensilé ou enrubanné, céréales stockées en silo) ou la mauvaise conservation des aliments représentant des facteurs de risque de contamination des bovins, il convient d'être particulièrement attentif à leur maîtrise : élimination des cadavres d'animaux, soins portés lors de la réalisation et du stockage des récoltes fourragères et céréalières, hygiène générale lors de la distribution des aliments. De surcroît, la mise en place de mesures de biosécurité est essentielle pour prévenir les contaminations entre les ateliers volailles et bovins et prévenir l'apparition de nouveaux foyers. En effet, les bovins sont particulièrement sensibles au sérotype D/C, lequel peut être présent dans l'environnement proche et au sein d'ateliers de volailles, notamment de poulets de chair, sans manifestation clinique (Souillard, Le Maréchal, Ballan, Mahé, *et al.* 2017). Les mesures de biosécurité entre ces deux types d'élevage visent donc à limiter au maximum les possibilités de contamination des exploitations bovines par différentes sources : directes comme le fumier de volaille (stockage et épandage) ou indirectes, comme les matériels et véhicules utilisés en commun, qu'il convient de décontaminer, ou les intervenants communs (bottes et vêtements dédiés à chaque atelier).

Ces mesures incluent également la lutte contre la présence d'animaux indésirables, d'oiseaux ou de petits mammifères dans les locaux d'élevage et au niveau des lieux de stockage des aliments, la surveillance des aliments conservés et distribués (présence éventuelle de cadavres d'animaux) et le respect de leurs bonnes conditions de stockage.

En moyenne, ce sont une dizaine de foyers de botulisme bovin qui sont confirmés chaque année en France. Ces foyers, impliquant principalement le type D/C mais également le type C, concernent dans la majorité des cas des élevages laitiers. L'atteinte clinique des animaux se manifeste généralement par une paralysie ascendante dont l'évolution peut être plus ou moins rapide, entraînant très fréquemment la mort des animaux malades dans un laps de temps variable : de quelques heures à plusieurs jours. La confirmation d'une suspicion clinique est réalisée par le laboratoire à partir de différents prélèvements cliniques ou nécropsiques (foie, contenu ruminal, contenu intestinal, fèces) et environnementaux (aliment suspecté, surfaces des locaux et environnement d'élevage).

Le portage digestif de *C. botulinum* par les bovins a pu être mis en évidence par diverses études de terrain en Europe. Il a été observé chez des animaux convalescents ou chez des animaux sans signes cliniques, issus d'élevages ayant connu ou non un épisode de botulisme. Le portage digestif chez les animaux sans signe clinique en dehors de tout contexte de botulisme apparaît, lorsqu'il est détecté, d'un niveau très réduit (à la limite de détection des méthodes de laboratoire).

Aucun traitement curatif n'est considéré comme étant efficace chez les bovins. La prévention médicale est envisageable en ayant recours à un vaccin bivalent (anatoxines C et D) non distribué en France, mais disponible dans le cadre d'une autorisation temporaire d'utilisation (ATU). Cette vaccination, dont l'effet protecteur ne s'installe qu'un mois après l'injection, peut être envisagée dans un contexte local défavorable ou, beaucoup plus fréquemment, pour prémunir un foyer vis-à-vis de l'apparition de nouveaux cas cliniques.

Les mesures de prévention et de maîtrise sanitaires, ainsi que le respect des mesures de biosécurité, représentent les moyens les plus efficaces pour limiter et prévenir la contamination des élevages bovins par différentes sources bien identifiées : cadavres d'animaux dans l'alimentation, contamination initiale et mauvaise conservation des fourrages ensilés, présence d'élevages de volailles à proximité (ou élevages mixtes), épandage de fumier de volailles sur les pâtures ou non loin de l'élevage.

## 5.4 Botulisme aviaire

Le botulisme a déjà été rapporté chez 264 espèces d'oiseaux représentant 39 familles (Rocke 2006), les Anatidés étant l'une des familles les plus concernées, dans l'avifaune, au moins en France (Ventujol *et al.* 2017). En élevage avicole, les espèces concernées sont les poulets de chair, dindes, faisans et, dans une moindre mesure, les canards, poules pondeuses (élevées sur litière ou en plein air uniquement), oies, cailles et pintades (Bano 2019, Le Maréchal *et al.* 2016, Le Maréchal *et al.* 2017, Souillard *et al.* 2014, Ventujol *et al.* 2017). Les espèces charognardes et plus particulièrement les vautours sont résistants et peuvent éliminer les cadavres d'animaux contaminés (Holdeman 1970, Kalmbach 1939, Ohishi *et al.* 1979, Slocum et Morris 2020).

Les mâles semblent plus affectés que les femelles, en particulier chez les dindes (Popp *et al.* 2012, Smart, Laing, et Winkler 1983, Souillard *et al.* 2014). Aucune explication à cette observation n'a été apportée à ce jour. Il est à noter que la durée d'élevage des mâles est plus longue que celle des femelles, cependant l'impact de ce facteur sur la survenue d'un foyer de botulisme n'a pas été évalué.

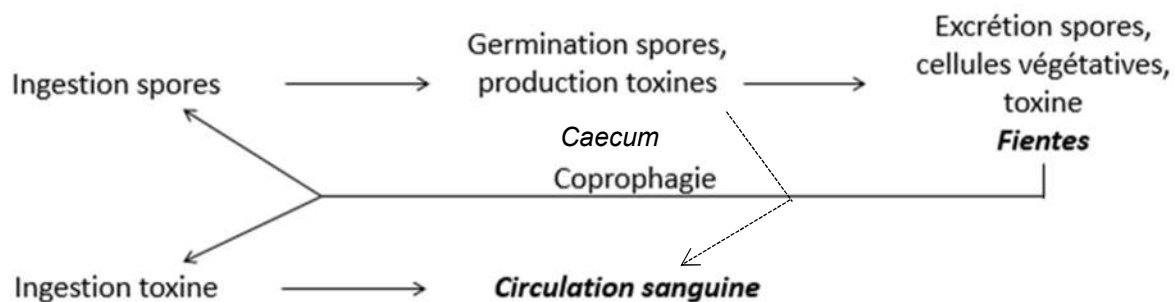
La majorité des espèces d'oiseaux sont expérimentalement sensibles aux différentes toxines botuliques lorsqu'elles sont inoculées par voie intraveineuse, mais à des degrés divers selon l'espèce et les doses reçues (le poulet par exemple étant, par voie intraveineuse, 3000 fois plus sensible à la toxine A qu'à la toxine C) (Gross et Smith 1971, Miyazaki et Sakaguchi 1978). Néanmoins, les seules souches de *C. botulinum* naturellement impliquées dans les foyers de botulisme chez les oiseaux sont celles produisant les toxines C, D ou leurs mosaïques C/D et D/C, la toxine E et, beaucoup plus rarement, la toxine A. Les types C, D ou leurs mosaïques C/D et D/C sont les plus fréquemment en cause, tant dans l'avifaune que chez les espèces domestiques. Moins fréquemment incriminé, le type E est assez régulièrement à l'origine de cas sporadiques ou d'épizooties chez les oiseaux sauvages piscivores des régions septentrionales, mais l'est rarement en élevage (seulement 5 foyers recensés en France dans des élevages de poulets de chair entre 1997 et 2000) (AFSSA 2002). Quant au botulisme de type A, il n'a été décrit qu'à quelques reprises aux États-Unis dans l'avifaune (mortalités de mouettes dans le bassin de la rivière Klamath en Californie) et il semble excessivement rare en élevage (1 foyer dans un élevage de poulets aux États-Unis décrit par Graham et Schwarze (1921)). En France, le type prépondérant responsable du botulisme aviaire est le type mosaïque C/D.

## 5.4.1 Pathogenèse et signes cliniques

### 5.4.1.1 Pathogenèse

Dans sa revue bibliographique de 1989, Popoff présente le botulisme chez les poulets de la façon suivante : « Les poulets se contaminent par des spores de *C. botulinum* de l'environnement : sol, nourriture, eau, litière. Les spores ingérées germent, prolifèrent et produisent de la toxine principalement dans le caecum. Puisqu'il faut des quantités importantes de toxine par voie orale pour causer la maladie, et que de telles sources de toxines n'ont pas été retrouvées dans l'environnement des élevages de poulets où s'est déclaré du botulisme, on admet que la production de toxine a lieu *in vivo*. L'absorption de toxine formée dans le tube digestif est responsable des symptômes » (Popoff 1989).

Trois études (Hyun et Sakaguchi 1989, Kurazono, Shimozawa, et Sakaguchi 1987, Miyazaki et Sakaguchi 1978) de reproduction expérimentale de botulisme aviaire, réalisées par la même équipe japonaise montrent via la ligature des caeca des animaux que ceux-ci sont indispensables au développement du botulisme. À partir de ces 3 études, cette équipe a émis l'hypothèse suivante sur la pathogenèse du botulisme chez le poulet de chair (cf. Figure 12) : les poulets ingèrent des spores de *C. botulinum* de type C, qui se développent et produisent la toxine botulique au niveau des caeca. La toxine, les spores et les cellules végétatives sont ensuite excrétées dans les fientes, avant d'être ingérées de nouveau par les animaux via le phénomène de la coprophagie. La toxine passe alors dans la circulation sanguine à travers l'épithélium intestinal au niveau de la partie supérieure de l'intestin tandis que les spores nouvellement ingérées se développent de nouveau, évoluant vers des formes végétatives au niveau du caecum, lesquelles vont produire de la toxine botulique au cours de leur croissance. La toxine va ainsi s'accumuler dans le sang jusqu'à atteindre le seuil d'induction des signes cliniques. Aucune autre étude de ce type n'a été publiée pour appuyer cette hypothèse. Cependant la quantité de toxine nécessaire pour induire des signes cliniques chez le poulet est telle qu'il n'est en effet pas possible d'en retrouver à un niveau aussi élevé dans l'environnement des animaux (Dohms, Allen, et Rosenberger 1982). Cet élément supplémentaire appuie les résultats obtenus dans ces études et est en faveur de cette hypothèse de la toxi-infection initiale, c'est-à-dire de la production *in situ* de la toxine botulique.



**Figure 12 :** Pathogenèse du botulisme chez le poulet de chair

Une dernière étude (Okamoto *et al.* 1999) a montré que l'inoculation de  $10^4$  à  $10^7$  spores (Dohms, Allen, et Rosenberger 1982) ne permet pas d'induire les signes cliniques du botulisme chez des poulets de chair et que l'utilisation d'un perturbateur de la flore intestinale (Endoxan, cyclophosphamide) était nécessaire pour induire les signes cliniques et l'installation de la souche au niveau caecal.

Plusieurs études rapportent que différents organes, notamment le foie, la rate et le jabot, sont infectés par *C. botulinum* chez les individus présentant des signes cliniques, mais également chez des individus asymptomatiques dans les lots atteints (Anniballi *et al.* 2012, Anniballi, Auricchio, *et al.* 2013, Dohms, Allen, et Rosenberger 1982, Franciosa *et al.* 1996, Woudstra *et al.* 2012). Une autre étude a montré que l'analyse des foies des animaux atteints est une méthode efficace pour la mise en évidence de *C. botulinum* lors des foyers de botulisme aviaire (Le Maréchal *et al.* 2016). Le rôle de la colonisation des organes par l'agent pathogène lui-même dans l'apparition des signes cliniques ou dans le développement de la maladie est inconnu à ce jour. Mais le fait que celui-ci ne soit détecté que dans les tissus des animaux provenant d'élevages atteints suggère une association entre la présence de celui-ci et le déclenchement de la maladie (Dohms, Allen, et Rosenberger 1982).

### 5.4.1.2 Signes cliniques

- Description clinique

Le botulisme aviaire se manifeste par une paralysie flasque ascendante qui progresse depuis les pattes vers les paupières et est souvent associé à une détresse respiratoire.

Le premier signe clinique chez les poulets de chair est la paralysie des pattes (Bano 2019). Il semblerait que la paralysie touche ensuite rapidement, voire en premier lieu, les ailes qui restent écartées et pendantes. Les signes caractéristiques du botulisme sont : décubitus sternal avec les yeux fermés, réticence à se déplacer, paralysie flasque du cou avec une incapacité à relever la tête (Sharpe *et al.* 2011). Les oiseaux sont très souvent incapables de redresser la tête, de marcher, ou même de se tenir debout ou de fuir. Ils restent prostrés (Skarin, Lindgren, et Jansson 2015). Des souillures au niveau des narines ont été parfois signalées chez les poulets de chair et les poules (Dohms, Allen, et Rosenberger 1982, Sharpe *et al.* 2011, Skarin, Lindgren, et Jansson 2015). En élevage de dindes, les signes cliniques peuvent être parfois moins évidents et, le plus souvent, le botulisme est suspecté en cas d'augmentation soudaine du taux de mortalité (Bano 2019). Chez les oiseaux sauvages, la noyade est fréquente du fait de la paralysie du cou des animaux et de leur incapacité à relever la tête.

Des taux de mortalité élevés sont rapportés. Par exemple en France, le taux de mortalité moyen relevé dans le cadre d'investigations de foyers confirmés en élevage était de 13,9 % (Souillard *et al.* 2014), ce taux variant de 1 % à 25 % en élevage de volailles selon certaines études (Dohms, Allen, et Rosenberger 1982) ou de 2,8 % à 35,2 % selon d'autres (Souillard *et al.*, 2014). Des taux encore plus élevés ont été également rapportés chez d'autres espèces : jusqu'à 30 % (Smart *et al.*, 1983) ou 50 % en élevages de dindes (Popp *et al.* 2012) et 84 % en élevages de faisans (Borland 1976).

Des foyers importants, en particulier aux États-Unis (13 foyers sur la période 1910-1997) induisant des niveaux de mortalité élevés (plus de 100 000 oiseaux) ont été signalés chez plusieurs espèces d'oiseaux sauvages (Rocke et Bollinger 2007).

Le cas particulier du portage asymptomatique de *C. botulinum* chez les volailles, est traité dans la partie 6.4.3 (présence et concentration des différentes formes de *C. botulinum* dans les tissus en fonction de l'état d'un animal), notamment en raison des conséquences que cela peut avoir sur l'interprétation des résultats d'identification dans les tissus animaux.

- Aspects méconnus de la maladie et non couverts :

Les facteurs à l'origine de l'initiation d'un foyer de botulisme aviaire ne sont pas élucidés, en particulier le rôle du portage asymptomatique dans l'émergence d'un foyer qui est souvent mis en avant mais non clairement démontré. Même si plusieurs études émettent l'idée que la toxine est produite *in vivo*, la pathogenèse du botulisme aviaire n'est pas encore clairement élucidée, notamment le rôle joué par la bactérie dans la maladie. La dose de *C. botulinum* nécessaire pour initier un foyer, les conditions propices à la croissance de la bactérie *in vivo* et à la production de toxines sont inconnues.

## 5.4.2 Diagnostic

Le diagnostic différentiel doit être fait avec les intoxications aux ionophores (en particulier chez la dinde), au sélénium ou au plomb et les maladies susceptibles de provoquer des signes neurologiques telles que la maladie de Newcastle, la maladie de Marek ou l'Influenza aviaire.

La démarche diagnostique s'appuie systématiquement sur la prise en compte du contexte épidémiologique et une confirmation par des analyses de laboratoire.

Suite à une étude menée par le LNR entre 2013 et 2016 (Le Maréchal *et al.* 2016), il a été montré que l'analyse par PCR en temps réel, après une étape d'enrichissement, de 4 foies prélevés sur des animaux présentant des signes cliniques évocateurs de botulisme est la méthode recommandée pour confirmer le botulisme aviaire au laboratoire (mise en évidence de l'agent pathogène). Les foies doivent être congelés au plus vite après prélèvement afin de garantir la stabilité de l'échantillon (Le Maréchal *et al.* 2017).

## 5.4.3 Présence et concentration des différentes formes de *C. botulinum* dans les tissus en fonction de l'état d'un animal

Dans ce paragraphe sont considérés plusieurs cas de figure afin d'évaluer la présence de *C. botulinum* et de la toxine dans les tissus chez les animaux atteints et les animaux asymptomatiques, dans un contexte de foyer clinique de botulisme ou sans historique de botulisme.

Dans les conditions naturelles, les spores de *C. botulinum* absorbées par voie orale peuvent rester inactives ou, après germination, se développer à un faible niveau dans le tube digestif (Popoff, 1989). Mais, les quelques

investigations avec prélèvements systématiques sur des animaux sans signes cliniques, y compris dans des élevages avec historique de botulisme, ne permettent pas de disposer de données claires sur la prévalence du portage asymptomatique chez les animaux d'élevage.

Les quelques données disponibles sur le portage aviaire sont présentées dans ce paragraphe.

#### 5.4.3.1 Portage asymptomatique de *C. botulinum* en dehors du contexte de foyers cliniques

L'une des hypothèses pour expliquer le démarrage d'un foyer de botulisme aviaire est l'ingestion de toxines à partir de cadavres d'oiseaux putréfiés. Cette hypothèse laisse entendre que la bactérie est présente dans l'organisme de l'animal avant sa mort et qu'il existe un portage asymptomatique de *C. botulinum* dans le tractus digestif des oiseaux. Peu de données sont disponibles sur cette question et les résultats pour explorer cette hypothèse varient d'une étude à l'autre.

Une équipe norvégienne a ainsi testé 100 lots de poulets de chair pour évaluer la prévalence du portage de *C. botulinum* de type C et C/D dans des élevages sans historique et avec historique de botulisme et n'a pu mettre en évidence l'agent pathogène dans aucun des caeca analysés (Hardy et Kaldhusdal 2013). Ce résultat est concordant avec une étude antérieure menée en Grande-Bretagne au cours de laquelle l'investigation de 100 litières issues d'élevages sans historique de botulisme n'avaient pas permis de détecter *C. botulinum* (Roberts et Aitken 1974)

A *contrario*, une étude menée en Suède a permis de détecter *C. botulinum* de type C/D dans 11% des élevages sains en Suède (Blomqvist *et al.* 2009). L'Anses avait mené une étude en 2011 pour évaluer la prévalence de *C. botulinum* dans les élevages de poulets de chair en réalisant des prélèvements dans 23 élevages. Dans cette étude, *C. botulinum* de type C/D n'avait été détecté que dans un seul élevage, à partir de 3 prélèvements d'environnement (pédichiffonnette du bâtiment, pédichiffonnette des extérieurs, chiffonnettes du bac d'équarrissage) mais dans aucun des caeca analysés. Une seconde étude, menée par le LNR, incluant 5 élevages sans historique de botulisme avait permis de détecter *C. botulinum* type D/C dans les caeca d'une dinde (25 caeca et 25 foies analysés) ainsi que dans le fumier de cet élevage (données non publiées).

Des investigations menées dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques lors de foyers de botulisme bovin ont permis de mettre en évidence un portage de *C. botulinum* de type D/C dans des élevages avicoles proches, en particulier chez les poulets de chair, et dans une moindre mesure un portage de type C/D et de type C (données non publiées). Dans le cadre du projet BOTUSOL (2019-2022), il est prévu d'évaluer la prévalence de ce portage dans 30 élevages avicoles.

La variabilité des résultats pourrait provenir du fait d'un portage à un niveau très faible, inférieur au seuil de détection des méthodes disponibles (Le Bouquin *et al.* 2017, Popoff 1989).

#### 5.4.3.2 Dans un contexte de foyer clinique

##### 5.4.3.2.1 *Cas des animaux présentant des signes cliniques.*

*C. botulinum* est détecté dans différents organes chez les animaux présentant des signes cliniques : foie, rate, rein, jabot, contenu intestinal, contenu caecal, bile, gésier, estomac.

La toxine botulique a été mise en évidence dans les foies, gésiers et jabots des animaux présentant des signes cliniques (Pigatto *et al.* 2007). Au contraire, l'analyse de fèces d'oiseaux atteints de botulisme n'a permis la mise en évidence de la toxine que dans 6,2 % des canards testés (Jensen 1981). Il est connu que les bactéries lactiques ont la capacité d'inactiver la toxine botulique (Allison, Maloy, et Matson 1976), ce qui pourrait expliquer la différence de détectabilité de la toxine en fonction des matrices.

##### 5.4.3.2.2 *Cas des animaux ne présentant pas de signes cliniques*

- En élevage

Une étude préliminaire (non publiée) a été menée par le LNR botulisme aviaire pour estimer la prévalence de portage de *C. botulinum* par les animaux ne présentant pas de signe clinique issus de lots atteints de botulisme. Dans les 5 élevages investigués, les résultats étaient positifs au niveau du foie chez 60 % à 100 % des animaux et 0 à 100 % au niveau du caecum des animaux testés. Ce résultat montre donc que les animaux issus de lots ayant rencontré un épisode de botulisme mais ne présentant pas de signe clinique sont porteurs de *C. botulinum* au niveau du caecum et du foie.

Deux autres études rapportent également ce portage asymptomatique chez les animaux issus d'élevages atteints (Dohms *et al.*, 1982, Roberts and Aitken, 1974). Il a ainsi été montré que le foie, la rate, le duodénum, le jabot et la bile fournissaient des résultats positifs pour *C. botulinum* type C chez des animaux sans signe clinique issus du bâtiment atteint et du bâtiment adjacent dans lequel aucun signe clinique n'avait été détecté (Dohms *et al.*, 1982).

- Dans la faune sauvage

Dans le cadre d'une autre étude<sup>24</sup>, les organes de 36 oiseaux tués à la chasse, dans un secteur où le botulisme E et C/D avait été mis en évidence, ont été stockés au congélateur du service départemental de l'ex-ONCFS dans l'Ain, soit 7 oies, 13 colverts et 16 sarcelles. Aucune mortalité n'avait été signalée depuis le 25 septembre 2018, les oiseaux ont été chassés le 20 octobre 2018. Du portage a pu être mis en évidence dans les caeca de 7 oiseaux et dans le gésier d'un oiseau. *C. botulinum* de type E a été mis en évidence à la limite du seuil de détection de la méthode dans un échantillon de caecum et un autre de bréchet. La toxine n'a cependant pas été détectée dans la culture bactérienne de ces deux échantillons.

Une étude portant sur la détection de *C. botulinum* dans des fèces « fraîches » collectées dans des sites naturels dans lesquels des cas de botulisme avaient été recensés, a mis en évidence *C. botulinum* par PCR après culture dans 83% des fèces collectés dans la zone où il y avait eu un nombre élevé de cas et 80% dans les zones dans lesquelles il y avait eu absence ou peu de cas de botulisme (Zechmeister *et al.* 2005). Dans cette même étude, après l'étape de culture, la production de toxines botuliques dans les échantillons en provenance des zones à risque élevé était deux fois plus élevée par rapport aux zones à risque faible pour un niveau équivalent de gènes de toxines détectés par PCR.

#### 5.4.4 Traitement et prévention

Un traitement de tous les animaux avec des  $\beta$ -lactamines administrées par voie orale (amoxicilline en général) est couramment utilisé dans les élevages avicoles en cas de foyer de botulisme. Les signes cliniques sont stoppés rapidement suite à la mise en place du traitement. Cependant une reprise de la mortalité et de la paralysie est souvent observée à l'arrêt de celui-ci. Il n'est pas rare, dans certains cas graves, que les animaux restants fassent l'objet d'une euthanasie ou d'un abattage prématuré (Souillard *et al.* 2014).

La mise en place de barrières afin de séparer physiquement les animaux atteints et les animaux sains, le repaillage régulier, l'élimination des animaux malades peuvent permettre de limiter également le nombre d'animaux nouvellement atteints. Le point important à préciser est qu'il faut augmenter la fréquence du ramassage des cadavres de volailles et s'assurer de ne pas en oublier car ceux-ci deviennent rapidement une source de contamination.

La vaccination est également envisageable mais il n'existe pas d'AMM en France et cela n'est pas réalisé dans les faits sauf sous ATU dans les élevages de gibier. La vaccination est également possible en faune sauvage mais ne semble pas utilisée dans les faits (Anniballi, Fiore, *et al.* 2013, Martinez et Wobeser 1999, Rocke *et al.* 2000, Work *et al.* 2010).

En ce qui concerne l'avifaune, il est possible (après encagement des oiseaux par exemple) de « soigner » les animaux atteints en les nourrissant et en les abreuvant jusqu'à ce que les signes cliniques disparaissent.

En termes de prévention, la mise en place de mesures de biosécurité au niveau du sas d'entrée des bâtiments est importante. La gestion des animaux indésirables dans l'élevage (rongeurs, oiseaux, chiens, chats et animaux sauvages), les conditions de stockage et de distribution des aliments, le ramassage régulier des cadavres d'animaux, les opérations de nettoyage et désinfection des bâtiments et des équipements sont aussi importants pour prévenir les foyers et limiter les récurrences. Lorsque des parcours sont présents, leur entretien, incluant l'élimination rapide de cadavres d'animaux et une gestion intégrée des espèces indésirables doit être prioritaire.

<sup>24</sup> Données Anses LNR botulisme aviaire, Institut Pasteur CNR des bactéries anaérobies et du botulisme et Office français de la biodiversité -OFB



En moyenne, ce sont une trentaine de foyers de botulisme qui sont confirmés chaque année en France dans les élevages avicoles et une vingtaine en faune sauvage. Ces foyers impliquent principalement le type C/D dans les élevages de poulets de chair et de dindes majoritairement, mais également le type D ou D/C uniquement dans les élevages de dindes. En ce qui concerne l'avifaune, les anatidés sont les oiseaux les plus touchés, les cas impliquant principalement le type C/D.

L'atteinte clinique des animaux se manifeste généralement par une paralysie ascendante (ailes tombantes, cou pendant, paralysie de la paupière) et un taux de mortalité élevé. La confirmation d'une suspicion clinique est réalisée par le laboratoire à partir de l'analyse des foies prélevés sur des animaux symptomatiques.

L'existence et la prévalence d'un portage digestif de *C. botulinum* par les oiseaux restent peu documentées à ce jour.

La gestion des épisodes en élevage repose sur la mise en place d'un traitement antibiotique ( $\beta$ -lactamines) qui permet de limiter la mortalité dans les lots atteints. L'arrêt du traitement (avant envoi à l'abattoir pour respecter le temps d'attente, par exemple) se traduit par une reprise rapide des signes cliniques et de la mortalité.

Les facteurs d'initiation des foyers de botulisme aviaire en élevages sont encore peu connus. Une bonne gestion de la biosécurité (gestion des animaux indésirables, conditions de stockage et de distribution des aliments, ramassage régulier et plus fréquent des cadavres d'animaux, etc.) est indispensable pour prévenir l'apparition des épisodes.

## 5.5 Botulisme chez les poissons

Les poissons, comme l'ont montré diverses études expérimentales s'avèrent sensibles aux toxines botuliques A, B, C, D, E et F, selon un degré variant notamment, en fonction de l'espèce, avec le type toxinique, la dose administrée, la voie d'administration et la température de l'eau (Chatla *et al.* 2016, Eklund *et al.* 2004, Haagsma 1975, Lalitha et Gopakumar 2001, Skulberg et Grande 1967). Néanmoins la particularité des poissons est leur forte sensibilité à la toxine E estimée par exemple, chez le saumon argenté juvénile de 12-15 g dans une eau à 15 °C, à 0,5 MLD après administration IP et 90 MLD après administration digestive (Eklund *et al.* 2004), avec des différences très importantes selon l'espèce (Haagsma 1975).

Ces études suggèrent que certaines espèces de poissons, parmi les plus sensibles, puissent être naturellement atteintes de botulisme de type E, comme cela est d'ailleurs décrit, généralement sous forme de mortalité, chez des espèces sauvages (par exemple, le gobie à taches noires - *Neogobius melanostomus* - dans les Grands Lacs d'Amérique du Nord, le poisson chat - *Ictalurus punctatus* - dans le delta du Mississippi aux États-Unis) ou d'aquaculture (élevages de truites ou de saumons en Amérique du Nord ou en Europe du Nord, de carpes au Japon). En revanche, les observations relatives à l'intervention d'autres types toxiques, par exemple le type C (auquel les poissons s'avèrent moins sensibles) comme rapporté par Nol *et al.* (2004) chez le tilapia (*Oreochromis mossambicus*) dans un lac salé (Salton sea) de Californie (États-Unis), sont exceptionnelles.

*Clostridium botulinum* de type E est principalement isolé dans les régions les plus septentrionales de l'hémisphère Nord (Alaska, Canada, Nord de l'Europe, de l'Asie et du Japon), dans les environnements marins (zones côtières) et d'eau douce (Grands Lacs d'Amérique du Nord, par exemple).

Régulièrement décrites autrefois dans les fermes aquacoles dans les années 1960-2000 (notamment dans des élevages de truites ou de saumons), les atteintes botuliques en aquaculture semblent devenues rares, du fait notamment de l'évolution des pratiques d'élevage et de gestion sanitaire. Les seules références relativement récentes, en dehors de celles relatives aux cas de botulisme E affectant les poissons des Grands Lacs d'Amérique du Nord (Getchell *et al.* 2006) concernent le botulisme du poisson chat (voir plus loin) décrit dans certains élevages du sud des États-Unis (Beecham *et al.* 2014, Khoo *et al.* 2011).

En France, *C. botulinum* type E est identifié, mais avec une très faible prévalence, dans des sédiments côtiers (Fach *et al.* 2002) ou d'eau douce (Smith, Moryson, et Walmsley 1977).

### 5.5.1 Pathogénèse et signes cliniques

#### 5.5.1.1 Pathogénèse : contamination botulique des poissons

Comme chez les mammifères, le botulisme chez les poissons est causé par un blocage de la libération d'acétylcholine aux jonctions neuromusculaires conduisant à la paralysie des muscles squelettiques (incluant ceux contrôlant les nageoires) (Beecham *et al.* 2014, Eklund *et al.* 2004). Le temps d'évolution vers la mort et le

taux de létalité sont dose-dépendants, le seuil critique pour l'apparition des signes cliniques variant beaucoup selon la sensibilité propre à l'espèce (Yule, LePage, *et al.* 2006).

Les mécanismes du développement du botulisme chez le poisson sont mal connus. L'ingestion de la neurotoxine E en quantité suffisante (variable selon l'espèce de poissons), par exemple lors de cannibalisme chez le saumon ou la truite, peut provoquer la mort des poissons. Bien qu'il soit difficile de reproduire la maladie en faisant ingérer des spores aux poissons (Eklund *et al.* 1984), le botulisme peut relever d'une toxi-infection à point de départ digestif, sans que l'on ait cependant déterminé les circonstances permettant aux spores de germer dans l'intestin et à la bactérie d'y proliférer et d'y produire la toxine. Dans ses investigations dans des élevages de saumons atteints de botulisme E, Eklund *et al.* (1984) constatait ainsi que tous les poissons présentant des signes cliniques contenaient des quantités de bactéries se situant entre 75 et 110 000 par gramme d'intestin, et des quantités de toxine pouvant atteindre plus de 200 MLD par gramme.

La prévalence du portage de *C. botulinum* type E (tractus digestif, peau, ouïes) chez les poissons est en général en relation avec le taux de contamination des sédiments (marins ou en eau douce). La contamination des poissons intervient au contact des eaux contaminées véhiculant des spores et lors de l'ingestion de débris végétaux, algues et planctons contaminés accumulés à l'interface sédiments - eaux ou en suspension dans l'eau, ou d'organismes benthiques (vers de vases, moules...) (Chun *et al.* 2013, Dolman 1957, Hannett *et al.* 2011, Wijesinghe *et al.* 2015, Yule, Barker, *et al.* 2006). La consommation de poissons contaminés (et le cannibalisme en élevage) peuvent aussi permettre la contamination d'espèces carnivores (truites, saumons par exemple) (Cann et Taylor 1982, Eklund *et al.* 1984).

La mort des poissons contaminés, quelle qu'en soit la cause (y compris l'intoxication botulique) permet, dans les cadavres en décomposition (offrant les conditions anoxiques nécessaires), la germination des spores qui s'y trouvent et la multiplication bactérienne, associée à la production de toxine (jusqu'à 10 000 MLD/g par exemple dans les cadavres décomposés de truites (Cann et Taylor 1982). L'accumulation de poissons morts sur le fond contribue fortement à l'enrichissement des sédiments en spores, avec des concentrations parfois très importantes (jusqu'à 240 000 spores par g de sédiment détectées dans un bassin d'élevage de saumons juvéniles en cours de maladie (Eklund *et al.* 1982). Elle a été démontrée en élevage aquacole, outre les conditions de température (plus chaude) favorables à leur émergence, comme un facteur important d'initiation des épizooties dans les élevages de truites ou de saumons (Cann et Taylor 1982, Eklund *et al.* 1982). Cela semble aussi être le cas dans l'initiation des épizooties de botulisme dans les Grands Lacs nord-américains (Yule, Barker, *et al.* 2006).

### 5.5.1.2 Signes cliniques

Les signes cliniques observés dans les cas spontanés ou après inoculation expérimentale de toxine E préformée sont identiques (Cann et Taylor 1982, Eklund *et al.* 1982, Eklund *et al.* 2004, Eklund *et al.* 1984, Haagsma 1975, Lalitha et Gopakumar 2001, Yule, Austin, *et al.* 2006, Yule, Barker, *et al.* 2006, Yule, LePage, *et al.* 2006). Une entité clinique particulière, dénommée « toxicose viscérale » (*catfish visceral toxicosis* ou CVT), se traduisant parfois par une mortalité soudaine sur des sujets apparemment sains, est aussi décrite chez le poisson chat (Beecham *et al.* 2014, Chatla *et al.* 2014, Chatla *et al.* 2012, Gaunt, Kalb, et Barr 2007, Khoo *et al.* 2011). Les signes principaux, témoignant notamment d'une paralysie musculaire progressive (débutant par une atteinte des muscles des nageoires pectorales et s'étendant vers la queue), sont, après une phase d'hyperactivité, une nage désordonnée, des troubles de l'équilibre postural (nage sur le dos par exemple), la perte des mouvements de la queue, des troubles respiratoires (perte des mouvements operculaires et abduction des opercules), une léthargie et la mort. Certaines espèces, notamment les gobies, montrent une hyperpigmentation cutanée. Des lésions sont parfois mises en évidence chez les poissons, incluant, notamment dans la CVT, invagination et blanchiment des intestins, ascite, congestion de la rate et parfois exophtalmie (Gaunt, Kalb, et Barr 2007, Khoo *et al.* 2011). Il est habituel, chez certaines espèces comme le saumon, de trouver, accumulée dans la partie distale de l'intestin, une substance fécale visqueuse et jaune orangée suggérant un désordre digestif ou une constipation (Eklund *et al.* 1982).

Lors des foyers de botulisme survenant naturellement dans les fermes aquacoles, les pertes peuvent être importantes, avec des taux de mortalités atteignant 79 % dans certaines écloséries de truites et de saumons, comme cela a été signalé, entre autres, lors d'épizooties décrites aux États-Unis entre 1979 et 1983 (Eklund *et al.* 1984). En raison de l'importance de la mortalité et des pertes économiques dues à la maladie, le botulisme de type E était historiquement nommé la « maladie de la banqueroute » par les éleveurs (Eklund *et al.* 1984, Huss et Eskildsen 1974). En revanche, la mortalité survenant chez les poissons sauvages n'est généralement perceptible qu'au travers du développement d'épizooties de botulisme chez les oiseaux (Nol *et al.* 2004, Yule, Barker, *et al.* 2006).

Par ailleurs, comme démontré chez le poisson chat inoculé avec des doses sub-létales de toxine E (Beecham *et al.* 2014), de faibles doses de toxines peuvent réduire les performances de la nage et contribuer indirectement à la mortalité en augmentant le risque de prédation (Chatla *et al.* 2012).

### 5.5.2 Diagnostic

Les troubles de l'équilibre et les difficultés de la nage associés à une mortalité importante observés dans le botulisme chez le poisson ne sont pas spécifiques et la suspicion implique l'élimination préalable de maladies (maladies virales en particulier) ou intoxications plus courantes.

Le diagnostic de certitude implique, chez les poissons malades ou moribonds, la démonstration de la présence de toxine dans le sang et le tractus digestif (contenu intestinal, estomac). La caractérisation concomitante de *C. botulinum* dans le tube digestif des poissons corrobore le diagnostic mais demeure à elle seule insuffisante en raison du portage décrit chez les sujets sains (Cann et Taylor 1982).

Le diagnostic peut être cependant mis en défaut par l'absence de neurotoxine libre dans les tissus (Yule, LePage, *et al.* 2006) ou par une sensibilité insuffisante des tests sur souris par rapport aux concentrations présentes et éventuellement actives chez certains poissons, notamment le poisson chat dans la CVT, chez lesquels la toxine détectable dans le sérum est souvent inférieure à 0,5 MLD<sub>50</sub> par mL (Chatla *et al.* 2014, Gaunt, Kalb, et Barr 2007). Le recours au poisson zèbre (*Danio rerio*), plus sensible à la toxine E a été ainsi proposé comme alternative à la souris (Chatla *et al.* 2014, Chatla *et al.* 2016), ou encore celle de rechercher la toxine par la méthode Endopep-MS (Gaunt, Kalb, et Barr 2007).

### 5.5.3 Présence et concentration des différentes formes de *C. botulinum* dans les tissus en fonction de l'état d'un animal

#### 5.5.3.1 Méthodes diagnostiques utilisées et limites

Il n'y a pas de méthode normalisée pour détecter *C. botulinum* ou la toxine botulique chez les poissons, rendant difficile la comparaison des résultats publiés, notamment dans les études les plus anciennes. Il est en outre difficile de comparer les résultats d'investigations portant sur des espèces très différentes, cliniquement atteintes ou non, vivant dans des écosystèmes variés, en milieu naturel ou en élevage.

Les investigations portent majoritairement sur la recherche de la toxine par inoculation à la souris à partir du sang prélevé chez les poissons malades, ou le surnageant filtré après centrifugation du contenu intestinal ou d'un broyat de tissus musculaires (filets). Dans la plupart des publications (majoritairement antérieures à 2000), les recherches de *C. botulinum* dans le tube digestif des poissons, les sédiments et autres échantillons poolés ou non, sont réalisées par culture suivie d'une recherche de la toxine par inoculation à la souris et sa caractérisation par séroprotection. En revanche, les publications les plus récentes, essentiellement consacrées à des études de prévalence, comme celles de Hyytiä, Hielm, et Korkeala (1998), Hielm, Björkroth, *et al.* (1998), (Hielm, Hyytiä, *et al.* 1998) ou Fach *et al.* (2002), sont fondées sur la caractérisation, après mise en culture des échantillons, du gène codant la toxine E. Les données quantitatives (nombre de *C. botulinum* par g) relèvent le plus souvent du calcul du nombre le plus probable.

Les limites de ces études, notamment en termes de sensibilité, sont celles inhérentes aux techniques choisies. La question de la sensibilité du test sur souris pour la recherche de la toxine E dans le diagnostic du botulisme chez le poisson a été évoquée ci-dessus.

#### 5.5.3.2 Présence et concentration de *C. botulinum* E chez les poissons

Les données les plus complètes sur le botulisme du poisson sont celles collectées lors des études menées dans les élevages atteints, de truites et saumons en particulier. Chez ces espèces, les analyses pratiquées sur les sujets malades ou moribonds, comme déjà indiqué, révèlent des concentrations de *C. botulinum* et de toxine qui peuvent être importantes dans le contenu digestif (Cann et Taylor 1982, Eklund *et al.* 1982, Eklund *et al.* 1984). Pour autant, les concentrations de toxines retrouvées dans le sérum et les filets peuvent être variables, et éventuellement inférieures au seuil de détection chez la souris. Eklund *et al.* (1982) indiquent ainsi, se référant à des foyers de botulisme dans des élevages de saumons, que la présence de toxine E dans les filets n'est pas systématique et est retrouvée plutôt chez les poissons dont les intestins contiennent plus de 100 MLD par mL. Dans des conditions de température plus basses (en dessous de 10°C) et lorsque le délai entre l'ingestion de la toxine et l'apparition des signes cliniques est rallongé, la toxine est détectée moins fréquemment dans les tissus (Eklund *et al.* 1984). Des expérimentations d'inoculation de toxine E par voie digestive chez des poissons

sauvages des Grands Lacs d'Amérique du nord montrent également que malgré l'observation de signes cliniques, la mort des animaux et la présence de toxine dans la partie viscérale (viscères/tête, queue), elle peut ne pas être détectée dans les prélèvements musculaires (chez le gobie, par exemple, inoculé avec 4000 MLD, la toxine est retrouvée dans la fraction viscérale de 11 des 12 sujets morts de botulisme et seulement dans les filets de 2 d'entre eux) (Yule, Austin, *et al.* 2006, Yule, Barker, *et al.* 2006).

Les analyses réalisées sur des poissons sans signe clinique, prélevés dans les bassins d'élevage au cours d'un foyer botulique montrent également la présence, dans une proportion variable, de *C. botulinum* E dans leur tractus digestif (Cann et Taylor 1982, Eklund *et al.* 1984). La présence de la bactérie est également mise en évidence chez des poissons sauvages ou d'élevage capturés en dehors de foyers cliniques, rendant nécessaire la recherche de la toxine pour un besoin diagnostique.

La présence de *C. botulinum* de type E est fréquente dans le contenu digestif des poissons vivant dans les zones géographiques connues pour héberger *C. botulinum* de type E, ce qui a conduit certains chercheurs à considérer le tractus digestif comme un potentiel réservoir (Dolman 1957) et un prélèvement de choix pour la recherche de cette bactérie. La bactérie peut être également isolée sur la peau et les ouïes des poissons témoignant de l'importance de la contamination du milieu dans certains sites.

La prévalence est variable selon le lieu avec des fluctuations selon la saison ou l'année des prélèvements.

- La présence de *C. botulinum* de type E est ainsi mise en évidence dans 2 à 31 % de divers poissons (saumons, truites, soles, cabillauds...) issus de différents sites du Nord-ouest canadien (Craig, Hayes, et Pilcher 1968). Une étude réalisée sur plus de 3 000 poissons des Grands Lacs nord-américains appartenant à 25 espèces différentes indiquait une prévalence moyenne variant de 1 à 9 % selon le lac, pouvant atteindre 57 % dans certains sites, variations attribuées, comme dans les eaux et sédiments des mêmes sites, à l'importance des activités humaines et des rejets d'effluents (Bott *et al.* 1966).
- En Finlande, des analyses effectuées sur 438 poissons (sauvages et d'aquaculture) ont révélé une prévalence, variant selon l'espèce, de 10 % chez le corégone blanc (*Coregonus albula*) à 40 % chez le hareng de la Baltique (*Clupea harengus membras*). Dans ce même pays, *C. botulinum* de type E a été retrouvé, dans 60 à 95 % des élevages investigués et 15 % des échantillons d'intestins analysés (Hielm, Hyytiä, *et al.* 1998, Hyytiä, Hielm, et Korkeala 1998)

Les quantités de *C. botulinum* trouvées dans les intestins varient d'une étude à l'autre, mais sont en général plutôt faibles, par exemple 240 (30 à 1900) spores/kg dans l'étude de (Hyytiä, Hielm, et Korkeala 1998). La situation rencontrée se limite le plus souvent à un portage intestinal des spores ingérées sans germination dans le tube digestif. Les spores bactériennes peuvent, en revanche, germer et les formes végétatives se multiplier et produire leur toxine chez les poissons morts dont les cadavres contribuent à l'enrichissement du milieu en spores bactériennes.

#### 5.5.4 Traitement et prévention

Bien que Hiroki (1970) ait montré qu'une immunisation active pouvait être obtenue par injection d'anatoxine E chez la carpe (*Cyprinus carpio*), cette possibilité n'a pas été étudiée chez d'autres espèces de poissons.

La prévention et la lutte contre le botulisme pisciaire sont prises en compte en aquaculture, notamment dans les zones à risque. Les risques de contamination alimentaire sont maintenant très limités mais les bassins à fond de terre constituent un milieu toujours favorable à la survie des spores. La prévention passe par la prise en compte de mesures de biosécurité destinées à limiter le risque de contamination des bassins d'élevage, leur curage régulier pour éliminer les sédiments contaminés et leur traitement à la chaux vive, et l'élimination régulière des poissons morts (Cann et Taylor 1982, Eklund *et al.* 1984).

Le botulisme chez le poisson est causé, dans la quasi-totalité des cas, par *C. botulinum* de type E. Cela s'explique par la sensibilité particulière des poissons, avec de grandes disparités en fonction des espèces, à la neurotoxine de type E. La maladie est décrite dans les zones de répartition de ce type toxinique (régions les plus septentrionales de l'hémisphère Nord) et peut affecter des espèces marines ou d'eau douce, sauvages ou d'élevage. Son développement résulte de l'ingestion de toxine (intoxication survenant, par exemple, à la suite de la consommation de poissons malades ou lors du cannibalisme décrit chez les truites et saumons en élevage) ou du développement d'une toxi-infection à point de départ digestif chez des poissons hébergeant la bactérie, issue de l'eau ou des sédiments, dans leur intestin.

La maladie passe généralement inaperçue dans le milieu naturel et la description des signes cliniques résulte des observations faites à la suite d'inoculations expérimentales ou dans les élevages atteints. Les signes cliniques sont principalement ceux d'une paralysie musculaire progressive se manifestant par une nage désordonnée, des troubles de l'équilibre postural (nage sur le dos par exemple), la perte des mouvements de la queue, des troubles respiratoires (perte des mouvements operculaires et abduction des opercules), une léthargie et la mort qui survient souvent rapidement. Une entité clinique particulière, dénommée « toxicose viscérale » (*catfish visceral toxicosis* ou CVT), est aussi décrite aux États-Unis chez le poisson chat. La mortalité en élevage est souvent importante (jusqu'à 79 % par exemple, dans des élevages de truites et de saumons).

Le diagnostic de certitude, en l'absence de spécificité des signes cliniques observés (attribuables à de nombreuses maladies, notamment virales) et en raison de la prévalence souvent élevée du portage digestif chez les poissons sains, implique l'identification de la toxine dans le sang et le tractus digestif des poissons malades. Ce diagnostic est cependant facilement mis en défaut du fait de la sensibilité insuffisante des tests sur souris par rapport aux concentrations présentes et éventuellement actives chez certaines espèces.

Les pertes importantes observées à une époque dans les piscicultures confrontées à cette maladie ont justifié la mise en œuvre de mesures préventives axées en particulier sur la biosécurité, une alimentation sécurisée, l'élimination régulière des cadavres de poissons et l'entretien des bassins d'élevage (suppression des bassins à fonds de terre, élimination et traitement des sédiments, nettoyage-désinfection). Ces mesures ont contribué à rendre très rares les signalements de botulisme chez les poissons d'élevage.

## 5.6 Bases de données de surveillance en santé animale

### 5.6.1 Etude des données de surveillance relatives au botulisme chez les animaux en France

En France, le botulisme animal est un danger sanitaire de 1<sup>ère</sup> catégorie chez toutes les espèces sensibles. À ce titre, il s'agit d'une maladie qui donne lieu à déclaration obligatoire dès le stade de la suspicion. Les cas sont confirmés par deux laboratoires, le Centre National de Référence (CNR) et le Laboratoire National de Référence (LNR). Historiquement, c'est le CNR qui établissait les diagnostics de botulisme, à la fois chez l'être humain et les animaux. En 2012, un LNR a été créé au laboratoire de l'Anses de Ploufragan dans l'unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins (HQPAP), associant l'unité Épidémiologie Santé et Bien Être (EPISABE) ainsi que la Plateforme IdentityPath du Laboratoire de Sécurité des Aliments de l'Anses Maisons-Alfort. Depuis cette date une partie des diagnostics animaux y sont effectués, sur les volailles dans un premier temps puis les oiseaux sauvages. En 2017, le LNR a commencé à diagnostiquer également des foyers chez les bovins.

Des données complémentaires ont été identifiées auprès d'autres partenaires : il est probable que le botulisme chez les bovins ne fasse pas toujours l'objet d'une demande d'analyse de confirmation par le laboratoire de référence. Des informations complémentaires sur les suspicions (données issues des demandes d'indemnisation des mortalités pour botulisme) sont probablement disponibles auprès des Groupement de défense sanitaire (GDS). De même, le réseau SAGIR<sup>25</sup> dispose d'informations complémentaires pour la faune sauvage, basées sur

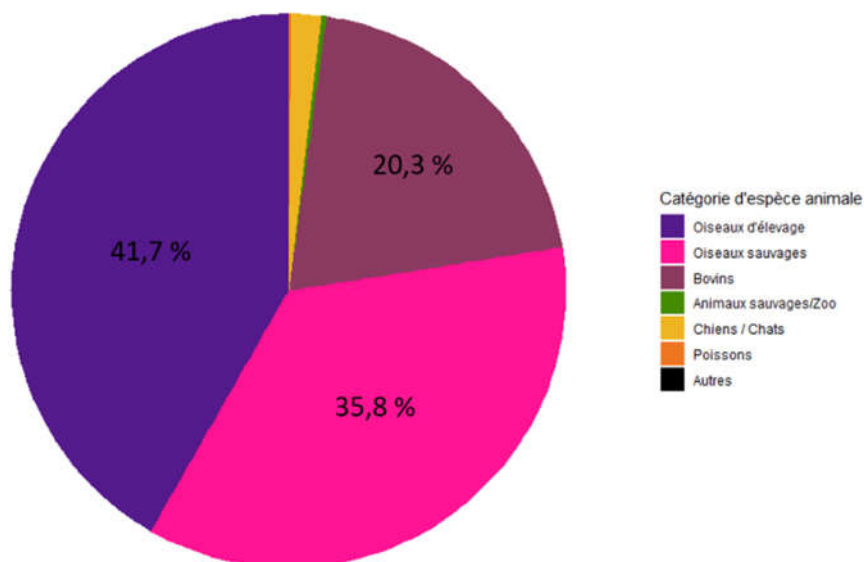
<sup>25</sup> Le réseau SAGIR est un réseau de surveillance sanitaire de la faune sauvage piloté par l'Office Français de la Biodiversité impliquant la Fédération nationale de chasseurs et les laboratoires départementaux. Créé en France (en 1986), il met en œuvre une épidémiologie et une toxicovigilance sur les mammifères terrestres et oiseaux sauvages sur tout le territoire français (incluant les DOM-TOM) grâce à un réseau d'observateurs formés et à un réseau de laboratoires.

la surveillance événementielle des mortalités aviaires anormales. Toutes ces données complémentaires n'ont pas été investiguées.

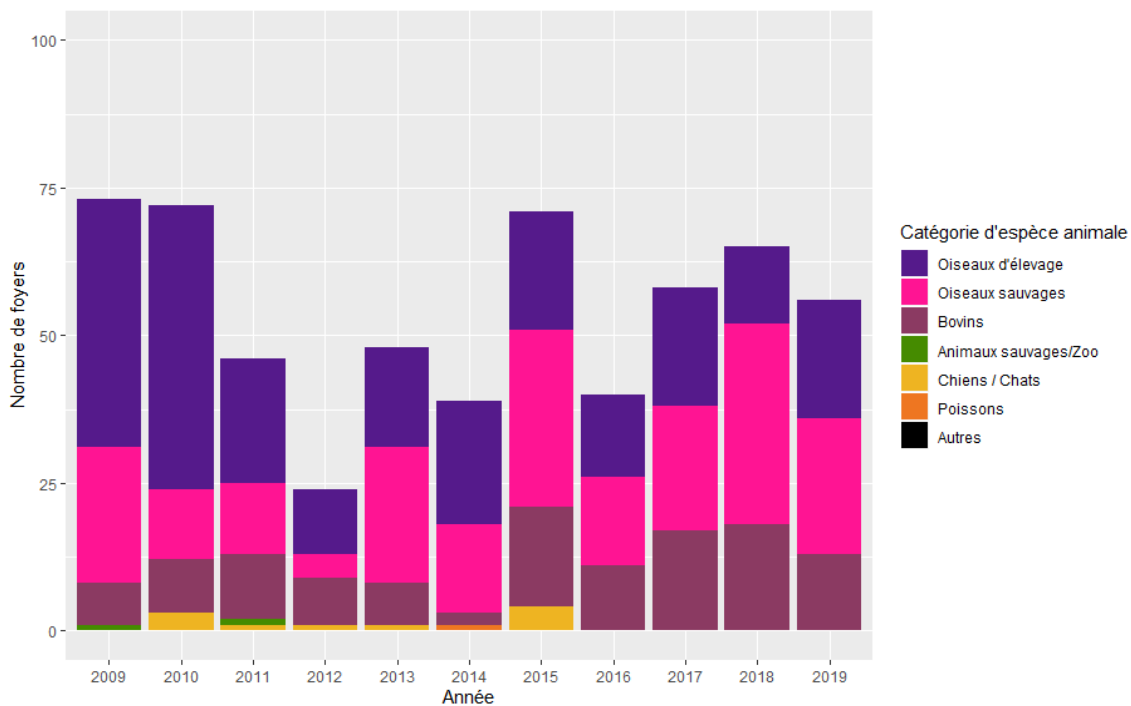
L'analyse porte donc sur la période 2005-2019 à partir des données disponibles sur les cas confirmés provenant à la fois du CNR (de 2005 à 2019) et du LNR (de 2013 à 2019). Une analyse complémentaire a pu être conduite à partir des données du LNR permettant de décrire plus finement les caractéristiques de la maladie et son évolution dans les élevages depuis 2013.

#### 5.6.1.1 Répartition des foyers de botulisme par espèce

Le nombre de foyers de botulisme, recensé par le CNR, pour les catégories d'espèces animales autres que « Oiseaux sauvages » et « Oiseaux d'élevage », ne sont disponibles qu'à partir de 2009. Ainsi, l'analyse de ces espèces porte sur la période de 2009 à 2019. Pour « Oiseaux sauvages » et « Oiseaux d'élevage » l'analyse a été effectuée de 2005 à 2019. Pour la période de 2009 à 2019, 592 foyers de botulisme animal ont été recensés par ces deux laboratoires. Le botulisme est principalement présent chez les **oiseaux d'élevage** (n = 247), les **oiseaux sauvages** (n = 212) et les **bovins** (n = 120). À titre plus anecdotique, quelques foyers ont été identifiés chez d'autres espèces (chiens/chats (n=10), poissons (n=1), animaux sauvages et de zoos (n=2) (Figure 13 et Figure 14).

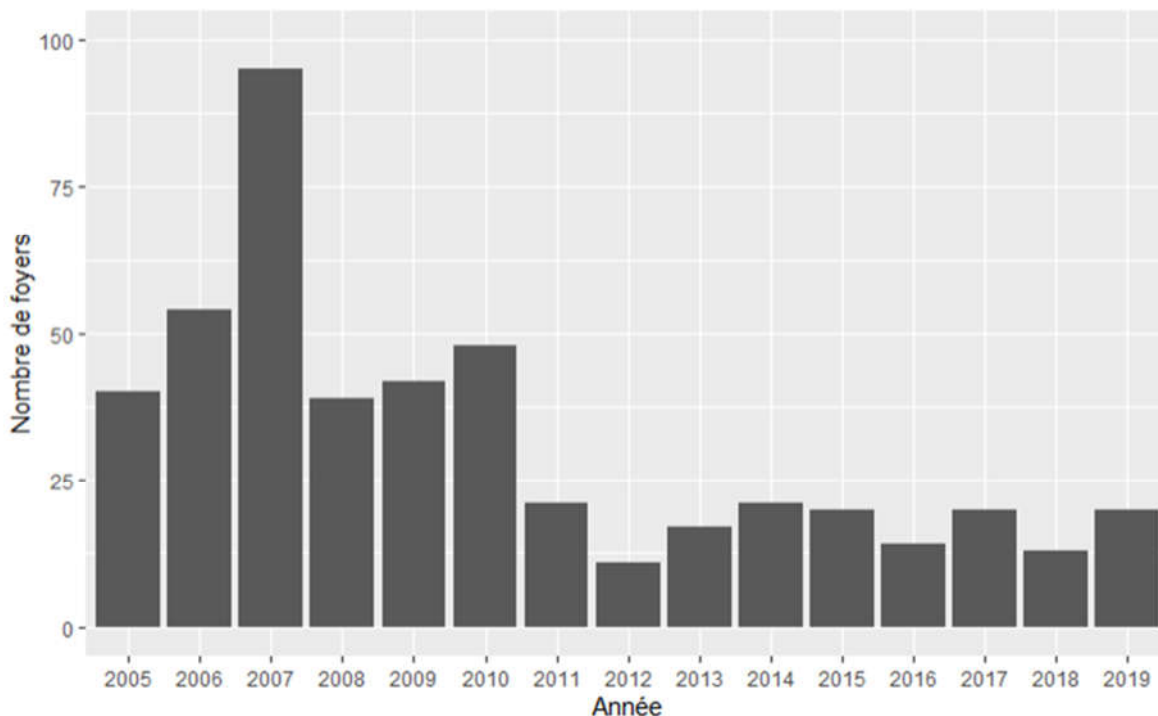


**Figure 13** : Répartition des foyers botuliques recensés de 2009 à 2019 par espèce (n = 592)  
(Source CNR/LNR)



**Figure 14** : Évolution des foyers botuliques recensés par année de 2009 à 2019 par espèce (n = 592)  
(Source CNR/LNR)

Les figures suivantes représentent le nombre de foyers en élevage et le nombre de cas en faune sauvage recensés dans les trois populations les plus touchées par le botulisme (i.e., oiseaux d'élevage, oiseaux sauvages et bovins). Chaque année, une trentaine de foyers sont recensés en moyenne dans les élevages de volailles, environ une vingtaine de cas chez les oiseaux sauvages et une dizaine de foyers dans l'espèce bovine. Ce nombre fluctue néanmoins selon les années.



**Figure 15** : Évolution du nombre de foyers de botulisme pour les oiseaux d'élevage recensés de 2005 à 2019 (n = 247) (Source CNR/LNR)

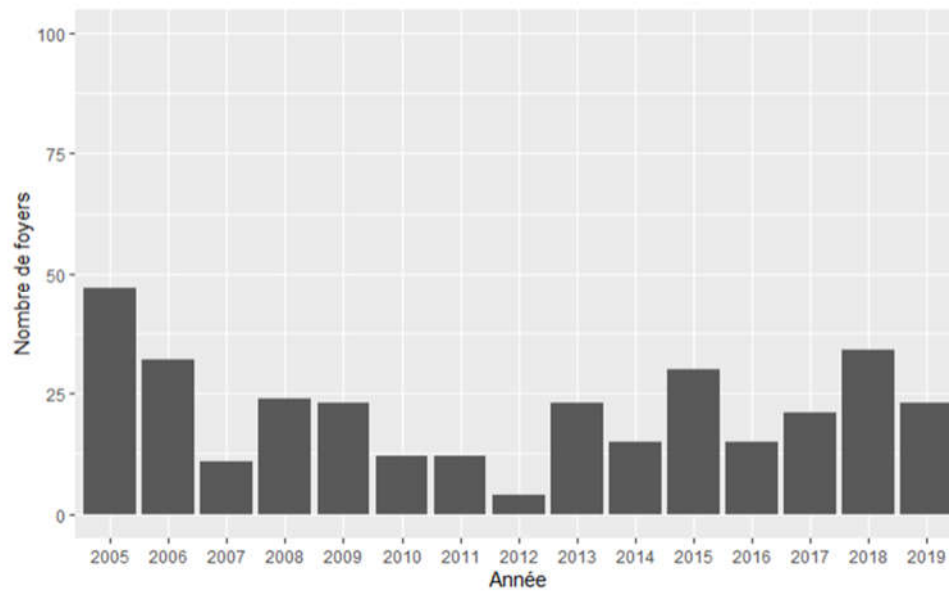


Figure 16: Évolution du nombre de foyers de botulisme pour les oiseaux sauvages recensés de 2005 à 2019 (n = 212) (Source CNR/LNR)

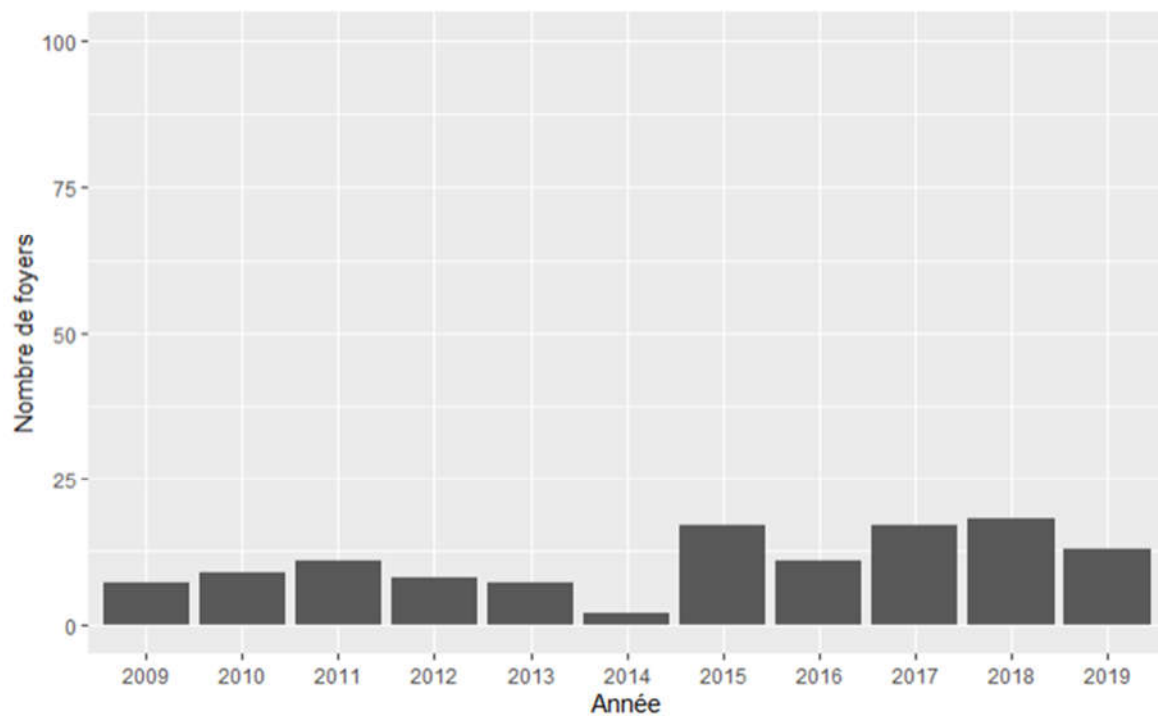


Figure 17 : Évolution du nombre de foyers de botulisme pour les bovins recensés de 2009 à 2019 (n = 120) (Source CNR/LNR)

Le LNR réalise aujourd'hui près de la moitié des diagnostics.

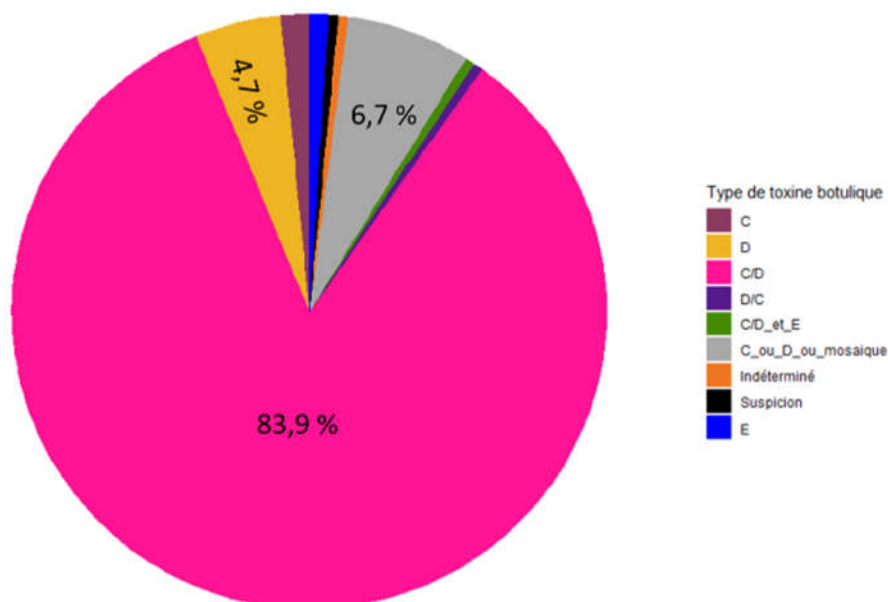


### 5.6.1.2 Répartition des types de *C. botulinum*

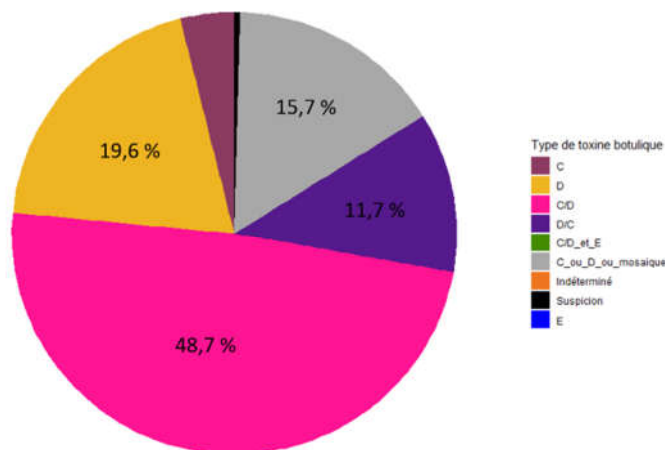
Le type mosaïque C/D représente la forme dominante chez les oiseaux, qu'il s'agisse des oiseaux sauvages (n = 162) ou des oiseaux d'élevage (n = 112). Les types D (n = 45) et D/C (n = 27) sont également souvent détectés chez les oiseaux d'élevage. Chez les bovins, c'est la toxine botulique mosaïque D/C qui est très largement majoritaire (n = 82) suivie de la forme C (n = 12).

Concernant les autres catégories animales, en 2014 un seul cas de botulisme (toxine D ou mosaïque C/D) sur des poissons (une anguille sauvage - *Anguilla anguilla*) a été détecté de façon concomitante à un foyer de botulisme chez des oiseaux aquatiques dans une réserve ornithologique. Deux foyers sur des « animaux sauvages/ Zoo » ont été détectés. Le premier, en 2009, était dû à une toxine C et le second, en 2011, à une toxine « C, D ou mosaïque ». Dix foyers de « chiens/ chats » ont été détectés entre 2010 et 2015. Ils étaient majoritairement dus à une toxine de type « C, D ou mosaïque » et D.

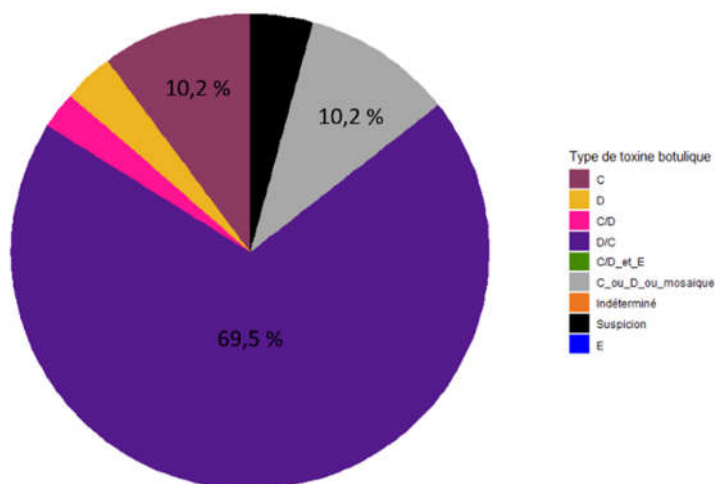
Au cours de cette période, le type E n'a été retrouvé que dans 3 foyers chez les oiseaux sauvages (soit 1 % des cas chez les oiseaux sauvages). Ces oiseaux étaient également porteurs du type C/D.



**Figure 18: Répartition des toxines botuliques pour les foyers d'oiseaux sauvages recensés de 2010 à 2019 (n = 193)**  
(Source CNR/LNR)



**Figure 19 : Répartition des types de botulisme pour les foyers d'oiseaux d'élevage recensés de 2010 à 2019 (n = 231)**  
(Source CNR/LNR)



**Figure 20 : Répartition des types de botulisme pour les foyers de bovins recensés de 2010 à 2019 (n = 118)**  
(Source CNR/LNR)

Au cours du temps, les méthodes de diagnostic ont évolué. Avant 2010, le diagnostic biologique se faisait très majoritairement sur sérum par la méthode de séroneutralisation qui ne permettait pas de faire la distinction des formes mosaïques. Depuis cette date et la mise en œuvre de techniques PCR, les formes mosaïques sont devenues les formes majoritaires, aussi bien chez les oiseaux que chez les bovins. Le type D, très présent chez les volailles et les oiseaux sauvages avant 2010, apparaît très probablement surévalué sur les figures : il a depuis considérablement baissé au profit du type mosaïque C/D.

Par la suite, une analyse a été conduite spécifiquement à partir des données du LNR. Les données disponibles depuis 2013 étant plus détaillées et exhaustives, une analyse plus fine a été réalisée permettant d'étudier notamment la saisonnalité, les espèces touchées et les types de toxines associés.

### 5.6.1.3 Étude de la saisonnalité

La survenue des cas de botulisme suit un rythme saisonnier chez les oiseaux sauvages et d'élevage avec une incidence significativement plus élevée au cours du troisième trimestre (test de Student) et dans une moindre mesure au cours du quatrième trimestre de chaque année (Figure 21 et Figure 22). Ainsi 80% des foyers identifiés chez les oiseaux sauvages et 47,3 % des foyers recensés chez les oiseaux d'élevage ont lieu au cours du 3<sup>e</sup> trimestre tandis que 26,4 % des foyers recensés chez les oiseaux d'élevage sont observés durant le 4<sup>e</sup> trimestre. Cet effet saisonnier n'a pu être mis en évidence chez les bovins pour lesquels un nombre plus restreint de données sur un plus faible nombre d'années était disponible.

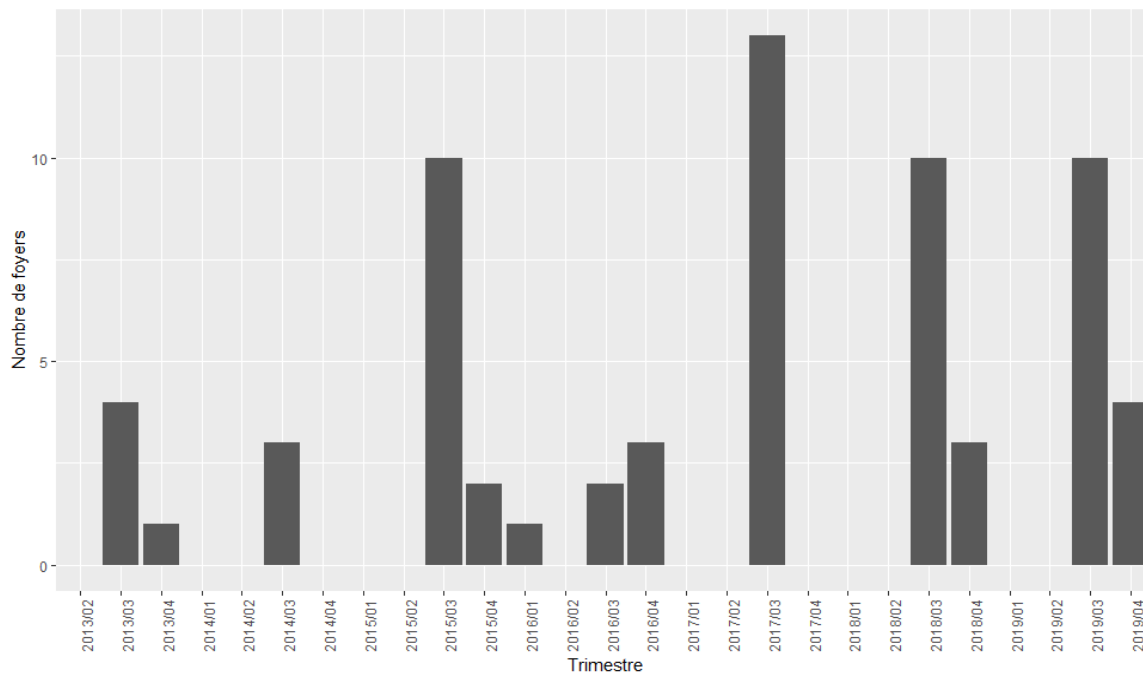


Figure 21 : Répartition par trimestre des foyers recensés sur des oiseaux sauvages (n = 66)  
(Source LNR)

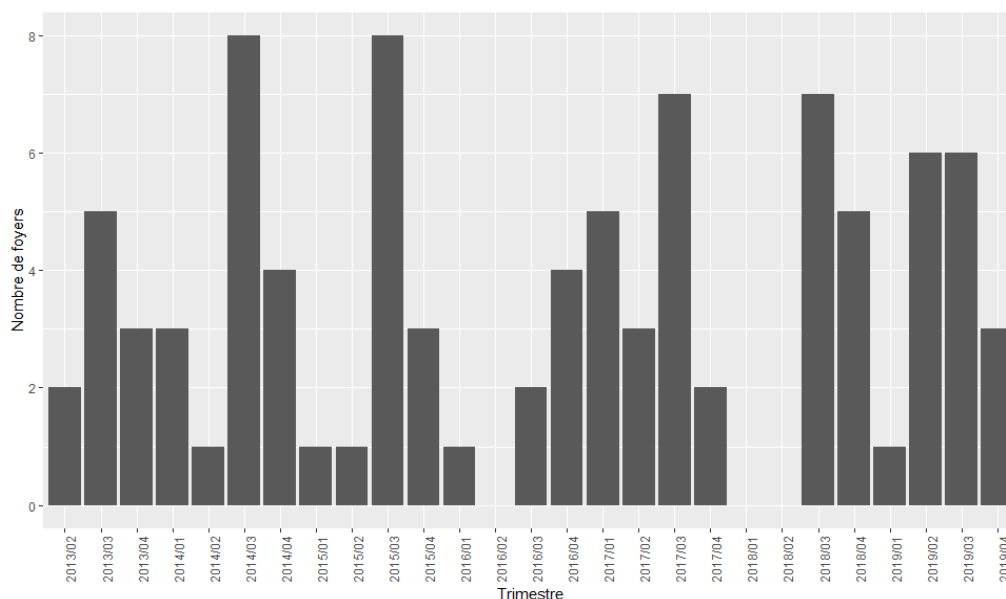
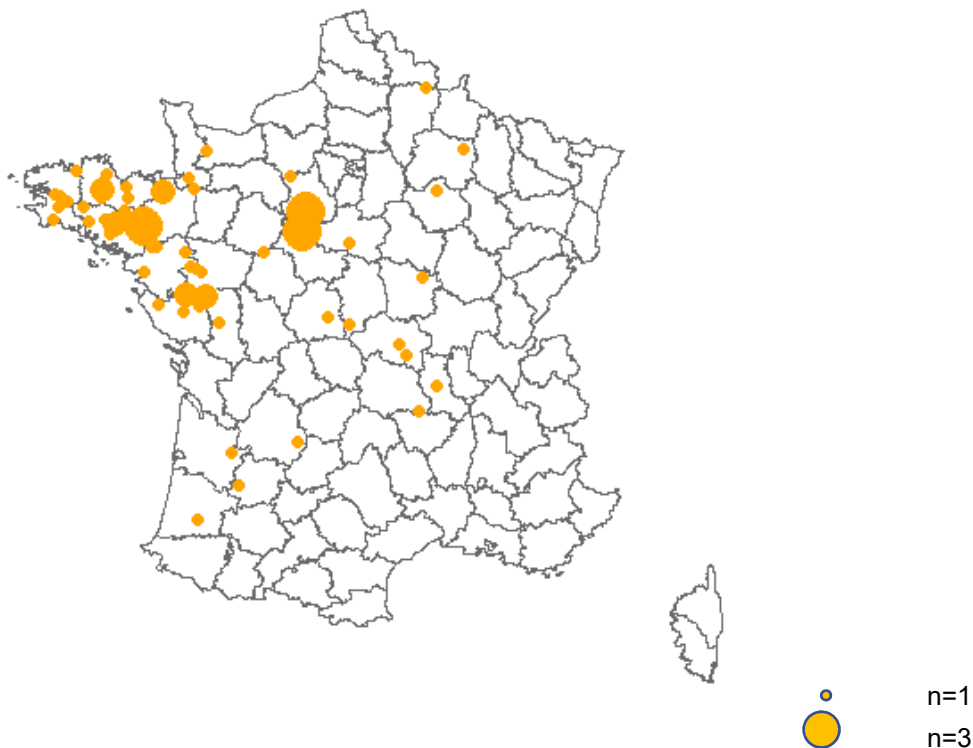


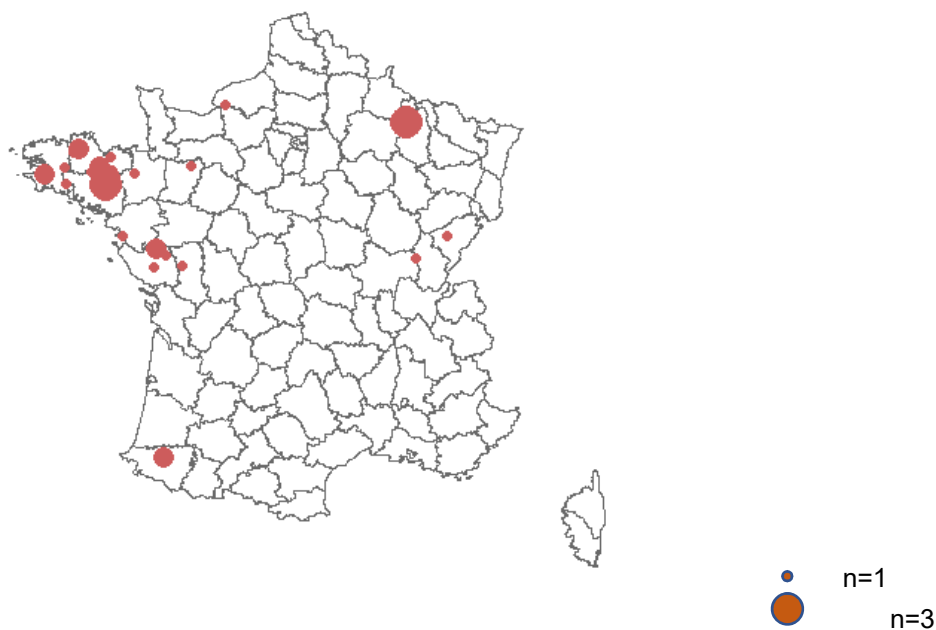
Figure 22 : Répartition par trimestre des foyers recensés sur des oiseaux d'élevage (n = 91)  
(Source LNR)

### 5.6.1.4 Répartition géographique

La majorité des foyers en élevages de bovins et de volailles se développent dans le grand ouest de la France, notamment en Bretagne, région de forte production (42% des foyers de volailles et 56% des foyers bovins), mais des cas groupés ont pu être observés dans d'autres régions (Figure 23 et Figure 24). La taille des cercles est proportionnelle au nombre de foyers observés (n=1 à 3).



**Figure 23: Répartition des foyers de botulisme recensés sur des oiseaux d'élevage de 2013 à 2019**  
(Source LNR) (n = 77)

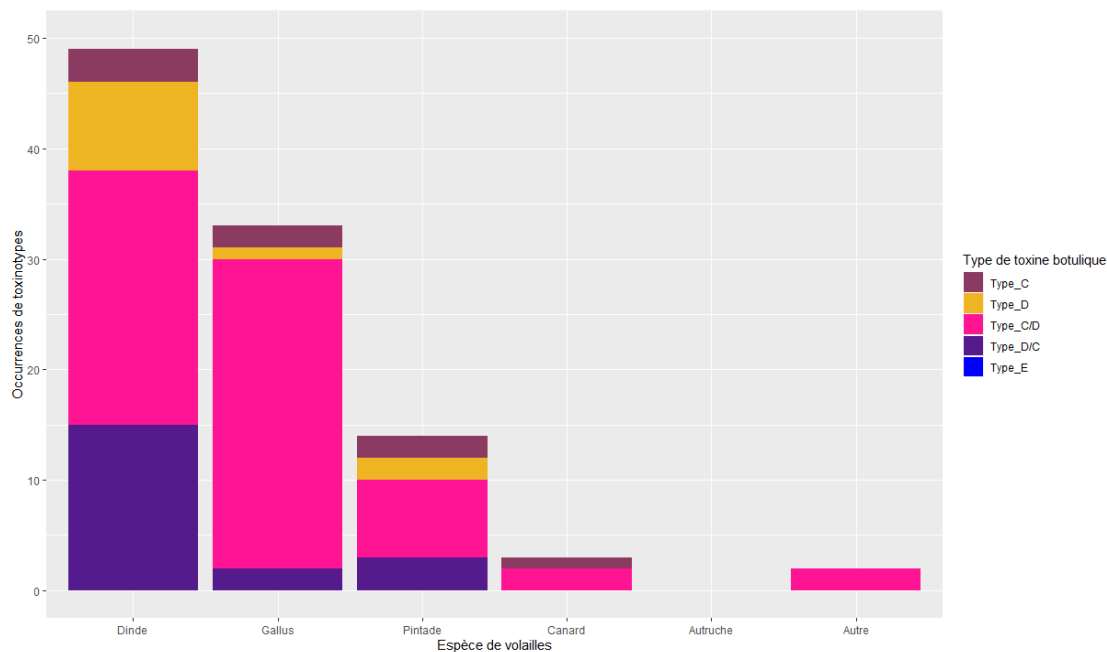


**Figure 24 : Répartition des foyers de botulisme bovins recensés de 2017 à 2019**  
(Source LNR) (n = 36)

Une recrudescence de cas est observée certaines années, sans pour autant que les enquêtes épidémiologiques aient permis d'en identifier les causes. Même si la Bretagne semble être la région la plus concernée par les cas de botulisme tant bovins qu'aviaires, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre les pics de survenue chez ces deux filières.

#### 5.6.1.5 Caractéristiques des élevages de volailles et des oiseaux sauvages atteints

Parmi les 81 foyers identifiés chez les volailles depuis 2012, les espèces les plus touchées par le botulisme (Figure 25) sont les dindes (n=41 foyers, 51 %) puis les poules pondeuses et poulets de chair (n=28 foyers, 35 %). Pour les dindes, ce sont les types mosaïques C/D (47%) et D/C (31%) qui sont les plus fréquents, alors que la majorité des types identifiés chez les poules pondeuses et les poulets de chair sont de type mosaïque C/D (85 %), comme chez les pintades. Cette analyse détaillée confirme que la forme C/D est majoritaire chez la plupart des espèces d'oiseaux, mais elle met aussi en lumière la part non négligeable de la forme D/C chez les dindes.



**Figure 25 : Répartition des types de *C. botulinum* recensés par espèce de volailles (n = 81 foyers)**  
(Source LNR)

L'âge à l'apparition des signes cliniques en élevage est très variable selon les espèces, mais il est à noter que les cas se développent le plus souvent **en fin de période d'élevage**.

D'autres paramètres ont été investigués (mortalité, maillon et type de production ...) mais le nombre de données ou leur fiabilité sont insuffisants pour conclure.

Pour les oiseaux sauvages, les espèces les plus touchées par le botulisme sont celles appartenant à la famille des anatidés (oies, cygnes, canards) (n = 71 foyers soit 87 %). Les foyers retrouvés sur d'autres espèces d'oiseaux sauvages sont peu nombreux (n = 11 soit 13 %) (laridés : mouettes, goélands et rallidés : râles, foulques). La forme mosaïque C/D est là encore la plus présente. Trois foyers impliquant simultanément les types C/D et E ont été observés, deux sur des anatidés (un canard colvert d'une part et un cygne tuberculé d'autre part) et le troisième sur un ciconiidé (cigogne).

#### 5.6.1.6 Discussion

L'analyse de ces données sur la période 2005-2019 a permis de mettre en évidence les espèces et filières concernées par les cas de botulisme animal en France. Deux filières animales sont essentiellement touchées : les filières avicole et bovine. D'une manière générale, les oiseaux sont très fortement concernés, qu'ils soient domestiques ou sauvages. De rares cas ont été confirmés sur d'autres espèces, surtout des carnivores domestiques (chats/chiens). L'analyse des types de *C. botulinum* par filière montre une prédominance de la forme mosaïque C/D chez les oiseaux (domestiques et sauvages), et la forme mosaïque D/C chez les bovins.

L'analyse détaillée effectuée à partir des données du LNR permet d'apporter des précisions intéressantes, notamment sur les élevages de volailles (espèces concernées, âge de survenue des cas, types dominants par

espèce, etc.). Il n'a pas été possible de conduire une analyse aussi fine pour les bovins du fait du manque de recul sur les données (disponibles uniquement depuis 2017). En tout état de cause, cette analyse reste difficile à conduire sur des données rétrospectives reposant presque uniquement sur des fiches commémoratives accompagnant les prélèvements au laboratoire.

Au cours de la période étudiée, on a pu observer la montée en puissance des activités du LNR botulisme et le transfert d'une partie des analyses diagnostiques. Alors que le CNR était le seul laboratoire de référence jusqu'en 2012, les premiers diagnostics réalisés au LNR deviennent disponibles à partir de l'année 2013 sur les oiseaux, puis de 2017 sur les bovins. À l'heure actuelle, le diagnostic de botulisme animal est en majorité réalisé par le LNR. À terme, le transfert des méthodes de diagnostic du botulisme animal vers un réseau de laboratoires agréés permettra la mise en œuvre des analyses de première intention.

L'évolution des méthodes diagnostiques au cours du temps est notable. Avant 2010, la méthode de détection des toxines botuliques ne permettait pas de distinguer les formes mosaïques. Ainsi, il est difficile de comparer l'évolution de la présence de certains types notamment entre les périodes situées avant et après 2010.

Les caractéristiques des tests ont aussi évolué. L'optimisation des méthodes de prélèvements (choix des matrices, protocole d'échantillonnage, modalités de transport et de conservation) a fort probablement conduit à une meilleure sensibilité de détection. Il reste néanmoins des situations de suspicions cliniques fortement évocatrices de la maladie, notamment en filière bovine, ne pouvant être confirmées par le laboratoire en fonction des caractéristiques du prélèvement reçu.

Les cas présentés dans ce rapport correspondent aux foyers recensés par le CNR et le LNR. Toute suspicion de botulisme faisant l'objet d'une demande de diagnostic de laboratoire passe actuellement *in fine* par le laboratoire de référence. Le botulisme animal étant une maladie à déclaration obligatoire en France, l'ensemble des prélèvements collectés devraient donc transiter par les laboratoires de référence dès suspicion. Il est cependant probable qu'un certain nombre de suspicions ne soient pas déclarées sans toutefois pouvoir en évaluer l'ampleur. Cette sous-déclaration est certainement limitée en filière bovine dans la mesure où les éleveurs doivent fournir une confirmation d'infection pour accéder au fonds d'indemnisation en cas de foyer. En filières volailles, les foyers de botulisme s'exprimant en fin de période d'élevage, on ne peut exclure l'éventualité de lots partant à l'abattoir en phase de démarrage d'un foyer de botulisme. La surveillance du botulisme chez les oiseaux sauvages, qui repose sur une surveillance événementielle, conduit, elle aussi, à une sous-représentation des cas observés sans pour autant pouvoir l'évaluer.

À l'exception du type E, qui a été détecté par PCR à 3 reprises sur des oiseaux sauvages en 2018 (de manière concomitante avec du type C/D), les types de *C. botulinum* retrouvés dans les foyers de botulisme animal sont différents de ceux identifiés dans les foyers humains ces dix dernières années en France et aucun foyer de botulisme humain investigué par Santé Publique France et le CNR n'a été rattaché à un foyer de botulisme animal durant cette période.

Pour ce qui est du botulisme de type E, aucun cas n'a été déclaré chez les espèces domestiques depuis 2000, date du dernier cas recensé sur des volailles. En 1997, le RNOEA avait en effet enregistré un premier foyer de type E, suivi d'autres foyers en 1998, 1999 et 2000, tous constatés chez l'espèce *Gallus gallus* (d'après Drouin, Durand, Dufour (1999), cité dans AFSSA (2002)). En outre, le botulisme de type E chez des poissons d'élevage est quasi-inexistant : le seul foyer répertorié dans les 30 dernières années a touché un lot de truitelles dans un élevage de truites arc-en-ciel en Bretagne dans les années 2000 (Le Bouquin, communication personnelle). Selon différentes investigations destinées à rechercher *C. botulinum* dans les sols, eaux et sédiments en France, *C. botulinum* de type E est identifié, mais avec une très faible prévalence, dans des sédiments côtiers (Fach *et al.* 2002) et en Camargue (Smith, Moryson, et Walmsley 1977). Aucun foyer de type E n'a par ailleurs été signalé chez les poissons sauvages, et le taux de portage de *C. botulinum* de type E chez des poissons pêchés le long des côtes ou en eau douce apparaît extrêmement faible, sans doute en relation avec sa faible prévalence en France (Fach *et al.* 2002).

## 5.6.2 Situation dans les autres pays européens

Dans le cadre du projet européen ANIBOTNET, un questionnaire sur la surveillance du botulisme a été envoyé à 16 pays (Italie, France, Belgique, Pologne, Lettonie, Finlande, Pays-Bas, Irlande, Espagne, Danemark, Allemagne, Estonie, Royaume-Uni, Norvège, Portugal et Suède). Les 9 premiers ont répondu.

Parmi eux, deux ne possèdent pas de laboratoire de surveillance et n'ont donc pas fourni de données sur les foyers. Il s'agit de la Lettonie et de la Finlande. Les sept autres pays, (i.e., Italie, France, Belgique, Pologne, Pays-Bas, Irlande et Espagne) pratiquent tous une surveillance événementielle du botulisme depuis plusieurs années. Le botulisme est une maladie à déclaration obligatoire pour cinq pays (i.e., France, Belgique, Espagne, Lettonie

et Finlande). Quatre pays (i.e., Belgique, Pologne, Irlande et Espagne) surveillent toutes les espèces d'élevages, les trois autres, (i.e., Italie, France et Pays-Bas) surveillent toutes les espèces animales.

Les données recueillies portent sur la période 2016 à 2020, et seuls les foyers confirmés par mise en évidence de la bactérie et/ou mise en évidence de la toxine ont été pris en compte. La mise en évidence de la bactérie *C. botulinum* est réalisée par analyse PCR afin de détecter le gène de la toxine. La mise en évidence de la toxine peut être réalisée par des tests sur souris.

En faisant abstraction des données françaises, précédemment présentées, l'analyse suivante portera sur des données très partielles puisqu'elles issues de seulement 6 pays européens.

#### 5.6.2.1 Répartition des foyers de botulisme par pays

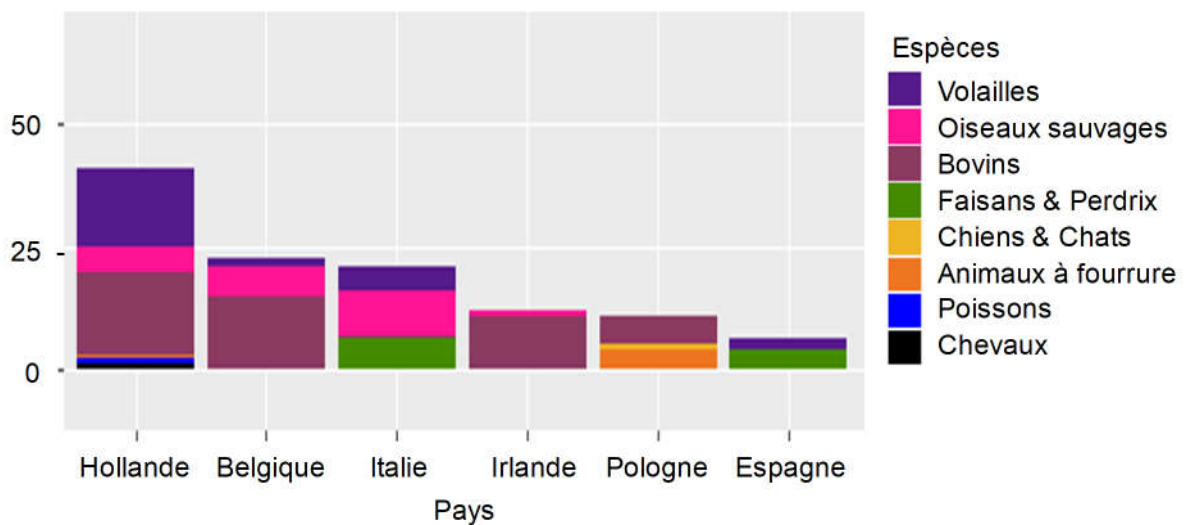
Au cours de la période de 2016 à 2020, 114 foyers de botulisme ont été recensés dans les six pays dont les données de surveillance ont été transmises, ce qui est faible en comparaison des 208 foyers recensés en France (cf. tableau 12). Les raisons de cette disparité, qui peuvent dépendre de multiples facteurs (incidence réelle, pression de surveillance, nombre et types d'élevages, espèces animales surveillées...) n'ont pas été investiguées.

**Tableau 12 : Répartition des foyers botuliques par pays (n = 322)**

France	Pays-Bas	Belgique	Italie	Irlande	Pologne
208	41	23	21	12	11

#### 5.6.2.2 Répartition des foyers de botulisme par espèce

Les espèces les plus représentées sont les bovins, les volailles et les oiseaux sauvages. Cependant, des différences de répartition entre espèces sont observées selon les pays : seuls des foyers aviaires ont été recensés en Italie (oiseaux sauvages, gibier et volailles) et en Espagne (gibier et volailles) ; quatre foyers portant sur des animaux à fourrure ont été détectés en Pologne.



**Figure 26 : Répartition des foyers par espèces et par pays (n = 114)**

(Source ANIBOTNET)

#### 5.6.2.3 Répartition des foyers de botulisme par types de *C. botulinum*

Les types majoritaires varient en fonction des espèces. Rappelons que le diagnostic peut être fondé sur la mise en évidence de la bactérie et/ou de la toxine.

Pour les volailles, si le type C est le plus présent lorsque le diagnostic repose sur la mise en évidence de la toxine (probablement du fait de l'utilisation majoritaire du test sur souris comme outil diagnostique, ce qui ne permet pas de faire la distinction entre le type C et le C/D), c'est la forme mosaïque C/D qui apparaît majoritaire lorsque le diagnostic a été fondé sur la recherche de la bactérie.

Pour les autres espèces, on peut noter que, les types majoritaires sont la forme mosaïque C/D pour les oiseaux sauvages et la forme mosaïque D/C pour les bovins. Le type E a été mis en évidence aux Pays-Bas en 2016, une fois sur des oiseaux sauvages et une fois sur des poissons (carpe commune ; *Cyprinus carpio*) en 2016. *C. botulinum* de type B a aussi été mis en évidence chez un cheval en 2018 aux Pays-Bas et chez un animal à fourrure (i.e., vison) en 2016 en Pologne.

#### 5.6.2.4 Etude de la saisonnalité

Les données recueillies ne laissent pas apparaître une saisonnalité nette des foyers, sauf chez les oiseaux sauvages, chez lesquels les foyers sont principalement identifiés en été.

Au total, l'analyse réalisée à partir des données provenant de six pays européens montre les mêmes tendances que ce qui a pu être observé en France, aussi bien en termes de catégories d'espèces concernées que de types recensés ou dominants. En revanche, la différence essentielle par rapport à la situation française porte sur le faible nombre de foyers recensés. De plus, il faudrait disposer des données de l'ensemble des pays d'Europe pour tirer un bilan définitif.



Sur la période de 2009-2019, 592 foyers de botulisme animal ont été recensés en France par les laboratoires et centres nationaux de référence, principalement chez les oiseaux sauvages (35,8 %), les oiseaux d'élevage (41,7 %) et les bovins (20,3 %). À titre plus anecdotique, quelques foyers ont été identifiés sur d'autres espèces (carnivores domestiques, poissons, animaux sauvages captifs). Chaque année, une dizaine de foyers sont recensés en moyenne dans l'espèce bovine, une vingtaine chez les oiseaux sauvages et une trentaine dans les élevages de volailles. Ce nombre fluctue néanmoins selon les années.

Le type mosaïque C/D représente la forme dominante chez les oiseaux, qu'il s'agisse des oiseaux sauvages ou des oiseaux d'élevage, suivi des types D et D/C. Chez les bovins, c'est la toxine botulique mosaïque D/C qui est très largement majoritaire suivie de la forme C. Le type E n'a été retrouvé qu'à trois reprises chez les oiseaux sauvages en 2018, de manière concomitante avec le type C/D.

L'aspect saisonnier de la maladie a pu être mis en évidence chez les oiseaux sauvages et d'élevage avec une incidence significativement plus élevée au cours du troisième trimestre et dans une moindre mesure au cours du quatrième trimestre de chaque année. La majorité des foyers en élevages de bovins et de volailles sont apparus dans le grand ouest de la France, zone d'élevage importante, mais des cas groupés ont pu être observés dans d'autres régions.

À l'exception du type E, détecté à 3 reprises sur des oiseaux sauvages, les types de botulisme retrouvés dans les foyers de botulisme animal sont différents de ceux identifiés dans les foyers humains ces dix dernières années en France et aucun foyer de botulisme humain investigué par Santé Publique France et le CNR n'a été rattaché à un foyer de botulisme animal.

Les données européennes (disponibles seulement pour 6 pays en plus de la France) sont trop partielles pour permettre de dresser un bilan clair de la situation à l'échelle du continent. En dehors des différences portant sur le faible nombre de foyers recensés (114 foyers recensés sur la période 2016-2020, contre 208 en France), on peut cependant relever une similitude quant aux espèces atteintes et aux types toxiques recensés ou dominants. En supplément, le type E a été mis en évidence à deux reprises en 2016 (oiseaux sauvages, poissons) aux Pays-Bas. *C. botulinum* de type B a aussi été mis en évidence chez un cheval en 2018 aux Pays-Bas et chez un animal à fourrure en 2016 en Pologne.

Les limites de cette étude et les principales sources d'incertitude portent sur l'évolution des techniques d'analyse au cours de la période visée, qui a permis à partir de 2010 un diagnostic de plus en plus fin et l'identification des formes mosaïques C/D et D/C. La sensibilité de la méthode de diagnostic au sens large, incluant les modalités de prélèvement et de transport jusqu'au laboratoire s'est aussi considérablement améliorée dans le temps et permet aujourd'hui une meilleure confirmation des cas. Il est par ailleurs probable qu'une part non négligeable de cas cliniques ne fassent pas l'objet d'un diagnostic de confirmation au laboratoire et de ce fait ne puissent être recensés. L'importance de cette sous-déclaration est difficile à évaluer et varie vraisemblablement selon les catégories d'espèces.

## 6 *Clostridium botulinum* et denrées alimentaires d'origine animale

Le botulisme humain est une maladie à déclaration obligatoire ; il s'agit d'une maladie rare mais extrêmement grave. Les aliments les plus souvent incriminés lors de foyers de botulisme sont des aliments peu acides, mal préservés et/ou mal conservés, d'origine animale (souvent porcins et poissons) ou végétale. Comme indiqué précédemment, *C. botulinum* est un micro-organisme tellurique. Il est également présent dans le tube digestif d'animaux de production ou de poissons. La principale porte d'entrée pour contaminer ces animaux est digestive (voir cycle épidémiologique), entraînant un portage intestinal, asymptomatique le plus souvent. Les deux sources principales de contamination des denrées alimentaires d'origine animale (DAOA) sont donc connues : le tube digestif des animaux vivants et l'environnement de production ou de transformation. En première approximation, les contaminations par contact avec les surfaces dans les locaux de productions (stalles d'élevage, salles de traite, couvoirs) ne peuvent être exclues, comme dans les abattoirs où, néanmoins, les contaminations à partir du contenu du tube digestif semblent plus importantes que celles environnementales.

À l'abattoir les contaminations sont :

- *Ante-mortem* : elles peuvent se traduire par une contamination profonde des muscles, favorisée soit par la digestion (les bonnes pratiques d'abattage imposent de ne pas nourrir les animaux, voire demandent une mise à jeun avant le départ (pour les porcins)), soit par l'effet du stress subi au cours du transport, du déchargement, de combats sociaux lors d'une attente de durée variable.
- *Agonique* : les bactériémies digestives agoniques correspondent au passage de micro-organismes à travers les barrières intestinales « fragilisées » (stress d'abattage) vers les muscles proches ou le torrent circulatoire, si cela intervient avant la saignée. Il s'agira de contaminations en profondeur des muscles.
- *Post-mortem* : Les contaminations *post-mortem* sont des contaminations de surface généralement (environnement, personnel, matériel, cuir, plumes, aérocontamination...).

### 6.1 Données de prévalence dans les denrées alimentaires d'origine animale (Types C, D, mosaïque C/D, D/C et E)

#### 6.1.1 Méthodes mises en œuvre pour déterminer la prévalence de *Clostridium botulinum* dans des échantillons alimentaires

*C. botulinum* est recherché depuis plusieurs décennies (de nombreux articles déjà dans les années 1960) dans des échantillons alimentaires, cliniques ou environnementaux et sa présence a été mise en évidence par des techniques variées évoluant au gré des progrès apportés dans les méthodes de détection des bactéries pathogènes. Ces techniques incluent notamment (i) la détection dans le bouillon d'enrichissement d'un échantillon de la toxine botulique par un test sur souris, qui reste la méthode de référence, et la détermination du type de toxine par séroneutralisation, ou (ii) la détection par méthodes moléculaires d'isolats bactériens possédant des gènes codant les neurotoxines botuliques ou la détection de leur présence dans un bouillon d'enrichissement bactérien. L'échantillon est incubé en anaérobiose et souvent traité par la chaleur préalablement à l'enrichissement afin d'éliminer les cellules végétatives de flores compétitrices (Lindström et Korkeala 2006, Lund et Peck 2013).

#### 6.1.2 Viandes et produits carnés

La bibliographie concernant la présence ou la quantification de *C. botulinum* de type C, D et mosaïque C/D, D/C dans les DAOA est très peu abondante. La contribution de Greenberg *et al.* (1966) semble être une référence en la matière car il s'agit d'une étude d'envergure sur une période d'une année en Amérique du Nord, portant sur la recherche de spores de bactéries putréfiantes (*Putrefiant Anaerobic* : PA) dans un grand nombre d'échantillons de viandes. Au total, plus de 19 000 isolats de PA ont été traités pour présomption de *C. botulinum*, des subcultures ont été effectuées sur « *peptone colloid broth* » et incubées 72h à 37°C (Greenberg *et al.* 1966). À l'issue de cette incubation, seules les colonies suspectes ont été testées sur souris pour présence éventuelle de toxine botulique. Un seul isolat, issu d'un prélèvement de cuisse de poulet (période hivernale) a agi sur les souris et a été identifié comme une souche de type C. Les auteurs ont estimé en conséquence que, dans les viandes

fraîches de boucherie et de volailles, le ratio Spores de PA / *C. botulinum* est de 20 000 :1. Abrahamsson et Riemann (1971) font référence à ce travail dans leur étude sur 372 produits carnés semi-préservés (jambon cuit, dinde fumée, pastrami, salami, *corned beef*, bologna (saucisson cuit), etc). Dans cette étude 5 échantillons sur 100 de jambon cuit (on présume qu'il s'agit de porc) présentent de la toxine botulique (sur souris), révélant deux isolats de *C. botulinum* de type A. Un échantillon sur 41 de dinde fumée présente de la toxine botulique, une souche de *C. botulinum* de type B est isolée. Les auteurs indiquent que les prévalences obtenues sont du même ordre que celles présentées dans un autre travail, sur des produits similaires (Insalata *et al.* 1969) mais plus élevées que celle de Greenberg *et al.* (1966) sur les viandes fraîches. La discordance peut s'expliquer par la différence de méthode de recherche et/ou par la masse de l'échantillon analysée (prise d'essai), supérieure à celle de Greenberg *et al.* (1966) dans leur cas. La synthèse des données publiées par Dodds (1993), poursuit la description de rares travaux, détectant majoritairement des prévalences faibles de spores de *C. botulinum* dans des échantillons de viande. Une étude de 1977 sur de la viande de porc crue tranche avec cette perspective (Roberts et Smart 1977). Dans cette étude la prévalence apparente atteint les 14% (échantillons de 30g) et le typage réalisé met en évidence la production de toxine de type C dans environ la moitié d'entre eux (6 % des échantillons). Le travail de revue de Dodds confirme et documente que la prise d'essai conditionne la prévalence mesurée. En effet, dans une étude au Royaume Uni analysant du bacon emballé sous vide (Roberts et Smart 1976), le passage d'échantillons de 25g (prise d'essai courante 25-30g) à des échantillons de 175g, entraîne une augmentation de la prévalence apparente qui passe de 4 à 73%. En comparaison et sur un même produit, la prévalence apparente au Canada apparaît plus faible. Ceci, associé à quelques mentions d'études n'ayant pas mis en évidence de spores de l'agent pathogène (par ex Thatcher *et al.* 1967, cité par Dodds (1993), dans 436 échantillons de viande transformée hachée commercialisée au Canada) fait dire à Dodds (1993) que l'incidence de spores de *C. botulinum* est rare, mais serait plus élevée en Europe qu'en Amérique du nord.

Dans l'ensemble des données publiées jusqu'en 1993, la mention du type C a donc concerné la volaille et le porc, cette détection apparaissant sporadiques comparativement à celle des types A et B, dans un corpus de références où les études sont rares et décrivent des prévalences faibles. Ces travaux qui datent du siècle dernier ont été complétés par une revue de la littérature de Rasetti-Escargueil, Lemichez, et Popoff (2019) qui cible les cas humains liés aux sérotypes C/D et mosaïques. Sans surprise on ne peut évoquer de prévalence, en l'absence d'analyses dédiées, cependant cette revue rapporte quelques cas documentés d'association entre un botulisme clinique humain et la consommation de viande contaminée : pâté de porc faits maison (dans les années 1955 en France et 1960 en Rhodésie), volaille fumée en 1972 et poulet en 2006 pour le type C, et une mention pour le type D dans du jambon salé au Tchad en 1958.

Sur la base de données de prévalence, une démarche de type NPP (Nombre le plus probable) permet d'approcher le nombre de spores présentes dans un aliment donnant un résultat positif pour les différentes études, et l'ordre de grandeur est au maximum de la dizaine d'unité par kg de viande.

### 6.1.3 Œufs et ovoproduits

Les études de prévalence sur les œufs et ovoproduits distribués semblent inexistantes. Indirectement les travaux réalisés dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques sur la production dans un élevage de poules pondeuses à l'occasion du suivi d'un foyer clinique peuvent être considérés. Dans ce contexte *a priori* défavorable (Souillard, Le Maréchal, Ballan, Rouxel, *et al.* 2017), les analyses de pool de 30 œufs détectent régulièrement le type C/D par PCR en temps réel après enrichissement (5 pools sur les 10 réalisés à l'occasion des 5 visites successives). Mais quand des pools de 3 œufs sont réalisés (4 pools par visite pour 4 visites) seules deux surfaces sont détectées positives, il s'agit d'œufs macroscopiquement souillés de fientes, prélevés lors de la visite la plus proche de la confirmation du foyer clinique. Les contenus des œufs ne donnent pas de résultats positifs en qPCR. Encore une fois, même si le design de cette étude ne visait pas à établir une prévalence dans les œufs et les ovoproduits, ces données indiquent que même dans un contexte de suivi d'un foyer clinique, les prévalences à l'œuf sont faibles pour les surfaces (de l'ordre de 2%), les contenus n'apparaissent pas contaminés (0 sur 32 pools de 3 œufs). Dans ce contexte, avec ces fréquences de détection, les contaminations sur les surfaces sont estimées à 20 spores par œuf (NPP). Ces conclusions indirectes devraient être confortées par des études de prévalence qui, compte tenu de la présence possible de spores à la surface de l'œuf, incluraient une évaluation de leur devenir dans les ovoproduits.

### 6.1.4 Lait et produits laitiers

Dodds dans sa revue décrit deux études dans le fromage pour indiquer qu'il n'y a pas d'échantillon ayant fourni un résultat positif dans ces études : Taclindo *et al.* (1967) sur des fromages emballés sous vide, et Insalata *et al.* (1969) pour 50 échantillons de cheddar et edam. Une étude de Kauiter *et al.* (1982) (100 échantillons de lait en poudre et 90 de lait entier) confirme la non-détection de la bactérie dans ces échantillons de 25 g ou 25 mL. Dans ce travail l'absence de détection dans ces échantillons de lait permet une extrapolation quantitative à moins de

0,4 spore par kg, ordre de grandeur déjà évoqué par Dodds (1993) : « présence inférieure à une spore par litre de lait ». Une revue de Lindström *et al.* (2010) rapporte 20 foyers documentés de cas humains associés (de façon plus ou moins convaincante et directe) à des produits laitiers, entre 1912 et 2007. Les types incriminés sont A et B, aucun C, D ou mosaïque n'est mentionné dans ce cas.

Une étude allemande (Bohnel et Gessler 2013) rapporte la détection de toxine botulique (type C et/ou D dans le lait d'une ferme et A et/ou B et/ou E dans deux fermes sur les 37 investiguées) et de bactéries (type A et/ou B et/ou E) dans des échantillons de lait de tank issus de fermes dans lesquelles des signes cliniques étaient suspectés ou confirmés. En particulier, le résultat positif dans le lait avec le pool de type C et/ou D, n'a pas été conforté par un typage C et D séparés.

Le Groupe Socle émet toutefois des réserves sur la validité de ces résultats compte tenu des méthodes analytiques utilisées (cf. section botulisme bovin). De plus, ces résultats ne sont pas confortés par une étude de Moeller *et al.* (2009), où 3 vaches auxquelles a été injecté de la toxine de type C n'avaient montré aucune trace de passage de la toxine dans le lait.

### 6.1.5 Poisson (type E)

Pour les poissons également les publications de prévalence de type E sont rares (8 recensées depuis 1990, incluant la revue de Dodds (1993)).

Manifestement l'environnement de production, de pêche et de manipulation des poissons est favorable à une présence plus fréquente de spores de *C. botulinum* de type E dans les produits de la mer que d'autres DAOA comme les viandes. En conséquence les prévalences les plus faibles sont retrouvées sur des produits peu manipulés et ou traités par fumaison (les prévalences sont alors de quelques %) quand des produits saumurés et/ou transformés peuvent présenter des prévalences nettement plus élevées (souvent au-delà de 10% parfois jusque 100%).

Dans ce contexte les estimations de quantités de spores fournies par l'approche NPP présentent souvent des valeurs de plusieurs centaines de spores par kg d'échantillon. Le type E est nettement le plus représenté lors des détections en Amérique du Nord, les types A, B et C viennent plus rarement compléter les listes. En Europe comme rapporté par Hauschild en 1989 (cité par Dodds (1993)) le type détecté est systématiquement et exclusivement le type E. Dans cette même revue, les rares études en Indonésie (Suhadi, Thayib, et Sumarsono 1981) et au Japon (Haq et Sakaguchi 1980) retrouvent les types A, B, C, D et F et C et D, respectivement, à l'exclusion du type E dans cette partie du monde. Les derniers rapports compilés par Rasetti-Escargueil *et al.* (2019) pondèrent l'exclusivité du type E en Europe, avec des détections finalement fréquentes de groupes B et A en France (côte atlantique (Fach *et al.* 2002). Par ailleurs, La présence de souches de type E dans l'hémisphère sud n'a été rapportée que dans une seule enquête (Raphael *et al.* 2012).

## 6.2 Croissance et production de la neurotoxine botulique de type C, D ou E par *Clostridium botulinum* dans les denrées alimentaires d'origine animale

Le botulisme alimentaire est une intoxication causée par la multiplication de *Clostridium botulinum* dans les aliments et la synthèse de neurotoxine botulique. Le potentiel de croissance de la bactérie dans les aliments est déterminé soit par une évaluation de la croissance proprement dite, soit par la détection de la neurotoxine. Dans cette section, la « croissance » regroupera indistinctement multiplication et toxinogénèse.

### 6.2.1 Croissance des souches de *Clostridium botulinum* du Groupe III dans les aliments

La croissance de *C. botulinum* du groupe III dans les denrées alimentaires a suscité peu de travaux. Des limites (température, NaCl, pH) de croissance pour les souches du type C ont été établies par quelques-uns d'entre eux. L'absence de croissance à 10°C, la croissance de quelques souches à partir de 12,8°C et la croissance de six souches sur six à 15,6°C ont été relevées (Segner, Schmidt, et Boltz 1971). Aucune croissance n'est relevée pour des concentrations en sel au-delà de 3 % NaCl, pour des valeurs de pH inférieures ou égales à 4,9. Dans une DAOA (en l'occurrence du haddock) la croissance s'est avérée aussi rapide que celle obtenue dans un milieu de culture au laboratoire. En l'absence de données spécifiques supplémentaires de croissance ou de production de toxine dans les denrées alimentaires, la nature des substrats à l'origine des foyers de botulisme de type C suggère une bonne adaptation dans de nombreuses matrices contenant des denrées d'origine animale. La température, le pH ou l' $a_w$  contrôlant la croissance des souches du groupe I (protéolytiques type A et B)

permettront très vraisemblablement également le contrôle des souches du groupe III (Roberts et Gibson 1979); ces dernières présentant de moindres capacités à se développer à basse température, bas pH ou faible  $a_w$ .

### 6.2.2 Croissance des souches de *Clostridium botulinum* du Groupe II, y compris les souches produisant la neurotoxine de type E

Les souches du groupe II sont dites psychrotrophes en raison de leurs capacités à se multiplier dès 3°C. L'intérêt de la réfrigération des produits alimentaires contenant ces *Clostridium* et de l'application des mesures d'hygiène de rang II (cf section 6.1), s'en trouve plus limitée que si les *Clostridium* présents sont de groupes III et I. Ces souches ont ainsi suscité une attention particulière. Les résultats de plusieurs centaines de tests d'épreuves microbiologiques (Peck *et al.* 2008) ont été publiés et montrent que :

- La croissance et/ou la production de toxines est possible dans les DAOA dont les températures de conservation, le pH et l' $a_w$  sont compatibles avec les exigences des souches du type II.

- La toxine botulique a pu être détectée après seulement quelques jours de conservation dans des aliments stockés à 8°C, et également à des températures de conservation inférieures (après une durée de stockage plus longue).

- Récemment, Peck, Webb, et Goodburn (2020) ont réalisé un test de croissance en inoculant des spores de *C. botulinum* (types B et E) à des viandes de bœuf, agneau et porc, représentatives du marché britannique (maturation courte ou longue) et conservées selon un scénario de chaîne du froid partiellement maîtrisée (3°C/1j, 5°C/1j, 22°C/2h puis 8°C le reste du temps). La toxine botulique n'a été détectée que dans la viande de porc et ce après 35 jours de conservation. Tous les autres essais n'ont pu la mettre en évidence. Il est à noter que toutes les viandes présentaient un état d'insalubrité (odeur, couleur, aspect d'altération) au bout de 35 jours pour le bœuf, 12 à 25 j pour l'agneau et 12 j pour le porc. Les auteurs concluent que, dans tous les cas, la présence de toxine botulique dans une viande d'aspect consommable (*organoleptic shelf-life*) est très improbable.

Par ailleurs, *C. botulinum* est une bactérie anaérobie stricte. Cependant la conservation des aliments dans une atmosphère contenant de l'oxygène ne permet pas, à elle seule, d'inhiber la croissance de la bactérie et la production de la neurotoxine. En effet, de nombreux aliments ont naturellement un potentiel redox bas (Morris 2000). Par exemple, après l'abattage, le potentiel redox Eh est de l'ordre de 0 mV en surface et descend à -250mV en profondeur quelques heures après la mort. L'oxygène dissous peut être consommé par l'oxydation de composés présents dans les matrices alimentaires ou par la croissance du microbiote naturellement présent (Lund 1993, Peck *et al.* 2008).

Parmi les conservateurs, le nitrite sous forme de sel est un inhibiteur de croissance de *C. botulinum*, très utilisé en charcuterie pour maîtriser des souches du groupe I, le principal danger dans ce type de produits (Lücke et Roberts 1993). En saurisserie une concentration minimale de 100 ppm est recommandée, principalement pour maîtriser la croissance des souches du groupe II produisant la neurotoxine de type E (FDA 2020). Ces dernières semblent plus sensibles que les souches du groupe I à l'addition de nitrites dans les milieux de croissance. La question des nitrites a été uniquement abordée sous l'angle de leur effet sur *C. botulinum* (Roberts et Gibson 1979).

Des modèles de prévision de la croissance sont disponibles dans des logiciels accessibles via internet (ComBase, par exemple, [www.combase.cc](http://www.combase.cc)) ou dans la littérature scientifique (Peck *et al.* 2008). L'*Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food* (ACMSF) au Royaume-Uni présente des lignes directrices pour le contrôle de *C. botulinum* non-protéolytique dans les aliments. Elles sont basées sur le maintien des denrées alimentaires à une température inférieure à 3°C, à un pH inférieur à 5,0, à une teneur en sel supérieure à 3,5 % et/ou à une  $a_w$  inférieure à 0,97. Ces lignes directrices considèrent également les effets combinés de traitements thermiques et de facteurs de maîtrise, établissant solidement grâce à des tests d'épreuve microbiologique ou des modèles prévisionnels, l'absence de croissance et de production de neurotoxine botulique (ACMSF 2020).

## 7 Méthodes, procédés d'inactivation des différentes formes de *Clostridium botulinum*

### 7.1 Maîtrise des *C. botulinum* dans les denrées alimentaires d'origine animale

Comme vu dans les chapitres précédents *Clostridium botulinum* pose un problème d'insécurité des aliments d'origine animale rare, mais aux conséquences graves, qu'il convient de maîtriser. Le terme de maîtrise dans ce chapitre n'est pas utilisé dans le sens d'une « sûreté d'exécution » mais plutôt au sens d'un objectif à atteindre, à savoir éviter l'ingestion par le consommateur et par le biais d'un aliment vecteur, d'un nombre (spores, cellules) ou d'une quantité (toxine) de dangers susceptibles d'affecter sa santé. L'atteinte de cet objectif est évidemment du ressort de tous les acteurs de la chaîne de l'alimentation humaine même si certains maillons (comme celui des responsables de la 1<sup>ère</sup> mise sur le marché) ont des stratégies et des organisations plus élaborées que d'autres. Souvent, ces stratégies s'appuient sur le désormais célèbre triptyque de maîtrise des dangers : Réglementation/Éléments organisationnels/Facteurs opérationnels. Les facteurs à caractère opérationnel sur le danger sont ainsi mis en œuvre grâce à une organisation en relation avec l'hygiène de production et, souvent, dans un cadre réglementaire. Concernant les éléments organisationnels, il est aisé de citer, par exemple, les Bonnes Pratiques (agricoles, d'élevage, hygiéniques...), les démarches de biosécurité, HACCP ou Qualité Totale comme illustrations. C'est dans ces cadres que ces facteurs se retrouvent à la base de ce que l'on appelle « des mesures d'hygiène ou mesures de maîtrise<sup>26</sup> ».

Dans la production d'aliments, la maîtrise des dangers biologiques repose sur des mesures d'hygiène :

- De rang I : elles sont d'ordre préventif visant à empêcher ou limiter le transfert des agents de leur source vers leur cible
- De rang II : elles sont à la fois préventives et curatives : visant à empêcher l'amplification du danger (inhiber la croissance, stopper la toxinogénèse...)
- De rang III : elles sont curatives et vont inactiver ou éliminer le danger totalement ou suffisamment. Il s'agit de traitements physiques le plus souvent, chimiques, voire biologiques, des produits.

Ces mesures pourront être utilisées seules ou en combinaison dans des approches de type « technologies de barrières ». Les mesures d'hygiène de rang III ont donc une action sur le danger mais, souvent, également sur le produit et, ce, d'une manière non souhaitée par les producteurs (dégradation des qualités organoleptiques ou nutritionnelles notamment). Elles ne sont donc pas toujours appliquées. Lorsqu'elles sont utilisées elles conduisent à :

- une **inactivation** des dangers que nous définirons comme la perte irréversible pour le micro-organisme de la capacité à se reproduire (perte de viabilité) ou à germer (spore). Le même terme d'inactivation sera utilisé par la suite pour décrire l'effet des traitements (des mesures) sur la toxine et englobera également ce que l'on appelle la destruction microbienne (rupture des enveloppes, collapsus, « *ghost cells* » ...)
- une **élimination** des dangers grâce par exemple à la force centrifuge ou leur rétention sur une membrane filtrante. Le produit est alors littéralement physiquement « débarrassé » de tout ou partie de ses dangers.

#### 7.1.1 Procédés physiques d'inactivation

Les facteurs physiques à caractère opérationnel mis en jeu ont donc un effet, souvent mesurable et prédictible, sur les dangers. Il s'agira de la chaleur, de rayonnements (ionisant ou lumineux), de la pression, de champs électriques ou magnétiques, ou d'actions physiques exploitant la taille et/ou la masse comme la filtration ou la séparation centrifuge qui feront l'objet d'un développement en 7.1.3. Les procédés sont nombreux. Le caractère prévisible et reproductible de leurs effets sur les dangers est de mieux en mieux connu pour de nombreux procédés plus ou moins innovants, mais c'est avec les traitements thermiques que tout a commencé. C'est vers 1920 que la thermobactériologie est née aux USA et les premiers travaux visaient à inactiver les spores de *C. botulinum* dans divers produits et dans des emballages étanches. Le développement de ces travaux s'est poursuivi et a abouti à la description de deux paramètres d'inactivation qui permettent de caractériser un traitement :  $D_T$  et  $z$ .

<sup>26</sup> Actions et activités auxquelles on peut avoir recours pour prévenir ou éliminer un danger qui menace la sécurité des aliments ou pour le ramener à un niveau acceptable.

### 7.1.1.1 Traitement thermique

#### 7.1.1.1.1 Paramètres d'inactivation -

##### **Paramètre D**

La diminution en fonction du temps d'une population de micro-organismes soumise à une température létale T peut être décrite par le paramètre  $D_T$  appelé temps de réduction décimale. Il est défini comme la durée de traitement thermique, exprimée généralement en minutes, nécessaire à la température T pour diviser par dix la charge microbienne. Il est à noter que les traitements de D minutes sont cumulatifs. Pour les spores de *C. botulinum* protéolytiques, la valeur utilisée comme standard dans l'industrie alimentaire est  $D_{121,1} = 0,21$  min (Kim et Foegeding 1993).

$D_T$  varie en fonction de la température car lorsque la température de traitement augmente, la destruction des micro-organismes est plus rapide ;  $D_T$  est donc plus faible. Le paramètre qui relie  $D_T$  à la température est appelé z.

##### **Paramètre z - Influence de la température sur les cinétiques de destruction**

Le paramètre z est utilisé pour exprimer l'écart de température (en degrés Celsius (°C)) pour lequel les temps de réductions décimales ( $D_T$ ) sont dans un rapport de 1 à 10. Dans la pratique, cela signifie que lorsque la température est augmentée de z°C, le temps nécessaire pour obtenir le même résultat en termes de destruction bactérienne est divisé par 10. Lorsque la température est réduite de z°C, le temps nécessaire pour obtenir le même résultat en termes de destruction bactérienne est multiplié par 10. Les formes sporulées ont, en général, un z compris entre 7 et 14°C et les formes végétatives un z compris entre 4 et 7°C. Le milieu dans lequel les micro-organismes sont étudiés peut modifier la valeur de z.

Sur la base des différentes valeurs de D et z reportées dans la littérature, des équivalences de barèmes thermiques sont proposées pour les *C. botulinum* non protéolytiques, notamment par l'*Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food* (comité consultatif sur la sécurité microbiologique des aliments) au Royaume-Uni (ACMSF 2020).

#### 7.1.1.1.2 Mode d'action des traitements thermiques

Sur les cellules végétatives, la chaleur humide a un mode d'action dit multi-cibles. Ainsi, elle va dénaturer, de manière croissante avec la température, les membranes et les biomolécules. Les membranes sont souvent la première cible quel que soit le type de transfert (par convection ou conduction). La chaleur sèche est moins efficace et plus lente sur les cellules végétatives. Son action semble cibler les acides nucléiques des spores, alors que le mode d'action de la chaleur humide sur ces dernières n'est pas totalement connu. Il est toutefois décrit une dénaturation de protéines clés du métabolisme et des collapsus mécaniques des enveloppes. Ce mode d'action a été décrit il y a quelques années et semble la base de la thermobactériologie quel que soit le procédé thermique utilisé, c'est-à-dire quel que soit l'équipement, classique ou innovant, qui opère le transfert de chaleur. En effet, des procédés innovants de traitements thermiques sont apparus au cours des dernières décades. Peuvent être cités : les micro-ondes, les infrarouges, les radio-fréquences, le Tube à Passage de Courant, le chauffage ohmique. L'innovation est dans la façon dont la chaleur est transmise mais le mode d'action reste le même, et l'effet est toujours régi par la même loi fondamentale de thermobactériologie ayant conduit à l'existence des paramètres  $D_T$  et z vus ci-avant. Ces connaissances ont permis le développement d'un grand nombre de filières de production qui trouvaient là un moyen d'assainissement et de prolongation de la durée de vie de leurs produits, ouvrant de nouveaux marchés pour ces derniers. Les procédés sont passés dans le langage courant : appertisation, pasteurisation, upérisation, cuissons, Plats Cuisinés à l'Avance (PCA).

#### 7.1.1.1.3 Résistance des spores de *C. botulinum*, en particulier de type C, D et E à la chaleur en milieu humide.

La résistance à la chaleur en milieu humide des spores de *C. botulinum* est très bien documentée, et ce depuis le début du XX<sup>ème</sup> siècle pour les spores des souches du groupe I (*C. botulinum* protéolytique, types A, B et F). Des méta-analyses récentes donnent une vision synthétique des paramètres D et z. Ainsi,  $D_{121^\circ\text{C}}$  est estimé, à partir de 394 données, à 0,19 min pour les spores des *Clostridium botulinum* protéolytiques, avec une valeur de z de 11,3°C (Diao, Andre, et Membre 2014). Pour les spores de *C. botulinum* non protéolytiques (n = 549), les estimations de  $D_{80^\circ\text{C}}$  pour les types non protéolytiques B, E et F sont comprises entre 1 min et 1,5 min avec des valeurs de z comprises entre 6,5°C et 6,9°C (Wachnicka *et al.* 2016). Une particularité des *C. botulinum* non-

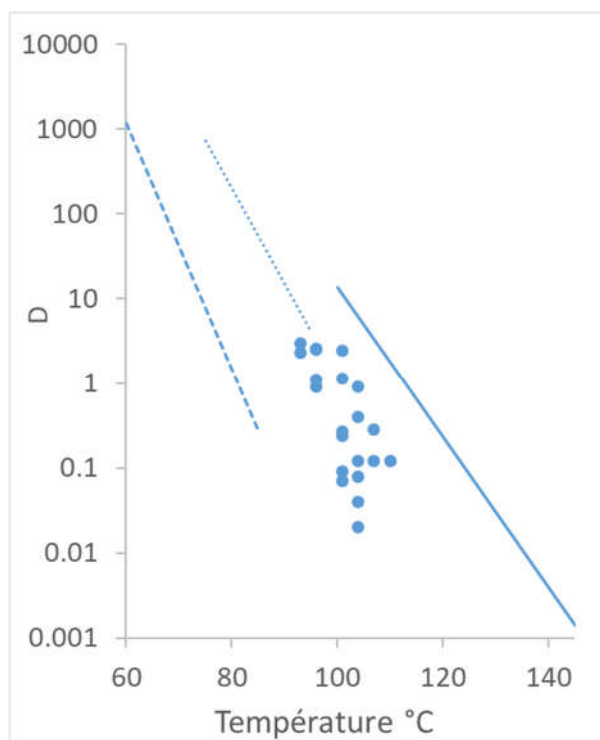
protéolytiques est l'existence, dans une population, de fractions de populations (sous-populations) plus résistantes à la chaleur. Ces dernières sont révélées par l'ajout de lysozyme qui favorise la germination et la reprise de croissance des spores préalablement soumises à un traitement thermique. Les valeurs de  $D_{80^\circ\text{C}}$  de ces fractions de populations résistantes sont nettement plus élevées (estimées autour de 100 min) et leur valeur de  $z$  est estimée à  $9^\circ\text{C}$  (Wachnicka *et al.* 2016). Le lysozyme est naturellement présent dans de nombreux aliments, dans le blanc d'œuf à des concentrations très élevées, mais également dans d'autres DAOA. Le lysozyme est également résistant à la chaleur et pourrait persister, après une pasteurisation par exemple (Lund et Notermans 1993).

Les seules valeurs disponibles pour les spores des souches du Groupe III ont été publiées par Segner Segner et Schmidt (1971) (Tableau 13). Les paramètres de résistance des 4 souches testées, repris par l'ICMSF (1996), suggèrent une résistance bien supérieure à celle des spores des *C. botulinum* non protéolytiques, mais également très inférieure à celle des spores protéolytiques (Figure 27).

#### 7.1.1.1.4 Inactivation par la chaleur de *C. botulinum* dans les DAOA

- Les spores des souches du groupe I sont les plus résistantes à la chaleur humide. En d'autres termes, leur maîtrise par un procédé thermique (par exemple appertisation avec  $F_0 = 3 \text{ min}^{27}$ ) permet la maîtrise des spores des souches des autres groupes, en particulier des souches de type C appartenant au groupe III.

- Les lignes directrices les plus abouties qui considèrent l'inactivation des spores de *C. botulinum* du type II sont relatives aux produits alimentaires sous-vide ou emballés sous atmosphère modifiée et conservés à basse température, y compris les viandes fraîches (« *Vacuum-packed and Modified atmosphere packed chilled foods, including fresh meat, held at temperatures from 3 to 8°C* ») et proposées par l'*Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food* (ACMSF 2020). Un traitement thermique de  $90^\circ\text{C}$  pendant 10 min, ou des traitements équivalents présentés dans le document, permet une inactivation d'au moins six réductions décimales, propre à assurer une durée de vie prolongée de ces aliments à basse température.



**Figure 27 : Représentation schématique des relations entre la température appliquée et les valeurs du temps de réduction décimale D (min) pour les spores de *C. botulinum***

Spores de *C. botulinum* de type I (protéolytiques) (trait plein) (Diao, Andre, et Membre 2014), de type II (non protéolytiques) (tirets) (Wachnicka *et al.* 2016), des fractions de populations de spores du type II résistantes à la chaleur en présence de lysozyme (pointillés) (Wachnicka *et al.* 2016), et du type III, avec représentation des données individuelles (points) issues de Segner et Schmidt (1971)

<sup>27</sup> le terme "F0" est défini comme le nombre de minutes équivalentes de stérilisation à la vapeur à  $250^\circ\text{F}$  ( $121,1^\circ\text{C}$ ) délivré à une charge...



## Toxines botuliques

Il est important de noter que les toxines botuliques sont plus facilement inactivées par la chaleur que les spores. Cependant, les données sur leur inactivation apparaissent très diverses dans la littérature scientifique selon les conditions expérimentales, le pH et la composition du milieu utilisé, entre autres. De plus, l'inactivation n'intervient pas de manière linéaire, ce qui ne permet pas les intercomparaisons (Popoff 2017). Pour Siegel (1993) la valeur  $D_{76,7}$  pour la concentration des toxines botuliques A et B (chaleur humide) varie de 1 à 8 min selon le pH et la composition de l'aliment. La pasteurisation (72°C, 15 sec) permet d'inactiver 99,9% des toxines A et B dans le lait (Siegel 1993, Weingart *et al.* 2010) 2010).

La toxine de type E est plus thermosensible que celles de type A et B, avec un temps d'inactivation de la toxine de 5 min relevé dès 58°C et de 10 min à 62°C, respectivement, en tampon phosphate à pH 7,2. Elle est plus stable à pH acide. Dans une matrice alimentaire (préparation à base de saumon), 5 min à 79°C ou 10 min à 74°C sont nécessaires pour obtenir une inactivation (Popoff 2017).

Roberts et Gibson (1979) soulignent dans leur revue que la résistance thermique des toxines botuliques C et D est supérieure à celle des toxines A, B et E. Si pour ces dernières un traitement de 2 min à 70°C suffit pour inactiver ces toxines, il faut atteindre 90°C pour obtenir le même résultat en 2 min sur les toxines C et D.

Les températures et durées de traitement mises en œuvre dans ces essais évaluant l'inactivation par la chaleur des toxines botuliques sont bien supérieures à celles déclenchant la sensation de brûlure chez l'être humain (50-60°C). Ainsi le simple réchauffage d'un aliment est insuffisant pour inactiver les toxines botuliques.

### 7.1.1.2 Autres procédés physiques d'inactivation

Comme indiqué plus haut, d'autres facteurs physiques peuvent être utilisés comme facteurs opérationnels, tels l'énergie de rayonnement (ionisants ou lumineux), la pression et un champ électrique ou magnétique.

#### 7.1.1.2.1 *L'ionisation*

L'ionisation des aliments consiste en l'exposition des aliments à l'action de rayonnements ionisants, c'est-à-dire à une énergie suffisante pour arracher un électron d'une structure atomique ou moléculaire, en vue d'améliorer leurs qualités hygiéniques. À l'image des traitements thermiques il s'agit d'un traitement « dans la masse » du produit. Les rayonnements ionisants les plus utilisés en radioconservation sont de nature électromagnétique (rayonnement gamma principalement, issu de la désintégration d'une source radioactive) ou corpusculaire (rayonnement bêta principalement, correspondant à un faisceau d'électrons accélérés). Les rayonnements vont créer dans la matière exposée, selon la dose, des produits de radiolyse (radicaux libres) qui vont exercer l'essentiel des effets létaux sur les micro-organismes. L'unité pour exprimer le traitement en Système International (S.I) est le Gray (Gy). Sa description mathématique est connue, depuis longtemps, et un paramètre équivalent au temps de réduction décimale (valeur D) a été décrit, à savoir la Dose de Réduction Décimale (DRD ou  $D_{10}$ ). Il s'agit de la dose (exprimée en kGy) qui permet d'inactiver 90% de la population exposée. La valeur DRD pour un micro-organisme permet de le repositionner facilement par rapport à certaines « références » (ICMSF 1996, Kim et Foegeding 1993). Parmi ces dernières on trouve *Salmonella* (DRD 0.33 à 0.5 kGy dans l'œuf entier liquide). Les valeurs de DRD des spores des types C ou D, dans de l'eau ou une matrice carnée, sont généralement comprises entre 1 et 3 kGy et sont très similaires aux valeurs de DRD des spores du groupe I. Les valeurs de DRD des spores produisant des neurotoxines de type E dans divers tampons de laboratoire ou dans des aliments, y compris des produits carnés ou des produits de la mer, sont inférieures (entre 1 et 2 kGy), mais la différence est considérée comme marginale (Roberts et Gibson 1979, Kim et Foegeding 1993, ICMSF 1996). La résistance aux rayonnements ionisants augmente avec l'abaissement de la température. Ainsi les valeurs de DRD ont tendance à augmenter de 0,1 kGy pour un abaissement de température de 10°C pour des traitements effectués entre +50°C et -200°C (Kim et Foegeding 1993). En ce qui concerne les formes végétatives de *C. botulinum*, peu d'informations sont disponibles mais il est raisonnable de penser que la valeur DRD est du même ordre que pour des bactéries ne formant pas de spores. Les mycotoxines et toxines bactériennes sont considérées comme radiorésistantes, leur inactivation par les seuls rayonnements ionisants nécessite la mise en œuvre de très fortes doses, incompatibles avec le maintien des qualités organoleptiques du produit. En particulier les valeurs de DRD des neurotoxines botuliques, évaluées entre 16 à 70 kGy (Siegel 1993, Gominet 2001), sont ainsi très supérieures aux valeurs de DRD des spores. Les aliments protègent très nettement les neurotoxines botuliques de la dégradation par les rayonnements ionisants (Siegel 1993). L'utilisation des traitements usuels d'aliments par des rayonnements ionisants comme facteur de maîtrise des cellules végétatives et des spores de *C. botulinum* (tous types) est concevable. Cela n'est pas le cas pour la toxine.

L'ionisation est utilisée pour l'alimentation animale ou l'alimentation humaine. Dans ce dernier cas, il s'agit d'un procédé soumis à autorisation après évaluation d'un dossier présentant l'avantage technologique et l'innocuité

du traitement. Chaque état dispose d'une liste de produits autorisés au traitement avec la dose autorisée. Par exemple, les États-Unis autorisent le traitement de la viande pour déparasiter (0,1 kGy) ou lutter contre *E. coli* O157:H7 (1,5 kGy) (Radomyski *et al.* 1994), le Mexique et la France permettent le traitement de cuisses de grenouilles avec 8 et 7 kGy, respectivement. Toujours en France, d'anciennes autorisations existent pour :

- certains composants du lait (caséines et caséinates (6 kGy) ou le lait cru (doses comprises entre 2,25 et 3,5 kGy).
- les viandes de volailles séparées mécaniquement (VVSM) et les viandes de volailles hachées, broyées, morcelées avec 5 kGy maximum
- le blanc d'œuf, liquide déshydraté, congelé (<4kGy)
- le colostrum bovin pour l'alimentation des veaux (<10 kGy)

Il s'agit bien d'autorisations, et donc d'applications potentielles, et non du reflet de l'activité en France, aujourd'hui.

#### 7.1.1.2.2 Les plasmas froids

Les plasmas constituent le 4ème « état » de la matière, présents dans la nature (aurores boréales) ils peuvent être créés artificiellement par application d'une énergie suffisante dans un gaz. Le passage de l'état gazeux (l'hélium et l'azote sont les plus utilisés) à l'état plasma (par voie électrique le plus souvent) s'accompagne de l'émission d'électrons, de radicaux libres, d'énergie UV... constituant un milieu énergétique très réactif. Le retour, spontané, à un état plus stable de moindre énergie se fera par émission de photon (UV notamment) et par transmission d'énergie à la surface exposée, à l'origine des effets délétères sur les micro-organismes (spores comprises) approchant celui des rayonnements ionisants (Desmonts *et al.* 2001, Tseng *et al.* 2012, Misra et Jo 2017). L'action anti-microbienne des plasmas est due à (i) l'action de gravure qui attaque la paroi des micro-organismes sous forme végétative et les spores et (ii) l'action des UV sur la paroi et l'ADN.

#### 7.1.1.2.3 Les Hautes Pressions Hydrostatiques (HPH)

##### Principe et mode d'action

Le principe de cette technologie est de soumettre des denrées alimentaires à de fortes pressions à l'intérieur d'une enceinte close, dans le but d'assainir et/ou de transformer ces produits. Il s'agit d'un traitement discontinu dans la masse du produit (cf. figure 28). L'unité S.I pour exprimer le traitement est le Pascal (Pa). Le domaine de pressions utilisées dans les industries agro-alimentaires s'étend généralement de 100 à 1000 MPa (1 000 à 10 000 fois la pression atmosphérique). Les traitements sont appliqués pour une large gamme de température (-20 à 100°C), ainsi que de durée. Généralement, ils durent de 5 à 30 min à température ambiante ou au froid positif. Il est à noter que l'on peut combiner hautes pressions et hautes températures. Le fluide qui est utilisé pour transmettre cette pression est l'eau, on parle alors de pression hydrostatique, à ne pas confondre avec le procédé d'homogénéisation du lait, procédé dynamique et continu, dans lesquels les pressions atteintes sont très inférieures, sauf dans le cas de l'homogénéisation sous ultra haute pression (UHPH *Ultra High Pressure Homogenization*, voir ci-dessous)

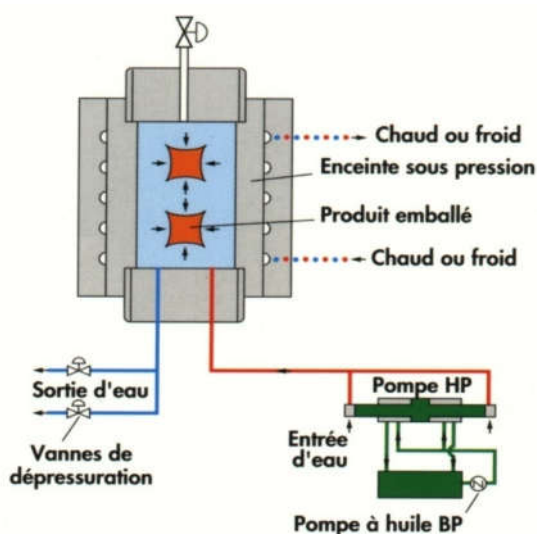


Figure 28 : Coupe transversale d'une enceinte de compression indirecte.

En orange produit emballé à traiter, en bleu ciel liquide de compression, en gris l'acier

L'inactivation des cellules végétatives par les HPH a fait l'objet de plusieurs revues bibliographiques et ouvrages divers (Lerasle *et al.* 2012, Guillou *et al.* 2017). L'inactivation augmente évidemment avec la pression, mais également avec l'augmentation de température. À ce titre, les traitements HP/HT (Hautes pressions/Hautes températures) semblent être une voie d'avenir pour le développement de ce procédé. Des synergies avec les pH acides (ou basiques) ont également été décrites. Sauf exceptions, il semble que les bactéries à Gram – soient plus barosensibles que les bactéries à Gram +. En l'absence de données sur les cellules végétatives de *C. botulinum*, on peut souligner que des traitements supérieurs à 400/450 MPa sont efficaces contre *L. monocytogenes* (Lerasle *et al.* 2012). L'inactivation de spores par les hautes pressions est grandement favorisée par un traitement thermique combiné (Rivalain, Roquain, et Demazeau 2010). Plusieurs réductions décimales de spores de type E sont obtenues en quelques minutes par diverses combinaisons de traitements HPH supérieurs à 600 MPa et de traitement thermique à température comprise entre 30°C et 100°C. Cependant, la possible stérilisation de produits alimentaires par ce procédé n'est pas formellement établie et des produits traités par HPH ou HPHT doivent être maintenus à basse température pour prévenir le développement des micro-organismes survivants.

Il a été montré que le cortex (une des enveloppes de la spore), responsable du maintien de la faible teneur en eau dans le cœur de la spore, était la principale cause de la résistance des spores à la pression (Black *et al.* 2007). De plus, sa composition (protéines, acide dipicolonique...) participe à sa protection vis-à-vis des agents extérieurs, la solvatation et des réactions d'ionisation excessives (Federighi *et al.* 1995, Tonello 2001). Cette résistance est toutefois très variable, tout comme pour les bactéries sous forme végétative, elle dépend des *C. botulinum* envisagés. Pour exemple, Margosch *et al.* (2004) ont montré que la souche *C. botulinum* TMW 2.357 (protéolytique type B) était plus résistante que les autres souches de *C. botulinum* et que les souches de *Bacillus spp.* Il avait également été montré précédemment que *Clostridium* était plus résistante à la pression que *Bacillus* (Patterson 2014). De plus, les souches protéolytiques semblent plus résistantes que les souches non protéolytiques (Margosch *et al.* 2004, Reddy *et al.* 2003).

Toutefois, une pression modérée (50-300 MPa) entraîne la germination des spores. Plusieurs auteurs ont ainsi montré que l'inactivation des spores par hautes pressions pouvait se faire en deux étapes : la première à basse ou faible pression (50 à 300 MPa) ayant pour but d'induire la germination et la seconde à plus haute pression (>400 MPa) afin d'inactiver la forme végétative issue de la germination (Clouston et Wills 1969, Gould et Sale 1970, Ludwig *et al.* 1992, Kalchayanand *et al.* 2004, Kohler *et al.* 2018, Sarker *et al.* 2015). À notre connaissance, à ce jour, cette stratégie d'inactivation n'a pas donné lieu à un dossier de demande d'autorisation de traitement d'un produit.

Les hautes pressions hydrostatiques sont connues pour exercer une action sur les protéines dès la structure secondaire (Rivalain, Roquain, et Demazeau 2010). Cette capacité permet d'inactiver certaines enzymes d'altération dans les jus de fruits traités par exemple. Même si la nature protéique de la toxine botulique et les phénomènes de dégradation des protéines par les HPH laissent supposer qu'un tel traitement inactiverait les toxines botuliques, cela n'a pas été mis en évidence à ce jour.

Plusieurs applications existent concernant les DAOA dans différents pays ayant développé la technologie. En France, on peut citer le traitement de magrets de canards ou le décorticage des crustacés. Les traitements ayant lieu à froid ou à température ambiante, la revendication concerne l'élimination pour tout ou partie des bactéries pathogènes sous forme végétative (Lerasle *et al.* 2012).

### **Cas de l'homogénéisation sous ultra pression**

Les aliments pompables comme le lait peuvent être homogénéisés par passage sous hautes pressions dans un entrefer de petite dimension. Certains équipements récents mettent en œuvre des pressions allant jusqu'à 450 MPa. Dans l'entrefer, par conversion de l'énergie cinétique en chaleur, la température peut atteindre 120-155°C pendant un temps très court (Reineke et Mathys 2020). Plusieurs effets s'exercent alors sur les micro-organismes (dont les spores), sans exclure un probable phénomène de cavitation. Des réductions de 2 à 6 logs de spores de *Clostridium*, *Geobacillus* et *Bacillus* sont annoncées (Sevenich et Mathys 2018) provenant majoritairement de la chaleur, sans exclure la possibilité d'une synergie d'effets (Georget *et al.* 2014).

#### **7.1.1.2.4 Les champs lumineux pulsés – Les ultra-violets**

Le traitement par lumière pulsée est un procédé athermique innovant de préservation des aliments qui utilise la technologie de la puissance pulsée pour inactiver les micro-organismes en les soumettant aux flashes intenses de lumière blanche de large spectre pendant des temps très courts ( $10^{-6}$  à  $10^{-1}$  seconde). Ce système de traitement comporte un condensateur qui stocke l'énergie pendant une période relativement longue (de l'ordre de 0,2 seconde) et qui se décharge sur une ou plusieurs lampes à xénon. La lampe émet des impulsions lumineuses qui sont focalisées sur la surface de traitement pendant un temps très court de quelques centaines de micro-secondes. Selon les équipements, des réflecteurs permettent à la lumière d'atteindre toutes les surfaces du

produit. Il s'agit d'un traitement de surface des produits, à l'inverse des deux traitements précédents. Chaque flash délivre une énergie de quelques joules par cm<sup>2</sup>. L'énergie par flash et le nombre de flash déterminent l'effet antimicrobien du traitement. Dans le procédé Pure Bright™, la lampe émet des impulsions de lumière de longueurs d'onde comprises entre l'ultraviolet et le proche infrarouge : 21 % d'UltraViolets (UV de 180 à 380 nm, dont 8 à 10 % d'UV-C, bactéricide), 30 % de la lumière visible (380 à 700 nm) et 49 % d'infrarouges (700 à 1100 nm). Les spores sont de 10 à 50 fois plus résistantes aux rayonnements UV ou à la lumière pulsée que les cellules végétatives (Setlow 2006, Levy *et al.* 2012). Des valeurs de réduction décimale de 60 J/m<sup>2</sup> sont annoncées pour les cellules végétatives de *B. anthracis* alors que leurs spores demandent 810 J/m<sup>2</sup> (Reineke et Mathys 2020). La résistance supérieure des spores bactériennes, l'effet « *shadow* »<sup>28</sup> lié à la nature du procédé ainsi que son caractère de traitement de surface n'augurent pas d'un fort développement pour la préservation de la viande ou du lait, dans un objectif de maîtrise de *C. botulinum*. Il est à noter néanmoins que ce procédé peut être utilisé pour le traitement des œufs en coquilles (Levy *et al.* 2009).

Le procédé de traitement par illumination UV continu est connu depuis plus longtemps mais son utilisation est limitée dans les aliments du fait des réactions d'oxydation (notamment des lipides) qui entraînent des changements organoleptiques des produits qui en contiennent, alors que le système lumière pulsée, limite efficacement ces réactions d'oxydation. Les applications potentielles concernent également l'eau (par illumination continue ou flash) et les surfaces au contact des denrées. On peut penser dans certains cas à des applications à l'eau d'abreuvement des animaux et les matériels utilisés à l'abattoir.

<sup>28</sup> se dit pour les micro-organismes qui du fait de la topographie de la surface n'ont pas été exposés à l'énergie lumineuse

Tableau 13 : Impact des traitements d'inactivation applicables aux DAOA sur *C. botulinum*

Procédé	Groupe type /	Forme	Matrice	Conditions	Impact	Référence
Traitement thermique	I/A,B,F	Spore	Tampon	D <sub>121,1°C</sub> = 0,21 min - z = 10°C 3 min, 12D		Kim et Foegeding (1993)
	I/A,B,F	Spore	Divers (méta-analyse)	D <sub>121,1°C</sub> = 0,19 min - z = 11,3°C		Diao, Andre, et Membre (2014)
	I/A,B	Toxine		D <sub>76,7°C</sub> = 1 à 8 min		Siegel (1993)
	I/A,B	Spore	Lait	D <sub>125°C</sub> = 0,03 min D <sub>135°C</sub> = 0,003 min		Lindström <i>et al.</i> (2010)
	I/A,B	Toxine	Lait	72°C/15 sec (pasteurisation haute)	99,5 à 99,9% d'inactivation	Siegel (1993)
	II/B,E,F	Spore	Divers milieux et matrices alimentaires	D <sub>80°C</sub> = 1 -1,5 min z = 6,7°C		Wachnicka <i>et al.</i> (2016)
	II/B,E,F	Spore	Divers milieux et matrices alimentaires + lysozyme	D <sub>80°C</sub> = 100 – 257 min z = 9°C		Wachnicka <i>et al.</i> (2016)
	III/C	Spore	Tampon phosphate	D <sub>104°C</sub> = 0.1 à 0.9 min z = 5,7°C		Segner et Schmidt (1971)
	III/C	Toxine	Non précisée	70°C/ 2 min 80°C/ 2 min 90°C/ 2 min	90% d'inactivation 99% inactivation Inactivation totale	Prévo et Brygoo (1953) cité par Roberts et Gibson (1979)
	III/D	Toxine	Non précisée	90°C/2 min	Inactivation totale	
Ionisation	A,B	Spore	Tampon phosphate	DRD : 3,3 kGy		Desmonts <i>et al.</i> (2001)
		Toxines		DRD = 40-60 kGy		
	E	Spore	Boeuf	DRD = 1,4 KGy		
		Toxines		DRD = 17-21 kGy		
C	Spore	Eau	DRD = 2,1 KGy			
Hautes pressions hydrostratigiques	B	Spore	Tampon phosphate	827 MPa, 30 min, 75°C	6 réductions décimales	Reddy <i>et al.</i> (2006)
	II/B	spore	Tampon phosphate	827 MPa, 5 min, 50°C	5,5 réductions décimales	Reddy <i>et al.</i> (2006)
	C. sporogenes	spore	Tampon phosphate	400 MPa, 30 min, 60°C	2 réductions décimales	Rivalain, Roquain, et Demazeau (2010)
		spore	Poulet	680 MPa, 20 min, 80°C	2 réductions décimales	
	Type I	Spore	Tampon ACES	600-750 Mpa, 2-6 min, 105°C	> 3 réductions décimales	Reddy <i>et al.</i> (2013)
	E	Spore	Tampon IPB	750 Mpa, 10 min 30°C 600 Mpa, 10 min 80°C	> 3 réductions décimales	Lenz <i>et al.</i> (2015)
	E	Spore	Sole vapeur, veau braisé	600 MPa, 5 min, 90°C	> 3 réductions décimales	Maier <i>et al.</i> (2018)
Homogénéisation sous ultra pression	C. sporogenes	spore	Lait écrémé	100-300 Mpa 45-84°C	0,7 réduction décimales	Cité par Georget <i>et al.</i> (2014)

## 7.1.2 Procédés chimiques d'inactivation

Nous avons vu préalablement (Cf 7.2.2), le cas des nitrites utilisés comme conservateurs. Il s'agit dans ce cas d'aborder le cas des nitrites et de leurs actions, limitées, d'inactivation, sur *Clostridium botulinum*, entre autres. Il s'agit de conservateurs utilisés principalement dans les produits carnés et en saurisserie à des doses de 100 ppm. Lorsque le pH ultime des viandes est « normal » (5,6) les nitrites deviennent des agents nitrosants, chimiquement réactifs, qui vont interagir avec différentes molécules (glucides, lipides, protéines) exerçant notamment des propriétés anti-microbiennes, comme la séquestration du fer par exemple. Les bonnes pratiques de la salaison impliquent l'utilisation du mélange salant sur des viandes à évolution normale (pH 5,6) et au potentiel redox élevé.

Les spores de *C. botulinum* peuvent être inactivées par les composés chlorés (chlore libre 4,5 ppm (m/v) (pH 6,5), temps de réduction décimale 5-10 min en solution aqueuse), de même que les toxines botuliques généralement plus sensibles aux désinfectants que les spores (Siegel 1993, Popoff 2017, Anses 2020).

## 7.1.3 Procédés physiques d'élimination

### 7.1.3.1 Bactofugation (séparation centrifuge)

La séparation centrifuge est un procédé largement utilisé dans l'industrie laitière avec de multiples usages comme la clarification, l'écémage et la bactofugation qui permet d'obtenir grâce à la force centrifuge la séparation des micro-organismes (spores comprises) du lait, du fait de leur différence de densité. Le lait obtenu après bactofugation est « débarrassé » physiquement de ses micro-organismes (morts ou vivants) pouvant contenir des endotoxines, alors que les laits traités thermiquement vont contenir des micro-organismes « inactivés » et, éventuellement, des endotoxines « peu ou non inactivées ». De fait, les laits obtenus après bactofugation n'ont pas besoin de subir de traitements thermiques à Ultra Haute Température pour être utilisés dans d'autres fabrications. Par contre, le bactofugat, très enrichi en micro-organismes, doit subir un traitement UHT si l'on veut le ré-injecter dans le lait. La bactofugation n'a pas d'effet sur les exotoxines présentes dans le lait. Il est à noter que la bactofugation peut s'effectuer « à chaud ». La bactofugation seule permet au mieux une à deux réductions décimales pour les bactéries et spores, un rendement d'élimination généralement considéré inférieur aux procédés de filtration (Trouvé *et al.* 1991).

### 7.1.3.2 Filtration

La filtration sur membranes s'est développée au siècle dernier avec le développement du « *cracking* » du lait. Ce sont des procédés très utilisés pour le fractionnement ou pour la diminution de la charge microbienne du lait. Les principaux procédés sont représentés dans la figure ci-dessous, les dénominations sont données par la taille des pores qui vont donc laisser passer différentes entités (Figure 29).

Pour la microfiltration, le diamètre des pores de la membrane est de 0,1 µm à 10 µm, permettant la rétention de bactéries. L'ultrafiltration met en œuvre des pores de 0,1 à 0,01 µm. Comme son nom l'indique l'échelle de la nanofiltration est le nanomètre. Enfin, l'osmose inverse se situe à une échelle encore plus petite.

La filière lait représente 75 % des installations d'ultrafiltration dans le monde. L'ultrafiltration est utilisée pour la concentration des protéines du lactosérum et de la caséine, pour la préconcentration en fromagerie, où le rendement est augmenté de 10 %, et pour la mise au point de produits nouveaux dans le domaine des produits frais : laits fermentés et crèmes desserts entre autres. L'ultrafiltration fait son entrée à la ferme ; elle permet de pré-concentrer le lait pour le fromage et d'obtenir un jus lactosé concentré pouvant être utilisé sur place pour l'alimentation du bétail.

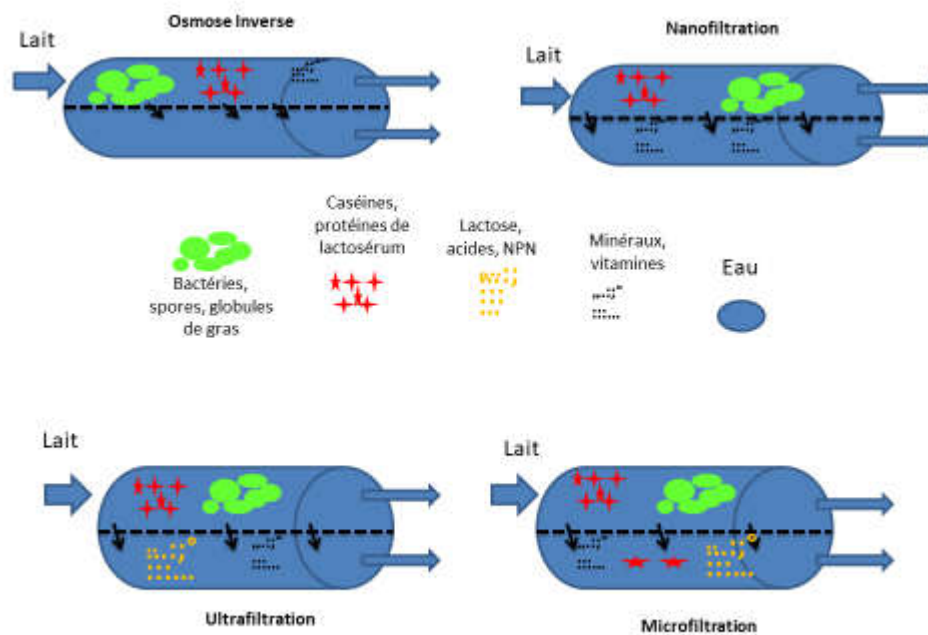


Figure 29 : Les différents procédés de filtration du lait<sup>29</sup>

Les industries fromagères sont les principales utilisatrices de ce procédé, mais certaines industries laitières préparent aussi du lait frais débarrassé des micro-organismes par filtration. Le lait entier cru est d'abord écrémé, la crème obtenue est pasteurisée et dégazée à 85-90°C. Le lait écrémé est micro filtré, toutes les bactéries sont arrêtées par le filtre. La crème et le microfiltrat sont ensuite homogénéisés ensemble ; le mélange est refroidi. Le rendement est de l'ordre de 95,5 %. Le lait ainsi obtenu a une DLC de 15 jours à 4°C. Commercialisé sous le nom de lait frais microfiltré, il présente toutes les qualités organoleptiques du lait frais. Pour Trouvé *et al.* (1991), l'abattement logarithmique moyen dans un lait écrémé microfiltré (diamètre moyen des pores 1,4 µm) inoculé avec différents micro-organismes, est de 2,6 logs (2,09 – 3,19 selon les micro-organismes).

Elwell et Barbano (2006) ont comparé les abattements logarithmiques et la durée de conservation de deux laits :

- du lait pasteurisé (79°C, 16s)
- du lait microfiltré (MF) auquel on rajoute son perméat pasteurisé (72°C, 15s)

Ils indiquent que la microfiltration donne une réduction de la flore totale de 3,8 logs et que la combinaison MF+perméat pasteurisé permet une conservation plus longue du produit.

#### 7.1.4 Procédés chimiques d'élimination

Il s'agit dans ce cas d'abord le cas des traitements de carcasses de poulets par immersion et circulation à contre-courant dans un bain d'eau contenant la molécule active. Les molécules vont avoir généralement un effet inactivant sur des cellules végétatives. Certaines d'entre elles exercent également un effet de « décrochage » des micro-organismes de la surface de la carcasse. Dans ce cas, il n'existe pas de « résistance » aux traitements. Il faut noter que, bien que réel, le résultat de ce « décrochage » reste très modeste.

#### 7.1.5 Traitements combinés pour la maîtrise des *Clostridium botulinum* dans les denrées alimentaires d'origine animale

La présentation séquentielle des traitements d'inactivation ou d'élimination est nécessaire mais pas forcément opportune en référence aux traitements d'aliments. En effet, certains facteurs de l'aliment ou du processus mis en œuvre pour leur production peuvent être favorisants (synergie) ou défavorisants (protecteurs) du traitement.

<sup>29</sup> Référence: Adapté de tetrapak.com

Par surcroît, les traitements peuvent également être combinés, de manière sub-optimale, dans une approche de type « effet barrière ». À ce titre, il est possible de mentionner, pour l'obtention d'un même résultat d'inactivation de spores de *C. botulinum*, l'utilisation de plus faibles doses de rayonnements ionisants dans un produit de charcuterie avec nitrites comparativement au même produit sans nitrites (Dutra *et al.* 2016), ou le fort potentiel de développement des traitements Haute Température/Hautes Pressions (Guillou *et al.* 2017). La synergie pH/chaleur est un parfait exemple de facteur favorisant l'efficacité du traitement thermique des spores de *C. botulinum* en relation avec la valeur « barrière » d'un pH de 4,5 permettant aux aliments dont le pH est inférieur d'être conservé longtemps à température ambiante, même après un traitement thermique « modéré ». Dans les produits carnés traités en salaison, le pH ultime des viandes (5,4 – 5,6) joue un rôle important, favorisant l'effet des nitrites sur *Clostridium*. À ce stade il est important de rappeler que le respect strict des Bonnes Pratiques de transport, de stabulation et d'abattage permettront d'éviter l'apparition de viandes à pH élevé (> à 6,1) comme les « viandes surmenées » par exemple.

En revanche, le traitement thermique, l'acidité et la teneur en sel de la plupart des plats cuisinés sous-vide ou sous atmosphère modifiée, généralement préparés sans conservateurs, sont généralement insuffisants pour autoriser une conservation à température ambiante. Ces produits sont donc maintenus sous chaîne du froid et une date limite de consommation (DLC) leur est appliquée. La maîtrise de la croissance de *C. botulinum* par biopréservation a été envisagée. Ainsi, divers travaux expérimentaux ont montré des retards dans la production des neurotoxines botuliques, voire une inhibition totale dans diverses DAOA (Lindstrom, Kiviniemi, et Korkeala 2006). La maîtrise de la croissance de *C. botulinum* par biopréservation a été envisagée. La croissance de *C. botulinum*, notamment de type E ou C est ainsi inhibée en présence de communautés d'autres espèces bactériennes dans des milieux alimentaires ou dans des substrats de l'environnement (Girardin *et al.* 2002, Lindstrom, Kiviniemi, et Korkeala 2006). La biopréservation « classique » par inoculation en surface des produits de flores compétitrices est envisageable pour les produits de la mer mais ne semble pas complètement adaptée pour les viandes de boucherie, pour lesquelles la contamination est dite « profonde ». À plus court terme, en élevage, l'utilisation de bactériocines et/ou de flores productrices de bactériocines ciblées sur *C. botulinum* et limitant le portage intestinal semble possible (Okereke et Montville 1991, Scalfaro *et al.* 2019).

### 7.1.6 Conclusion sur les procédés d'inactivation/élimination dans les denrées alimentaires d'origine animale

La gravité de la maladie (botulisme) évoquée en introduction a conduit les acteurs de la chaîne alimentaire à se préoccuper constamment de l'agent qui en est responsable : *Clostridium botulinum*. Ce micro-organisme est souvent considéré comme une référence de « résistance » et a conduit, par exemple, au concept du 12D pour les barèmes d'appertisation. Cependant, l'implication importante du groupe I dans les cas de botulisme humain a conduit les auteurs à privilégier les études sur ce groupe, délaissant le groupe III qui souffre d'un déficit d'informations en la matière. L'état actuel des connaissances ne permet pas de remettre en cause la conclusion de Roberts et Gibson (1979) selon laquelle les mesures appliquées dans l'industrie agroalimentaire pour maîtriser les *C. botulinum* de type A et B seront efficaces pour les types C et D. Ceci semble pouvoir être affirmé avec une plus grande certitude pour les traitements thermiques et pour certains traitements athermiques (ionisation, UV pulsés). Les toxines botuliques sont relativement facilement inactivées par la chaleur et les agents halogénés, mais résistent aux traitements ionisants et aux UV. Les toxines botuliques des types C et D semblent plus thermorésistantes que celles des types A, B, E. Cependant, des traitements thermiques supérieurs à 90°C/2 min permettent l'inactivation totale de ces toxines. Le type E semble légèrement plus sensible que le type A permettant de tenir le même raisonnement pour les traitements thermiques (spores et toxines), les traitements ionisants (spores) ainsi que les traitements plasmas froids atmosphériques (spores). Dans l'état actuel des connaissances sur le barocomportement de *C. botulinum*, il n'est pas possible d'extrapoler ou d'étendre les connaissances acquises sur le type A aux autres types. L'acquisition de données spécifiques en la matière est impérative. Plus généralement, l'acquisition de données spécifiques aux types qui sont l'objet de ce Groupe de Travail devrait être recommandée au cas par cas, au titre de validation du raisonnement exposé *in supra*.

Les cellules végétatives, quel que soit le groupe ne semblent pas présenter de résistance particulière. Les traitements d'élimination, bactofugation et filtration du lait, basés sur des critères physiques n'entraînent pas de différence de comportement entre les groupes, ni de phénomène de résistance. Leur efficacité, réelle, est cependant limitée, et ils doivent être utilisés en combinaison si l'objectif est un abattement supérieur à 2 logs.

En pratique, et en particulier pour les DAOA, la maîtrise de *C. botulinum* est obtenue par l'action combinée de plusieurs mesures d'hygiène et de facteurs : traitement thermique, ajout de sel ou séchage, ajout de nitrites ou d'autres conservateurs, fumage, réfrigération et/ou limitation de la durée de vie (Lund et Peck 2013).

Le biocontrôle ou la biopréservation (des solutions microbiennes à des problèmes microbiens) constituent des voies de maîtrise de *C. botulinum* qui méritent d'être investiguées à moyen terme, ce micro-organisme n'étant



pas connu pour être un grand « compétiteur ». Divers travaux expérimentaux ont montré des retards dans la production des neurotoxines botuliques, voire une inhibition totale dans diverses DAOA.

## 7.2 Opération de décontamination dans les élevages, établissements agroalimentaires et milieu naturel

Les opérations de décontamination incluent le nettoyage et la désinfection des locaux, surfaces et matériels ainsi que le traitement des cadavres d'animaux, produits, sous-produits et effluents contaminés ; elles ont pour objectif d'éliminer l'agent pathogène partout où il se trouve.

Ces opérations s'appliquent en particulier, dans le cas du botulisme, aux élevages, aux entreprises agroalimentaires et, le cas échéant, à l'environnement contaminé en cas d'identification d'un foyer dans l'avifaune.

### 7.2.1 Description des opérations par secteur

#### 7.2.1.1 Elevages

Les opérations de nettoyage désinfection se justifient en raison de la persistance de *C. botulinum* dans les élevages atteints de botulisme, comme cela a été montré, notamment en aviculture. C'est, par exemple, ce qu'ont révélé des investigations épidémiologiques menées dans 37 élevages de volailles de chair atteints (34 C/D et 3 D/C) dans lesquels des prélèvements environnementaux ont été collectés pour identifier les zones à risque pour la décontamination (Souillard *et al.* 2014). La bactérie a été retrouvée, avant décontamination, dans 26,4% des prélèvements, essentiellement au niveau des circuits de ventilation et sur les abords extérieurs, dans l'eau en bout de ligne ainsi que sur des petits ténébrions (*Alphitobius diaperinus*, autre vecteur mécanique connu de la bactérie). Vingt-six de ces élevages ont fait l'objet d'une seconde visite après nettoyage et désinfection. 13% des échantillons collectés restaient positifs sur ces mêmes zones, ainsi que dans les canalisations. *C. botulinum* pourrait en effet persister par l'intermédiaire de biofilms. Dans un élevage de poules pondeuses au sol, *C. botulinum* a été retrouvé en présence des animaux pendant plus de 5 mois après la survenue d'un épisode de botulisme (Souillard, Le Maréchal, Ballan, Rouxel, *et al.* 2017) sur le circuit d'œufs, le circuit d'aération, sur les murs et les caillebotis. Le circuit à œufs est une zone particulièrement complexe à décontaminer dans les élevages de pondeuses et un lieu propice au maintien des clostridies. La bactérie persiste en outre dans les effluents d'élevage, en particulier les fumiers (Souillard *et al.* 2020) et les lisiers. En conséquence, la découverte d'un foyer de botulisme dans un élevage va nécessiter une décontamination des infrastructures, des équipements, des effluents (lisier, fumier) et des abords pour assurer un assainissement et éviter une diffusion de la maladie et d'éventuelles résurgences.

Les cellules végétatives de *C. botulinum* n'étant pas envisagées comme particulièrement résistantes et la toxine botulique en elle-même n'étant pas considérée comme rémanente ni récalcitrante à la décontamination (Arnon *et al.* 2001), ce sont les spores de *C. botulinum* qui doivent donc être la cible privilégiée des procédés de décontamination, choisis et dimensionnés à dessein.

Pour une décontamination optimale en élevage, cinq étapes importantes sont à considérer :

- 1) **Retrait de la matière organique** : l'objectif est d'éliminer le maximum de matière organique dans et sur les matériels et bâtiments à désinfecter par un nettoyage à sec.

Cette étape consiste à délimiter la zone à nettoyer (parcours, bâtiment, etc.), à enlever le fumier, les restes d'aliments ainsi que tout autre résidu organique, à démonter et brosser les équipements, vider les abreuvoirs. Il est nécessaire de porter une attention particulière au système d'aération (composantes internes et externes) pour ce nettoyage à sec. Dans le bâtiment, l'opération est effectuée du haut vers le bas.

Les procédés mécaniques utilisés dans cette étape sont décrits en 7.2.2.4

- 2) **Détergence et décapage** : il s'agit d'une étape essentielle pour éliminer le reste de la matière organique mais aussi inactiver une partie non négligeable des micro-organismes présents.

Le nettoyage (incluant les étapes de retrait de la matière organique, détergence et décapage) est une étape primordiale. Elle vise à éliminer le maximum de matières organiques et minérales accumulées qui se retrouvent en quantité importante dans les locaux et sur le matériel d'élevage.

La qualité de la réalisation de cette opération conditionne l'efficacité de l'étape de désinfection et par conséquent l'effet des procédés chimiques tels que les produits biocides qui, d'une façon générale, voient leur efficacité diminuée en présence de souillures minérales et organiques. En effet, dans les milieux aqueux ou en conditions très humides, ces souillures peuvent prendre la forme de biofilms plus ou moins épais et complexes, où les micro-organismes pathogènes peuvent se trouver protégés physiquement des biocides, et/ou dans un état physiologique les rendant moins sensibles à ceux-ci.

La désinfection doit s'effectuer sur des surfaces nettoyées et séchées. En effet, la présence de liquide sur les surfaces à désinfecter risquerait de diluer le désinfectant et ainsi altérer l'efficacité de la désinfection.

Les procédés chimiques en 7.2.3 décrivent les produits détergents utilisés dans cette étape (7.2.3.1).

- 3) Désinfection et séchage :** La solution désinfectante est appliquée habituellement avec une pression moyenne (35 - 70 kg/cm<sup>2</sup>) pour assurer une bonne pénétration dans les pores et les cavités des matériaux. En général, de 125 à 300 mL/m<sup>2</sup> de solution désinfectante (en fonction du mode d'application) sont appliqués. La vaporisation nécessite un volume d'eau plus important que le moussage, et il faut s'assurer d'en mettre jusqu'à ruissellement sur des matériaux poreux comme le bois et le béton.

Après application aucun rinçage n'est effectué, sauf pour les lignes d'eau et les mangeoires et abreuvoirs, ou si une instruction spécifique de rinçage des surfaces est mentionnée sur l'étiquette du produit désinfectant utilisé.

L'assèchement du sol et du bâtiment contribue à la réduction du microbisme. Il est associé au vide sanitaire dont la durée minimale doit correspondre au temps nécessaire pour assécher entièrement le bâtiment. Le vide sanitaire qui suppose l'absence d'animaux, est systématiquement appliqué en élevage de volailles, mais pas toujours réalisable en élevage de bovins.

À noter qu'en cas de foyer de botulisme une deuxième désinfection, pour renforcer le processus de décontamination, est recommandée. Elle peut être envisagée par fumigation (particules de 0,5 µm) ou brumisation (particules de 5 µm) afin d'assurer une bonne désinfection des surfaces difficiles d'atteinte (incluant les crevasses dans certains matériaux).

Les produits désinfectants utilisés dans l'étape de désinfection sont décrits dans la partie des produits biocides en 7.2.3.2.

- 4) Contrôle des animaux indésirables** (rongeurs et oiseaux sauvages, arthropodes) : l'action à entreprendre (grilles aux entrées d'air, dératisation, filets de protection, contrôle de l'intégrité des grillages des bâtiments, ...) dépend de l'espèce introduite et du niveau d'infestation du site de production.

La gestion des animaux indésirables est indispensable. En cas de foyer de botulisme, il est nécessaire de renforcer les opérations de désinsectisation et de dératisation pour réduire au maximum le risque de maintien de l'infection sur le site.

Finalement, en particulier lors d'infestation par des ténébrions sur les sites de production avicole, il est judicieux de désinsectiser de nouveau avant l'arrivée d'une nouvelle bande. Pour chacune des étapes de décontamination décrites ci-dessus, différents procédés physiques ou chimiques existent mais tous ne vont pas être adaptés à une utilisation en élevage.

### **5) Traitement des cadavres d'animaux et effluents**

L'élimination et la destruction des cadavres d'animaux est essentielle dans la gestion d'un foyer de botulisme, de même que le traitement des litières, fumiers et lisiers contaminés (voir plus loin).

#### 7.2.1.2 Etablissements Agro-Alimentaires (EAA) (abattoir, ateliers de découpes, usines de transformation)

Le règlement (CE) 852/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 relatif à l'hygiène des denrées alimentaires prescrit à l'annexe I partie A II point 4a) pour la production primaire, à l'annexe II chapitre I, II, III, IV, V pour tous les exploitants du secteur alimentaire, hors production primaire, l'obligation de prendre des mesures adéquates pour nettoyer, et au besoin désinfecter, les équipements, les locaux, les caisses, les conteneurs, les surfaces ou les dispositifs en contact avec les denrées alimentaires, les véhicules de transport ou les navires.

Les opérations de nettoyage et désinfection (N&D), qu'elles soient réalisées simultanément ou l'une après l'autre, font, par conséquent, partie des programmes préétablies (ou prérequis) permettant d'assurer le maintien d'un bon environnement hygiénique de production, d'entreposage et/ou de transport. Il s'agit donc d'opérations d'hygiène rentrant dans le cadre notamment des Guides de Bonnes Pratiques Hygiéniques (GBPH), constituant, de fait, un préalable à toutes autres démarches de type mise en œuvre des principes de la méthode HACCP (*Codex Alimentarius*<sup>30</sup>).

Il est usuel, aujourd'hui, de parler de Programmes Pré-Requis (ou préétablis), acronymés « PRP » ou autres BPHs pour Bonnes Pratiques d'Hygiène surveillées. Les termes utilisés sont importants, il faut retenir : programme et surveillance. Le N&D doit donc faire l'objet d'une programmation préalable aboutissant à ce que l'on a coutume d'appeler « Plan de nettoyage et désinfection » (incluant souvent le plan de lutte contre les macro-nuisibles, improprement appelé plan de dératisation). En fait plusieurs plans de nettoyage sont réfléchis, généralement par zones, correspondant à des intensités de N&D graduelles, correspondant à l'ampleur de la « menace ».

Les opérations d'hygiène ne sont pas différentes de celles décrites dans le paragraphe précédent ou les suivants (cf. supra & infra), les moyens vont s'adapter aux locaux, aux surfaces et aux matériaux utilisés dans les EAA. Les échelles d'intensité des plans iront des activités de N&D quotidiennes, usuelles jusqu'à des séquences de désinfection renforcées voire de « stérilisation ». Leur mise en œuvre sera décidée au regard de l'intensité de la « menace » qui pourra être évaluée par une surveillance de l'environnement de production ou toutes autres informations (retraits, rappels, TIAC, informations suspectes contenues dans les documents ICA<sup>31</sup> accompagnant les lots d'animaux arrivant à l'abattoir...). La surveillance est sous la responsabilité du professionnel qui doit définir une stratégie de prélèvement et d'analyse appliquée avec strictement les mêmes méthodes qui doivent être parfaitement standardisées afin que le suivi dans le temps soit fait avec des résultats comparables.

Conformément aux dispositions du règlement (CE) n° 853/2004, l'envoi d'un lot de volailles malades à l'abattoir est interdit. Par dérogation, applicable au botulisme aviaire (arrêté ministériel du 30 mai 2008<sup>32</sup>) et instruction technique DGAL/SDSSA/2017-278), lorsqu'il s'agit de d'atteintes par les types C/D, C, D ou D/C), des sous-lots d'animaux reconnus comme non cliniquement atteints peuvent être identifiés au sein d'un lot comportant des animaux malades. L'envoi de ces animaux à l'abattoir sous laissez-passer sanitaire peut être autorisé par le directeur départemental en charge de la protection des populations (DDPP) du département dans lequel est implanté l'élevage sous réserve que le vétérinaire se soit assuré que les animaux ne présentaient pas de signes cliniques au moment de leur envoi à l'abattoir et que l'abatteur ait été informé du fait que les animaux acheminés sont issus d'un lot d'animaux malades par le biais du document de transmission de l'information sur la chaîne alimentaire (ICA). Ce lot fera l'objet d'une attention particulière à l'abattoir et d'une inspection ante et *post-mortem* renforcée. Des mesures complémentaires pourront être mises en place par l'abatteur, notamment une planification de l'abattage de ces lots en fin de journée pour éviter les risques de contamination croisée ainsi que des mesures de nettoyage et désinfection renforcées sur la chaîne d'abattage.

Les opérations de décontamination dans les établissements Agro-alimentaires sont concernées par les procédés de décontamination physiques (7.2.2.1), mécaniques (7.2.2.4) et chimiques (7.2.3.1 et 7.2.3.2).

### 7.2.1.3 Cas particulier : opérations de décontamination dans un foyer de botulisme en faune sauvage

Le développement de foyers de botulisme en faune sauvage résulte de mécanismes complexes permettant l'atteinte des animaux (oiseaux aquatiques en particulier) à partir du réservoir tellurique.

<sup>30</sup> Avant d'appliquer la méthode HACCP à un secteur de la chaîne alimentaire, celui-ci doit fonctionner conformément aux principes généraux d'hygiène du Codex & aux codes d'usages du secteur en question (i.e règles générales d'hygiène et Bonnes Pratiques Hygiéniques)

<sup>31</sup> ICA : Informations Chaîne Alimentaire

<sup>32</sup> Arrêté du 30 mai 2008 relatif aux conditions sanitaires auxquelles doivent satisfaire les lots de volailles et de lagomorphes en vue de leur abattage pour la consommation humaine

Hormis quelques situations particulières, les moyens préconisés dans les élevages et leur environnement proche (abords des bâtiments d'élevage, parcours) ne sont pas applicables à la décontamination des sols, eaux et sédiments des zones humides propices à la persistance des spores botuliques et à l'émergence de ces foyers.

Peu d'agents chimiques et physiques reconnus pour leur activité sporicide vis-à-vis de *C. botulinum* et préconisés en élevage sont utilisables dans le milieu naturel.

- La plupart des désinfectants sont peu ou pas efficaces lorsqu'ils sont appliqués sur la terre et peuvent générer des composés secondaires toxiques pour l'environnement. Les seules données disponibles sont relatives à l'utilisation de la chaux, et, à cet égard, Popoff et Argente (1996) indiquent (mais sans en apporter la démonstration) que la vidange, le curage et le chaulage des étangs sont certainement des mesures préventives efficaces du botulisme.
- Parmi les procédés physiques, le traitement par la vapeur d'eau a été testé sur des échantillons contaminés par *C. botulinum* de type E d'amas d'algues échoués sur des plages de certains Grands lac nord-américains dans l'optique de réduire la prolifération de la bactérie et ainsi d'atténuer l'ampleur des épisodes annuels de botulisme recensés dans ces sites (Chun *et al.* 2015). Le traitement par la vapeur d'eau a permis d'obtenir (à partir d'un temps de contact de 2 minutes) l'absence totale de détection de *C. botulinum* de type E dans les échantillons traités, mais l'absence de validation sur le terrain ne permet pas de statuer sur son efficacité et sa faisabilité.

La solution passe donc plutôt par la recherche de mesures de gestion visant à prévenir ou bloquer (en cours d'épisode de botulisme) les conditions favorables à la germination des spores présentes dans le milieu, à la multiplication bactérienne et la production de la toxine botulique (*cf.* chapitre *Clostridium botulinum* et environnement).

## 7.2.2 Procédés de décontamination physiques et chimiques

### 7.2.2.1 Procédés de décontamination physiques

Cette voie de décontamination comprend principalement des procédés thermiques, des procédés par rayonnements et des procédés mécaniques.

### 7.2.2.2 Procédés thermiques

Il n'y a pas d'information sur l'efficacité de procédés thermiques pour l'élimination de *C. botulinum* en élevage. Il convient d'ailleurs de rappeler que la thermo-résistance des spores botuliques (survie à 100°C pendant plusieurs heures, destruction à 120°C pendant 5 minutes, sur la base des données obtenues en hygiène alimentaire) implique d'atteindre des températures de traitement suffisamment élevées en les maintenant le temps nécessaire (importance du couple température/temps) pour leur destruction.

La décontamination thermique fait appel à divers procédés, selon qu'il s'agit, dans le cadre de la procédure de désinfection d'un élevage, de traiter les locaux (surfaces et matériels) ou de traiter les effluents d'élevage (litières, fumiers et lisiers). Le traitement à la chaux vive est exclu ici, considéré comme un procédé chimique même si son activité désinfectante tient à la réaction exothermique (et l'augmentation de pH) qu'elle induit. Est exclue aussi, dans le cadre de l'hygiénisation des effluents d'élevage, l'action thermisante d'origine biologique (action des micro-organismes thermophiles) observée dans les procédés de digestion aérobie (compostage) ou anaérobie (production de biogaz) qui intervient conjointement avec d'autres paramètres (pH, compétition microbienne...).

Deux procédés de thermo-désinfection sont utilisables pour le traitement des surfaces, la flamme appliquée en continu et la projection de vapeur sous pression à haute température (140 à 150°C). Dans les deux cas, l'efficacité de la désinfection est influencée par la conductibilité thermique des matériaux : la flamme, efficace pour du matériel métallique, l'est moins pour des surfaces en béton, et encore moins pour les sols en terre battue plus ou moins humides pour lesquels des températures de 1000°C doivent être atteintes pour se rapprocher de l'efficacité obtenue par action de la chaux vive (Valancony *et al.* 2000); l'efficacité de la vapeur d'eau est altérée par son refroidissement rapide, et elle est surtout préconisée pour la lutte contre certains parasites comme *Cryptosporidium* sp en élevage bovin. Leur mise en œuvre, tout en nécessitant un matériel spécifique, est difficile et coûteuse pour l'éleveur.

Les procédés thermiques applicables sur les effluents d'élevage sont, indépendamment de la stérilisation sous pression non réalisables dans les élevages, l'incinération et la pasteurisation. L'incinération, surtout applicable aux effluents solides, est totalement stérilisante mais difficilement applicable à l'échelle des exploitations. La pasteurisation selon le couple temps / température fixé à 70°C pendant 60 minutes (comme prescrit dans le Règlement n°142/2011 de la Commission européenne) est notamment préconisée en amont du procédé de digestion anaérobie (méthanisation) pour le traitement des intrants présentant un risque sanitaire. Elle implique que l'établissement de production de biogaz rattaché aux élevages dispose d'un équipement de pasteurisation. Il s'avère néanmoins que le couple 70°C / 60 minutes est insuffisant pour détruire les spores de *C. botulinum*. En outre, l'éventualité que le stress thermique à cette température induise la germination des spores est à considérer. Celle-ci pourrait donner la possibilité, si les conditions (anaérobiose, température...) dans le substrat le permettent, d'une croissance bactérienne.

#### 7.2.2.3 Procédés par rayonnements

L'utilisation de rayonnements de type lampes UV classiques n'est pas adaptée à la problématique de la décontamination des élevages touchés par le botulisme car cette technique est principalement utilisable sur des surfaces propres et est peu efficace sur les spores. Les générateurs d'UV à lumière pulsée utilisés principalement pour la désinfection d'emballage et d'aliments paraissent être plus performants en terme d'efficacité de décontamination. Des chutes supérieures à 5 logs sont revendiquées par certains fournisseurs concernant les spores. Néanmoins l'efficacité de ces équipements n'a pas été démontrée pour la désinfection des locaux et équipements d'élevage (Elmnasser *et al.* 2007).

Une étude sur *C. botulinum* 33A<sup>33</sup> a montré que, durant la période de sporulation, la souche développe une résistance à différents stress physiques et chimiques selon différents mécanismes. Ainsi, la résistance aux rayons ultraviolets et gamma survient environ deux heures avant le développement de la résistance à la chaleur.

Mais durant la germination, la souche a perdu simultanément sa résistance à la chaleur et aux rayons. Une augmentation des rayons ultraviolets semble aussi diminuer la résistance des souches aux rayons gamma. À noter toutefois qu'une dose subléthale de rayons gamma a pour effet de favoriser la production de toxine (Durban, Goodnow, et Grecz 1970).

#### 7.2.2.4 Procédés mécaniques

Les procédés mécaniques (balayage, brossage, dépoussiérage, raclage, nettoyage haute pression, ...) sont particulièrement utilisés lors des étapes de nettoyage du matériel et des bâtiments pour retirer le maximum de matière organique et ainsi maximiser l'efficacité de l'étape de désinfection. En élevage, l'action mécanique (frottement) lors du balayage ou du soufflage permet de remettre en suspension les salissures et certains agents biologiques ce qui favorise leur élimination partielle.

D'autres procédés mécaniques existent tels que la filtration et la centrifugation. Ces deux procédés sont plutôt adaptés au traitement de DAOA telles que le lait mais s'appliquent difficilement aux effluents liquides dans les élevages. La charge organique de ces effluents rend difficile leur épuration par filtration du fait des risques de colmatage. La séparation de phases mécanique (utilisation d'un décanteur centrifuge), applicable aux lisiers, n'a pas d'effet hygiénisant notable, tant sur la fraction liquide que sur la fraction solide, mais il est possible de traiter ensuite, séparément, chaque fraction par un procédé plus efficace.

<sup>33</sup> Il s'agit d'une souche qui est résistante aux rayons gamma (200-300 krad) Durban et Grecz, 1969. Cf.

<https://aem.asm.org/content/aem/18/1/44.full.pdf>

## 7.2.3 Procédés chimiques

### 7.2.3.1 Les produits détergents

Est considéré comme « détergent » toute substance ou mélange contenant des savons ou d'autres agents de surface destinés à des processus de lavage et de nettoyage. Leur commercialisation est encadrée par le règlement (UE) 648/2004. Il convient de suivre les recommandations d'utilisation d'étiquetage.

L'emploi de détergent associé au décapage est une étape essentielle pour éliminer la matière organique. Cette étape permet aussi de réduire la concentration de bactéries par un facteur d'un à trois log en comparaison à un lavage avec eau mais sans détergent. Le débit (10 à 20 L/min) lors de l'application est plus important que la pression. Deux-cent cinquante à 500 millilitres d'eau sont appliqués par mètre carré de surface. Si de l'eau chaude est disponible, sa température doit atteindre au minimum 40 °C afin d'éviter la création de biofilms (Böhm 1998). Le choix du détergent varie selon la dureté de l'eau de lavage (détergent acide pour retirer les dépôts minéraux).

Après l'application du détergent à basse pression (300 - 500 psi, ou 20 - 35 kg/cm<sup>2</sup>), il faut permettre un temps de contact adéquat (variable selon le détergent, mais généralement 15-20 min.) avant de rincer (décapage) à l'eau à haute pression (1000 - 3000 psi, ou 70 - 200 kg/cm<sup>2</sup>). Le décapage est facilité si le flux d'eau sort à 45 degrés par rapport à la surface à nettoyer.

Pour les surfaces poreuses (bois, béton), un détergent peu moussant à basse pression (50 - 300 psi, ou 3,5 kg/cm<sup>2</sup> - 21 kg/cm<sup>2</sup>) est appliqué. Un détergent moussant est privilégié sur des surfaces verticales et non poreuses (paroi en plastique).

S'il y a des lignes d'eau, elles sont vidées sous pression (au moins 1 kg/cm<sup>2</sup> ou 14 psi) et nettoyées à l'aide d'un détergent alcalin, suivi d'un détergent acide, en s'assurant d'un temps de contact d'environ 24 heures.

### 7.2.3.2 Les produits biocides

La mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides sont encadrées par le Règlement (UE) 528/2012 (dit Règlement biocide) concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides. Les produits biocides sont nécessaires pour lutter contre les organismes nuisibles pour la santé humaine ou animale et les organismes qui endommagent les matériaux naturels ou manufacturés.

Au sens du règlement, on entend par produit biocide « toute substance ou tout mélange, sous la forme dans laquelle il est livré à l'utilisateur, constitué d'une ou plusieurs substances actives, en contenant ou en générant, qui est destiné à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou à les combattre de toute autre manière par une action autre qu'une simple action physique ou mécanique ».

Dans le cadre du Règlement (UE) n°528/2012, les produits biocides destinés à être utilisés pour la désinfection des sites infectés par le botulisme, appartiennent :

- Au type de produit 3 (TP3) relatif à l'hygiène vétérinaire (produits utilisés pour l'hygiène vétérinaire et pour désinfecter les matériaux et surfaces associés à l'hébergement ou au transport des animaux) ;
- Au type de produit 4 (TP4) relatif aux surfaces en contact avec les denrées alimentaires et les aliments pour animaux (produits utilisés pour désinfecter le matériel, les conteneurs, les ustensiles de consommation, les surfaces ou conduits utilisés pour la production, le transport, le stockage ou la consommation de denrées alimentaires ou d'aliments pour animaux (y compris l'eau potable) destinés aux êtres humains ou aux animaux ;
- Au type de produit 5 (TP5) relatif à l'eau potable (produits utilisés pour désinfecter l'eau potable destinée aux êtres humains et aux animaux).

Selon l'article 19 du règlement biocide, une des conditions d'octroi d'une autorisation de mise à disposition sur le marché est que le produit biocide doit être suffisamment efficace pour les usages revendiqués.

### 7.2.3.3 Modes d'application et matrices environnementales à désinfecter en élevage atteint de botulisme

Dans le cadre d'un épisode de botulisme, pour le domaine de l'élevage, les matrices environnementales pertinentes à désinfecter ou à décontaminer en élevage sont :

- Les supports inertes incluant les locaux (par exemple sols, murs, plafonds), les matériels d'élevage, ainsi que les véhicules transportant des animaux et des cadavres d'animaux,
- L'environnement tels les abords immédiats des bâtiments, les aires de stationnement et voies d'accès, les parcours et les pâtures,
- Les effluents.

Sur ces supports, la désinfection peut s'effectuer :

- Par application directe sur les surfaces avec un produit biocide sporicide utilisé sous forme liquide (ou sous forme solide solubilisée dans un liquide), sous forme de gel ou de lingettes, par pulvérisation, aspersion, trempage, broyage, essuyage ...
- Par application par voie aérienne avec un produit biocide sporicide utilisé sous forme gazeuse ou sous forme de microgouttelettes (aérosol).

La nature (teneur en matières organiques) et le volume des effluents d'élevage, notamment des déjections (fumiers, lisiers), auxquels s'ajoute la possibilité ou non de les valoriser en tant que fertilisant des sols, excluent la possibilité de les traiter avec la majorité des désinfectants (le traitement par la chaux est le principal procédé envisageable). Si le compostage et la digestion anaérobie, associés notamment à une pasteurisation / hygiénisation (70°C, 60 minutes), s'avèrent insuffisants pour un assainissement satisfaisant, la solution passe alors par l'incinération ou la stérilisation sous pression.

La liste des matrices et surfaces retrouvées en élevage révèle la complexité des traitements, inhérente notamment à la diversité de la nature des milieux à traiter (notamment surfaces métalliques, bois...), mais aussi à l'accessibilité et à la nettoyabilité de ces supports. En conséquence, les modes d'application des produits biocides choisis (trempage, pulvérisation, nébulisation par exemple) devront être adaptés à ces contraintes.

De plus, il ne faut pas oublier tous les facteurs inhérents à une mauvaise utilisation des biocides comme l'utilisation d'une eau de dilution présentant un pH et une dureté ou une température inadaptée, le non-respect de la dose d'emploi ou du matériel préconisé ou encore l'incompatibilité entre différentes préparations, qui peuvent entraîner une inefficacité de la désinfection. Il est essentiel de suivre les conditions de l'autorisation (concentration d'emploi, température, temps de contact, ...).

## 7.2.4 **Méthodes d'évaluation de l'efficacité désinfectante des produits biocides dans le cadre d'une autorisation de mise sur le marché**

Selon EN 14885, la désinfection est la réduction du nombre de micro-organismes dans ou sur une matrice donnée, obtenue grâce à l'action irréversible d'un produit sur leur structure ou leur métabolisme, à un niveau jugé approprié en fonction d'un objectif donné.

Les requis et critères d'efficacité des produits biocides sont présentés dans le guide européen d'évaluation de l'efficacité de l'ECHA Vol II part B/C.

Ce guide pour les usages relatifs à la désinfection renvoie essentiellement aux normes d'efficacité du CEN.

En effet, les méthodes d'évaluation des activités microbicides des antiseptiques et désinfectants chimiques ont fait l'objet, au niveau européen, d'une démarche de standardisation au sein du CEN TC 216<sup>34</sup> depuis le début des années 1990. Aujourd'hui, plus d'une trentaine de méthodes de laboratoire sont publiées ou en cours d'élaboration, et la liste de ces normes ainsi que les modalités de leur utilisation sont décrites dans la norme générale EN 14885. Outre les définitions nécessaires à la compréhension de ces documents, cette norme regroupe les méthodes utiles pour justifier des revendications biocides dans trois grands domaines : le domaine médical, le domaine vétérinaire et le domaine alimentaire, industriel, domestique et collectivité.

<sup>34</sup> *Technical committee 216* - « Antiseptiques et désinfectants chimiques » du Comité Européen de Normalisation (CEN)

#### 7.2.4.1 Activité sporicide dans les normes CEN

Dans le cadre du CEN TC 216, aucune norme spécifique au domaine vétérinaire n'a été publiée pour l'activité sporicide pour les applications directes des produits sur les surfaces.

La norme de base EN 14347 ainsi que la norme de suspension EN 13704 sont utilisées pour revendiquer une activité sporicide des produits dans les secteurs alimentaire, industriel, domestique et collectivité. Il existe depuis 2018, une norme de suspension (EN 17126) pour la désinfection des surfaces, des instruments et du textile dans le domaine médical.

La norme 17272 (avril 2020) décrit une méthode d'essai permettant d'évaluer une activité désinfectante de procédés de désinfection des surfaces par voie aérienne. Elle est entre autres applicable à la démonstration de l'activité sporicide dans le domaine vétérinaire.

À côté de ces listes de normes européennes spécifiques à chacun des trois domaines, la norme NF EN 14885 spécifie également que, lorsqu'il n'existe aucune norme appropriée pour une application (exemple : domaine vétérinaire), l'utilisation d'une norme d'un autre domaine est recommandée (exemple : domaine médical ou industriel), en adaptant les conditions d'essais au domaine ciblé.

##### a- Micro-organismes d'essai

Le micro-organisme d'essai désigné dans la norme EN 13704 correspond à des spores de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) avec comme possibilités de micro-organismes additionnels, des spores de *Bacillus cereus* (ATCC 12826) et des spores de *Clostridium sporogenes* (CIP 7939).

La norme médicale EN 17126 rend obligatoire une efficacité à la fois sur *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus*, il est néanmoins possible de ne revendiquer que *Clostridium difficile*.

Pour la désinfection des surfaces par voie aérienne (EN 17272), le micro-organisme d'essai utilisé est *Bacillus subtilis*.

##### b- Méthodes d'essai

La recherche de l'activité sporicide dans les normes EN 13704 et EN 17126 est réalisée au moyen d'une technique en suspension permettant d'apprécier une réduction bactérienne supérieure ou égale à 3 log<sub>10</sub> (EN 13704) et 4 log<sub>10</sub> (EN 17126) en 15 à 60 min à 20°C, en présence de matière organique (conditions de propreté ou de saleté). Des conditions d'essai additionnelles sont également prévues portant sur le temps de contact (5, 15 ou 30 min) et la température (4, 10, 40 et 75 °C).

Pour la désinfection des surfaces par voie aérienne (EN 17272), les conditions d'essai (température, temps de contact) sont fonction des revendications ; la réduction visée est dans ce cas supérieure ou égale à 3 log<sub>10</sub>.

#### 7.2.4.2 Revue de l'efficacité des substances actives biocides dans la littérature

Les familles de substances actives notifiées/ approuvées dans le cadre du règlement biocides sont présentées dans le tableau 14 ci-dessous :



Tableau 14 : Familles de désinfectants et mode d'action

Famille de désinfectants	Exemples	Mode d'action déterminé sur les cellules végétatives	Action sporicide (Russell 1990)	TP3	TP4	TP5
Acides	Acide benzoïque	Inhibition de la synthèse des protéines et des acides nucléiques, altération des parois cellulaires	Non sporicide	X	X	X
Alcools	Ethanol, Isopropanol	Dénaturation protéique	Non sporicide		X	
Aldéhydes	Formaldéhyde, Glutaraldéhyde	Inhibition de la synthèse des protéines et des acides nucléiques, altération des parois cellulaires	Sporicide	X	X	
Ammoniums quaternaires	Benzalkonium	Altérations membranaires	Non sporicide	X	X	
Bases	Chaux vive et hydratée	Dénaturation protéique Altérations membranaires Altération des parois cellulaires	Sporicide	X		
Biguanides	Polyhexaméthylène biguanide	Altérations membranaires	Non sporicide			
Halogénés	Produits chlorés et iodés	Dénaturation protéique Altérations membranaires Altération des parois cellulaires	Sporicide	X	X	X
Isothiazolinones	Chlorométhylisothiazolinone	Dénaturation protéique Altérations membranaires	Non sporicide		X	
Métaux	Nitrate d'argent	Inhibition de la synthèse des protéines et des acides nucléiques Altérations membranaires	Non sporicide	X		X
Oxydants	Peroxyde d'hydrogène, acide peracétique,  (Ozone)	Dénaturation protéique	Sporicide	X	X	X
					(X)	(X)
Phénols et dérivés	Chlorocrésol	Altérations membranaires Dénaturation protéique	Non sporicide		X	

Concernant la désinfection des surfaces contaminées par des *C. botulinum*, il est impératif d'utiliser des produits désinfectants dont l'activité sporicide est reconnue car c'est sous sa forme sporulée que *C. botulinum* est le plus résistant à la désinfection. À noter que l'action sporicide d'une substance active peut être renforcée en fonction des coformulants qui seront ajoutés dans le produit fini.

Parmi les substances actives présentées dans le tableau ci-dessus, les produits appartenant aux classes des aldéhydes, oxydants et halogénés sont ceux qui sont considérés comme présentant les meilleures activités sporicides (Russell 1990). Ces derniers seront donc les produits les plus appropriés pour la désinfection des matrices souillées par des spores de *C. botulinum*.

Néanmoins très peu d'études ont été publiées sur la désinfection des surfaces contaminées par *C. botulinum*. Les principales données de la littérature portant sur les *Clostridium* ciblent les espèces *C. difficile*, un agent

bactérien incriminé dans les infections nosocomiales, et *C. perfringens* un agent responsable de contaminations alimentaires dont les volailles peuvent être à l'origine (McCrea et Macklin 2006), mais aussi responsable d'entérites nécrotiques chez plusieurs espèces d'animaux dont les volailles et les bovins.

Quelques résultats existent aussi pour *Clostridium sporogenes* qui peut être défini comme un *C. botulinum* du groupe I ne produisant pas de toxine botulique. À l'encontre, il existe beaucoup plus d'informations sur la désinfection des spores du genre *Bacillus* et en particulier de l'espèce *B. anthracis*. En effet de nombreux auteurs se sont intéressés à la désinfection des surfaces contaminées par les spores de cette espèce bactérienne suite à l'épisode des enveloppes contaminées par *Bacillus anthracis* aux États-Unis en septembre 2001. Les principales données disponibles sur la désinfection des spores concernent donc le genre *Bacillus* mais certains travaux ont pris en considération à la fois des spores des genres *Bacillus* et *Clostridium* ce qui permet de transposer les résultats obtenus sur les spores de *Bacillus* aux spores de *Clostridium*.

#### ➤ Les oxydants et halogénés et aldéhydes

Dans une étude ? Perez, Springthorpe, et Sattar (2005) ont comparé l'efficacité de différents produits désinfectants halogénés (dioxyde de chlore, eau de javel) et d'un produit désinfectant de nature oxydante, à base de peroxyde d'hydrogène, sur des spores de *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes* et *Clostridium difficile* (2 échantillons de la même souche cultivée sur deux milieux de culture différents) déposées sur des coupons en acier inoxydable. Les résultats obtenus montrent que les différents produits désinfectants entraînent un abattement de 6 log<sub>10</sub> du nombre de spores mais avec des temps d'exposition différents selon les produits et les souches. Néanmoins la durée maximale d'exposition nécessaire n'excède pas 30 minutes.

Oie *et al.* (2011) ont comparé l'efficacité de l'hypochlorite de sodium (additionnée ou non de vinaigre), du glutaraldéhyde à 2% et de l'acide peracétique à 0,3% pour désinfecter en solution ou par essuyage différentes matrices (PVC, bois, carrelage, ciment) contaminées par des spores de deux espèces de *Bacillus* ou des spores de *C. botulinum*, *C. tetani* et *C. difficile*. Les résultats concernant la désinfection des spores de trois différents *Clostridium* n'ont pas été détaillés mais leur résistance à la désinfection a été jugée moins forte que celle des spores du genre *Bacillus*. Il est apparu que l'hypochlorite de sodium avait peu d'activité sur la surface bois contrairement à l'acide peracétique à 0,3%. Les résultats montrent qu'une durée d'au moins 30 minutes est nécessaire pour achever la désinfection, même si pour certains couples désinfectant-surfaces les spores étaient inactivées au bout d'une dizaine de secondes.

Par ailleurs, Uwamahoro *et al.* (2018) ont évalué l'activité sporicide de deux désinfectants oxydants dont un à base d'acide peracétique et l'autre à base de peroxyde d'hydrogène et d'acide peracétique en prenant comme référence différentes formulations d'hypochlorite de sodium et de peroxyde d'hydrogène à 4,5%. Les agents cibles étaient des spores de *Clostridium difficile* et de *Bacillus amyloliquefaciens* déposées sur des coupons inox. Les résultats de l'étude indiquent que les différents désinfectants testés entraînaient une réduction du nombre de spores de l'ordre de 5 log<sub>10</sub> dans un laps de temps d'une dizaine de minutes. Le degré d'efficacité des produits désinfectants évalués est similaire vis-à-vis des spores des deux espèces bactériennes testées.

Pour assurer une meilleure efficacité des opérations de désinfection, en particulier sur des surfaces verticales, Le Toquin *et al.* (2018) ont évalué l'activité désinfectante d'une mousse à base de peroxyde d'hydrogène et du coformulant xanthane sur des spores de *Bacillus thuringiensis* déposées sur des coupons en polystyrène. Le procédé permet d'obtenir un abattement du nombre de spores de 8 log<sub>10</sub> en 45 minutes. L'importance de la température sur l'efficacité du procédé a été aussi mise en exergue. Le temps d'exposition pour atteindre un abattement de 8 log<sub>10</sub> était de 45 minutes à 30°C contre 2h30 à 4°C.

Les résultats publiés portent principalement sur les désinfectants utilisés par application directe sur les surfaces, Néanmoins deux études rapportent l'évaluation de l'utilisation du peroxyde d'hydrogène par voie aérienne sur des spores de *C. difficile* (Steindl *et al.* 2015) et *C. botulinum* de type A (une souche), E (une souche) et 3 souches de *Clostridium spp.* génétiquement proche des *C. botulinum* du groupe II (Johnston, Lawson, et Otter 2005). Les tests effectués sur les spores de *C. difficile* déposées sur des coupons (carreaux en céramique) en présence et absence de matières organiques montrent un abattement supérieur à 4 log<sub>10</sub> sous l'action du peroxyde d'hydrogène gazeux. Le temps d'action optimal du peroxyde d'hydrogène varie en fonction de la localisation des coupons. Un abattement supérieur à 4 log<sub>10</sub> est obtenu au bout d'une heure pour les coupons directement exposés au peroxyde d'hydrogène et au bout de trois heures pour les coupons placés dans un tiroir.

Les travaux de Johnston, Lawson, et Otter (2005) montrent aussi une efficacité du peroxyde d'hydrogène sous forme vapeur (355 ppm) en moins de 30 minutes. Il apparaît que la sensibilité des spores du genre *Clostridium* varie selon les souches, mais ce phénomène est aussi observé pour les spores de *Bacillus*. Une variabilité de la réponse des spores est mise en évidence dans de nombreuses études. Une part de cette variabilité pourrait être liée aux modes de préparation des spores dont différents paramètres (nature du milieu, température, purification éventuelle) (Dyer *et al.* 2019) ont été montrés comme capables d'influencer la stabilité.

Wood et Adrion (2019) ont passé en revue différents produits commerciaux de désinfection dont l'efficacité avait été évaluée sur des spores de *B. anthracis* déposées sur des surfaces. Les auteurs ont aussi indiqué des résultats concernant les spores d'autres espèces bactériennes dont les *Clostridium* lorsque des données étaient disponibles. Ils ont considéré un procédé comme efficace lorsqu'il entraînait un abattement supérieur à 6log10. L'hypochlorure (halogéné à action oxydante, non inclus au règlement biocides) utilisé sous différentes formes a été jugé efficace sauf sur les surfaces poreuses. L'utilisation de l'hypochlorure sous forme de gel apparaît intéressante pour la décontamination des surfaces verticales. Parmi les désinfectants oxydants, l'efficacité du peroxyde d'hydrogène liquide est limitée et doit être souvent optimisée par l'apport d'activateur. L'activité du peroxyde est faible sur les surfaces organiques comme le bois. L'acide peracétique est le désinfectant oxydant le plus efficace mais son instabilité (solution liquide) reste son point faible. Les aldéhydes tel que le formaldéhyde (liquide ou sous forme gazeuse) présentent une efficacité désinfectante significative vis-à-vis des spores mais son utilisation est strictement encadrée du fait de son classement CMR et doit rester limitée. L'efficacité du peroxyde d'hydrogène par voie aérienne sur les spores est variable selon les conditions opératoires. La difficulté réside dans le maintien d'une concentration optimale dans toutes les zones du local et sur les équipements à traiter. L'efficacité de la désinfection est moindre sur des surfaces comme le bois ou le béton. Le procédé est aussi sensible au taux d'humidité qui doit être faible pour éviter la condensation du peroxyde d'hydrogène.

L'efficacité du glutaraldéhyde/formaldéhyde 2% est optimisée à température élevée et en milieu acide ; il est peu sensible à la matière organique et aux eaux dures également peu corrosif pour les matériaux (Gosling *et al.* 2017, McLaren *et al.* 2011).

Certains dérivés halogénés, comme l'hypochlorite de sodium (eau de Javel) ont une bonne activité dans un pH acide mais sont sensibles à la chaleur (> 50 °C) et à la matière organique ; ils demeurent actifs en eaux dures et sont corrosifs pour les métaux lorsqu'à plus de 500 ppm (Fukuzaki 2006, Gelinis *et al.* 1984).

Les peroxygènes, comme l'acide peracétique, sont des produits stables et utilisés en milieu acide ; ils sont actifs à basse température, mais sensibles à la matière organique et aux eaux dures ; en présence de chlorures ils deviennent corrosifs sur les métaux (Amass, Ragland, et Spicer 2001, Chandler-Bostock et Mellits 2015).

#### ➤ Ozone

Wood et Adrion (2019) ont étudié l'utilisation de l'ozone pour assurer la décontamination par voie aérienne en espace intérieur de matériaux contaminés par des spores de *B. anthracis* ou *B. subtilis*. L'efficacité de la désinfection à l'ozone est apparue dépendante du taux d'humidité et du type de surface. Pour une concentration de 9000 ppm pendant 6 heures, à 75% d'HR, la chute logarithmique est pour les spores de *B. anthracis* de 2,2 sur le bois et de 1,7 sur le verre. À 85% d'HR la chute logarithmique est de 6,3 sur le bois et 3,2 pour le verre.

#### ➤ Chaux<sup>35</sup>

La chaux vive (oxyde de calcium) agit en augmentant l'alcalinité du milieu traité avec la possibilité d'atteindre un niveau de pH supérieur à 12. Cette substance présente un intérêt supplémentaire par rapport à la chaux éteinte (hydroxyde de calcium) car elle réagit avec l'eau présente pour former de l'hydroxyde de calcium (chaux éteinte) lors d'une réaction exothermique. Des températures de l'ordre de 45-100 °C peuvent être observées pendant quelques minutes, au moment de l'application de la chaux vive. Ainsi, la charge microbienne peut être réduite durant l'exposition aux températures les plus élevées, l'augmentation de la température ayant alors un effet synergique sur la dénaturation des protéines, dans un environnement alcalin. Cet effet synergique pH/température est particulièrement important dans le cas du traitement des fumiers et litières usagées d'un foyer de botulisme, car la montée en température va permettre une combustion des matières et par conséquent d'obtenir un volume restreint de matières infectées à l'issue de cette combustion. Il peut d'ailleurs être nécessaire d'arroser la chaux vive si la matière est insuffisamment humide, pour entraîner une montée en température suffisante et initier la combustion.

Dans le cas de sols en terre battue, la désinfection se fait le plus souvent avec de la chaux vive (50 kg/100 m<sup>2</sup>), éteinte avec de l'eau (de 30 à 100 L/100 m<sup>2</sup>). Il est à noter que l'on ne peut pas vraiment désinfecter de la terre, du sable, ou de l'argile<sup>36</sup>.

<sup>35</sup> Extrait de l'avis Anses 2016-SA-0196 relatif aux « [procédés efficaces de désinfection des parcours en exploitations de volailles](#) »

<sup>36</sup> <http://upchaux.fr/wp-content/uploads/2017/01/guidepratique.pdf>

### ➤ Iode et dérivés iodés

Les iodophores ont une très bonne activité à froid dans un pH acide (entre 3 et 5). Ils sont détruits à des températures excédant 40 °C. Les produits sont sensibles, surtout aux protéines et aux eaux dures. Ils ont une action corrosive sur les métaux et colorent les matériaux. Au final, ils ne sont pas aussi performants que l'hypochlorite de sodium (Gelinias *et al.* 1984, McDonnell et Russell 1999).

L'efficacité de certains désinfectants (aldéhydes et ammoniums quaternaires)<sup>37</sup> est réduite par temps froid (< 15 °C), lorsque la température ambiante est entre 0 et 5 °C (Blinov *et al.* 2014, Marois-Fiset *et al.* 2013).

En conditions expérimentales, plusieurs produits biocides et procédés ont été testés seuls ou en mélange sur des spores de *C. botulinum* (communication C. Lemaréchal)<sup>38</sup>. Les résultats obtenus montrent que :

- Les produits à base de chlore et de peroxyde d'hydrogène sont les plus efficaces.
- Les produits à base de glutaraldéhydes, ammoniums quaternaires, soude<sup>39</sup> vapeur d'eau inactivent les formes végétatives mais ne sont que partiellement efficaces sur les formes sporulées.

## 7.2.5 Protocole de désinfection et validation des opérations de décontamination

### 7.2.5.1 Protocole de désinfection

Le protocole de désinfection a déjà été évoqué en première partie.

Le choix du produit désinfectant devra s'effectuer en tenant compte des instructions données pour l'usage. D'une part, la désinfection s'effectuera avec un produit dont l'efficacité sporicide est démontrée dans le cadre du règlement Biocide sur des spores de *C. botulinum* ou sur l'une des souches modèles des normes CEN applicables. Parmi les substances actives les mieux adaptées apparaissent le chlore et les oxydants, et, d'autre part, le classement du désinfectant devra être pris en compte et les méthodes de prévention visant à éviter toute intoxication devront être mises en œuvre : port d'équipements de protection, désinfection hors présence humaine en dehors de l'applicateur et hors présence animale, gestion des effluents de produits, gestion du risque d'incendie ...

La désinfection des équipements en fonction de leur taille pourra s'effectuer par trempage ou aspersion/pulvérisation directe sur les surfaces.

La désinfection des locaux pourra s'effectuer de préférence par application directe sur les surfaces (pulvérisation, aspersion, ...).

Néanmoins, la voie aérienne paraît peu adaptée car l'étanchéité des locaux peut être difficile à réaliser, la nature de certaines surfaces peut aussi être incompatible avec le désinfectant dispersé et il peut être difficile d'assurer une concentration optimale du désinfectant dans tout le local. La désinfection par voie aérienne pourrait néanmoins être privilégiée pour les systèmes et équipements aérauliques.

La désinfection par aspersion/pulvérisation directe sur les surfaces paraît plus adaptée pour les locaux, l'utilisation d'un désinfectant sous forme de mousse ou de gel pourrait être une bonne alternative aux formulations liquides pour réduire la quantité d'effluent et visualiser le dépôt du désinfectant sur les surfaces, en particulier verticales, pour s'assurer que toutes les zones à désinfecter sont atteintes.

Le temps de contact entre les surfaces à désinfecter et le désinfectant doit être le plus long possible (supérieur à une heure) et conforme à *minima* au temps de contact autorisé sur l'étiquette pour atteindre le meilleur résultat possible.

La température est un facteur essentiel à l'efficacité du produit et la désinfection sera plus efficace si elle est effectuée dans des locaux chauffés si besoin, pour atteindre une température d'au moins 20 °C.

Il est à noter que certains produits désinfectants ont une efficacité à une température de 10°C, qui est la température obligatoire des normes CEN du domaine vétérinaire.

Après désinfection, les locaux et équipements doivent être aérés pour évacuer les résidus du désinfectant pouvant exercer une éventuelle toxicité sur l'être humain ou les animaux.

<sup>37</sup> [Low Temperature Performance of Disinfectants | The Poultry Site](#)

<sup>38</sup> Dossier de test et de validation Des procédés de décontamination de *C. botulinum* dans le cadre des activités du LNR botulisme aviaire (Code Projet : Projet LNR botulisme aviaire 16-1, révision 01 du 18/04/2016, Code du dossier de validation : DV désinfectants Révision 00 du 19/04/2016). Laboratoire de Ploufragan-Plouzané (Unité HQPAP)

<sup>39</sup> À noter que la soude n'est pas notifiée au programme d'examen des substances actives du règlement 528/2012 et ne peut pas être utilisé en tant que désinfectant.

### 7.2.5.2 Validation des opérations de désinfection

Il conviendra de s'assurer de la qualité des opérations de décontamination avec des phases de validation, d'une part de l'étape de nettoyage et d'autre part de l'étape de désinfection, sur la base de procédures de contrôle pré-établies et adaptées aux spores de *C. botulinum* et aux surfaces à traiter.

Pour cela, il est recommandé après désinfection de réaliser des prélèvements pour rechercher la présence éventuelle de *C. botulinum*. Les prélèvements seront effectués dans différentes zones de l'élevage et sur différentes matrices, tel que proposé dans l'étude de Souillard *et al.* (2014).

Du fait de la persistance possible de spores jusqu'à plusieurs années dans l'environnement, les récurrences de botulisme sont fréquentes dans les élevages. L'efficacité des opérations de nettoyage et de désinfection des bâtiments d'élevage après un épisode de botulisme est donc une étape cruciale pour prévenir les récurrences.

La validation des opérations de désinfection s'applique également aux entreprises agro-alimentaires. Dans ce contexte, les méthodes préconisées visent à :

- Détecter/quantifier les micro-organismes présents sur les surfaces par empreinte sur gélose ou en utilisant un objet frottant. L'utilisation de ces méthodes permet généralement de valider une opération de désinfection.
- Détecter/quantifier des molécules indicatrices de souillures. L'utilisation de ces méthodes permet le plus souvent de valider une opération de nettoyage.

De surcroît, il est impératif de neutraliser d'éventuels résidus de désinfectant avant d'effectuer le prélèvement, ces derniers pourraient affecter la cultivabilité des micro-organismes et donc le résultat par des méthodes culturales. De fait, un neutralisant doit être incorporé aux géloses utilisées pour faire des empreintes et les objets frottants doivent être humidifiés par une solution neutralisante. Un neutralisant spécifique du principe actif du désinfectant ou un neutralisant polyvalent comme celui recommandé dans la norme ISO 18593<sup>40</sup> peut être utilisé.

Enfin, il convient de noter que tout doit concourir à optimiser le résultat des opérations de N&D, par le respect des principes hygiéniques de construction et de fonctionnement (principe de Schwarz, séparation des secteurs (zonage), non entrecroisement...) et l'utilisation de matériaux et de matériels performants, y compris hygiéniquement (démarche de conception hygiénique des matériels).

### 7.2.5.3 Exemples de cas pratiques en élevage

Selon les protocoles de nettoyage/désinfection transmis par les groupements d'élevage, les étapes suivantes sont décrites :

- Chaque élevage dispose d'un protocole de nettoyage et désinfection à appliquer en routine.
- En cas de survenue d'un foyer de botulisme, un protocole renforcé s'applique. Les opérations de nettoyage/désinfection peuvent être réalisées par l'éleveur lui-même ou par un professionnel du nettoyage et de la désinfection qui intervient comme prestataire de service sur tout ou partie des opérations.
- Après balayage et démontage des installations, les bâtiments sont lavés à l'aide d'un détergent. Le sol est décontaminé une première fois par pulvérisation à l'aide de soude caustique liquide ou épandage de chaux vive. Les parois, jupes et lanterneaux sont désinfectés à l'aide d'un désinfectant (à base d'ammoniums quaternaires + glutaraldéhyde + chlorocrésol, ou bis (peroxymonosulfate) bis (sulfate) de pentapotassium + dichloroisocyanurate de sodium ou de formaldéhyde). Après mise en place de la litière, une deuxième désinfection est réalisée.
- Les abords des bâtiments et les voies de circulation sont chaulés ou pulvérisés de soude caustique.

<sup>40</sup> ISO 18593:2018 - Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthodes horizontales pour les prélèvements de surface

Par ailleurs, les canalisations d'eau destinées à la consommation humaine ou animale sont d'abord nettoyées avec des détergents acide ou alcalin, avant une étape de désinfection avec un désinfectant généralement à base de peroxyde d'hydrogène.

Il est à noter que l'eau de réseau destinée à la consommation humaine et animale est désinfectée chimiquement avec des produits désinfectants (TP5) depuis les usines de traitement de l'eau. Le chlore est la substance active biocide la plus utilisée pour la désinfection chimique de l'eau de consommation.

- Un contrôle microbiologique de l'efficacité des opérations de nettoyage et de désinfection peut être réalisé par des prélèvements d'environnement (en privilégiant des chiffonnettes imbibées de neutralisant ; puis un stockage au congélateur (température inférieure à -18°C) est conseillé jusqu'à mise en analyse au laboratoire pour la recherche de *C. botulinum*).

Un autre exemple de chantier de nettoyage désinfection en élevage est présenté dans une étude de cas suite à un épisode de botulisme dans un élevage bovin (Le Maréchal *et al.* 2019). Le chantier a démarré par le démontage de l'ensemble des éléments qui pouvaient l'être puis par une phase de nettoyage. Celle-ci a été réalisée à l'aide d'un produit détergent moussant qui a été appliqué avec un appareil haute-pression. Cette phase de nettoyage a été suivie d'une désinfection avec un produit à base de formaldéhyde, appliqué au pistolet à mousse. Après ces opérations initiales, les prélèvements effectués à l'aide de chiffonnettes ont fourni des positifs au niveau de certains équipements et un second nettoyage-désinfection (à base de formaldéhyde) a été mis en œuvre, avec notamment cette fois-ci le trempage des équipements une fois démontés. *C. botulinum* n'a pas été détecté au niveau des échantillons collectés après ce deuxième nettoyage/désinfection.

Il convient de rappeler que la norme U47-900 relative à la désinfection des élevages après un épisode infectieux spécifie les opérations de désinfection d'un bâtiment à réaliser dans le cas d'un épisode infectieux. Par ailleurs, si ce document ne traite pas des opérations réalisées en amont de la désinfection, dont le nettoyage qui est une des étapes qui conditionnent l'efficacité de la désinfection, il traite du contrôle des opérations de nettoyage.

Les opérations de décontamination, en particulier les opérations de nettoyage et désinfection, constituent une phase essentielle dans la gestion des foyers de botulisme, la principale difficulté rencontrée étant la résistance importante des spores de *C. botulinum* qui assurent la pérennité de la bactérie dans tous les environnements contaminés. Des opérations de décontamination renforcées sont nécessaires notamment dans les élevages atteints, dans les établissements agro-alimentaires (abattoirs, ateliers de découpes, usines de transformation) ayant reçu des animaux et produits issus de ces élevages. Les foyers de botulisme en faune sauvage mais aussi les parcours/patures pour les élevages sont également concernés.

Tout en étant renforcées, les opérations de nettoyage à sec (balayage, brossage, dépoussiérage, raclage et de nettoyage) et humide (application de détergent, décapage à haute pression, entre autres) pour *C. botulinum* sont analogues à celles pratiquées pour d'autres maladies infectieuses.

En revanche, une double désinfection chimique est nécessaire avec le choix d'un produit dont l'efficacité sporicide est démontrée dans le cadre du règlement Biocide sur des spores de *C. botulinum* ou sur l'une des souches modèles des normes CEN applicables (d'après la littérature, les oxydants, halogénés et aldéhydes sont les plus efficaces).

Des procédés de désinfection physiques existent également, comme le traitement par rayonnement ou le traitement thermique, mais le traitement par rayonnement n'est pas adapté aux élevages et il existe peu d'informations sur l'efficacité des procédés thermiques pour l'élimination de *C. botulinum* en élevage.

Il convient, en outre, de s'assurer de la qualité de ces opérations de décontamination en élevage avec des phases de validation, d'une part, de l'étape de nettoyage, et d'autre part, de l'étape de désinfection, sur la base de procédures de contrôles préétablies et adaptées aux surfaces à traiter. Des prélèvements devraient être effectués à différents endroits de l'élevage et sur les différentes surfaces (en ayant soin de neutraliser l'activité du désinfectant encore présent). Il est possible, à cet égard, de s'inspirer des méthodes de détection/quantification utilisées dans les établissements agroalimentaires pour y valider les opérations de nettoyage et désinfection.

## 8 Synthèse et conclusion du groupe de travail

Ce rapport de mise à jour des connaissances sur les différentes formes des types C, D, mosaïques C/D et D/C et E de *Clostridium botulinum* est la première étape de l'expertise collective permettant de traiter les saisines 2019-SA-0112 à 2019-SA-0115. Les particularités de *C. botulinum*, la multiplicité de ses formes (végétative, spore) et de ses toxines et des interrelations entre les différents compartiments animaux ou environnementaux nécessitaient d'établir avec un groupe multidisciplinaire d'experts un état des lieux des connaissances actuelles en matière d'épisodes de botulisme et des outils de prévention à disposition. Les questions d'évaluation de risque seront traitées dans un second temps par des groupes de travail (GT) spécifiques à chaque thématique (bovins et volailles ; décontamination ; faune sauvage et environnement), en s'appuyant sur ce rapport.

Après une introduction générale présentant les caractéristiques de *C. botulinum*, qui permet de comprendre sa grande diversité, les toxines botuliques et la réglementation afférente, le GT s'est plus particulièrement intéressé aux types C, D, mosaïques C/D et D/C et E. Ont aussi été explorés la maladie dans l'espèce humaine et pour les espèces animales concernées par les saisines (bovins, oiseaux et poissons), la présence des différentes formes et types de *C. botulinum* dans les denrées alimentaires d'origine animale et les méthodes et procédés d'inactivation existants et utilisables. Chacun de ces volets a été traité et développé en vue d'apporter les connaissances nécessaires au traitement des questions d'évaluation de risque portées par les saisines. La synthèse de ce travail conséquent est présentée ci-dessous.

- **Considérations générales sur *Clostridium botulinum***

Le GT s'est d'abord intéressé à *C. botulinum*, qui est constitué d'un ensemble de souches (et même d'espèces) bactériennes dont le point commun est la capacité à synthétiser une toxine botulique. Les souches de *Clostridium* productrices de toxine botulique sont classées aujourd'hui en six groupes (groupes I à VI) en fonction de leurs caractéristiques biochimiques (notamment protéolytiques) et génétiques. La classification basée sur le type de toxine produite par les souches (9 types classés de A à H et le type X) est actuellement la plus employée, c'est celle qui est retenue dans ce rapport.

Les neurotoxines botuliques sont responsables du botulisme, une affection neurologique dont le mécanisme d'action est l'inhibition de la libération synaptique de l'acétylcholine, ce qui entraîne des paralysies pouvant conduire à la mort. Les neurotoxines botuliques se distinguent entre elles par des différences de spécificité d'hôte, de cibles moléculaires, de toxicité. *C. botulinum* a la capacité de sporuler, ce qui permet aux souches de résister lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables à la forme végétative. La forme sporulée confère également une résistance aux procédés physiques ou chimiques mis en œuvre par exemple lors d'un traitement thermique ou d'une désinfection. La formation de ces spores est envisageable dans un grand nombre d'environnements naturels. La synthèse des neurotoxines de *C. botulinum* est possible dans une très large variété de conditions environnementales et est favorisée par les mêmes conditions que celles favorisant la multiplication des cellules et *in fine* la production des spores.

Le GT a ensuite fait le bilan sur la présence de *C. botulinum* dans l'environnement. Il est intéressant de noter que *C. botulinum* est une bactérie sporulée tellurique anaérobie présente sur tous les continents, dans la terre, l'eau et les sédiments marins et d'eau douce. La répartition géographique et la prévalence des différents types toxiniques varient selon les écosystèmes. *C. botulinum*, comme sa toxine peuvent être stockés dans les tissus de certains végétaux (notamment des algues) et animaux, notamment des invertébrés (mollusques bivalves et larves d'insectes). Les poissons et l'avifaune peuvent héberger ou multiplier la bactérie dans leur tube digestif. La décomposition des espèces végétales ou des cadavres d'animaux contaminés (tels que poissons, oiseaux, mammifères) représente un terrain optimal pour le développement bactérien et la production de toxines, favorisant ainsi des chaînes de transmission qui permettent à la bactérie d'atteindre d'autres espèces cibles sensibles à la toxine.

Les types C, D et mosaïques C/D ou D/C sont, dans l'espace naturel, plus étroitement associés aux zones humides riches en sédiments (marais, étangs et lacs) propices à leur développement. Le type E est, quant à lui, étroitement associé aux écosystèmes aquatiques, marins ou d'eau douce dans lesquels la faune aquatique et plus particulièrement les poissons jouent un rôle central. Un certain nombre de facteurs (climatiques et pollutions générées par les activités humaines entre autres) contribuent au dérèglement des écosystèmes et les rendent plus propices au développement de *C. botulinum*. La connaissance de ces facteurs peut permettre d'identifier et de mettre en place des mesures de gestion (notamment la collecte et la destruction des cadavres d'animaux dans les zones à risque), pour tenter d'en maîtriser les effets ou de les prévenir.

L'arsenal réglementaire est adapté aux spécificités de *C. botulinum* et à ses conséquences tant en santé publique qu'en santé animale. Si au niveau européen le botulisme est pris en compte via la surveillance des zoonoses et des agents zoonotiques et la protection des travailleurs (exposition à des agents biologiques au travail), son encadrement réglementaire est plus drastique au niveau national. C'est une maladie à déclaration obligatoire, tant chez l'être humain que chez l'animal, quelle que soit l'espèce atteinte. Dans les deux cas, la réalisation des analyses biologiques nécessaires au diagnostic du botulisme relève des dispositions sur la protection des travailleurs mais aussi de la réglementation des « micro-organismes et toxines » (MOT).

- **Maladie humaine et aspect zoonotique**

D'une manière générale, le botulisme humain est une maladie rare et létale (de 1 à 10% de décès selon les formes cliniques). Il existe plusieurs formes de botulisme, selon le mode de contamination et d'exposition à la toxine. Le botulisme alimentaire en est la forme la plus fréquente. La suspicion clinique et le diagnostic présumé sont posés sur la base des signes cliniques et des informations épidémiologiques. Le diagnostic est confirmé par la détection et l'identification de la toxine botulique ou de la bactérie. Le traitement est symptomatique et peut être complété, le plus rapidement possible, par l'administration d'une antitoxine heptavalente.

L'analyse des données de surveillance du botulisme humain dans le monde sur la période 1976-2018 confirme que les formes de botulisme très majoritaires sont le botulisme alimentaire et infantile, les types de toxines botuliques en cause sont les types A et B puis E, occasionnellement F. Sur cette période, le GT n'a pu mettre en évidence aucun cas de type C, C/D, D ou D/C.

Parmi les types de botulisme existant chez l'être humain, le GT s'est intéressé plus spécialement au botulisme de type E. Majoritairement d'origine pisciaire, ce type de botulisme prédomine dans les zones arctiques et pays proches. La mortalité associée est inférieure à 5%.

Pour traiter la question d'un potentiel aspect zoonotique des types C et D, le GT a analysé dans le détail les publications existantes sur les rares cas recensés de par le monde depuis les années 1950. Les articles originaux ont été retrouvés et leur lecture critique a permis d'établir une relation causale entre l'exposition à la toxine botulique et/ou *C. botulinum* de type C et la survenue de cas de botulisme humain (deux foyers confirmés). Néanmoins, les sources de contamination n'ont pas été formellement confirmées et une incertitude faible demeure sur l'origine zoonotique de ces cas. S'agissant du type D, un seul foyer de botulisme alimentaire a été identifié dans le monde sur la période étudiée, pour lequel l'exposition à la toxine botulique de type D est suspectée. La faible sensibilité de l'être humain aux toxines C, D et mosaïque est l'hypothèse privilégiée pour expliquer la quasi-absence de cas liés aux types C, D, C/D, D/C.

- **Le botulisme chez l'animal**

Pour ce qui est du botulisme animal, le GT s'est intéressé aux épisodes de botulisme en élevage et a établi les cycles épidémiologiques de cette affection chez les bovins et les volailles. Il en ressort que les véhicules de contamination du botulisme en élevage pour ces espèces sont les aliments et l'eau, qui peuvent être contaminés directement par deux sources prépondérantes : les cadavres d'animaux et les fumiers. Dans une moindre mesure, cette contamination peut se faire indirectement via le matériel, l'opérateur, les fèces d'animaux, la contamination aéroportée, le sol.

Le GT a également étudié les doses toxiques, qui sont variables en fonction des types de botulisme et de l'espèce animale. Il est ainsi possible de dresser une comparaison de la sensibilité des espèces animales, avec par ordre décroissant : les bovins > les dindes et faisans > les poulets > les carnivores > le porc (considéré comme particulièrement résistant aux différents types de toxines).

Les poissons sont également assez résistants à toutes les toxines à l'exception de la toxine E, même si cette sensibilité est très variable selon les espèces considérées.

L'une des difficultés du diagnostic du botulisme animal est liée à l'absence de norme pour la détection de l'agent pathogène ou de sa toxine. Les différentes méthodes existantes, que ce soit pour le diagnostic du botulisme animal ou l'analyse des aliments du bétail et l'environnement des élevages comportent de nombreuses variantes dans leurs protocoles selon les équipes. L'analyse des résultats nécessite l'étude précise de la méthode utilisée.

En élevage, les types recherchés en priorité sont les types C, D, C/D et D/C, par détection de la toxine botulique ou de la bactérie et du/es gènes codant la/les toxines.

La détection de *C. botulinum* se fait en général par PCR sur fèces, contenus digestifs et organes après enrichissement en bouillon anaérobie.



La détection de la toxine botulique peut se faire en principe par le test sur souris ou un test ELISA (mais ces tests ne sont pas disponibles en pratique pour les types C, D et mosaïques). Reste l'endopeptidase-MS, généralement plus sensible que la méthode souris, qui n'est pas encore utilisée en France en routine.

En France, le diagnostic vétérinaire sur prélèvement animal peut être réalisé par 3 structures différentes : CNR, LNR et laboratoires d'analyses vétérinaires (ces derniers réalisent uniquement la PCR). L'analyse des autres échantillons (aliment, environnement...) nécessite de détenir des autorisations spécifiques et ne peut donc être mise en œuvre que par le CNR et le LNR.

Concernant le botulisme chez les bovins en France, ce sont en moyenne une dizaine de foyers qui sont confirmés chaque année. Ces foyers impliquent essentiellement des élevages laitiers et sont principalement de type D/C, mais également de type C. La maladie entraîne très fréquemment la mort dans un laps de temps allant de quelques heures à plusieurs jours. La confirmation d'une suspicion clinique est réalisée par le laboratoire à partir de différents prélèvements cliniques ou nécropsiques et environnementaux.

Le portage digestif de *C. botulinum* par les bovins a pu être mis en évidence par diverses études de terrain en Europe, que cela soit chez des animaux indemnes ou convalescents d'élevages atteints ou même chez des animaux sains d'élevage n'ayant connu aucun épisode de botulisme. En dehors de tout contexte de botulisme, ce portage digestif apparaît, lorsqu'il est détecté, d'un niveau très réduit (à la limite de détection des méthodes de laboratoire).

Aucun traitement curatif n'est considéré comme efficace chez les bovins. La prophylaxie médicale est envisageable en ayant recours à un vaccin bivalent (anatoxines C et D) non distribué en France, mais disponible dans le cadre d'une ATU. Cette vaccination, dont l'effet protecteur ne s'installe qu'un mois après l'injection, peut être envisagée dans un contexte local défavorable ou, beaucoup plus fréquemment, au sein d'un foyer de manière à le prémunir de l'apparition de nouveaux cas cliniques.

Les mesures de prévention et de maîtrise sanitaires, ainsi que le respect des mesures de biosécurité, représentent les moyens les plus efficaces pour limiter et prévenir la contamination des élevages bovins par différentes sources bien identifiées, comme la présence de cadavres d'animaux dans l'alimentation, la contamination initiale et la mauvaise conservation des fourrages ensilés, la présence d'élevages de volailles à proximité (ou d'élevages mixtes), l'épandage de fumier de volaille sur les pâtures ou non loin de l'élevage.

Concernant le botulisme chez les oiseaux en France, ce sont en moyenne une trentaine de foyers qui sont confirmés chaque année en France dans les élevages de volailles et une vingtaine de cas en faune sauvage (principalement des anatidés). Ces foyers impliquent principalement le type C/D chez les oiseaux sauvages et dans les élevages de poulets de chair et de dindes, mais également le type D ou D/C dans les élevages de dindes uniquement.

L'atteinte clinique des animaux se manifeste généralement par une paralysie ascendante et une augmentation rapide du taux de mortalité. La confirmation d'une suspicion clinique est réalisée par le laboratoire à partir de l'analyse des foies prélevés sur des animaux en phase clinique.

L'existence et la prévalence d'un portage digestif de *C. botulinum* par les oiseaux restent peu documentées à ce jour.

La gestion des épisodes en élevage repose sur la mise en place d'un traitement antibiotique ( $\beta$ -lactamines) qui permet de limiter la mortalité dans les lots atteints.

Les facteurs d'initiation des foyers de botulisme aviaire en élevages sont encore peu connus. Une gestion efficace de la biosécurité (contrôle des espèces indésirables dans l'élevage, conditions de stockage et de distribution des aliments, ramassage régulier des cadavres d'animaux, etc.) est indispensable pour prévenir l'apparition des épisodes.

Enfin, le botulisme chez le poisson est causé, dans la quasi-totalité des cas, par *C. botulinum* de type E. La maladie peut affecter des espèces marines ou d'eau douce, sauvages ou d'élevage.

La maladie passe généralement inaperçue dans le milieu naturel et la description des signes cliniques résulte des observations faites à la suite d'inoculations expérimentales ou dans les élevages atteints. Les signes cliniques sont principalement une paralysie musculaire progressive, une léthargie et la mort qui survient souvent rapidement. Le diagnostic est confirmé avec l'identification de la toxine dans le sang et le tractus digestif des poissons malades.

Les mesures préventives sont axées en particulier sur la biosécurité (élimination régulière des cadavres d'animaux et entretien des bassins d'élevage) et une alimentation sécurisée. Ces mesures ont contribué à rendre très rares les signalements de botulisme chez les poissons d'élevage.

L'analyse des données de surveillance en France a montré que, sur la période 2009-2019, 592 foyers de botulisme animal ont été recensés par les laboratoires et centres nationaux de référence, principalement chez les oiseaux sauvages, les oiseaux d'élevage et les bovins. Cette analyse est en cohérence avec la littérature scientifique.

Le type mosaïque C/D représente la forme dominante chez les oiseaux, qu'il s'agisse des oiseaux sauvages ou des oiseaux d'élevage, suivi des types D et D/C. Chez les bovins, c'est la toxine botulique mosaïque D/C qui est très largement majoritaire suivie de la forme C. Le type E n'a été retrouvé qu'à trois reprises chez les oiseaux sauvages en 2018, de manière concomitante avec le type C/D.

L'aspect saisonnier de la maladie a pu être mis en évidence chez les oiseaux sauvages et d'élevage avec une incidence significativement plus élevée au cours du troisième trimestre et dans une moindre mesure au cours du quatrième trimestre de chaque année. La majorité des foyers en élevages de bovins et de volailles sont apparus dans le grand ouest de la France, zone d'élevage importante, mais des cas groupés ont pu être observés dans d'autres régions.

À l'exception du type E, détecté à 3 reprises sur des oiseaux sauvages, les types de botulisme retrouvés dans les foyers de botulisme animal sont différents de ceux identifiés dans les foyers humains ces dix dernières années en France et aucun foyer de botulisme humain investigué par Santé Publique France et le CNR n'a été rattaché à un foyer de botulisme animal.

L'analyse des données de surveillance est à croiser avec l'amélioration des techniques d'analyse (notamment leur sensibilité), qui a permis à partir de 2010 un diagnostic de plus en plus fin, l'identification des formes mosaïques C/D et D/C et une meilleure confirmation des cas. Cependant, il est probable qu'une part non négligeable de cas cliniques ne fassent pas l'objet d'un diagnostic de confirmation au laboratoire et de ce fait ne puissent être recensés. L'importance de cette sous déclaration est difficile à évaluer et varie vraisemblablement selon les catégories d'espèces.

- **Maîtrise de *Clostridium botulinum***

La gravité du botulisme a conduit les acteurs de la chaîne alimentaire à se préoccuper de *Clostridium botulinum*. En pratique, l'implication importante des types A et B chez l'être humain a favorisé les études les concernant, tandis que les types C et D souffrent d'un déficit d'informations. L'état actuel des connaissances ne permet pas de remettre en cause le principe admis selon lequel les mesures appliquées dans l'industrie agroalimentaire pour maîtriser les *C. botulinum* de type A et B seraient efficaces pour les types C et D. Les cellules végétatives et les toxines botuliques, quel que soit leur type, ne semblent pas présenter de résistance particulière. Ceci semble plus évident pour les traitements thermiques et pour certains autres traitements physiques athermiques (ionisation, UV pulsés). Le type E semble légèrement plus sensible que le type A, permettant de tenir le même raisonnement pour les traitements thermiques (spores et toxines), les traitements ionisants (spores) ainsi que les traitements plasmas froids atmosphériques (spores). Dans le cas particulier du barocomportement de *C. botulinum*, il n'est pas actuellement possible d'extrapoler ou d'étendre les connaissances acquises sur le type A aux autres types. L'acquisition préalable de données spécifiques en la matière est impérative. Plus généralement, l'acquisition de données spécifiques aux types étudiés par le GT devrait être recommandée au cas par cas, au titre de validation du raisonnement exposé *in supra*.

Les traitements d'élimination, bactofugation et filtration du lait, basés sur des critères physiques n'entraînent pas de différence de comportement entre les groupes, ni de phénomène de résistance. Leur efficacité, réelle, est cependant limitée, ils doivent être utilisés en combinaison si l'objectif est un abattement supérieur à 2 logs.

En pratique, et en particulier pour les denrées alimentaires d'origine animale, la maîtrise de *C. botulinum* est obtenue par l'action combinée de plusieurs mesures : traitement thermique, ajout de sel ou séchage, ajout de nitrites ou autres conservateurs, fumage, réfrigération et/ou limitation de la durée de vie de l'aliment.

Le biocontrôle ou la biopréservation constituent des voies de maîtrise de *C. botulinum* qui méritent d'être investiguées, ce micro-organisme n'étant pas connu pour être un grand « compétiteur ». Divers travaux ont montré des retards dans la production des neurotoxines botuliques, voire une inhibition totale dans diverses denrées alimentaires d'origine animale.

Enfin, les opérations de décontamination, en particulier les opérations de nettoyage et désinfection, constituent une phase essentielle dans la gestion des foyers de botulisme, la principale difficulté rencontrée étant la résistance importante des spores. Des opérations de décontamination renforcée s'imposent notamment dans les élevages atteints, dans les établissements agro-alimentaires (abattoirs, ateliers de découpes, usines de transformation) ayant reçu des animaux et produits issus de ces élevages, voire, lorsqu'elles y sont applicables, dans le milieu naturel. Tout en étant renforcées, les opérations de nettoyage à sec et de nettoyage humide pour *C. botulinum* sont analogues à celles pratiquées pour d'autres agents infectieux. En revanche, une double

désinfection chimique est nécessaire avec le choix d'un produit dont l'efficacité sporicide est démontrée. Des procédés de désinfection physiques existent également, mais ne sont pour l'heure pas applicables en élevage. Pour l'instant, même s'il n'existe pas de phases de validation des opérations de nettoyage et décontamination en élevage, faute de procédures de contrôles adaptées à ce danger sanitaire et aux surfaces à traiter, celles-ci pourraient être développées en s'inspirant des méthodes de détection/quantification utilisées dans les établissements agroalimentaires.

**Date de validation du rapport d'expertise collective par le groupe de travail et par le comité d'experts spécialisé santé et bien-être des animaux : 12 janvier 2021**

## 9 Bibliographie

- Abrahamsson, K., et H. Riemann. 1971. "Prevalence of Clostridium botulinum in semipreserved meat products." *Appl Microbiol* 21 (3):543-544.
- ACMSF. 2020. "(Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food) Subgroup on non-proteolytic *Clostridium botulinum* and vacuum and modified atmosphere packaged foods. Final report. <https://acmsf.food.gov.uk/acmsfpreps/acmsfreports>." ACMSF.
- AFSSA. 2002. "Rapport sur le botulisme d'origine aviaire et bovine." Rapport du comité d'experts spécialisé « Santé animale » de l'AFSSA. Maisons-Alfort: AFSSA. 82 p.
- Allison, M. J., S. E. Maloy, et R. R. Matson. 1976. "Inactivation of Clostridium botulinum toxin by ruminal microbes from cattle and sheep." *Appl Environ Microbiol* 32 (5):685-8. doi: 10.1128/aem.32.5.685-688.1976.
- Amass, S. F., D. Ragland, et P. Spicer. 2001. "Evaluation of the efficacy of a peroxygen compound, Virkon (R) S, as a boot bath disinfectant." *Journal of Swine Health and Production* 9 (3):121-123.
- Anderson, Jaime, Patrick T. Williams, Alexandre M. Katos, Mark Krasna, Whitney Burrows, et Corey J. Hilmas. 2009. "CHAPTER 30 - Botulinum Toxin." Dans *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, édité par Ramesh C. Gupta, 407-432. San Diego: Academic Press.
- Anniballi, F., B. Auricchio, E. Delibato, M. Antonacci, D. De Medici, et L. Fenicia. 2012. "Multiplex real-time PCR SYBR Green for detection and typing of group III Clostridium botulinum." *Vet Microbiol* 154 (3-4):332-8. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.07.018.
- Anniballi, F., B. Auricchio, A. Fiore, D. Lonati, C. A. Locatelli, F. Lista, S. Fillo, G. Mandarino, et D. De Medici. 2017. "Botulism in Italy, 1986 to 2015." *Eurosurveillance* 22 (24):30550.
- Anniballi, F., B. Auricchio, C. Woudstra, P. Fach, A. Fiore, H. Skarin, L. Bano, B. Segerman, R. Knutsson, et D. De Medici. 2013. "Multiplex real-time PCR for detecting and typing Clostridium botulinum group III organisms and their mosaic variants." *Biosecur Bioterror* 11 Suppl 1 (Suppl 1):S207-14. doi: 10.1089/bsp.2012.0084.
- Anniballi, F., A. Fiore, C. Löfström, H. Skarin, B. Auricchio, C. Woudstra, L. Bano, B. Segerman, M. Koene, V. Båverud, T. Hansen, P. Fach, A. Tevell Aberg, M. Hedeland, E. Olsson Engvall, et D. De Medici. 2013. "Management of animal botulism outbreaks: from clinical suspicion to practical countermeasures to prevent or minimize outbreaks." *Biosecur Bioterror* 11 Suppl 1:S191-9. doi: 10.1089/bsp.2012.0089.
- Anses. 2017. "Illustrations et actualisation des recommandations pour l'évaluation du poids des preuves et l'analyse d'incertitude à l'Anses." Maisons-Alfort. 80 p.
- Anses. 2020. "Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : "*Clostridium botulinum*, *Clostridium* neurotoxigènes". Maisons-Alfort: Anses. 5 p.
- Anza, I., D. Vidal, J. Feliu, E. Crespo, et R. Mateo. 2016. "Differences in the Vulnerability of Waterbird Species to Botulism Outbreaks in Mediterranean Wetlands: an Assessment of Ecological and Physiological Factors." *Appl Environ Microbiol* 82 (10):3092-9. doi: 10.1128/aem.00119-16.
- Anza, I., D. Vidal, C. Laguna, S. Díaz-Sánchez, S. Sánchez, A. Chicote, M. Florín, et R. Mateo. 2014. "Eutrophication and Bacterial Pathogens as Risk Factors for Avian Botulism Outbreaks in Wetlands Receiving Effluents from Urban Wastewater Treatment Plants." *Appl Environ Microbiol* 80 (14):4251-4259. doi: 10.1128/aem.00949-14.
- Arnon, S. S., R. Schechter, T. V. Inglesby, D. A. Henderson, J. G. Bartlett, M. S. Ascher, E. Eitzen, A. D. Fine, J. Hauer, M. Layton, S. Lillibridge, M. T. Osterholm, T. O'Toole, G. Parker, T. M. Perl, P. Russell, D. L. Swerdlow, K. Tonat, et for the Working Group on Civilian Biodefense. 2001. "Botulinum Toxin as a Biological Weapon: Medical and Public Health Management." *JAMA* 285 (8):1059-1070. doi: 10.1001/jama.285.8.1059.
- Aureli, Paolo, Lucia Fenicia, Beatrice Pasolini, Monica Gianfranceschi, Loretta M. McCroskey, et Charles L. Hatheway. 1986. "Two Cases of Type E Infant Botulism Caused by Neurotoxigenic Clostridium butyricum in Italy." *The Journal of Infectious Diseases* 154 (2):207-211. doi: 10.1093/infdis/154.2.207.
- Bano, L. 2019. "Botulism in farmed animals." Workshop on risk associated with animal botulism and ANIBOTNET final meeting, Maisons-Alfort.
- Bano, L., I. Drigo, E. Tonon, F. Agnoletti, D. Giovanardi, et E. Morandini. 2013. "Rice hulls as a possible source of Clostridium botulinum type C spores for poultry." *Vet Rec* 173 (17):427-8. doi: 10.1136/vr.f6521.
- Bano, L., I. Drigo, E. Tonon, G. Berto, A. Tavella, C. Woudstra, K. Capello, et F. Agnoletti. 2015. "Evidence for a natural humoral response in dairy cattle affected by persistent botulism sustained by non-chimeric type C strains." *Anaerobe* 36:25-29. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.09.007>.
- Bano, L., I. Drigo, E. Tonon, S. Pascoletti, C. Puiatti, F. Anniballi, B. Auricchio, F. Lista, C. Montecucco, et F. Agnoletti. 2017. "Identification and characterization of Clostridium botulinum group III field strains by

- matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)." *Anaerobe* 48:126-134.
- Barash, J. R., et S. S. Arnon. 2014. "A novel strain of *Clostridium botulinum* that produces type B and type H botulinum toxins." *J Infect Dis* 209 (2):183-91. doi: 10.1093/infdis/jit449.
- Barr, J. R., H. Moura, A. E. Boyer, A. R. Woolfitt, S. R. Kalb, A. Pavlopoulos, L. G. McWilliams, J. G. Schmidt, R. A. Martinez, et D. L. Ashley. 2005. "Botulinum neurotoxin detection and differentiation by mass spectrometry." *Emerg Infect Dis* 11 (10):1578-83. doi: 10.3201/eid1110.041279.
- Barras, S. C., et J. A. Kadlec. 2000. "Abiotic predictors of avian botulism outbreaks in Utah." *Wildlife Society Bulletin*:724-729.
- Beecham, R., T. Thomas, D. X. Gao, et P. S. Gaunt. 2014. "The effects of a sublethal dose of botulinum serotype E on the swimming performance of channel catfish fingerlings." *Journal of Aquatic Animal Health* 26 (3):149-153.
- Bergey, D. H., F. C. Harrison, R. S. Breed, B. W. Hammer, et F. M. Huntoon. 1923. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Edité par 1st ed. Baltimore.
- Bernardor, J., J. Neveu, H. Haas, G. Pitelet, M. R. Popoff, C. Mazuet, E. Bérard, C. Boulay, et B. Chabrol. 2018. "Infant botulism: Two case reports and electroneuromyogram findings." *Archives de Pédiatrie* 25 (5):340-343.
- Birch, T. B., et T. P. Bleck. 2019. "Botulism (*Clostridium botulinum*)." Dans *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (9th Edition)*, édité par John E. Bennett, Raphael Dolin et Martin J. Blaser. Philadelphia: W.B. Saunders.
- Black, Elaine P, Peter Setlow, Ailsa D Hocking, Cynthia M Stewart, Alan L Kelly, et Dallas G Hoover. 2007. "Response of spores to high-pressure processing." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 6 (4):103-119.
- Blinov, V., K. Volchek, C. Brown, et E. Rohonczy. 2014. "Cold weather decontamination/disinfection methods and technologies." Proceedings of the Thirty-Seventh Arctic and Marine Oil Spill Program (AMOP) Technical Seminar.
- Blomqvist, G., H. Skarin, A. Lindberg, V. Båverud, et B. Engström. 2009. "Surveillance for *Clostridium botulinum* type C or C/D in Swedish broilers." The 16th World Vet Poultry Congress.
- Böhm, R. 1998. "Disinfection and hygiene in the veterinary field and disinfection of animal houses and transport vehicles." *International biodeterioration & biodegradation* 41 (3-4):217-224.
- Bohnel, H., et F. Gessler. 2013. "Presence of *Clostridium botulinum* and botulinum toxin in milk and udder tissue of dairy cows with suspected botulism." *Vet Rec* 172 (15):397. doi: 10.1136/vr.100418.
- Böhnel, H., B. Schwagerick, et F. Gessler. 2001. "Visceral botulism—a new form of bovine *Clostridium botulinum* toxication." *Journal of Veterinary Medicine Series A* 48 (6):373-383.
- Borland, E. D. 1976. "Outbreak of botulism in reared East Anglian pheasants." *Vet Rec* 99 (11):220-221.
- Bott, T. L., J. S. Deffner, E. McCoy, et E. M. Foster. 1966. "*Clostridium botulinum* type E in fish from the Great Lakes." *J Bacteriol* 91 (3):919-924. doi: 10.1128/JB.91.3.919-924.1966.
- Bott, T. L., J. Jr. Johnson, E. M. Foster, et H. Sugiyama. 1968. "Possible origin of the high incidence of *Clostridium botulinum* type E in an inland bay (Green Bay of Lake Michigan)." *J Bacteriol* 95 (5):1542-1547. doi: 10.1128/JB.95.5.1542-1547.1968.
- Braun, U., K. Feige, G. Schweizer, et A. Pospischil. 2005. "Clinical findings and treatment of 30 cattle with botulism." *Veterinary Record* 156 (14):438-441.
- Brunt, J., A. H. M. van Vliet, F. van den Bos, A. Carter, et M. W. Peck. 2016. "Diversity of the germination apparatus in *Clostridium botulinum* Groups I, II, III, and IV." *Front Microbiol* 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.01702.
- Bryan, Frank L. 1980. "Epidemiology of Foodborne Diseases Transmitted by Fish, Shellfish and Marine Crustaceans in the United States, 1970–1978." *J Food Prot* 43 (11):859-876. doi: 10.4315/0362-028x-43.11.859.
- Byappanahalli, Muruleedhara N, et Richard L Whitman. 2009. "*Clostridium botulinum* type E occurs and grows in the alga *Cladophora glomerata*." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 66 (6):879-882.
- Cann, D. C., et L. Y. Taylor. 1982. "An outbreak of botulism in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, farmed in Britain." *Journal of Fish Diseases* 5 (5):393-399.
- Carlin, Frédéric. 2011. "Origin of bacterial spores contaminating foods." *Food Microbiol* 28 (2):177-182. doi: DOI: 10.1016/j.fm.2010.07.008.
- Chandler-Bostock, R., et K. H. Mellits. 2015. "Efficacy of disinfectants against porcine rotavirus in the presence and absence of organic matter." *Letters in applied microbiology* 61 (6):538-543.
- Chatla, K., P. Gaunt, L. Petrie-Hanson, C. Hohn, L. Ford, et L. Hanson. 2014. "Zebrafish (*Danio rerio*) bioassay for visceral toxicosis of catfish and botulinum neurotoxin serotype E." *Journal of veterinary diagnostic investigation* 26 (2):240-245.
- Chatla, K., P. S. Gaunt, L. Hanson, D. X. Gao, et R. Wills. 2012. "Determination of the median lethal dose of botulinum serotype E in channel catfish fingerlings." *Journal of Aquatic Animal Health* 24 (2):105-109.

- Chatla, K., P. S. Gaunt, L. Petrie-Hanson, L. Ford, et L. A. Hanson. 2016. "Zebrafish sensitivity to botulinum neurotoxins." *Toxins (Basel)* 8 (5):132.
- Cheng, L. W., B. Onisko, E. A. Johnson, J. R. Reader, S. M. Griffey, A. E. Larson, W. H. Tepp, L. H. Stanker, D. L. Brandon, et J. M. Carter. 2008. "Effects of purification on the bioavailability of botulinum neurotoxin type A." *Toxicology* 249 (2-3):123-9. doi: 10.1016/j.tox.2008.04.018.
- Chun, C. L., C. I. Kahn, A. J. Borchert, M. N. Byappanahalli, R. L. Whitman, J. Peller, C. Pier, G. Lin, E. A. Johnson, et M. J. Sadowsky. 2015. "Prevalence of toxin-producing *Clostridium botulinum* associated with the macroalga *Cladophora* in three Great Lakes: growth and management." *Science of the Total Environment* 511:523-529.
- Chun, C. L., U. Ochsner, M. N. Byappanahalli, R. L. Whitman, W. H. Tepp, G. Lin, E. A. Johnson, J. Peller, et M. J. Sadowsky. 2013. "Association of toxin-producing *Clostridium botulinum* with the macroalga *Cladophora* in the Great Lakes." *Environ Sci Technol* 47 (6):2587-94. doi: 10.1021/es304743m.
- Clouston, J. G., et P. A. Wills. 1969. "Initiation of germination and inactivation of *Bacillus pumilus* spores by hydrostatic pressure." *J Bacteriol* 97 (2):684-90. doi: 10.1128/jb.97.2.684-690.1969.
- Coffield, J. A., N. Bakry, R. D. Zhang, J. Carlson, L. G. Gomella, et L. L. Simpson. 1997. "In vitro characterization of botulinum toxin types A, C and D action on human tissues: combined electrophysiologic, pharmacologic and molecular biologic approaches." *J Pharmacol Exp Ther* 280 (3):1489-98.
- Connan, C., C. Deneve, C. Mazuet, et M. R. Popoff. 2013. "Regulation of toxin synthesis in *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani*." *Toxicon* 75:90-100. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.06.001.
- Contreras de Vera, A., A. García Fernandez, M. J. Cubero Pablo, et L. León-Vizcaino. 1991. "Low prevalence of C botulinum in Spanish wetlands with a tidal regime." *Vet Rec* 128 (8):187-8. doi: 10.1136/vr.128.8.187.
- Craig, J. M., S. Hayes, et K. S. Pilcher. 1968. "Incidence of *Clostridium botulinum* type E in salmon and other marine fish in the Pacific Northwest." *Appl Microbiol* 16 (4):553-557.
- Czerwiński, Michał, Mirosław P Czarkowski, et Barbara Kondej. 2018. "Foodborne botulism in Poland in 2016." *Przegl Epidemiol* 72 (2):149-155.
- Dahlenborg, M., E. Borch, et P. Rådström. 2003. "Prevalence of *Clostridium botulinum* types B, E and F in faecal samples from Swedish cattle." *Int J Food Microbiol* 82 (2):105-110. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00255-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00255-6).
- DasGupta, B. R. 2006. "Botulinum neurotoxins: perspective on their existence and as polyproteins harboring viral proteases." *J Gen Appl Microbiol* 52 (1):1-8. doi: 10.2323/jgam.52.1.
- Demarchi, J., C. Mourgues, J. Orio, et A. R. Prevot. 1958. "[Existence of type D botulism in man]." *Bull Acad Natl Med* 142 (21-22):580-2.
- Desmots, M. H., A. Strasser, C. Hasselmann, E. Marchioni, et F. Hausser. 2001. "Traitements ionisants des aliments." Dans *Traitements ionisants et hautes pressions des aliments*, édité par Federighi M. & Tholozan J.L, 21 - 149. Paris: Polytechnica.
- Diao, M. M., S. Andre, et J. M. Membre. 2014. "Meta-analysis of D-values of proteolytic *Clostridium botulinum* and its surrogate strain *Clostridium sporogenes* PA 3679." *Int J Food Microbiol* 174:23-30. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.029.
- Dineen, Sean S, Marite Bradshaw, et Eric A Johnson. 2003. "Neurotoxin gene clusters in *Clostridium botulinum* type A strains: sequence comparison and evolutionary implications." *Current microbiology* 46 (5):0345-0352.
- Dodds, K. L. 1992. "Worldwide incidence and ecology of infant botulism." *Clostridium botulinum: ecology and control in foods*:105-107.
- Dodds, K. L. 1993. "*Clostridium botulinum* in foods." Dans *Clostridium botulinum. Ecology and control in foods*, édité par A. H. W. Haushchild et K.M. Dodds, 53-68. New York: Marcel Dekker
- Dohms, J. 2008. *Botulism*. Édité par Y Saif, *Diseases of Poultry*.
- Dohms, J. E., P. H. Allen, et J. K. Rosenberger. 1982. "Cases of type C botulism in broiler chickens." *Avian Dis*:204-210.
- Dolman, C. E. 1957. "Type E (fish-borne) botulism: a review." *Jpn J Med Sci Biol* 10 (6):383-95. doi: 10.7883/yoken1952.10.383.
- Doutre, M. P. 1969. "Fréquence au Sénégal du botulisme animal d'origine hydrique." *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux* 22 (1):29-31.
- Doutre, M. P., et J. Chambron. 1966. "Le botulisme des ruminants et des équidés au Sénégal... Caractères de la souche isolée de *Clostridium botulinum* et de sa toxine." *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux* 19:495. doi: 10.19182/remvt.7386.
- Doxey, A. C., M. J. Mansfield, et C. Montecucco. 2018. "Discovery of novel bacterial toxins by genomics and computational biology." *Toxicon* 147:2-12. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.02.002.
- Dressler, Dirk, Katja Kollwe, Tilmann H. C. Kruger, Niklas Gade, Stefan Sikorra, et Hans Bigalke. 2019. "Botulinum toxin type D blocks autonomic cholinergic synapses in humans: discussion of a potential therapeutic use." *Journal of Neural Transmission* 126 (10):1337-1340. doi: 10.1007/s00702-019-02029-5.

- Duncan, R. M., et W. I. Jensen. 1976. "A relationship between avian carcasses and living invertebrates in the epizootiology of avian botulism." *Journal of Wildlife Diseases* 12 (1):116-126.
- Durban, E., R. Goodnow, et N. Grecz. 1970. "Changes in resistance to radiation and heat during sporulation and germination of *Clostridium botulinum* 33A." *J Bacteriol* 102 (2):590-592.
- Dürre, Peter. 2014. "Physiology and Sporulation in *Clostridium*." *Microbiology Spectrum* 2 (4). doi: doi:10.1128/microbiolspec.TBS-0010-2012.
- Dutra, Monalisa Pereira, Glécia de Cássia Aleixo, Alcinéia de Lemos Souza Ramos, Maurício Henriques Louzada Silva, Marcio Tadeu Pereira, Roberta Hilsdorf Piccoli, et Eduardo Mendes Ramos. 2016. "Use of gamma radiation on control of *Clostridium botulinum* in mortadella formulated with different nitrite levels." *Radiation Physics and Chemistry* 119:125-129. doi: <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2015.10.008>.
- Dyer, C., L. P. Hutt, R. Burky, et L. T. Joshi. 2019. "Biocide resistance and transmission of *Clostridium difficile* spores spiked onto clinical surfaces from an American health care facility." *Appl Environ Microbiol* 85 (17).
- ECDC. 2018. "Annual Epidemiological Report for 2015 - Botulism." <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/botulism-annual-epidemiological-report-2015>. ; .
- ECDC. 2019. "Surveillance systems overview for 2018." <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-systems-overview-2018>. ; .
- ECDC. 2020. "Surveillance Atlas for Infectious Diseases." <https://atlas.ecdc.europa.eu/>. ; .
- Eklund, M. W., G. A. Pelroy, R. Paranjpye, M. E. Peterson, et F. M. Teeny. 1982. "Inhibition of *Clostridium botulinum* Types A and E Toxin Production by Liquid Smoke and NaCl in Hot-Process Smoke-Flavored Fish." *J Food Prot* 45 (10):935-941. doi: 10.4315/0362-028x-45.10.935.
- Eklund, M. W., F. T. Poysky, R. N. Paranjpye, M. E. Peterson, et G. A. Pelroy. 2004. "Susceptibility of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), to different toxins of *Clostridium botulinum*." *Aquaculture Research* 35 (6):594-600. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01058.x>.
- Eklund, M. W., F. T. Poysky, M. E. Peterson, L. W. Peck, et W. D. Brunson. 1984. "Type E botulism in salmonids and conditions contributing to outbreaks." *Aquaculture* 41 (4):293-309. doi: [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90198-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90198-4).
- Eleopra, Roberto, Cesare Montecucco, Grazia Devigili, Christian Lettieri, Sara Rinaldo, Lorenzo Verriello, Marco Pirazzini, Paola Caccin, et Ornella Rossetto. 2013. "Botulinum neurotoxin serotype D is poorly effective in humans: An in vivo electrophysiological study." *Clinical Neurophysiology* 124 (5):999-1004. doi: <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2012.11.004>.
- Eleopra, Roberto, Valeria Tugnoli, Ornella Rossetto, Cesare Montecucco, et Domenico De Grandis. 1997. "Botulinum neurotoxin serotype C: a novel effective botulinum toxin therapy in human." *Neuroscience Letters* 224 (2):91-94. doi: [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(97\)13448-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(97)13448-6).
- Elmnasser, N., S. Guillou, F. Leroi, N. Orange, A. Bakhrouf, et M. Federighi. 2007. "Pulsed-light system as a novel food decontamination technology: a review." *Canadian journal of microbiology* 53 (7):813-821.
- Elwell, M. W., et D. M. Barbano. 2006. "Use of microfiltration to improve fluid milk quality." *J Dairy Sci* 89 Suppl 1:E20-30. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72361-X.
- ENVA. 2019. "Dangers sanitaires de 1ère ET 2ème catégories chez les ruminants ". [https://eve.vet-alfort.fr/pluginfile.php/60750/mod\\_resource/content/0/Poly%20Dangers%20sanitaires%20rum%20juin%202019.pdf](https://eve.vet-alfort.fr/pluginfile.php/60750/mod_resource/content/0/Poly%20Dangers%20sanitaires%20rum%20juin%202019.pdf) [Accessed 17/04/2020].
- EPA. 2012. "Type E Botulism Outbreaks: A Manual for Beach Managers and the Public." USA: Environmental Protection Agency. 32 p.
- Ermengem, Van. 1896. *Untersuchungen über Fälle von Fleischvergiftung mit Symptomen von Botulismus*.
- Espelund, M., et D. Klaveness. 2014. "Botulism outbreaks in natural environments - an update." *Front Microbiol* 5. doi: 10.3389/fmicb.2014.00287.
- Evelsizer, D. D., R. G. Clark, et T. K. Bollinger. 2010. "Relationships between local carcass density and risk of mortality in molting mallards during avian botulism outbreaks." *J Wildl Dis* 46 (2):507-13. doi: 10.7589/0090-3558-46.2.507.
- Fach, P., S. Perelle, F. Dilasser, J. Grout, C. Dargaignaratz, L. Botella, J.-M. Gourreau, F. Carlin, M. R. Popoff, et V. Broussolle. 2002. "Detection by PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of *Clostridium botulinum* in Fish and Environmental Samples from a Coastal Area in Northern France." *Appl Environ Microbiol* 68 (12):5870-5876. doi: 10.1128/aem.68.12.5870-5876.2002.
- FDA. 2020. "(US Food and Drug Administration) Chapter 13. *Clostridium botulinum* toxin formation." Dans *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance Fourth Edition*. <https://www.fda.gov/media/80637/download>, 245-292.
- Federighi, M., M. Vidon, J. F. Mesclé, et M. F. Pilet. 1995. "Traitement hautes pressions et denrées alimentaires : revue bibliographique. I: Le matériel, le procédé et ses effets sur les composants des aliments; High pressure treatment of food : an overview. I: Material, process and effects on food constituents." *M.A.N. Microbiologie, aliments, nutrition* 13 (2):115-126.

- Fjølstad, M., et T. Klund. 1969. "outbreak of botulism among ruminants in connection with ensilage feeding." *Nord Veterinaermed.*
- Fleck-Derderian, S., M. Shankar, A. K. Rao, K. Chatham-Stephens, S. Adjei, J. Sobel, M. I. Meltzer, D. Meaney-Delman, et S. K. Pillai. 2017. "The Epidemiology of Foodborne Botulism Outbreaks: A Systematic Review." *Clin Infect Dis* 66 (suppl\_1):S73-s81. doi: 10.1093/cid/cix846.
- Fleming, R. H. 1960. "Report on four cases of botulism in Gatooma, S. Rhodesia." *Cent Afr J Med* 6:91-4.
- Fohler, S., S. Discher, E. Jordan, C. Seyboldt, G. Klein, H. Neubauer, M. Hoedemaker, T. Scheu, A. Campe, K. Charlotte Jensen, et A. Abdulmawjood. 2016. "Detection of Clostridium botulinum neurotoxin genes (A-F) in dairy farms from Northern Germany using PCR: A case-control study." *Anaerobe* 39:97-104. doi: 10.1016/j.anaerobe.2016.03.008.
- Franciosa, G., L. Fenicia, C. Caldiani, et P. Aureli. 1996. "PCR for detection of Clostridium botulinum type C in avian and environmental samples." *Journal of Clinical Microbiology* 34 (4):882-885.
- Franz, D.R., L.M. Pitt, M.A. Clayton, M.A. Hanes, et K.J. Rose. 1993. "Efficacy of Prophylactic and Therapeutic Administration of Antitoxin for Inhalation Botulism " Dans *Botulinum and Tetanus Neurotoxins*, édité par DasGupta B.R. Boston, MA: Springer.
- Frye, E. A., C. Egan, M. J. Perry, E. E. Crouch, K. E. Burbank, et K. M. Kelly. 2020. "Outbreak of botulism type A in dairy cows detected by MALDI-TOF mass spectrometry." *Journal of veterinary diagnostic investigation* 32 (5):722-726.
- Fukuzaki, S. 2006. "Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes." *Biocontrol science* 11 (4):147-157.
- Galazka, A, et A Przybylska. 1999. "Surveillance of foodborne botulism in Poland: 1960-1998." *Eurosurveillance* 4 (6):69-72.
- Galey, F. D. 2001. "Botulism in the horse." *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 17 (3):579-588.
- Galey, F. D., R. Terra, R. Walker, J. Adaska, M. A. Etchebarne, B. Puschner, E. Fisher, R. H. Whitlock, T. Rocke, D. Willoughby, et E. Tor. 2000. "Type C botulism in dairy cattle from feed contaminated with a dead cat." *J Vet Diagn Invest* 12 (3):204-9. doi: 10.1177/104063870001200302.
- Gaunt, P. S., S. R. Kalb, et J. R. Barr. 2007. "Detection of botulinum type E toxin in channel catfish with visceral toxicosis syndrome using catfish bioassay and endopep mass spectrometry." *Journal of veterinary diagnostic investigation* 19 (4):349-354.
- Gauthier, D. T. 2015. "Bacterial zoonoses of fishes: a review and appraisal of evidence for linkages between fish and human infections." *Vet J* 203 (1):27-35. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.10.028.
- Gauvry, E., A. G. Mathot, I. Leguerinel, O. Couvert, F. Postollec, V. Broussolle, et L. Coroller. 2017. "Knowledge of the physiology of spore-forming bacteria can explain the origin of spores in the food environment." *Research in Microbiology* 168 (4):369-378. doi: 10.1016/j.resmic.2016.10.006.
- Gelinas, P., J. Goulet, G. M. Tastayre, et G. A. Picard. 1984. "Effect of temperature and contact time on the activity of eight disinfectants-a classification." *J Food Prot* 47 (11):841-847.
- Georget, E., B. Miller, M. Callanan, V. Heinz, et A. Mathys. 2014. "(Ultra) high pressure homogenization for continuous high pressure sterilization of pumpable foods - a review." *Front Nutr* 1:15. doi: 10.3389/fnut.2014.00015.
- Gessler, F., et H. Böhnelt. 2006. "Persistence and mobility of a Clostridium botulinum spore population introduced to soil with spiked compost." *FEMS Microbiol Ecol* 58 (3):384-93. doi: 10.1111/j.1574-6941.2006.00183.x.
- Getchell, R. G., W. J. Culligan, M. Kirchgessner, C. A. Sutton, R. N. Casey, et P. R. Bowser. 2006. "Quantitative Polymerase Chain Reaction Assay Used to Measure the Prevalence of Clostridium botulinum type E in Fish in the Lower Great Lakes." *Journal of Aquatic Animal Health* 18 (1):39-50. doi: <https://doi.org/10.1577/H05-013.1>.
- Gill, D. M. 1982. "Bacterial toxins: a table of lethal amounts." *Microbiological reviews* 46 (1):86-94.
- Girardin, H., C. Albagnac, C. Dargaignaratz, C. Nguyen-the, et F. Carlin. 2002. "Antimicrobial activity of foodborne *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. against *Clostridium botulinum*." *J Food Prot* 65:806-813.
- Gominet, Michel. 2001. "Traitement des denrées alimentaires par rayonnements ionisants." *Techniques de l'ingénieur Opérations unitaires du génie industriel alimentaire* base documentaire : TIB430DUO (ref. article : f3050).
- Gosling, R. J., I. Mawhinney, K. Vaughan, R. H. Davies, et R. P. Smith. 2017. "Efficacy of disinfectants and detergents intended for a pig farm environment where Salmonella is present." *Veterinary Microbiology* 204:46-53.
- Gould, G. W., et A. J. Sale. 1970. "Initiation of germination of bacterial spores by hydrostatic pressure." *J Gen Microbiol* 60 (3):335-46. doi: 10.1099/00221287-60-3-335.
- Graham, R., et H. Schwarze. 1921. "Avian botulism (type A) or limber neck." *The Journal of Infectious Diseases* 28 (4):317-322. doi: 10.1093/infdis/28.4.317.



- Greenberg, R. A., R. B. Tompkin, B. O. Bladel, R. S. Kittaka, et A. Anellis. 1966. "Incidence of mesophilic Clostridium spores in raw pork, beef, and chicken in processing plants in the United States and Canada." *Appl Microbiol* 14 (5):789-93.
- Gross, W. B., et L. D. Smith. 1971. "Experimental botulism in gallinaceous birds." *Avian Dis*:716-722.
- Guillou, Sandrine, Marion Lerasle, Hélène Simonin, et Michel Federighi. 2017. "High-pressure processing of meat and meat products." Dans *Emerging Technologies in Meat Processing*, 37-101.
- Guizelini, C. C., R. A. A. Lemos, J. L. P. de Paula, R. C. Pupin, D. C. Gomes, C. S. L. Barros, D. A. Neves, L. O. B. Alcântara, R. O. S. Silva, et F. C. F. Lobato. 2019. "Type C botulism outbreak in feedlot cattle fed contaminated corn silage." *Anaerobe* 55:103-106.
- Haagsma, J. 1975. "Sensitivity of eels (*Anguilla anguilla*) and carp (*Cyprinus carpio*) to type C and E botulinum toxin." *Zentralbl Bakteriol Orig A* 230 (1):59-66.
- Haagsma, J. 1991. "Pathogenic anaerobic bacteria and the environment." *Rev Sci Tech* 10 (3):749-64. doi: 10.20506/rst.10.3.569.
- Hannett, G. E., W. B. Stone, S. W. Davis, et D. Wroblewski. 2011. "Biodiversity of Clostridium botulinum type E associated with a large outbreak of botulism in wildlife from Lake Erie and Lake Ontario." *Appl Environ Microbiol* 77 (3):1061-8. doi: 10.1128/aem.01578-10.
- Haq, I., et G. Sakaguchi. 1980. "Prevalence of Clostridium botulinum in fishes from markets in Osaka." *Jpn J Med Sci Biol* 33 (1):1-6. doi: 10.7883/yoken1952.33.1.
- Hardy, S. P., et M. Kaldhusdal. 2013. "Type C and C/D toxigenic Clostridium botulinum is not normally present in the intestine of healthy broilers." *Veterinary Microbiology* 165 (3-4):466-468.
- Hauschild, A. H., et L. Gauvreau. 1985. "Food-borne botulism in Canada, 1971-84." *Cmaj* 133 (11):1141-6.
- Heckman, Charles W. 1986. "The role of marsh plants in the transport of nutrients as shown by a quantitative model for the freshwater section of the Elbe estuary." *Aquatic Botany* 25:139-151. doi: [https://doi.org/10.1016/0304-3770\(86\)90050-1](https://doi.org/10.1016/0304-3770(86)90050-1).
- Herrero, B. A., A. E. Ecklung, C. S. Streett, D. F. Ford, et J. K. King. 1967. "Experimental botulism in monkeys-- a clinical pathological study." *Exp Mol Pathol* 6 (1):84-95. doi: 10.1016/0014-4800(67)90007-x.
- Hielm, S., J. Björkroth, E. Hyytiä, et H. Korkeala. 1998. "Prevalence of Clostridium botulinum in Finnish Trout Farms: Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing Reveals Extensive Genetic Diversity among Type E Isolates." *Appl Environ Microbiol* 64 (11):4161-4167.
- Hielm, S., E. Hyytiä, A. B. Andersin, et H. Korkeala. 1998. "A high prevalence of Clostridium botulinum type E in Finnish freshwater and Baltic Sea sediment samples." *J Appl Microbiol* 84 (1):133-7. doi: 10.1046/j.1365-2672.1997.00331.x.
- Hill, Karen K., Gary Xie, Brian T. Foley, Theresa J. Smith, Amy C. Munk, David Bruce, Leonard A. Smith, Thomas S. Brettin, et John C. Detter. 2009. "Recombination and insertion events involving the botulinum neurotoxin complex genes in Clostridium botulinum types A, B, E and F and Clostridium butyricum type E strains." *BMC Biology* 7 (1):66. doi: 10.1186/1741-7007-7-66.
- Hiroki, H. 1970. "Sensitivity and immune response of fresh-water fishes to Clostridium botulinum type E toxin." Proceedings of the first US and Japan conference on toxic micro-organisms, M. Hertzberg (ed.). United States and Japan Cooperative Program in Natural Resources.
- Hobbs, Robert J., Carol A. Thomas, Jennifer Halliwell, et Christopher D. Gwenin. 2019. "Rapid Detection of Botulinum Neurotoxins—A Review." *Toxins (Basel)* 11 (7):418.
- Hodowanec, A, et TP Bleck. 2015. "Clostridium botulinum (Botulism)." *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders*:2763.
- Hogg, R., C. Livesey, et J. Payne. 2008. "Diagnosis and implications of botulism." *In practice* 30 (7):392-397.
- Holdeman, L. V. 1970. "The ecology and natural history of Clostridium botulinum." *Journal of Wildlife Diseases* 6 (4):205-210.
- Holzer, E. 1962. "Botulism caused by inhalation." *Medizinische Klinik* 57:1735-1738.
- Horowitz, B. Z. 2010. "Type E botulism." *Clin Toxicol (Phila)* 48 (9):880-95. doi: 10.3109/15563650.2010.526943.
- Hubálek, Z., et J. Halouzka. 1991. "Persistence of Clostridium botulinum type C toxin in blow fly (*Calliphoridae*) larvae as a possible cause of avian botulism in spring." *J Wildl Dis* 27 (1):81-5. doi: 10.7589/0090-3558-27.1.81.
- Hughes, James M, Jeffrey R Blumenthal, Michael H Merson, George L Lombard, Vulus R Dowell Jr, et Eugene J Gangarosa. 1981. "Clinical features of types A and B food-borne botulism." *Annals of internal medicine* 95 (4):442-445.
- Huss, H. H. 1980. "Distribution of Clostridium botulinum." *Appl Environ Microbiol* 39 (4):764-769.
- Huss, H. H., et U. Eskildsen. 1974. "Botulism in farmed trout caused by Clostridium botulinum type E. A preliminary report." *Nordisk veterinærmedicin*.
- Hyun, S.H., et G. Sakaguchi. 1989. "Implication of coprophagy in pathogenesis of chicken botulism." *The Japanese Journal of Veterinary Science* 51 (3):582-586.
- Hyytiä, E., S. Hielm, et H. Korkeala. 1998. "Prevalence of Clostridium botulinum type E in Finnish fish and fishery products." *Epidemiology and Infection* 120 (3):245-250. doi: 10.1017/S0950268898008693.

- ICMSF. 1996. "(International Commission on Microbiological Specifications for Foods). *Clostridium botulinum*." Dans *Micro-organisms in Foods 5. Microbiological Specifications of Food Pathogens*, édité par T. A. Roberts, A. C. Baird-Parker et R. B. Tompkin, 66-111. London: Blackie Academic and Professional.
- Inger, R., D. T. C. Cox, E. Per, B. A. Norton, et K. J. Gaston. 2016. "Ecological role of vertebrate scavengers in urban ecosystems in the UK." *Ecology and Evolution* 6 (19):7015-7023. doi: <https://doi.org/10.1002/ece3.2414>.
- Insalata, N. F., S. J. Witzeman, G. J. Fredericks, et F. C. Sunga. 1969. "Incidence study of spores of *Clostridium botulinum* in convenience foods." *Appl Microbiol* 17 (4):542-544.
- Jensen, W. I. 1981. "Evaluation of coproexamination as a diagnostic test for avian botulism." *Journal of Wildlife Diseases* 17 (2):171-176. doi: 10.7589/0090-3558-17.2.171.
- Johannsen, A. 1963. "*Clostridium botulinum* in Sweden and the Adjacent Waters." *Journal of Applied Bacteriology* 26 (1):43-47. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1963.tb01153.x>.
- Johnson, A. L., S. C. McAdams-Gallagher, et H. Aceto. 2015. "Outcome of adult horses with botulism treated at a veterinary hospital: 92 cases (1989–2013)." *Journal of veterinary internal medicine* 29 (1):311-319.
- Johnston, M. D., S. Lawson, et J. A. Otter. 2005. "Evaluation of hydrogen peroxide vapour as a method for the decontamination of surfaces contaminated with *Clostridium botulinum* spores." *Journal of Microbiological Methods* 60 (3):403-411. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.10.021>.
- Joubert, L., C. Chirol, et P. Beaureau. 1969. "Concerning 7 cases of bovine botulism C of feline origin: Epidemiological and pathogenical hypotheses." *Bull. Soc. Sci. Vet. Med. Comp. Lyon* 71:95-101.
- Kalb, S. R., J. Baudys, B. H. Raphael, J. K. Dykes, C. Lúquez, S. E. Maslanka, et J. R. Barr. 2015. "Functional characterization of botulinum neurotoxin serotype H as a hybrid of known serotypes F and A (BoNT F/A)." *Anal Chem* 87 (7):3911-7. doi: 10.1021/ac504716v.
- Kalb, S. R., J. Baudys, T. J. Smith, L. A. Smith, et J. R. Barr. 2017. "Characterization of Hemagglutinin Negative Botulinum Progenitor Toxins." *Toxins (Basel)* 9 (6). doi: 10.3390/toxins9060193.
- Kalchayanand, N., C. P. Dunne, A. Sikes, et B. Ray. 2004. "Germination induction and inactivation of *Clostridium* spores at medium-range hydrostatic pressure treatment." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 5 (3):277-283. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.02.004>.
- Kalmbach, E. R. 1939. "American vultures and the toxin of *Clostridium botulinum*." *J Am Vet Med Assoc* 94:187-191.
- Kamvar, Zhian N, Jun Cai, Juliet RC Pulliam, Jakob Schumacher, et Thibaut Jombart. 2019. "Epidemic curves made easy using the R package incidence." *F1000Research* 8.
- Karsen, Hasan, Mehmet Resat Ceylan, Hasan Bayindir, et Hayrettin Akdeniz. 2019. "Foodborne botulism in Turkey, 1983 to 2017." *Infectious Diseases* 51 (2):91-96.
- Kauiter, Donald A., Timothy Lilly, Jr., Haim M. Solomon, et Richard K. Lynt. 1982. "*Clostridium botulinum* Spores in Infant Foods: A Survey." *J Food Prot* 45 (11):1028-1029. doi: 10.4315/0362-028x-45.11.1028.
- Kenri, Tsuyoshi, Tsuyoshi Sekizuka, Akihiko Yamamoto, Masaaki Iwaki, Takako Komiya, Takashi Hatakeyama, Hiroshi Nakajima, Motohide Takahashi, Makoto Kuroda, et Keigo Shibayama. 2014. "Genetic Characterization and Comparison of *Clostridium botulinum* Isolates from Botulism Cases in Japan between 2006 and 2011." *Appl Environ Microbiol* 80 (22):6954. doi: 10.1128/AEM.02134-14.
- Khoo, L. H., A. E. Goodwin, D. J. Wise, W. E. Holmes, L. A. Hanson, J. M. Steadman, L. M. McIntyre, et P. S. Gaunt. 2011. "The pathology associated with visceral toxicosis of catfish." *Journal of veterinary diagnostic investigation* 23 (6):1217-1221.
- Kim, J., et P. M. Foegeding. 1993. "Principles of control " Dans *Clostridium botulinum. Ecology and control in foods*, édité par A. H. W. Hauschild et K. L. Dodds, 121–176. New York: Marcel Dekker
- King, L. A. 2008. "Two severe cases of botulism associated with industrially produced chicken enchiladas, France, August 2008." *Eurosurveillance* 13 (37):18978.
- King, L. A., T. Niskanen, M. Junnikkala, E. Moilanen, M. Lindström, H. Korkeala, T. Korhonen, M. R. Popoff, C. Mazuet, et H. Callon. 2009. "Botulism and hot-smoked whitefish: a family cluster of type E botulism in France, September 2009." *Eurosurveillance* 14 (45):19394.
- King, L. A., M. R. Popoff, C. Mazuet, E. Espié, et V. Vaillant. 2010. "Infant botulism in France, 1991-2009." *Archives de pediatrie: organe officiel de la Societe francaise de pediatrie* 17 (9):1288-1292.
- Klarmann, D. 1989. "The detection of *Clostridium botulinum* in fecal samples of cattle and swine and in the raw material and animal meal of different animal body rendering plants." *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* 102 (3):84-86.
- Kobayashi, Takeshi, Chihiro Taguchi, Kakeru Kida, Hiroko Matsuda, Takeshi Terahara, Chiaki Imada, Nant Kay Thwe Moe, et Su Myo Thwe. 2016. "Diversity of the bacterial community in Myanmar traditional salted fish yegyo ngapi." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32 (10):1-9.
- Kohler, L.J., A.V. Quirk, S.L. Welkos, et C.K. Cote. 2018. "Incorporating germination-induction into decontamination strategies for bacterial spores." *J Appl Microbiol* 124 (1):2-14. doi: <https://doi.org/10.1111/jam.13600>.

- Kudrow, David B, Dan A Henry, David A Haake, Ginder Marshall, et Glenn E Mathisen. 1988. "Botulism associated with *Clostridium botulinum* sinusitis after intranasal cocaine abuse." *Annals of internal medicine* 109 (12):984-985.
- Kummel, J., R. Krametter-Froetscher, G. Six, R. Brunthaler, W. Baumgartner, et B. Altenbrunner-Martinek. 2012. "Descriptive study of botulism in an Austrian dairy herd: a case report." *Veterinari Medicina* 57 (3).
- Kurazono, H, K Shimozawa, et G Sakaguchi. 1987. Experimental botulism in pheasants.
- Lafrancois, B. M., S. C. Riley, D. S. Blehert, et A. E. Ballmann. 2011. "Links between type E botulism outbreaks, lake levels, and surface water temperatures in Lake Michigan, 1963–2008." *Journal of Great Lakes Research* 37 (1):86-91. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2010.10.003>.
- Lalitha, K. V., et K. Gopakumar. 2001. "Sensitivity of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to *Clostridium botulinum* toxins." *Aquaculture Research* 32 (9):761-764. doi: 10.1046/j.1365-2109.2001.00616.x.
- Le Bouquin, S., C. Le Marechal, V. Ballan, S. Rouxel, D. Leon, L. Balaine, T. Poezevara, E. Houard, B. Robineau, C. Robinault, M. Chemaly, et R. Souillard. 2017. "Investigation d'un cas de botulisme aviaire dans un élevage de poules pondeuses plein-air." *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* 78:13-17.
- Le Dréan-Quenec'hdu, S., L. Marion, et M.R. Popoff. 2005. "Epidemiology of avium botulism in France : example of Grand Lieu lake." 8th European A A V Conference, Association of Avian Veterinarians ; 6th Scientific E C A M S Meeting, European College of Avian Medicine and Surgery, Arles, France, April 24-30, 2005.
- Le Maréchal, C., V. Ballan, S. Rouxel, M. H. Bayon-Auboyer, M. A. Baudouard, H. Morvan, E. Houard, T. Poëzevara, R. Souillard, et C. Woudstra. 2016. "Livers provide a reliable matrix for real-time PCR confirmation of avian botulism." *Anaerobe* 38:7-13.
- Le Maréchal, C., Y. Derman, M. Dorner, F. Anniballi, P. De Santis, R. Souillard, C. Seyboldt, M. Hedeland, H. Skarin, A. Tevell Aberg, et L. Bano. 2020. "Procedure and guidelines for the management of animal botulism." Animal botulism: innovative tools for diagnosis, prevention, control and epidemiological investigation (Anibotnet), Maisons-Alfort.
- Le Maréchal, C., S. Fourour, V. Ballan, S. Rouxel, R. Souillard, et M. Chemaly. 2018. "Detection of *Clostridium botulinum* group III in environmental samples from farms by real-time PCR using four commercial DNA extraction kits." *BMC Research Notes* 11 (1):441. doi: 10.1186/s13104-018-3549-5.
- Le Maréchal, C., O. Hulin, S. Macé, C. Chuzeville, S. Rouxel, T. Poëzevara, C. Mazuet, F. Pozet, E. Sellal, L. Martin, A. Viry, C. Rubbens, et M. Chemaly. 2019. "A Case Report of a Botulism Outbreak in Beef Cattle Due to the Contamination of Wheat by a Roaming Cat Carcass: From the Suspicion to the Management of the Outbreak." *Animals* 9 (12):1025.
- Le Maréchal, C., S. Rouxel, V. Ballan, E. Houard, T. Poezevara, M. H. Bayon-Auboyer, R. Souillard, H. Morvan, M. A. Baudouard, C. Woudstra, C. Mazuet, S. Le Bouquin, P. Fach, M. Popoff, et M. Chemaly. 2017. "Development and Validation of a New Reliable Method for the Diagnosis of Avian Botulism." *PLoS One* 12 (1):e0169640. doi: 10.1371/journal.pone.0169640.
- Le Maréchal, C., C. Woudstra, et P. Fach. 2016. *Botulism*. Wiley. ed, *Clostridial Diseases of Animals*.
- Le Toquin, E., S. Faure, N. Orange, et F. Gas. 2018. "New biocide foam containing hydrogen peroxide for the decontamination of vertical surface contaminated with *Bacillus thuringiensis* spores." *Front Microbiol* 9:2295.
- Leclair, D., J. Fung, J. L. Isaac-Renton, J. F. Proulx, J. May-Hadford, A. Ellis, E. Ashton, S. Bekal, J. M. Farber, B. Blanchfield, et J. W. Austin. 2013. "Foodborne botulism in Canada, 1985-2005." *Emerg Infect Dis* 19 (6):961-8. doi: 10.3201/eid1906.120873.
- Lenz, C. A., K. Reineke, D. Knorr, et R. F. Vogel. 2015. "High pressure thermal inactivation of *Clostridium botulinum* type E endospores - kinetic modeling and mechanistic insights." *Front Microbiol* 6:652. doi: 10.3389/fmicb.2015.00652.
- Lerasle, M., F. Duranton, H. Simonin, J.M. Membré, R. Chéret, M. De Lamballerie, S. Guillou, et M. Federighi. 2012. "Traitements par hautes pressions hydrostatiques des denrées alimentaires : état de l'art " *Revue de Médecine Vétérinaire* 12 (163):595-614
- Levy, C., X. Aubert, B. Lacour, et F. Carlin. 2012. "Relevant factors affecting microbial surface decontamination by pulsed light." *Int J Food Microbiol* 152 (3):168-174. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.022.
- Levy, C., G. Gatt, M. Busnel, M. Chemaly, M. Coignard, et M-A. Valette. 2009. "Décontamination des œufs coquilles par le procédé de lumière pulsée." Huitièmes Journées de la Recherche Avicole, St Malo, 25 et 26 mars 2009.
- Lindstrom, M., K. Kiviniemi, et H. Korkeala. 2006. "Hazard and control of group II (non-proteolytic) *Clostridium botulinum* in modern food processing." *Int J Food Microbiol* 108 (1):92-104. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.003.
- Lindström, M., et H. Korkeala. 2006. "Laboratory diagnostics of botulism." *Clin Microbiol Rev* 19 (2):298-314. doi: 10.1128/cmr.19.2.298-314.2006.
- Lindström, M., J. Myllykoski, S. Sivelä, et H. Korkeala. 2010. "*Clostridium botulinum* in Cattle and Dairy Products." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 50 (4):281-304. doi: 10.1080/10408390802544405.

- Lücke, F.-K., et T. A. Roberts. 1993. "Control in meat and meat products." Dans *Clostridium botulinum. Ecology and Control in Foods*, édité par A.H.W. Hauschild et K.L. Dodds, 177-208. New York: Marcel Dekker.
- Ludwig, H., C. Bieler, K. Hallbauer, et W. Scigalla. 1992. "Inactivation of microorganisms by hydrostatic pressure." Dans *High Pressure and Biotechnology*, édité par C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans et P. Masson, 25 - 32 Paris: INSERM and John Libbey.
- Lund, B. M. 1993. "Quantification of factors affecting the probability of development of pathogenic bacteria, in particular *Clostridium botulinum*, in foods." *Journal of Industrial Microbiology* 12 (3-5):144-155. doi: 10.1007/bf01584183.
- Lund, B. M., et S. Notermans. 1993. "Potential hazards associated with REPFEDS." Dans *Clostridium botulinum. Ecology and Control in Food*, édité par A. H. W. Hauschild et K. L. Dodds, 279-304. New York: Marcel Dekker.
- Lund, B. M., et M. W. Peck. 2013. *Clostridium botulinum*. Édité par R. G. Labbe et S. Garcia, *Guide to Foodborne Pathogens, 2nd Edition*.
- MacDonald, Kristine L, George W Rutherford, Stephen M Friedman, John R Dietz, Brian R Kaye, George F McKinley, James H Tenney, et Mitchell L Cohen. 1985. "Botulism and botulism-like illness in chronic drug abusers." *Annals of internal medicine* 102 (5):616-618.
- Maier, M. B., T. Schweiger, C. A. Lenz, et R. F. Vogel. 2018. "Inactivation of non-proteolytic *Clostridium botulinum* type E in low-acid foods and phosphate buffer by heat and pressure." *PLoS One* 13 (7):e0200102. doi: 10.1371/journal.pone.0200102.
- Mansfield, M. J., J. B. Adams, et A. C. Doxey. 2015. "Botulinum neurotoxin homologs in non-*Clostridium* species." *FEBS Lett* 589 (3):342-8. doi: 10.1016/j.febslet.2014.12.018.
- Mansfield, M. J., et A. C. Doxey. 2018. "Genomic insights into the evolution and ecology of botulinum neurotoxins." *Pathogens and Disease* 76 (4). doi: 10.1093/femspd/fty040.
- Mansfield, M. J., Travis Gwynn Wentz, Sicai Zhang, Elliot Jeon Lee, Min Dong, Shashi Kant Sharma, et Andrew Charles Doxey. 2019. "Bioinformatic discovery of a toxin family in *Chryseobacterium piperi* with sequence similarity to botulinum neurotoxins." *Scientific Reports* 9 (1):1634. doi: 10.1038/s41598-018-37647-8.
- Margosch, Dirk, Matthias A. Ehrmann, Michael G. Gänzle, et Rudi F. Vogel. 2004. "Comparison of Pressure and Heat Resistance of *Clostridium botulinum* and Other Endospores in Mashed Carrots." *J Food Prot* 67 (11):2530-2537. doi: 10.4315/0362-028x-67.11.2530.
- Marion, W. R., T. E. O'Meara, G. D. Riddle, et H. A. Berkhoff. 1983. "Prevalence of *Clostridium botulinum* type C in substrates of phosphate-mine settling ponds and implications for epizootics of avian botulism." *Journal of Wildlife Diseases* 19 (4):302-307.
- Marois-Fiset, J.-T., A. Carabin, A. Lavoie, et C. C. Dorea. 2013. "Effects of temperature and pH on reduction of bacteria in a point-of-use drinking water treatment product for emergency relief." *Appl Environ Microbiol* 79 (6):2107-2109.
- Martinez, R., et G. Wobeser. 1999. "Immunization of ducks for type C botulism." *Journal of Wildlife Diseases* 35 (4):710-715.
- Martrenchar, Arnaud, Félix Djossou, Cécile Stagnetto, Céline Dupuy, Elodie Brulez, Christiane Attica, Gerald Egmann, Jérôme Gruenfeld, Jean-Michel Fontanella, et Michel-Robert Popoff. 2019. "Is botulism type C transmissible to human by consumption of contaminated poultry meat? Analysis of a suspect outbreak in French Guyana." *Anaerobe* 56:49-50. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.02.008>.
- Matveev, K.I., N.P. Nefedjeva, T.I. Bulatova, et I.S. Sokolov. 1966. "Epidemiology of botulism in the U.S.R.R." Dans *Botulism*, édité par M. Ingram, Roberts, T.A., 1-10. London, UK: Chapman and Hall.
- Maupas, Ph, J. P. Lamagnere, F. Lamisse, et J. Laugier. 1976. "Botulisme de Type C. Intérêt de la Recherche de la Toxémie." *Médecine et Maladies Infectieuses* 6 (6):207-210. doi: [https://doi.org/10.1016/S0399-077X\(76\)80079-0](https://doi.org/10.1016/S0399-077X(76)80079-0).
- Mazuet, C., P. Bouvet, L. A. King, et M. R. Popoff. 2011. "Le botulisme humain en France, 2007-2009." *Bull Epidemiol Hebd* 2011:49-53.
- Mazuet, C., N. Da Silva Jourdan, C. Legeay, J. Sautereau, et R. M. Popoff. 2018. "Le botulisme humain en France, 2013-2016." *Bull. Epidemiol. Hebd* 3:46-54.
- Mazuet, C., C. Legeay, J. Sautereau, C. Bouchier, A. Criscuolo, P. Bouvet, H. Trehard, N. Da Silva Jourdan, et M. Popoff. 2017. "Characterization of *Clostridium baratii* type F strains responsible for an outbreak of botulism linked to beef meat consumption in France." *PLoS currents* 9.
- Mazuet, C., C. Legeay, J. Sautereau, L. Ma, C. Bouchier, P. Bouvet, et M. R. Popoff. 2016. "Diversity of Group I and II *Clostridium botulinum* Strains from France Including Recently Identified Subtypes." *Genome biology and evolution* 8 (6):1643-1660. doi: 10.1093/gbe/evw101.
- Mazuet, C., M. R. Popoff, J. Sautereau, C. Legeay, et P. Bouvet. 2014. "Le botulisme humain en France, 2010-2012." *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* (6):106-114.
- McCrea, B. A., et K. S. Macklin. 2006. "Effect of different cleaning regimens on recovery of *Clostridium perfringens* on poultry live haul containers." *Poultry science* 85 (5):909-913.

- McDonnell, G., et A. D. Russell. 1999. "Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance." *Clin Microbiol Rev* 12 (1):147-179.
- McLaren, I., A. Wales, M. Breslin, et R. H. Davies. 2011. "Evaluation of commonly-used farm disinfectants in wet and dry models of Salmonella farm contamination." *Avian Pathology* 40 (1):33-42.
- Meyer, K. F. 1953. "Food poisoning (concluded)." *N Engl J Med* 249 (21):843-52; concl. doi: 10.1056/nejm195311192492105.
- Meyer, K. F. 1956. "The status of botulism as a world health problem." *Bulletin of the World Health Organization* 15 (1-2):281-298.
- Misra, N.N., et Cheorun Jo. 2017. "Applications of cold plasma technology for microbiological safety in meat industry." *Trends in Food Science & Technology* 2017 v.64:pp. 74-86. doi: 10.1016/j.tifs.2017.04.005.
- Miyazaki, S., et G. Sakaguchi. 1978. "Experimental botulism in chickens: the cecum as the site of production and absorption of botulinum toxin." *Japanese Journal of Medical Science and Biology* 31 (1):1-15.
- Moeller, R. B., Jr., B. Puschner, R. L. Walker, T. E. Rocke, S. R. Smith, J. S. Cullor, et A. A. Ardans. 2009. "Short communication: Attempts to identify Clostridium botulinum toxin in milk from three experimentally intoxicated Holstein cows." *J Dairy Sci* 92 (6):2529-33. doi: 10.3168/jds.2008-1919.
- Moeller, R. B. Jr., B. Puschner, R. L. Walker, T. Rocke, F. D. Galey, J. S. Cullor, et A. A. Ardans. 2003. "Determination of the median toxic dose of type C botulinum toxin in lactating dairy cows." *J Vet Diagn Invest* 15 (6):523-6. doi: 10.1177/104063870301500603.
- Montazer Khorasan, Mohammad Reza, Mohammad Rahbar, Abed Zahedi Bialvaei, Mohammad Mehdi Gouya, Fereshte Shahcheraghi, et Babak Eshtrati. 2020. "National surveillance of food-borne botulism in Iran during 2011–2015." *Reviews in Medical Microbiology* 31 (1).
- Moore, R. J., et J. A. Lacey. 2019. "Genomics of the Pathogenic Clostridia." *Microbiol Spectr* 7 (3). doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0033-2018.
- Morris, G.J. 2000. "The effect of redox potential." Dans *The Microbiological Quality and Safety of Food. Volume I*, édité par B.M. Lund, A.C. Baird-Parker et G.W. Gould, 235-250. Gaithersburg: Aspen Publishers.
- Mylykoski, J., M. Lindström, R. Keto-Timonen, H. Söderholm, J. Jakala, H. Kallio, A. Sukura, et H. Korkeala. 2009. "Type C bovine botulism outbreak due to carcass contaminated non-acidified silage." *Epidemiology & Infection* 137 (2):284-293.
- Nakamura, K., T. Kohda, K. Umeda, H. Yamamoto, M. Mukamoto, et S. Kozaki. 2010. "Characterization of the D/C mosaic neurotoxin produced by Clostridium botulinum associated with bovine botulism in Japan." *Veterinary Microbiology* 140 (1):147-154. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.023>.
- Neill, S. D., M. F. McLoughlin, et S. G. McIlroy. 1989. "Type C botulism in cattle being fed ensiled poultry litter." *Vet Rec* 124 (21):558-60. doi: 10.1136/vr.124.21.558.
- Neimanis, A., D. Gavier-Widén, F. Leighton, T. Bollinger, T. Rocke, et T. Mörner. 2007. "An outbreak of type C botulism in herring gulls (*Larus argentatus*) in southeastern Sweden." *J Wildl Dis* 43 (3):327-36. doi: 10.7589/0090-3558-43.3.327.
- Nol, P., T. E. Rocke, K. Gross, et T. M. Yuill. 2004. "Prevalence of neurotoxic Clostridium botulinum type C in the gastrointestinal tracts of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) in the Salton Sea." *Journal of Wildlife Diseases* 40 (3):414-419.
- Notermans, S. H., A. H. Havelaar, J. B. Dufrenne, et J. Oosterom. 1985. "Incidence of Clostridium botulinum on cattle farms." *Tijdschrift voor diergeneeskunde* 110 (5):175-180.
- Oguma, K., K. Yokota, S. Hayashi, K. Takeshi, M. Kumagai, N. Itoh, N. Tachi, et S. Chiba. 1990. "Infant botulism due to Clostridium botulinum type C toxin." *The Lancet* 336 (8728):1449-1450. doi: [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)93157-K](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)93157-K).
- Ohishi, I., G. Sakaguchi, H. Riemann, D. Behymer, et B. Hurvell. 1979. "ANTIBODIES TO <span class="genus-species">Clostridium botulinum</span> TOXINS IN FREE-LIVING BIRDS AND MAMMALS." *Journal of Wildlife Diseases* 15 (1):3-9, 7.
- Oie, S., A. Obayashi, H. Yamasaki, H. Furukawa, T. Kenri, M. Takahashi, K. Kawamoto, et S.-I. Makino. 2011. "Disinfection methods for spores of Bacillus atrophaeus, B. anthracis, Clostridium tetani, C. botulinum and C. difficile." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 34 (8):1325-1329.
- Okamoto, K., K. Sato, M. Adachi, et T. Chuma. 1999. "Some factors involved in the pathogenesis of chicken botulism." *Journal of the Japan Veterinary Medical Association* 52 (3):159-163.
- Okereke, Amechi, et Thomas J Montville. 1991. "Bacteriocin inhibition of Clostridium botulinum spores by lactic acid bacteria." *J Food Prot* 54 (5):349-353.
- Palmer, J. S., R. L. Hough, H. M. West, et L. M. Avery. 2019. "A review of the abundance, behaviour and detection of clostridial pathogens in agricultural soils." *European Journal of Soil Science* 70 (4):911-929. doi: 10.1111/ejss.12847.
- Panditrao, Mayuri V., Haydee A. Dabritz, N. Neely Kazerouni, Karla H. Damus, Joyce K. Meissinger, et Stephen S. Arnon. 2020. "Descriptive Epidemiology of Infant Botulism in California: The First 40 Years." *The Journal of Pediatrics*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2020.08.013>.
- Pasteur, Institut. 2019. "Botulisme." [www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/botulisme](http://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/botulisme).

- Patterson, M. 2014. "High-Pressure Treatment of Foods." Dans *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, édité par Carl A. Batt et Mary Lou Tortorello, 206-212. Oxford: Academic Press.
- Payne, J. H., R. A. Hogg, A. Otter, H. I. Roest, et C. T. Livesey. 2011. "Emergence of suspected type D botulism in ruminants in England and Wales (2001 to 2009), associated with exposure to broiler litter." *Vet Rec* 168 (24):640. doi: 10.1136/vr.d1846.
- Peck, M. W. 2009. "Biology and genomic analysis of *Clostridium botulinum*." *Advances in microbial physiology* 55:183-320.
- Peck, M. W., K. E. Goodburn, R. P. Betts, et S. C. Stringer. 2008. "Assessment of the potential for growth and neurotoxin formation by non-proteolytic *Clostridium botulinum* in short shelf-life commercial foods designed to be stored chilled." *Trends in Food Science & Technology* 19 (4):207-216. doi: 10.1016/j.tifs.2007.12.006.
- Peck, M. W., Theresa J. Smith, Fabrizio Anniballi, John W. Austin, Luca Bano, Marite Bradshaw, Paula Cuervo, Luisa W. Cheng, Yagmur Derman, Brigitte G. Dorner, Audrey Fisher, Karen K. Hill, Suzanne R. Kalb, Hannu Korkeala, Miia Lindström, Florigio Lista, Carolina Lúquez, Christelle Mazuet, Marco Pirazzini, Michel R. Popoff, Ornella Rossetto, Andreas Rummel, Dorothea Sesardic, Bal Ram Singh, et Sandra C. Stringer. 2017. "Historical Perspectives and Guidelines for Botulinum Neurotoxin Subtype Nomenclature." *Toxins (Basel)* 9 (1):38. doi: 10.3390/toxins9010038.
- Peck, M. W., M. D. Webb, et K. E. Goodburn. 2020. "Assessment of the risk of botulism from chilled, vacuum/modified atmosphere packed fresh beef, lamb and pork held at 3 degrees C-8 degrees C." *Food Microbiol* 91:103544. doi: 10.1016/j.fm.2020.103544.
- Pediatrics, American Academy of. 2018. "Botulism and Infant Botulism " Dans *Red Book: 2018 Report of the Committee on Infectious Diseases*, édité par Brady MT Kimberlin DW, Jackson MA, Long SS, 283-286. : American Academy of Pediatrics; .
- Pegram, P , et S Stone. 2020. "Botulism." <https://www.uptodate.com/contents/botulism>.
- Pellett, Sabine, William H. Tepp, Jacob M. Scherf, Christina L. Pier, et Eric A. Johnson. 2015. "Activity of botulinum neurotoxin type D (strain 1873) in human neurons." *Toxicon* 101:63-69. doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.04.015>.
- Peng Chen, Z., J. G. Jr. Morris, R. L. Rodriguez, A. Wagle Shukla, J. Tapia-Núñez, et M. S. Okun. 2012. "Emerging opportunities for serotypes of botulinum neurotoxins." *Toxins (Basel)* 4 (11):1196-1222. doi: 10.3390/toxins4111196.
- Pérez-Fuentetaja, A., M. D. Clapsadl, D. Einhouse, P. R. Bowser, R. G. Getchell, et W. T. Lee. 2006. "Influence of Limnological Conditions on *Clostridium Botulinum* Type E Presence in Eastern Lake Erie Sediments (Great Lakes, USA)." *Hydrobiologia* 563 (1):189-200. doi: 10.1007/s10750-005-0011-1.
- Pérez-Fuentetaja, A., M. D. Clapsadl, R. G. Getchell, P. R. Bowser, et W. T. Lee. 2011. "*Clostridium botulinum* type E in Lake Erie: Inter-annual differences and role of benthic invertebrates." *Journal of Great Lakes Research* 37 (2):238-244. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2011.03.013>.
- Perez, J., V. S. Springthorpe, et S. A. Sattar. 2005. "Activity of selected oxidizing microbicides against the spores of *Clostridium difficile*: relevance to environmental control." *American journal of infection control* 33 (6):320-325.
- Pigatto, C. P., R. P. Schocken-Iturrino, T. P. Chioda, G. R. Garcia, J. Vittori, et S. C. P. Berchielli. 2007. "Natural *Clostridium botulinum* type " C" toxicosis in a group of chickens." *Archives of Veterinary Science*.
- Pingeon, J. M., C. Vanbockstael, M. R. Popoff, L. A. King, B. Deschamps, G. Pradel, H. Dupont, A. Spanjaard, A. Houdard, et C. Mazuet. 2011. "Two outbreaks of botulism associated with consumption of green olive paste, France, September 2011." *Eurosurveillance* 16 (49):20035.
- Popoff, M. R. 1989. "Revue sur l'épidémiologie du botulisme bovin en France et analyse de sa relation avec les élevages de volailles." *Rev Sci Tech* 8(1):129-145. doi: 10.20506/rst.8.1.404. .
- Popoff, M. R. 2017. "*Clostridium botulinum* et autres *Clostridium* producteurs de neurotoxines botuliques." Dans *Risques microbiologiques alimentaires*, édité par M. Naïtali, L. Guillier et F. Dubois-Brissonnet. : Lavoisier
- Popoff, M. R. 2018. "Botulinum Toxins, Diversity, Mode of Action, Epidemiology of Botulism in France " Dans *Botulinum Toxin*, édité par IntechOpen Nikolay Serdev.
- Popoff, M. R., et G. Argente. 1996. "Le botulisme animal est-il une menace pour l'homme?" *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*.
- Popoff, M. R., C. Mazuet, B. Poulain, E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, et F. Thompson. 2013. Botulism and tetanus. : Springer Verlag (Germany).
- Popp, C., R. Hauck, W. Gad, et H. M. Hafez. 2012. "Type C botulism in a commercial turkey farm: a case report." *Avian Dis* 56 (4):760-763.
- Poulain, B, E Lonchamp, E Jover, MR Popoff, et J Molgó. 2009. "Mécanismes d'action des toxines et neurotoxines botuliques." *Annales de Dermatologie et de Venereologie*.
- Poulain, B., et M. R. Popoff. 2019. "Why Are Botulinum Neurotoxin-Producing Bacteria So Diverse and Botulinum Neurotoxins So Toxic?" *Toxins (Basel)* 11 (1). doi: 10.3390/toxins11010034.

- Prevot, A.R., J. Terrasse, J Daumail, M. Cavaroc, J. Riol, et R. Sillio. 1955. "Existence en France du botulisme humain de type C." *Bull. Acad. Natl. Med.* 139:355–358.
- Quinn, P. J., et R. A. P. Crinion. 1984. "A two year study of botulism in gulls in the vicinity of Dublin Bay." *Irish veterinary journal* 38:214-219.
- Quortrup, E. R., et A. L. Holt. 1941. "Detection of Potential Botulinus-Toxin-Producing Areas in Western Duck Marshes with Suggestions for Control." *J Bacteriol* 41 (3):363-72. doi: 10.1128/jb.41.3.363-372.1941.
- Radomyski, T., E. A. Murano, D. G. Olson, et P. S. Murano. 1994. "Elimination of Pathogens of Significance in Food by Low-dose Irradiation: A Review." *J Food Prot* 57 (1):73-86. doi: 10.4315/0362-028x-57.1.73.
- Rao, Agam K., et Susan Maslanka. 2018. "Botulism." Dans *Harrison's Principles of Internal Medicine, 20e*, édité par Anthony S. Fauci J. Larry Jameson, Dennis L. Kasper, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, Joseph Loscalzo.
- Rao Vemula, Sudershan, R. Naveen Kumar, et Kalpagam Polasa. 2012. "Foodborne diseases in India – a review." *British Food Journal* 114 (5):661-680. doi: 10.1108/00070701211229954.
- Raphael, Brian H., Matthew Lautenschlager, Suzanne R. Kalb, Laura I. T. de Jong, Michael Frace, Carolina Lúquez, John R. Barr, Rafael A. Fernández, et Susan E. Maslanka. 2012. "Analysis of a unique Clostridium botulinum strain from the Southern hemisphere producing a novel type E botulinum neurotoxin subtype." *BMC microbiology* 12:245-245. doi: 10.1186/1471-2180-12-245.
- Rasetti-Escargueil, C., E. Lemichez, et M. R. Popoff. 2019. "Public Health Risk Associated with Botulism as Foodborne Zoonoses." *Toxins (Basel)* 12 (1). doi: 10.3390/toxins12010017.
- Rasetti-Escargueil, C., E. Lemichez, et M. R. Popoff. 2020. "Human Botulism in France, 1875–2016." *Toxins (Basel)* 12 (5):338.
- Reddy, N. R., K. M. Marshall, T. R. Morrissey, V. Loeza, E. Patazca, G. E. Skinner, K. Krishnamurthy, et J. W. Larkin. 2013. "Combined high pressure and thermal processing on inactivation of type a and proteolytic type B spores of Clostridium botulinum." *J Food Prot* 76 (8):1384-1392. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-538.
- Reddy, N. R., H. M. Solomon, R. C. Tetzloff, et E. J. Rhodehamel. 2003. "Inactivation of Clostridium botulinum type A spores by high-pressure processing at elevated temperatures." *J Food Prot* 66 (8):1402-1407. doi: 10.4315/0362-028X-66.8.1402.
- Reddy, N. R., R. C. Tetzloff, H. M. Solomon, et J. W. Larkin. 2006. "Inactivation of Clostridium botulinum nonproteolytic type B spores by high pressure processing at moderate to elevated high temperatures." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 7 (3):169-175. doi: 10.1016/j.ifset.2006.03.002.
- Reed, T. M., et T. E. Rocke. 1992. "The role of avian carcasses in botulism epizootics." *Wildlife Society Bulletin (1973-2006)* 20 (2):175-182.
- Reineke, K., et A. Mathys. 2020. "Endospore Inactivation by Emerging Technologies: A Review of Target Structures and Inactivation Mechanisms." *Annu Rev Food Sci Technol* 11:255-274. doi: 10.1146/annurev-food-032519-051632.
- Relun, A., L. Dorso, A. Douart, C. Chartier, R. Guatteo, C. Mazuet, M. R. Popoff, et S. Assié. 2017. "A large outbreak of bovine botulism possibly linked to a massive contamination of grass silage by type D/C Clostridium botulinum spores on a farm with dairy and poultry operations." *Epidemiol Infect* 145 (16):3477-3485. doi: 10.1017/s0950268817002382.
- Rey, M., I. Diop Mar, R. Baylet, M. Armengaud, R. Michel, R. Bon-Nardot, et M. Sow. 1964. "Du botulisme en pays Serer, à propos de six cas hospitalisés." *Bull. Soc. Méd. Afr. noire* 9:34-44.
- Rivalain, N., J. Roquain, et G. Demazeau. 2010. "Development of high hydrostatic pressure in biosciences: pressure effect on biological structures and potential applications in biotechnologies." *Biotechnol Adv* 28 (6):659-72. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.04.001.
- Roberts, T. A., et I. D. Aitken. 1974. "Botulism in birds and mammals in Great Britain and an assessment of the toxicity of Clostridium botulinum type C toxin in the domestic fowl." Dans *Barker, A.N., Gould, G.W., Wolf, J. (Eds.), Spore Research 1973. Academic Press, London, pp. 1–9.*
- Roberts, T. A., et Angela M. Gibson. 1979. "The relevance of Clostridium botulinum type C in public health and food processing." *International Journal of Food Science & Technology* 14 (3):211-226. doi: 10.1111/j.1365-2621.1979.tb00866.x.
- Roberts, T. A., et J. L. Smart. 1976. "The occurrence and growth of Clostridium spp. in vacuum-packed bacon with particular reference to Cl. perfringens (welchii) and Cl. botulinum." *International Journal of Food Science & Technology* 11 (3):229-244. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1976.tb00720.x>.
- Roberts, T. A., et J. L. Smart. 1977. "The occurrence of Clostridia, particularly Clostridium botulinum, in bacon and pork." Dans *Spore Research 1973*, édité par A. N. Barker, J. Wolf, D. J. Ellar, G. J. Dring et G. W. Gould, 911-915. : Academic Press.
- Roblot, France, M Popoff, JP Carlier, C Godet, P Abbadie, S Matthis, A Eisendorn, G Le Moal, B Becq-Giraudon, et P Roblot. 2006. "Botulism in patients who inhale cocaine: the first cases in France." *Clinical Infectious Diseases* 43 (5):e51-e52.

- Rocke, T. E. 2006. *The global importance of avian botulism*. Waterbirds around the world. Edinburgh ed: UK: The stationery office.
- Rocke, T. E., et T. K. Bollinger. 2007. "Avian botulism." Dans *Infectious diseases of wild birds*, édité par N.J. Thomas, D.B. Hunter et C.T. Atkinson, 377-416. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- Rocke, T. E., N. H. Euliss, et M. D. Samuel. 1999. "Environmental Characteristics Associated with the Occurrence of Avian Botulism in Wetlands of a Northern California Refuge." *The Journal of Wildlife Management* 63 (1):358-368. doi: 10.2307/3802520.
- Rocke, T. E., M. D. Samuel, P. K. Swift, et G. S. Yarris. 2000. "Efficacy of a type C botulism vaccine in green-winged teal." *Journal of Wildlife Diseases* 36 (3):489-493.
- Rocke, T. E., S. R. Smith, et S. W. Nashold. 1998. "Preliminary evaluation of a simple in vitro test for the diagnosis of type C botulism in wild birds." *J Wildl Dis* 34 (4):744-51. doi: 10.7589/0090-3558-34.4.744.
- Rosen, Osnat, Liron Feldberg, Sigalit Gura, Tal Brosh-Nissimov, Alex Guri, Oren Zimhony, Eli Shapiro, Adi Beth-Din, Dana Stein, et Eyal Ozeri. 2015. "Early, real-time medical diagnosis of botulism by endopeptidase-mass spectrometry." *Clinical Infectious Diseases* 61 (12):e58-e61.
- Rossetto, O., et C. Montecucco. 2019. "Tables of toxicity of botulinum and tetanus neurotoxins." *Toxins (Basel)* 11 (12):686.
- Rulff, R., W. Schrodler, S. Basiouni, J. Neuhaus, et M. Kruger. 2015. "Is downer cow syndrome related to chronic botulism?" *Polish journal of veterinary sciences* 18 (4).
- Rummel, Andreas, et Thomas Binz. 2013. *Botulinum Neurotoxins, Current Topics in Microbiology and Immunology*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Russell, A. D. 1990. "Bacterial spores and chemical sporicidal agents." *Clin Microbiol Rev* 3 (2):99-119.
- Sandler, R. J., T. E. Rocke, M. D. Samuel, et T. M. Yuill. 1993. "Seasonal prevalence of Clostridium botulinum type C in sediments of a northern California wetland." *J Wildl Dis* 29 (4):533-9. doi: 10.7589/0090-3558-29.4.533.
- Sandler, R. J., T. E. Rocke, et T. M. Yuill. 1998. "The inhibition of Clostridium botulinum type C by other bacteria in wetland sediments." *J Wildl Dis* 34 (4):830-3. doi: 10.7589/0090-3558-34.4.830.
- Sanford, Daniel C, Roy E Barnewall, Michelle L Vassar, Nancy Niemuth, Karen Metcalfe, Robert V House, Ian Henderson, et Jeffry D Shearer. 2010. "Inhalational botulism in rhesus macaques exposed to botulinum neurotoxin complex serotypes A1 and B1." *Clinical and Vaccine Immunology* 17 (9):1293-1304.
- Sarker, Mahfuzur R., Saeed Akhtar, J. Antonio Torres, et Daniel Paredes-Sabja. 2015. "High hydrostatic pressure-induced inactivation of bacterial spores." *Critical Reviews in Microbiology* 41 (1):18-26. doi: 10.3109/1040841X.2013.788475.
- Sasaki, Y., N. Takikawa, A. Kojima, M. Norimatsu, S. Suzuki, et Y. Tamura. 2001. "Phylogenetic positions of Clostridium novyi and Clostridium haemolyticum based on 16S rDNA sequences." *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 51 (3):901-904.
- Scalfaro, C, B Auricchio, M Varcasia, P De Santis, A Fiore, S Bilei, T Vicenza, et F Anniballi. 2019. "P6: In vitro bio-competitive activity exerted by lactic acid bacteria against BoNT-producing clostridia: preliminary results." Botulism Workshop, Risk associated with animal botulism and ANIBOTNET final meeting, Maisons-Alfort, France.
- Schmid, A., U. Messelhäusser, S. Hörmansdorfer, C. Sauter-Louis, et R. Mansfeld. 2013. "Occurrence of zoonotic Clostridia and Yersinia in healthy cattle." *J Food Prot* 76 (10):1697-1703.
- Schocken-Iturrino, R. P., F. A. Avila, et S. C. P. Berchielli. 1990. "First case of type A botulism in zebu (Bos indicus)." *Veterinary Record* 126 (9):217-218.
- Scott, Alan B, et David Suzuki. 1988. "Systemic toxicity of botulinum toxin by intramuscular injection in the monkey." *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* 3 (4):333-335.
- Sebald, M. 1982. "Clostridium." Dans *Bacteriologie Médicale, Le Minor et Veron*, 586-587. Baltimore, USA: Flammarion.
- Segner, W. P., et C. F. Schmidt. 1971. "Heat resistance of spores of marine and terrestrial strains of Clostridium botulinum type C." *Appl Microbiol* 22 (6):1030-1033.
- Segner, W. P., C. F. Schmidt, et J. K. Boltz. 1971. "Minimal growth temperature, sodium chloride tolerance, pH sensitivity, and toxin production of marine and terrestrial strains of Clostridium botulinum Type C." *Appl Microbiol* 22 (6):1025-&. doi: 10.1128/aem.22.6.1025-1029.1971.
- Semenko, N., H. Mokhort, O. Sokolovska, I. Kolesnikova, I. Kuzin, et K. Saylor. 2020. "Foodborne Botulism in Ukraine from 1955 to 2018." *Foodborne Pathog Dis*. doi: 10.1089/fpd.2020.2826.
- Setlow, Peter. 2006. "Spores of Bacillus subtilis: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals." *J Appl Microbiol* 101 (3):514-525.
- Setlow, Peter. 2014. "Germination of spores of Bacillus species: what we know and do not know." *J Bacteriol* 196 (7):1297-1305.
- Setlow, Peter, S. W. Wang, et Y. Q. Li. 2017. "Germination of Spores of the Orders Bacillales and Clostridiales." Dans *Annual Review of Microbiology, Vol 71*, édité par S. Gottesman, 459-477.



- Sevenich, R., et A. Mathys. 2018. "Continuous Versus Discontinuous Ultra-High-Pressure Systems for Food Sterilization with Focus on Ultra-High-Pressure Homogenization and High-Pressure Thermal Sterilization: A Review." *Compr Rev Food Sci Food Saf* 17 (3):646-662. doi: 10.1111/1541-4337.12348.
- Seyboldt, C., S. Discher, E. Jordan, H. Neubauer, K. C. Jensen, A. Campe, L. Kreienbrock, T. Scheu, A. Wichern, et F. Gundling. 2015. "Occurrence of Clostridium botulinum neurotoxin in chronic disease of dairy cows." *Veterinary Microbiology* 177 (3-4):398-402.
- Shapiro, Roger L, Charles Hatheway, et David L Swerdlow. 1998. "Botulism in the United States: a clinical and epidemiologic review." *Annals of internal medicine* 129 (3):221-228.
- Sharpe, A. E., E. J. Sharpe, E. D. Ryan, H. J. Clarke, et S. A. McGettrick. 2011. "Outbreak of type C botulism in laying hens." *Veterinary Record* 168 (25):669-669.
- Siegel, L. S. 1993. "Destruction of Botulinum Toxins in Food and Water " Dans *Clostridium botulinum. Ecology and control in foods*, édité par A. H. W. Haushchild et K. L. Dodds, 323-332. New York: Marcel Dekker
- Silva, R. O. S., R. A. Martins, R. A. Assis, C. A. Oliveira Junior, et F. C. F. Lobato. 2018. "Type C botulism in domestic chickens, dogs and black-pencilled marmoset (*Callithrix penicillata*) in Minas Gerais, Brazil." *Anaerobe* 51:47-49. doi: 10.1016/j.anaerobe.2018.03.013.
- Skarin, H., T. Håfström, J. Westerberg, et B. Segerman. 2011. "Clostridium botulinum group III: a group with dual identity shaped by plasmids, phages and mobile elements." *BMC Genomics* 12 (1):185. doi: 10.1186/1471-2164-12-185.
- Skarin, H., Y. Lindgren, et D. S. Jansson. 2015. "Investigations into an Outbreak of Botulism Caused by Clostridium botulinum Type C/D in Laying Hens." *Avian Dis* 59 (2):335-40. doi: 10.1637/10861-051214-Case.
- Skulberg, A, et G Holt. 1987. *Avian botulism in scandinavia*. Springfield, IL: Charles C Thomas ed, *Avian Botulism, an International Perspective*.
- Skulberg, A., et M. Grande. 1967. "Susceptibility of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson, to Clostridium botulinum toxins." *Transactions of the American Fisheries Society* 96 (1):67-70.
- Slocum, S. K., et K. L. Morris. 2020. "Assessing Preference in a Paired-Stimulus Arrangement with Captive Vultures (*Aegypius Monachus*)." *J Appl Anim Welf Sci*:1-6. doi: 10.1080/10888705.2020.1857253.
- Smart, J. L., T. O. Jones, F. G. Clegg, et M. J. McMurtry. 1987. "Poultry waste associated type C botulism in cattle." *Epidemiology & Infection* 98 (1):73-79.
- Smart, J. L., P. W. Laing, et C. E. Winkler. 1983. "Type C botulism in intensively farmed turkeys." *Vet Rec* 113 (9):198-200. doi: 10.1136/vr.113.9.198.
- Smart, J. L., T. A. Roberts, K. G. McCullagh, V. M. Lucke, et H. Pearson. 1980. "An outbreak of type C botulism in captive monkeys." *Vet Rec* 107 (19):445-6. doi: 10.1136/vr.107.19.445.
- Smith, D.S., et S. Sugiyama. 1988. *Botulism. The organism, its toxins, the disease*. Edité par 2nd edn. Vol. Pp. xi and 171, *American Lecture Series in Clinical Microbiology* (ed. by A. Balows). Springfield, Illinois: Pubn No. 1078. Charles C. Thomas.
- Smith, G. R., et R. A. Milligan. 1979. "Clostridium botulinum in soil on the site of the former Metropolitan (Caledonian) Cattle Market, London." *Epidemiology & Infection* 83 (2):237-241.
- Smith, G. R., C. J. Moryson, et J. G. Walmsley. 1977. "The low prevalence of Clostridium botulinum in the lakes, marshes and waterways of the Camargue." *Epidemiology & Infection* 78 (1):33-37.
- Smith, G.R. 1978. "Botulism, waterfowl and mud." *British Veterinary Journal* 134 (5):407-411.
- Smith, G.R., et A.M. Young. 1980. "Clostridium botulinum in British soil." *The Journal of hygiene* 85 (2):271-274. doi: 10.1017/s0022172400063300.
- Smith, L. D. 1975. "Inhibition of Clostridium botulinum by strains of Clostridium perfringens isolated from soil." *Appl Microbiol* 30 (2):319-323.
- Soos, C., et G. Wobeser. 2006. "Identification of Primary Substrate in the Initiation of Avian Botulism Outbreaks." *Journal of Wildlife Management* 70 (1):43-53, 11.
- Souillard, R., Le Maréchal C., L. Balaine, S. Rouxel, T. Poezevara, V. Ballan, M. Chemaly, et L. E. Bouquin S. 2020. "Manure contamination with Clostridium botulinum after avian botulism outbreaks: management and potential risk of dissemination." *Vet Rec* 187 (6):233. doi: 10.1136/vr.105898.
- Souillard, R., C. Le Maréchal, V. Ballan, F. Mahé, M. Chemaly, et S. Le Bouquin. 2017. "A bovine botulism outbreak associated with a suspected cross-contamination from a poultry farm." *Vet Microbiol* 208:212-216. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.07.022.
- Souillard, R., C. Le Maréchal, V. Ballan, S. Rouxel, D. Leon, L. Balaine, T. Poezevara, E. Houard, B. Robineau, C. Robinault, M. Chemaly, et S. Le Bouquin. 2017. "Investigation of a type C/D botulism outbreak in free-range laying hens in France." *Avian Pathol* 46 (2):195-201. doi: 10.1080/03079457.2016.1240355.
- Souillard, R., C. Le Maréchal, F. Hollebecque, S. Rouxel, A. Barbé, E. Houard, D. Léon, T. Poëzévara, P. Fach, C. Woudstra, F. Mahé, M. Chemaly, et S. Le Bouquin. 2015. "Occurrence of C. botulinum in healthy cattle and their environment following poultry botulism outbreaks in mixed farms." *Vet Microbiol* 180 (1-2):142-5. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.07.032.

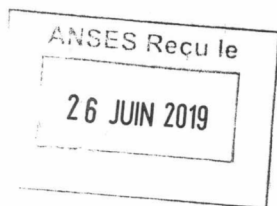
- Souillard, R., C. Woudstra, C. Le Maréchal, M. Dia, M. H. Bayon-Auboyer, M. Chemaly, P. Fach, et S. Le Bouquin. 2014. "Investigation of *Clostridium botulinum* in commercial poultry farms in France between 2011 and 2013." *Avian Pathology* 43 (5):458-464. doi: 10.1080/03079457.2014.957644.
- Steindl, G., A. Fiedler, S. Huhulescu, G. Wewalka, et F. Allerberger. 2015. "Effect of airborne hydrogen peroxide on spores of *Clostridium difficile*." *Wiener klinische Wochenschrift* 127 (11):421-426.
- Suhadi, F., S. S. Thayib, et N. Sumarsono. 1981. "Distribution of *Clostridium botulinum* Around Fishing Areas of the Western Part of Indonesian Waters." *Appl Environ Microbiol* 41 (6):1468-1471.
- Taclindo, C., T. Midura, G. S. Nygaard, et H. L. Bodily. 1967. "Examination of Prepared Foods in Plastic Packages for *Clostridium botulinum*." *Appl Microbiol* 15 (2):426-430.
- Tavakoli, H. R., M. Aghazadeh Meshgi, N. Jonaidi Jafari, M. Izadi, R. Ranjbar, et A. A. Imani Fooladi. 2009. "A survey of traditional Iranian food products for contamination with toxigenic *Clostridium botulinum*." *Journal of Infection and Public Health* 2 (2):91-95. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2009.03.001>.
- Tehran, Domenico Azarnia, et Marco Pirazzini. 2018. "Novel Botulinum Neurotoxins: Exploring Underneath the Iceberg Tip." *Toxins (Basel)* 10 (5):190.
- Therre, H. 1999. "Botulism in the European Union." *Euro Surveill* 4 (1):2-7. doi: 10.2807/esm.04.01.00048-en.
- Tonello. 2001. "Les équipements." Dans *Traitements ionisants et hautes pressions des aliments* édité par M Federighi et Jean-Luc Tholozan, 151-160. Paris: Polytechnica.
- Torrens, J. K. 1998. "*Clostridium botulinum* was named because of association with "sausage poisoning." *Bmj* 316 (7125):151. doi: 10.1136/bmj.316.7125.151c.
- Trouvé, E., J. Maubois, L., M. Piot, M. Madec, N., J. Fauquant, A. Rouault, J. Tabard, et G. Brinkman. 1991. "Retention of various microbial species during milk eparation by cross-flow microfiltration." *Lait* 71 (1):1-13.
- Tseng, S., N. Abramzon, J. O. Jackson, et W. J. Lin. 2012. "Gas discharge plasmas are effective in inactivating *Bacillus* and *Clostridium* spores." *Appl Microbiol Biotechnol* 93 (6):2563-70. doi: 10.1007/s00253-011-3661-0.
- Uwamahoro, M.-C., R. Massicotte, Y. Hurtubise, F. Gagné-Bourque, Akier A. Mafu, et Y. L'Hocine. 2018. "Evaluating the sporicidal activity of disinfectants against *Clostridium difficile* and *Bacillus amyloliquefaciens* spores by using the improved methods based on ASTM E2197-11." *Frontiers in public health* 6:18.
- Valancony, H., P. Drouin, P. Buffet, F. Humbert, et L. Balaine. 2000. "Study of the efficiency of thermo-disinfection for the disinfection of the poultry house mud floors." *Sciences et Techniques Avicoles (France)*.
- Ventujol, A., A. Decors, C. Le Maréchal, J. Y. Toux, V. Allain, C. Mazuet, M. H. Bayon-Auboyer, S. Le Bouquin, et R. Souillard. 2017. "Le botulisme aviaire en France: Etude des cas signalés dans la faune sauvage et dans les élevages par deux réseaux de surveillance entre 2000 et 2013." *Epidémiol Santé Animale* 72:85-102.
- Vidal, D., I. Anza, M. A. Taggart, E. Pérez-Ramírez, E. Crespo, U. Hofle, et R. Mateo. 2013. "Environmental factors influencing the prevalence of a *Clostridium botulinum* type C/D mosaic strain in nonpermanent Mediterranean wetlands." *Appl Environ Microbiol* 79 (14):4264-4271. doi: 10.1128/AEM.01191-13.
- Wachnicka, E., S. C. Stringer, G. C. Barker, et M. W. Peck. 2016. "Systematic Assessment of Nonproteolytic *Clostridium botulinum* Spores for Heat Resistance." *Appl Environ Microbiol* 82 (19):6019-29. doi: 10.1128/aem.01737-16.
- Walker, T. J., et S. H. Dayan. 2014. "Comparison and overview of currently available neurotoxins." *The Journal of clinical and aesthetic dermatology* 7 (2):31-39.
- Wallace, B. J., J. J. Guzewich, M. Cambridge, S. Altekurse, et D. L. Morse. 1999. "Seafood-associated disease outbreaks in New York, 1980-1994." *Am J Prev Med* 17 (1):48-54. doi: 10.1016/s0749-3797(99)00037-9.
- Walton, Ryan N, Alexander Clemens, Jackson Chung, Stephen Moore, Deborah Wharton, Liz Haydu, Eileen de Villa, Greg Sanders, Jeff Bussey, David Richardson, et John W. Austin. 2014. "Outbreak of Type E Foodborne Botulism Linked to Traditionally Prepared Salted Fish in Ontario, Canada." *Foodborne Pathogens and Disease* 11 (10):830-834. doi: 10.1089/fpd.2014.1783.
- Webb, M. D., C. Pin, M. W. Peck, et S. C. Stringer. 2007. "Historical and contemporary NaCl concentrations affect the duration and distribution of lag times from individual spores of nonproteolytic *Clostridium botulinum*." *Appl Environ Microbiol* 73 (7):2118-27. doi: 10.1128/aem.01744-06.
- Weber, J. Todd, Richard G. Hibbs, Jr., Ahmed Darwish, Ban Mishu, Andrew L. Corwin, Magda Rakha, Charles L. Hatheway, Said El Sharkawy, Sobhi Abd El Rahim, Mohammed Fathi Sheba Al Hamd, James E. Sarn, Paul A. Blake, et Robert V. Tauxe. 1993. "A Massive Outbreak of Type E Botulism Associated with Traditional Salted Fish in Cairo." *The Journal of Infectious Diseases* 167 (2):451-454. doi: 10.1093/infdis/167.2.451.
- Weingart, O. G., T. Schreiber, C. Mascher, D. Pauly, M. B. Dorner, T. F. Berger, C. Egger, F. Gessler, M. J. Loessner, M. A. Avondet, et B. G. Dorner. 2010. "The case of botulinum toxin in milk: experimental data." *Appl Environ Microbiol* 76 (10):3293-300. doi: 10.1128/aem.02937-09.

- Weisemann, Jasmin, Nadja Krez, Uwe Fiebig, Sylvia Worbs, Martin Skiba, Tanja Endermann, Martin B. Dorner, Tomas Bergström, Amalia Muñoz, Ingrid Zegers, Christian Müller, Stephen P. Jenkinson, Marc-Andre Avondet, Laurence Delbrassinne, Sarah Denayer, Reinhard Zeleny, Heinz Schimmel, Crister Åstot, Brigitte G. Dorner, et Andreas Rummel. 2015. "Generation and Characterization of Six Recombinant Botulinum Neurotoxins as Reference Material to Serve in an International Proficiency Test." *Toxins (Basel)* 7 (12):5035-5054.
- Wentz, T. G., T. Muruvanda, S. Lomonaco, N. Thirunavukkarasu, M. Hoffmann, M. W. Allard, D. R. Hodge, S. P. Pillai, T. S. Hammack, E. W. Brown, et S. K. Sharma. 2017. "Closed Genome Sequence of *Chryseobacterium piperi* Strain CTM(T)/ATCC BAA-1782, a Gram-Negative Bacterium with Clostridial Neurotoxin-Like Coding Sequences." *Genome Announc* 5 (48). doi: 10.1128/genomeA.01296-17.
- Wijesinghe, R. U., R. J. Oster, S. K. Haack, L. R. Fogarty, T. R. Tucker, et S. C. Riley. 2015. "Spatial, temporal, and matrix variability of *Clostridium botulinum* type E toxin gene distribution at Great Lakes beaches." *Appl Environ Microbiol* 81 (13):4306-4315.
- Williamson, Judy L, Tonie E Rocke, et Judd M Aiken. 1999. "In situ detection of the *Clostridium botulinum* type C1 toxin gene in wetland sediments with a nested PCR assay." *Appl Environ Microbiol* 65 (7):3240-3243.
- Wobeser, G. 1997. "Avian botulism - Another perspective." *Journal of Wildlife Diseases* 33 (2):181-186. doi: 10.7589/0090-3558-33.2.181.
- Wobeser, G., S. Marsden, et R. J. MacFarlane. 1987. "Occurrence of toxigenic *Clostridium botulinum* type C in the soil of wetlands in Saskatchewan." *J Wildl Dis* 23 (1):67-76. doi: 10.7589/0090-3558-23.1.67.
- Woo, G. H., H. Y. Kim, Y. C. Bae, Y. H. Jean, S. S. Yoon, E. J. Bak, E. K. Hwang, et Y. S. Joo. 2010. "Outbreak of botulism (*Clostridium botulinum* type C) in wild waterfowl: Seoul, Korea." *Journal of Wildlife Diseases* 46 (3):951-955.
- Wood, J. P., et A. C. Adrion. 2019. "Review of decontamination techniques for the inactivation of bacillus anthracis and other spore-forming bacteria associated with building or outdoor materials." *Environ Sci Technol* 53 (8):4045-4062.
- Worbs, S., U. Fiebig, R. Zeleny, H. Schimmel, A. Rummel, W. Luginbühl, et B. G. Dorner. 2015. "Qualitative and quantitative detection of botulinum neurotoxins from complex matrices: Results of the first international proficiency test." *Toxins (Basel)* 7 (12):4935-4966.
- Work, T. M., J. L. Klavitter, M. L. Reynolds, et D. Blehert. 2010. "Avian botulism: a case study in translocated endangered Laysan ducks (*Anas laysanensis*) on Midway Atoll." *Journal of Wildlife Diseases* 46 (2):499-506.
- Woudstra, C., H. Skarin, F. Anniballi, L. Fenicia, L. Bano, I. Drigo, M. Koene, M.-H. Bâyon-Auboyer, J.-P. Buffereau, et D. De Medici. 2012. "Neurotoxin gene profiling of *Clostridium botulinum* types C and D native to different countries within Europe." *Appl Environ Microbiol* 78 (9):3120-3127.
- Yule, A. M., J. W. Austin, I. K. Barker, B. Cadieux, et R. D. Moccia. 2006. "Persistence of *Clostridium botulinum* Neurotoxin Type E in Tissues from Selected Freshwater Fish Species: Implications to Public Health." *J Food Prot* 69 (5):1164-1167. doi: 10.4315/0362-028x-69.5.1164.
- Yule, A. M., I. K. Barker, J. W. Austin, et R. D. Moccia. 2006. "Toxicity of *Clostridium botulinum* type E neurotoxin to Great Lakes fish: implications for avian botulism." *J Wildl Dis* 42 (3):479-93. doi: 10.7589/0090-3558-42.3.479.
- Yule, A. M., V. LePage, J. W. Austin, I. K. Barker, et R. D. Moccia. 2006. "Repeated low-level exposure of the round goby (*Neogobius melanostomus*) to *Clostridium botulinum* type E neurotoxin." *J Wildl Dis* 42 (3):494-500. doi: 10.7589/0090-3558-42.3.494.
- Zechmeister, T. C., A. K. Kirschner, M. Fuchsberger, S. G. Gruber, B. Suess, R. Rosengarten, F. Pittner, R. L. Mach, A. Herzig, et A. H. Farnleitner. 2005. "Prevalence of botulinum neurotoxin C1 and its corresponding gene in environmental samples from low and high risk avian botulism areas." *Altex* 22 (3):185-95.
- Zeiller, M., M. Rothballer, A. N. Iwobi, H. Böhnel, F. Gessler, A. Hartmann, et M. Schmid. 2015. "Systemic colonization of clover (*Trifolium repens*) by *Clostridium botulinum* strain 2301." *Front Microbiol* 6:1207-1207. doi: 10.3389/fmicb.2015.01207.
- Zhang, S., F. Lebreton, M. J. Mansfield, S. I. Miyashita, J. Zhang, J. A. Schwartzman, L. Tao, G. Masuyer, M. Martínez-Carranza, P. Stenmark, M. S. Gilmore, A. C. Doxey, et M. Dong. 2018. "Identification of a Botulinum Neurotoxin-like Toxin in a Commensal Strain of *Enterococcus faecium*." *Cell Host Microbe* 23 (2):169-176.e6. doi: 10.1016/j.chom.2017.12.018.
- Zulkifly, S., A. Hanshew, E. B. Young, P. Lee, M. E. Graham, M. E. Graham, M. Piotrowski, et L. E. Graham. 2012. "The epiphytic microbiota of the globally widespread macroalga *Cladophora glomerata* (Chlorophyta, Cladophorales)." *Am J Bot* 99 (9):1541-52. doi: 10.3732/ajb.1200161.

---

## **ANNEXES**

---

**Annexe 1 : Lettres des saisines 2019-SA-0112 à 2019-SA-0115**

2019-SA-0112



MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION

Direction générale de l'alimentation  
Mission des urgences sanitaires

Le Directeur général de l'alimentation

Suivi par : Lilian Calvo  
Tel : 01 49 55 42 34

à

[mus.dgal@agriculture.gouv.fr](mailto:mus.dgal@agriculture.gouv.fr)

Monsieur le Directeur Général de l'Agence  
nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,  
de l'environnement et du travail

251 rue de Vaugirard  
75732 PARIS CEDEX 15

Paris,

25 JUIN 2019

**Objet :** Mise à jour des connaissances et évaluation des risques en appui des mesures de gestion de produits dans la filière bovine, lors de suspicion et de confirmation de cas de botulisme.

Conformément aux dispositions de l'article L. 1313-1 et 1313-3 du Code de la santé publique j'ai l'honneur de solliciter l'avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur une demande d'actualisation de connaissances relatives au risque lié à la consommation des produits (lait et viande) potentiellement contaminés par le *C. botulinum* dans la filière bovine.

Les cas de botulisme de type C, D ou mosaïque C et D en élevages de bovin sont fréquents en France avec, dans certains cas, des impacts non négligeables pour l'élevage infecté.

Actuellement en France, le botulisme est classé comme un danger sanitaire de première catégorie pour toutes les espèces sensibles. Et, à ce jour, dans le diagnostic de botulisme animal sont recherchés les types toxiques suivants :

- Volaille : C, D, C/D, D/C et E
- Bovin : C, D, C/D, D/C

En 2002, l'Afssa a publié une évaluation du risque sanitaire relative au risque de transmission à l'homme de *C. botulinum* à partir de la consommation de produits (lait, viande, œufs) à l'état frais et transformé, provenant d'un lot d'animaux atteints de cette maladie, susceptibles de contenir de la neurotoxine et/ ou des formes végétatives ou encore des spores de *C. botulinum* d'animaux malades ou infectés dans les filières aviaire et bovine.

Postérieurement, dans sa réponse à la saisine 2008-SA-0334, l'Afssa s'est prononcée sur des mesures techniques et administratives relatives à la lutte contre le botulisme aviaire en distinguant notamment des mesures de gestion selon le type de toxine botulinique identifiée

viandes et intestins) issus d'animaux sains, c'est-à-dire en bonne santé, sans signe clinique de maladie voire sans lésion si abattu provenant d'un foyer confirmé de botulisme était également faite.

Toutefois, les informations disponibles ne permettent pas pleinement l'aide à la décision pour la gestion proportionnée de cas de botulisme bovin de type C, D ou mosaïque C et D. Les évaluations existantes répondent qu'en partie au risque de contamination par voie alimentaire et notamment celui du nourrisson, vulnérable à cause de l'immaturation de sa flore digestive qui ne le protège pas contre l'implantation de *C. botulinum*. En effet, l'estimation du risque associé à une exposition par voie alimentaire à partir de la consommation de lait provenant d'un animal atteint de botulisme ou en phase d'incubation, n'est pas aujourd'hui caractérisée. De ce fait, les mesures de gestion, notamment sur les produits laitiers, sont assez conservatrices lors de botulisme (de type C, D ou mosaïque C et D) par principe de précaution.

Dans ce contexte, il nous apparaît nécessaire de soumettre les questions listées ci-dessous qui visent à compléter et à actualiser les préconisations émises dans les avis précédents. **Cette évaluation concerne le botulisme bovin de type C ou D ou mosaïque (C/D, D/C) et tout autre sérotype qui serait pertinent en termes d'évaluation de la santé publique dans cette filière. Si des spécificités sont mises en évidence pour les DROM, il est demandé de les traiter dans un 2<sup>e</sup> temps.**

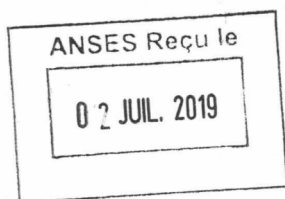
- Quel est le risque pour l'homme lié à la consommation de produits carnés ou laitiers provenant d'un bovin en incubation ou atteint de botulisme ? Le risque est-il différent selon les souches bactériennes et la population concernée (nourrissons, enfants, adultes, personnes fragiles, ...) ? Comment l'état de santé des animaux influence-t-il le risque pour le consommateur final (importance relative entre la phase d'incubation et la phase clinique) ?
- Quel est le risque potentiel associé aux produits carnés et laitiers issus des autres animaux du troupeau que ceux strictement malades ? Existe-t-il des moyens pour diminuer ce risque de contamination des produits ?
- La manipulation de carcasses en abattoir issues d'un animal d'un lot de bovins atteints de botulisme mais dépourvu de signes cliniques (l'animal malade étant bien évidemment exclu), présente-t-elle un risque pour les employés de contracter le botulisme ? Comment le maîtriser ?
- Quelle est l'efficacité des différents traitements du lait sur les formes végétatives et sporulées ? Dans quelle mesure peuvent-ils être considérés comme assainissants ?
  - pasteurisation
  - traitement UHT
  - bactérifugation
  - filtration membranaire

Je vous remercie de bien vouloir apporter votre réponse d'ici le 30 mai 2020.



Le Directeur Général de l'Alimentation

Bruno FERREIRA



2019-SA-0113



MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION

Direction générale de l'alimentation  
Mission des urgences sanitaires

Le Directeur général de l'alimentation

Suivi par : Lilian Calvo  
Tel : 01 49 55 84 54

à

[mus.dgal@agriculture.gouv.fr](mailto:mus.dgal@agriculture.gouv.fr)

Monsieur le Directeur Général de l'Agence  
nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,  
de l'environnement et du travail

251 rue de Vaugirard  
75732 PARIS CEDEX 15

Paris,

25 JUIN 2019

**Objet** : Mise à jour des connaissances et évaluation des risques en appui sur la décontamination et les mesures de gestion des sous-produits animaux lors de cas de botulisme bovin et aviaire.

Conformément aux dispositions de l'article L. 1313-1 et 1313-3 du Code de la santé publique j'ai l'honneur de solliciter l'avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur une demande d'actualisation de connaissances relatives à l'assainissement en élevage et au risque lors de manipulation de sous-produits animaux potentiellement contaminés par le *C. botulinum* dans la filière bovine et aviaire.

Les cas de botulisme de type C, D ou mosaïque C et D en élevages sont fréquents en France avec, dans certains cas, des impacts non négligeables pour l'élevage infecté.

Actuellement en France, le botulisme est classé comme un danger sanitaire de première catégorie pour toutes les espèces sensibles. Et, à ce jour, dans le diagnostic de botulisme animal sont recherchés les types toxiques suivants :

- Volaille : C, D, C/D, D/C et E
- Bovin: C, D, C/D, D/C

En 2002, l'Afssa a publié une évaluation du risque sanitaire relative au risque de transmission à l'homme de *C. botulinum* à partir de la consommation de produits (lait, viande, œufs) à l'état frais et transformé, provenant d'un lot d'animaux atteints de cette maladie, susceptibles de contenir de la neurotoxine et/ ou des formes végétatives ou encore des spores de *C. botulinum* d'animaux malades ou infectés dans les filières aviaire et bovine.

Postérieurement, dans sa réponse à la saisine 2008-SA-0334, l'Afssa s'est prononcée sur des mesures techniques et administratives relatives à la lutte contre le botulisme aviaire en distinguant notamment des mesures de gestion selon le type de toxine botulinique identifiée

(C, D, E, A, ou B). Une évaluation du risque liée à la consommation de certains produits (œufs, viandes et intestins) issus d'animaux sains, c'est-à-dire en bonne santé, sans signe clinique de maladie voire sans lésion si abattu provenant d'un foyer confirmé de botulisme était également faite.

Toutefois, les informations disponibles ne permettent pas pleinement la gestion proportionnée de cas de botulisme de type C, D ou mosaïque C et D.

L'état actuel des connaissances sur la persistance de spores et de formes végétatives de *C. botulinum*, ainsi que la sensibilité aux biocides sporicides (en complément de l'avis 2015-SA-0178) ne permettent pas d'évaluer l'efficacité des mesures d'assainissement des sous-produits animaux (lisier inclus), des eaux résiduaires, des bâtiments et matériels, du lait et des aliments (fourrage, foin, silo) contaminés ou exposés suite à un épisode de botulisme.

Dans ce contexte, il nous apparaît nécessaire de demander une actualisation des données sur les méthodes et les procédés d'inactivation des formes végétatives et sporulées de *C. botulinum*, ainsi que sur la résistance et la persistance des spores dans les sols.

Des questions listées ci-dessous qui visent à compléter et à actualiser les préconisations émises dans les avis précédents sont également soumises.

**Cette évaluation concerne le botulisme de type C ou D ou mosaïque (C/D, D/C) et tout autre sérotype présent en élevage qui serait pertinent en termes d'évaluation de la santé publique. Si des spécificités sont mises en évidence pour les DROM, il est demandé de les traiter dans un 2<sup>e</sup> temps.**

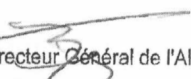
Dans l'hypothèse de matière non assainie,

- l'épandage des eaux résiduaires voire du lisier (ou fumier, litière usagée) présente-t-il un risque au regard de la santé des animaux, notamment un risque inter-espèce ? Des recommandations notamment sur les distances avec des élevages et l'épandage par injection suffisent-ils ?
- les opérations d'épandage présentent-elles un risque au regard de la santé humaine ?
- lors de l'épandage de fumier à proximité ou sur des sols destinés à des cultures et/ou matières premières végétales, quel est le risque pour la consommation humaine ou animale de ces végétaux ?

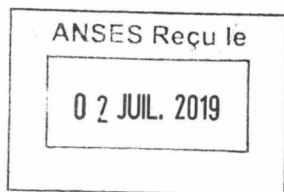
Le traitement de fumier et la litière usagée à la chaux permet-il d'assainir suffisamment les matières précitées en contact des animaux potentiellement contaminés ?

La conversion des lisiers en biogaz avec pasteurisation (70°C /1h) ou en compostage (70°C/1h) permet-elle une destruction des spores et de la toxine ?

Je vous remercie de bien vouloir apporter votre réponse d'ici le 30 mai 2020

  
Le Directeur Général de l'Alimentation  
Bruno FERREIRA





2019-SA-0114



## MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION

Direction générale de l'alimentation  
Mission des urgences sanitaires

Le Directeur général de l'alimentation

Suivi par : Lilian Calvo  
Tel : 01 49 55 42 34

à

[mus.dgal@agriculture.gouv.fr](mailto:mus.dgal@agriculture.gouv.fr)

Monsieur le Directeur Général de l'Agence  
nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,  
de l'environnement et du travail

251 rue de Vaugirard  
75732 PARIS CEDEX 15

Paris,

25 JUIN 2019

**Objet :** Mise à jour des connaissances et évaluation des risques en appui des mesures de gestion de produits et des sous-produits animaux dans la filière avicole, lors de suspicion et de confirmation de cas de botulisme.

Conformément aux dispositions de l'article L. 1313-1 et 1313-3 du Code de la santé publique j'ai l'honneur de solliciter l'avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur une demande d'actualisation de connaissances relatives au risque lié à la consommation des produits à base d'œufs et de viande et à la manipulation de sous-produits animaux potentiellement contaminés par le *C. botulinum* dans la filière avicole.

Les cas de botulisme de type C, D ou mosaïque C et D en élevage de volailles sont fréquents en France avec, dans certains cas, des impacts non négligeables pour l'élevage infecté. Par ailleurs, depuis l'émergence de cette maladie (type E) en 1997, en élevage avicole, une surveillance continue est nécessaire afin d'identifier l'éventuelle survenue d'un nouveau type de toxine ou d'une éventuelle source de contamination d'origine alimentaire.

Actuellement en France, le botulisme est classé comme un danger sanitaire de première catégorie pour toutes les espèces sensibles. Et, à ce jour, dans le diagnostic de botulisme animal sont recherchés les types toxiques suivants :

- Volaille : C, D, C/D, D/C et E
- Bovin : C, D, C/D, D/C

En 2002, l'Afssa a publié une évaluation du risque sanitaire relative au risque de transmission à l'homme de *C. botulinum* à partir de la consommation de produits (lait, viande, œufs) à l'état frais et transformé, provenant d'un lot d'animaux atteints de cette maladie, susceptibles de contenir de la neurotoxine et/ ou des formes végétatives ou encore des spores de *C. botulinum* d'animaux malades ou infectés dans les filières aviaire et bovine.

Postérieurement, dans sa réponse à la saisine 2008-SA-0334, l'Afssa s'est prononcée sur des mesures techniques et administratives relatives à la lutte contre le botulisme aviaire en distinguant notamment des mesures de gestion selon le type de toxine botulinique identifiée (C, D, E, A, ou B). Une évaluation du risque liée à la consommation de certains produits (œufs, viandes et intestins) issus d'animaux sains, c'est-à-dire en bonne santé, sans signe clinique de maladie voire sans lésion si abattu provenant d'un foyer confirmé de botulisme était également faite.

Toutefois, les informations disponibles ne permettent pas pleinement l'aide à la décision pour la gestion proportionnée de cas de botulisme aviaire de type C, D ou mosaïque C et D.

Dans ce contexte, il nous apparaît nécessaire de soumettre les questions listées ci-dessous qui visent à compléter et à actualiser les préconisations émises dans les avis précédents.

**Cette évaluation concerne le botulisme aviaire de type C, D, mosaïque C et D ou E et tout autre sérotype qui serait pertinent en termes d'évaluation de la santé publique dans cette filière. Si des spécificités sont mises en évidence pour les DROM, il est demandé de les traiter dans un 2<sup>e</sup> temps.**

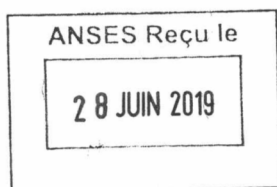
- Quel est le risque pour l'homme lié à la consommation des produits à base d'œufs et de viande selon les process de transformation et les formes de conditionnement. L'évaluation intégrera notamment la consommation des abats (fois, gésiers...) provenant d'animaux issus de lots atteints ou en période d'incubation. Comment l'état de santé des animaux (phase d'incubation, phase clinique, ...) influence-t-il le risque pour le consommateur final ?
- La manipulation de carcasses en abattoir issues d'un animal d'un élevage atteint de botulisme mais dépourvue de signes cliniques (l'animal malade étant bien évidemment exclu), présente-t-elle un risque pour les employés de contracter le botulisme ? Comment le maîtriser ?
- Quel processus de transformation appliqué sur les produits à base d'œufs et de viande peuvent-ils être considérés comme assainissants ?
- Quelles seraient les conditions et les moyens nécessaires pour diminuer le risque de contamination croisée à l'abattoir puis au cours de la transformation des viandes ou d'œufs ?
- Dans le cas où un traitement serait nécessaire, quelles seraient les mesures à prévoir pour la valorisation des sous-produits animaux habituellement destinés à l'alimentation d'animaux (plumes, sang, pattes, tête, viscères dont grappe intestinale)

Je vous remercie de bien vouloir apporter votre réponse d'ici le 1er mai 2021



Le Directeur Général de l'Alimentation

Bruno FERREIDA



2019-SA-0115



MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION

Direction générale de l'alimentation  
Mission des urgences sanitaires

Le Directeur général de l'alimentation

Suivi par : Lilian Calvo  
Tel : 01 49 55 84 54

à

[mus.dgal@agriculture.gouv.fr](mailto:mus.dgal@agriculture.gouv.fr)

Monsieur le Directeur Général de l'Agence  
nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,  
de l'environnement et du travail

251 rue de Vaugirard  
75732 PARIS CEDEX 15

Paris, 25 JUIN 2019

**Objet :** Mise à jour des mesures de gestion de cas botulisme dans faune sauvage.

Conformément aux dispositions de l'article L. 1313-1 et 1313-3 du Code de la santé publique j'ai l'honneur de solliciter l'avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur une demande d'actualisation de connaissances relative au risque pour la santé publique liée à la présence des oiseaux sauvages potentiellement contaminés par le *C. Botulinum* et les mesures de gestion et recommandations à mettre en place selon les types toxiques C, D, C/D, E.

Les cas de botulisme de type C et/ou D en élevage bovin et de volailles sont fréquents en France avec dans certains cas des impacts non négligeables pour l'élevage infecté. Le botulisme de type mosaïque C/D est dominant chez les oiseaux sauvages. Par ailleurs, depuis l'émergence de cette maladie (type E) en 1997, en élevage avicole, une surveillance continue est devenue nécessaire afin d'identifier au préalable l'éventuelle survenue d'un nouveau type de toxine ou d'une éventuelle source de contamination d'origine alimentaire.

Actuellement en France, le botulisme est classé comme un danger sanitaire de première catégorie pour toutes les espèces sensibles. Et, à ce jour, dans le diagnostic de botulisme animal sont recherchés les types toxiques suivants :

- Volaille et avifaune : C, D, C/D, D/C et E
- Bovin : C, D, C/D, D/C

En 2002, l'Afssa a publié une évaluation du risque sanitaire relative au risque de transmission à l'homme de *C. botulinum* à partir de la consommation de produits provenant d'un lot d'animaux atteints de cette maladie dans les filières aviaire et bovine, ainsi que quelques données épidémiologiques telles que le mode de contamination, les symptômes et les mesures de prévention chez les oiseaux sauvages.

Postérieurement, dans sa réponse à la saisine du 23 octobre 2008, d'une part, l'Afssa s'est prononcée, fixant des mesures techniques et administratives relatives à la lutte contre le botulisme aviaire, et a notamment distingué des mesures de gestion selon le type de toxine botulinique identifiée (C, D, E, A, ou B) ; d'autre part, elle a procédé à une évaluation du risque lié à l'utilisation de certains produits (œufs de consommation, œufs à couver, viandes et intestins) issus d'animaux sains provenant d'un foyer confirmé de botulisme.

Depuis aout 2018, les gènes codant pour les toxines C/D et E (le type E est impliqué dans les cas de botulisme humain) ont été détectés dans 3 foyers différents en faune sauvage. C'est la première fois que ce cas de figure se présente et les mesures de gestion n'ont pas été prévues.

Plusieurs questions se posent :

- Quel est le risque pour la santé publique lors de la manipulation de ces animaux lors de leur consommation ? Il est à noter que la recherche de botulisme dans l'avifaune n'est pas systématique (gibier sauvage) mais mise en œuvre que lors de mortalité groupées.
- La présence des cadavres potentiellement contaminés par des spores de *C. botulinum* du type C, D, C/D ou E au bord des plans d'eaux représente-t-elle un risque pour la santé publique liée à la consommation de poissons ou lors d'activités de loisirs ?
- A ce jour, les recommandations données pour limiter l'épisode animal sont le ramassage des cadavres ainsi que le chaulage de la zone où les animaux ont été trouvés. Quelles autres préconisations peuvent être apportées, notamment auprès des chasseurs pour limiter ce risque ?

Je vous remercie de bien vouloir apporter votre réponse d'ici le 1er mai 2021.



Le Directeur Général de l'Alimentation

Bruno FERREIRA

## Annexe 2 : Description et analyse des publications sur les cas humains recensés de botulisme de type C et D:

- Meyer, K.F.; Eddie, B.; York, G.K.; Collier, C.P.; Townsend, C.T. *Clostridium botulinum* type C and human botulism. In *Proceedings of the VI Congrès International de Microbiologie, Roma, Italy, 6–12 September 1953*; p. 276

La revue publiée en 1971 (Gangarosa), à laquelle Meyer participait, ne reprend pas ces cas dans le bilan du botulisme aux USA de 1899 à 1969.

- Prevot, A.R.; Terrasse, J.; Daumail, J.; Cavaroc, M.; Riol, J.; Sillio, R. Existence en France du botulisme humain de type C. *Bulletin de l'Académie nationale de médecine*. 1955, 139, 355–358

### Description de cas :

Se déroule en Auvergne à Riom le 5 avril : consommation d'un pâté de campagne préparé à la maison par une famille de 8 personnes. 6 d'entre elles n'ont pas été malades. Deux sœurs ont consommé la partie centrale de la semi-conserve et ont présenté 3 jours plus tard des symptômes de botulisme entraînant l'hospitalisation de l'une d'elles.

Malaise et vomissements pendant 3 jours avant l'apparition des signes classiques de botulisme. Le syndrome de Guillain-Barré est exclu par ponction lombaire dans une clinique. Hospitalisée le 11 avril.

Le 12, sa sœur développe également des symptômes mais moins graves. La sérothérapie est refusée par la malade, un traitement à base d'anatoxine polyvalente, salitropine, terramycine et vitamines B1 et B12 est institué.

Guérison 6 jours plus tard.

Trois échantillons du pâté sont analysés : pas de toxine

Bactériologie après chauffage 1 mn à 100°C : 2 prélèvements négatifs, un prélèvement présentant 2 types de colonies après culture en anaérobie. L'une des souches présente les caractères phénotypiques de *C. botulinum* type C.

L'étude de la toxinogénèse montre un type C après séroneutralisation.

### Interprétation :

Diagnostic clinique de botulisme chez 2 personnes

Pas de toxine mise en évidence dans le prélèvement de pâté par le test sur souris alors que la sensibilité des souris est très supérieure à celle attribuée à l'être humain.

Culture positive dans un seul échantillon, premier diagnostic bactériologique sur les caractères phénotypiques (bactérie différente de *C. botulinum* A et B)

Publication dans un bulletin scientifique sans comité de lecture international

Pas de mise en évidence de la toxine dans le pâté

Pas de diagnostic sur les malades

- 1 foyer, 2 cas, Type C non validé formellement

- Fleming, R.H. Report of four cases of botulism in Gatooma, S. Rhodesia. *Central African Journal of Medicine*. 1960, 6, 91–94.

Cité par Doutré 1966 : « Un autre foyer humain de type C a été signalé par FLEMING en Rhodésie ; également un pâté de préparation familiale était à l'origine de l'intoxication ».

- Matveev, K.I.; Nefedjeva, N.P.; Bulatova, T.I.; Sokolov, I.S. Epidemiology of botulism in "the U.S.R.R . In *Botulism*, 1966; Ingram, M., Roberts, T.A., Eds.; Chapman and Hall: London, UK, 1967; pp. 1–10

Cité par Doutré, 1966 « H. BEERENS nous a rapporté qu'au Congrès de bactériologie, tenu à Moscou en 1966, Mme MATTWEEV avait signalé deux nouveaux foyers de botulisme à type C chez l'être humain en U. R. S. S. Dans le premier cas, la consommation d'un poisson était à l'origine de l'infection. La souche fut isolée de l'intestin d'une personne ayant succombé à la maladie. Dans le second cas, une conserve familiale de concombres fut rendue responsable du botulisme de type C observé ».

- **Maupas, P.; Lamagnere, J.P.; Lamisse, F.; Laugier, J. Botulisme de type C. Intérêt de la recherche de toxémie. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 1976, 6, 207–210**

#### Description du cas

- 4 personnes déjeunent le 8 octobre : grand-mère, fille et gendre, petite -fille
- 11 octobre : hospitalisation de la fille, du gendre et de la petite-fille pour suspicion de botulisme
- 12 octobre : hospitalisation de la grand-mère en réanimation après avoir présenté une diplopie le 11 au soir. Présente des comorbidités.
  - o 14 et 16 octobre : aggravation du cas de la grand-mère
  - o 27 octobre : régression du ptosis, pas d'autonomie respiratoire
  - o 21 octobre : fistule trachéo-oesophagienne, décès
- 11 octobre : hospitalisation de la petite-fille après apparition de troubles neurologiques le 10. Clinique modérée et atypique. Un prélèvement effectué le 11 est positif à 4 DMM<sup>41</sup>/ml de sérum
  - o 13 octobre : le tableau se complète, asthénie, entrée dans le service de réanimation
  - o 19 octobre : coma vigile, convulsion, intubation : hyponatrémie sans explication valable. Toxémie de 2 DMM/ml
  - o 15 novembre : début de récupération
  - o 17 novembre : toxémie négative
  - o 24 novembre : respiration autonome puis les jours suivants en rééducation
- Parents : 8 jours d'hospitalisation avec simplement une diplopie et un ptosis transitoire
- Toxémie de type C précisée par séroneutralisation
- L'aliment incriminé est absent

#### Interprétation

- Utilité de prélever le sérum
- Botulisme de Type C confirmé chez la petite-fille (11 ans)
- Faible clinique chez les parents, comorbidités chez la grand-mère
- Publication : Médecine et maladies infectieuses
- Botulisme clinique chez les parents probables, mais non démontré formellement pour le type
- Grand-mère : botulisme confirmé et décès lié à son état général de santé
- Poulet fumé suspecté mais non analysé, toxinogénèse in vivo discutée, considérant que la toxinogénèse serait nulle à 37°C
  - 1 foyer, 4 cas, 2 botulismes de type C confirmés, origine animale suspectée, mais non confirmée
  -
- **Oguma, K.; Yokota, K.; Hayashi, S.; Takeshi, K.; Kumagai, M.; Itoh, N.; Tachi, N.; Ohiba, S. Infant botulism due to *Clostridium botulinum* type C toxin. *Lancet* 1990, 336, 1449–1450**

#### Description du cas :

- Hospitalisation d'une petite fille âgée de 6 mois pour troubles respiratoires en février 1990.
- Mise en place d'une ventilation mécanique.
- Toxine détectée dans les fèces : 2 000 DMM/ML
- Culture fécale : les caractères phénotypiques des cultures sont celles décrites pour *C. botulinum* type C
- La toxine est inactivée par le sérum anti C.
- Après 6 semaines d'hospitalisation, le titre de la toxine a baissé à 120 MLD/g
- La patiente a survécu

#### Interprétation :

- Publication dans un journal international
- Botulisme de type C validé chez l'enfant

<sup>41</sup> DMM : Dose Minimale Mortelle

- Aliment incriminé non trouvé,
- Origine environnementale probable
- Colonisation du colon
  - 1 foyer, 1 cas, botulisme de type C, colonisation du colon : botulisme infantile
  
- **Martrenchar, A.; Djossou, F.; Stagnetto, C.; Dupuy, C.; Brulez, E.; Attica, C.; Egmann, G.; Gruenfeld, J.; Fontanella, J.M.; Popoff, M.R. Is botulism type C transmissible to human by consumption of contaminated poultry meat? Analysis of a suspect outbreak in French Guyana. *Anaerobe* 2019, 56, 49–50.**

#### Description du cas :

- Épisode de botulisme sur élevage de type familial : 50 poulets / 100, 17 canards / 20, 10 dindes / 12.
- Le propriétaire tue les volailles paralysées et les cuisine, garde les restes au freezer
- Troubles de la vision 24 h plus tard, hospitalisé le 2 juillet
- Guérison au bout de 12h sans traitement
- Prélèvements le 3 juillet au domicile : sérum et tube digestif d'un poulet malade
- Les 2 sérum prélevé à 6 jours et feces chez le propriétaire sont négatifs pour BoNT ou *C. botulinum* 4 jours plus tard : tous les poulets sont morts. : prélèvements sur 3 sujets malades
- PCR négatives sur les oiseaux, sérums négatifs sauf 2 poulets et un canard : type C

#### Interprétation :

- Publication dans un journal international
- Botulisme type C dans un petit élevage familial sans biosécurité
- Symptômes de botulisme légers et très transitoires : non typé
- Pas de mise en évidence chez le patient ou les restes de repas, informations parcellaires sur la préparation du repas
- Consommation de poulets malades, mode de contamination non éclairci
  
- **Demarchi, J.; Mourgues, C.; Orio, J.; Prevot, A.R. Existence of type D botulism in man. *Bulletin de l'Académie nationale de médecine*. 1958, 142, 580–582.**

#### Description du cas : Tchad, 8 personnes

Le jambon provient d'un porc saigné et à la diète hydrique préparé par l'un des convives. Jambon cru salé consommé dans un premier temps après cuisson. Le repas toxique a lieu le 12 janvier.

Le réfrigérateur est défectueux, la température va de 24° le matin à 41 °C dans la journée, l'hygrométrie va de 7% à 15% (relevés météorologiques à Ndjamen). Pas d'odeur particulière : le jambon est consommé cru.

- 2 convives en mangent peu ou pas : non malades
- les signes cliniques débutent cinq à dix heures après le repas : diarrhée et vomissement
  - 4 se sont remis dès le lendemain.
  - 1 présenta une parésie de l'accommodation 36 heures après le repas
  - le dernier un botulisme complet 48 heures après le repas,

Dès la pose du diagnostic (jour non précisé), des prélèvements du jambon consommé sont transmis à l'IP de Brazzaville et un traitement anti A et B institué.

Première analyse à l'IPP de Brazzaville : une toxine est extraite par traitement à l'eau physiologique et typée D : transfert sur Paris confirme la toxine D. La séro-neutralisation s'est faite à la dilution limite d'activité. Une toxine de culture a été ensuite obtenue après ensemencement du matériel chauffé dix-sept minutes à 100°C :

Les conditions climatiques et le réfrigérateur défectueux ont favorisé cet incident. La toxine a été mise en évidence sur des reliefs de repas après transport à Brazzaville (conditions non précisées). Le malade a reçu un traitement anti A et B les principaux types responsables de botulisme chez l'être humain.

#### Interprétation :

Diagnostic clinique de botulisme chez 2 convives, intoxication alimentaire chez 4 et aucun symptôme chez 2 personnes.

L'identification du type fait sur une partie du jambon ne permet pas d'affirmer qu'il est à l'origine des symptômes. La répartition de la toxine dans le jambon semble hétérogène, puisque pour les 4 premiers malades, on pourrait conclure à une intoxication alimentaire classique (pas d'analyse effectuée sur ce sujet), le traitement anti A et B peut avoir joué un rôle et les conditions de transport (délais, climat) ne permettent pas d'affirmer que le prélèvement n'a pas subi une évolution entre temps. En janvier 1958, il fait entre 24 et 41°C à Brazzaville avec entre 68 et 99% d'humidité (relevés météorologiques).

Publication dans un bulletin sans comité de lecture international  
1 foyer, 2 cas de botulisme, type D possible mais non validé

- **Rey M., Diop Mar I., Baylet R., Armengaud M., Michel R., Bon-Nardot R. et Sow M.. -1964 Du botulisme en pays Serer, à propos de six cas hospitalisés. *Bulletin de la Societe Medicale d'Afrique Noire de Langue Francaise*, 1964, 9, 34-44**

Description :

Quatre foyers de botulisme impliquant 8 cas ont été enregistrés en pays de Serer de 1961 à 1963. Le diagnostic a été posé par exclusion : troubles oculaires, de la déglutition, constipation sur les premiers cas principalement, quatre décès. Pas de diagnostic de laboratoire sur les malades. Pas d'aliment suspects analysés après enquête. Des analyses ont été réalisées sur des prélèvements pris au hasard. Aucune toxine n'a été mise en évidence directement sur les prélèvements alimentaires. Présence de *Clostridium* ayant des caractères de *C. botulinum* sur des boules de Néré fermentée (nététou) produisant une toxine neutralisée par le sérum B. Une toxine peu active neutralisée par les sérums B et C produite par des *Clostridium* isolés de poissons du marigot où poussent des nénuphars dont les enfants mangent les racines ou les efflorescences. À la même période, morts suspectes de bovins comparables à la « maladie des forages » qui seraient un botulisme bovin dans la région du Ferlo et de poulets : deux malades ont consommé un poulet mort spontanément et bouilli.

Interprétation : pas de relation établie avec un aliment ou un type de *C. botulinum*.

4 foyers, 8 cas, aucune confirmation

**Publications portant sur des primates :**

Les cas de botulisme C chez les primates permettent de compléter cette liste.

- **Smart, J.L., Roberts, T.A., McCullagh, K.G., Lucke, V.M., Pearson, H., 1980. An outbreak of type C botulism in captive monkeys. *The Veterinary record* 107, 445-446.**

Description du cas :

- Élevage de primates : aout 1979
- En 6 jours, mort de 14 sujets avec des symptômes de botulisme en 23 à 72 heures. Les autopsies et analyses bactériologiques classiques n'ont pas donné de résultat.
- Repas de poulets : les poulets sont découpés et préparés à l'état frais puis conditionnés en paquets de 2 à 5 kg et congelés. Les colis sont décongelés la veille à température ambiante. Il ne semble pas y avoir eu de différence notable avec les autres jours. La cuisson consiste en une ébullition de courte durée.
- Seuls les singes ayant reçu des repas venant de 2 colis ont été malades. Les analyses des restes de repas et du sang de 9 singes ont mis en évidence la toxine C. Le titre de la toxine n'a pu être mesuré correctement.

Interprétation :

- Diagnostic cohérent entre l'analyse du repas et les sérums prélevés.
- La décongélation à température ambiante en plein été, couplé à une cuisson peut être insuffisante, peut expliquer cet événement.
- Comme dans le cas décrit par Martrenchar, il n'est pas facile d'obtenir les détails de la préparation du repas.

**Silva, R. O. S., Martins, R. A., Assis, R. A., Junior, C. A. O., Lobato, F. C. F. (2018). Type C botulism in domestic chickens, dogs and black-pencilled marmoset (*Callithrix penicillata*) in Minas Gerais, Brazil. *Anaerobe*, 51, 47-49.**

Description du cas : Foyer de botulisme de type C affectant simultanément poulets, chien et primates

Interprétation :

Le rapprochement des cas observés en Guyane, sur les primates et les chiens (renommés peu sensible à ces toxines) montre que des erreurs manifestes d'hygiène et en particulier de décongélation, manipulation, découpes



et stockage des poulets, consommation d'animaux malades sont susceptibles de générer de très haute quantités de toxine, en particulier durant les saisons chaudes.

### Annexe 3 : Diversité des milieux utilisés dans les publications, avec composition simplifiée

**Tableau 15:** Exemples de la diversité des milieux utilisés dans les publications, avec composition simplifiée

CMM	<i>Cooked Meat Medium</i> (coeur, peptone, extrait de boeuf, glucose)
EYA	<i>Egg Yolk Agar</i> : révélation lécithine et lipase
Egg yolk C-welchii	EYA avec antitoxine de <i>C. perfringens</i>
GAM-egg-yolk agar.	GAM agar est fourni par Nissui
Gélose de Veillon	Gélose VF en tube très fin
GS	Gélose au sang (5% sang de cheval)
McChung toabe agar	Gélose <i>egg yolk</i> tamponnée et sulfate de Mg
Meat medium	Milieu à base de viande
FCMM	<i>Forced Cooked Meat Medium</i>
FEM	<i>Forced Egg Meat medium</i>
MCM	<i>Modified Cooked Meat Medium</i>
RCM	<i>Reinforced Clostridial Medium</i>
RC	<i>Reinforced Clostridial Agar</i>
TGY	<i>Tryptone Glucose Yeast</i>
TPGY	<i>Tryptone Peptone Glucose Yeast</i>
VF glucose	Gélose Viande Foie glucosé en tube profond

Les extraits d'organes (viande, cerveau, foie) d'après la formule originale de Rosenow permettent la croissance des anaérobies. Les extraits de levures apportent des vitamines. Cystéine et thiosulfate permettent de baisser le potentiel redox. L'amidon favorise la germination des spores.

Numération :

Elle nécessite des dilutions successives de raison 10 et soit un ensemencement d'un bouillon, soit un isolement sur gélose (Julien 2008). Dans le premier cas, il faut tester la toxinogénèse dans chaque tube, dans l'autre sur chaque colonie suspecte, sachant qu'il n'y a pas de gélose sélective.

## Annexe 4 : Tableau des incertitudes sur les connaissances

Un recensement des sources d'incertitudes a été réalisé, en se basant sur les recommandations proposées par le groupe de travail « Méthodologie en évaluation des risques » (Anses 2017). Le rapport du GT consiste à une mise à jour des connaissances sans évaluation des risques. Le recensement a porté uniquement sur les incertitudes liées au corpus de connaissances sans évaluation de leur impact sur les résultats de l'évaluation.

Les sources d'incertitude liées au *corpus* de connaissances comprennent trois sous-classes (*état des connaissances, méthode de collecte de données et modèles existants*).

Les principales sources d'incertitudes recensées figurent dans le tableau suivant.

Source d'incertitude	Description de l'incertitude
<b>Caractéristiques microbiologiques de <i>Clostridium botulinum</i></b>	
	Aucune incertitude notée
<b><i>Clostridium botulinum</i> et environnement</b>	
État des connaissances	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peu de publications disponibles (quelques séries de publications mais provenant des mêmes équipes)</li> <li>• Peu d'études sur le transfert de <i>C. botulinum</i> de l'environnement vers les végétaux à destination de l'alimentation animale ou humaine</li> <li>• Nombre d'études réduit sur digestats et méthanisation</li> <li>• Manque d'information sur les types botuliques recherchés dans les différentes publications.</li> <li>• Manque de données de prévalence pour les types C et D dans les espaces agricoles</li> </ul>
Méthode de collecte de données	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Manque d'information sur les techniques analytiques adoptées dans les différentes publications</li> <li>• Différences entre méthodes utilisées, différents seuils de détection utilisés</li> <li>• Instabilité de la lysogénie des phages porteurs des toxines de <i>C. botulinum</i> du groupe III</li> <li>• Faible (voir absence de) distinction dans les résultats entre les types C, D, mosaïque C/D, D/C.</li> </ul>
<b>Maladie humaine</b>	
	Aucune incertitude notée
<b>Données de surveillance du botulisme en santé humaine</b>	
État des connaissances	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Certaines formes peuvent échapper aux cliniciens (incertitude sur diagnostic différentiel) (surtout lorsqu'il y a un seul cas clinique)</li> <li>• L'origine alimentaire des cas des botulismes est inconnue dans la moitié des cas (pas de restes d'aliments car les investigations sont menées tardivement par le clinicien).</li> </ul>
<b>Caractère zoonotique des types C, D et mosaïques C /D et D/C</b>	
États des connaissances	Des incertitudes demeurent sur des formes frustes qui ne seraient pas détectées.
Méthode de collecte de données	L'incertitude est liée aux méthodes analytiques des études évoquant des cas humains de botulisme C et D d'origine alimentaire qui datent dans leur grande majorité d'avant 1970. Le diagnostic de botulisme humain était alors souvent confirmé par la mise en évidence d'une toxine préformée présente dans l'aliment suspect, sans confirmation par un sérum biologique.
<b>Le botulisme chez l'animal</b>	

<b>Concentration dans les tissus</b>	
État des connaissances	Restent des sujets d'investigation : la physiopathologie exacte du botulisme bovin, les raisons pour lesquelles la présence de la toxine (C, D, D/C et C/D) est très rarement mise en évidence dans le sang des bovins malades, la réceptivité des bovins à chaque type toxinique, l'existence et l'absence de diagnostic de formes frustes, l'existence hypothétique d'un phénomène de toxi-infection en complément de l'intoxication, la façon dont la toxine passe de la lumière intestinale au compartiment sanguin.
Méthode de collecte de données	Incertitudes sur les caractéristiques et la qualité des méthodes analytiques utilisées dans certaines études expérimentales en botulisme bovin et aviaire.
<b>Données de surveillance en santé animale</b>	
Méthode de collecte de données	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sous détection dans la Faune Sauvage</li> <li>- Sous déclaration des cas probable (notamment en volailles – spécificité de filière liée à l'absence d'arrêté instaurant des compensations financières) car seuls les cas confirmés passent par le laboratoire national de référence (LNR). Suspensions non suivies de prélèvements.</li> <li>- Suspensions non confirmées liées à la difficulté de poser le diagnostic (diagnostic d'exclusion trop large ?) ou aux méthodes d'analyse (qui ne sont pas assez performantes ?)</li> <li>- Évolution des méthodes de diagnostic avec : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Détection des formes mosaïques D/C et C/D seulement depuis 2010,</li> <li>- Évolution de la sensibilité des méthodes de diagnostic avec l'optimisation des protocoles de prélèvements permettant de conclure plus facilement à un diagnostic de botulisme que ce qui pouvait être fait il y a 10 ans.</li> </ul> </li> </ul>
<b>Clostridium botulinum et denrées alimentaires d'origine animale</b>	
<b>Prévalence dans les DAOA</b>	
État des connaissances	Manque de données récentes sur la prévalence des types C et D dans les DAOA.
<b>Maîtrise des <i>C. botulinum</i> dans les DAOA</b>	
État des connaissances	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Les incertitudes associées aux valeurs de D<sup>42</sup> retrouvées dans la littérature.</li> <li>• Manque de données récentes sur l'impact des procédés de préservation des aliments sur les types C et D.</li> <li>• Informations contradictoires concernant l'inactivation des toxines (Pas de consensus précis pour définir, le couple temps-température par exemple, en fonction de la méthodologie d'analyse)</li> </ul>
<b>Opération de décontamination dans les élevages, établissements agroalimentaires et milieu naturel</b>	
État des connaissances	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Connaissance insuffisante pour la mise en œuvre de stratégie de décontamination efficaces.</li> <li>• Peu de données sur l'efficacité des produits sporicides</li> </ul>

<sup>42</sup> Pour une population microbienne, **D** est le temps nécessaire (exprimé généralement en minutes), à une température donnée, pour effectuer une réduction d'1 log<sub>10</sub>, ou diviser par 10, ou détruire à 90%

## Notes

---



# anses

**CONNAÎTRE, ÉVALUER, PROTÉGER**

AGENCE NATIONALE DE SÉCURITÉ SANITAIRE  
de l'alimentation, de l'environnement et du travail

14 rue Pierre et Marie Curie 94701 Maisons-Alfort Cedex  
Tél : 01 42 76 40 40  
[www.anses.fr](http://www.anses.fr) — @Anses\_fr