

COMMUNICATIONS

Recherches sur le botulisme expérimental chez le Cheval

PAR E. LEMETAYER, L. NICOL, O. GIRARD, R. CORVAZIER
et M. CHEYROUX

En 1931, A.-R. PRÉVOT et M. HUET signalent (1) les premiers cas identifiés en France de botulisme E humain, consécutifs à l'ingestion de conserves de poissons, et relatent leurs efforts couronnés de succès pour obtenir une souche indigène de *Cl. Botulinum E*. Celle-ci fut isolée à partir du contenu de l'intestin d'une perche provenant d'un étang d'Ile de France.

L'agent du botulisme d'origine pisciaire existait donc en France. Dès lors se présentait la possibilité de la toxi-infection des animaux, soit par une nourriture à base de poissons (farines ou poissons séchés), soit, pour les herbivores, par du foin contaminé par des cadavres de poissons dans les herbages proches de marais ou d'étangs, ou bien à la suite d'inondation.

Les expériences que nous rapportons ci-dessous ont été entreprises pour étudier chez le cheval l'évolution et les caractères de cette toxi-infection, et les moyens propres à la prévenir et à la combattre.

Nous donnerons tout d'abord les résultats de nos recherches sur la dose minima mortelle de toxine botulique E pour le cheval, puis nous exposerons les tableaux clinique et nécropsique de l'affection chez le même animal, ainsi que le résultat de nos essais pour retrouver la toxine dans les divers tissus.

Les expériences relatées ensuite présenteront les résultats obtenus dans la prévention et le traitement du botulisme E chez le cheval avec diverses doses de sérum anti-spécifique (2).

(1) A. R. PRÉVOT et M. HUET. — *Bull. Acad. Nat. Méd.* 1931, 135 n^{os} 25-26, 432.

(2) Nous remercions bien vivement M. A. R. PRÉVOT, Chef de service du laboratoire des anaérobies à l'I.P., de l'amabilité avec laquelle il a consenti à mettre à notre disposition les quantités de toxine botulique E nécessaires à tous nos essais.

I. — Recherche de la dose minima mortelle, pour le Cheval, de toxine botulique E

La toxine botulique E que nous avons utilisée titrait 2.000 doses minima mortelles pour la souris de 20 g au cm³. Nous avons fait 5 essais sur le cheval aux doses suivantes : 5.000 DM/souris, 8.000 D/M souris, 11.000 DM/souris, 42.000 DM/souris, 72.000 D/M souris.

L'introduction de la toxine a été faite par la voie sous-cutanée. L'injection a, chaque fois, donné lieu à une réaction inflammatoire locale, proportionnelle au volume injecté, et accompagnée quelques heures après d'une légère réaction thermique.

Lorsque des symptômes ont apparus, après un temps de latence plus ou moins long suivant la dose utilisée, ils ont toujours été suivis de mort. L'évolution de la toxi-infection dans tous les cas a été très rapide; et quelle que soit la dose utilisée, la mort est toujours survenue 15 heures environ après l'apparition des symptômes.

Le tableau ci-dessous résume les résultats de ces observations :

N° des CHEV.	POIDS	DOSE DE TOXINE injectée	TEMPS ÉCOULÉ APRÈS L'INJECTION							APPARITION DES SYMPTÔMES
			24 h.	48 heures	72 heures	96 heures	5 jours	6 jours	7 jours	
	kilos									
944	420	5.000 DM/s	—	—	—	—	—	—	—	Aucun symptôme
945	370	8.000 DM/s	—	—	—	—	—	—	—	Aucun symptôme
966	420	11.000 DM/s	—	—	—	M 80 ^e h.				13 h. avant la mort
947	470	42.000 DM/s	—	—	M 55 ^e h.					10 h. avant la mort
977	290	72.000 DM/s	—	M 40 ^e h.						17 h. avant la mort

La dose minima mortelle pour le cheval de toxine botulique E, s'établit donc à 10.000 DM pour la souris, environ (par voie sous-cutanée).

Au-dessous de cette dose, aucun symptôme de toxi-infection n'apparaît. Au-dessus, seule la période de latence est diminuée, proportionnellement à la quantité de toxine utilisée. Mais cette augmentation de la dose n'influe que très peu sur la durée de l'évolution et pas du tout sur le tableau clinique.

La toxi-infection botulique E, lorsque la dose minima mortelle est atteinte, évolue toujours de la même façon et très rapidement vers la mort.

II. — Tableau clinique de la toxi-infection botulique E chez le Cheval

Nous avons déjà noté que l'apparition de symptômes équivaut à un arrêt de mort, et dans tous les cas, l'évolution de la toxi-infection est tout entière contenue dans une quinzaine d'heures environ.

Le tableau clinique est toujours le même et comprend les symptômes suivants :

Tout d'abord une certaine paresse de l'animal, qui manque de vivacité et dont la démarche est molle. Dès ce stade, on peut noter une température à la limite inférieure de la normale, si même elle n'est déjà légèrement au-dessous. Elle va descendre ensuite régulièrement jusqu'à la mort. Nous avons pu la suivre ainsi jusqu'à 33° (cheval 947) et même 31° (cheval 977).

Peu après ce premier stade apparaît une légère mydriase qui elle aussi ira en s'accroissant. A tout moment cependant nous avons pu noter une persistance du réflexe pupillaire à l'éclaircissement malgré un ralentissement très net.

En même temps se manifestent des signes discrets de dysphagie et une gêne de la mastication. Peu à peu la déglutition des solides, puis des liquides devient difficile et ensuite impossible. L'animal mâchonne, mais ne parvient pas à former de bol alimentaire.

Des signes de déséquilibre du train postérieur apparaissent et s'affirment de plus en plus, jusqu'à l'impossibilité de la station debout. L'animal se couche en position sterno-abdominale, qui se transformera plus tard en décubitus latéral.

Des sueurs profuses apparaissent, avec des tremblements des masses musculaires; la respiration devient dyspnéique, avec une paralysie du diaphragme compensée par des contractions des muscles abdominaux (apparition de la corde du flanc à chaque expiration). En même temps une paralysie du larynx amène souvent un léger cornage.

Dans un cas (cheval 977) nous avons noté une teinte légèrement subictérique de la conjonctive.

C'est l'aggravation constante de l'ensemble de ces symptômes qui, en quelques heures, aboutit à la mort.

III. — Tableau nécropsique

L'autopsie a donné dans tous les cas le même tableau nécropsique. Ce qui frappe tout d'abord à l'ouverture du cadavre est l'intense congestion de tous les organes.

Congestion de la muqueuse gastrique.

Congestion de la muqueuse intestinale, tout au long du tractus digestif, avec prédominance sur le colon flottant, mais d'autant plus accusée que la mort a été plus tardive, allant presque à l'hémorragie dans la lumière intestinale pour les animaux morts à la 55^e et 80^e heure.

Forte congestion hépatique.

Rate : congestion très violente. Sur l'animal mort en 40 heures, la pulpe formait une bouillie noire, presque liquide.

Reins : violente congestion. Cependant l'urine n'était hématurique que dans le cas de la mort en 80 heures.

Poumons : légère congestion en dehors de l'hypostase due au décubitus.

Cœur : macroscopiquement, pas d'atteinte du myocarde. Le sang contenu dans les ventricules est mal coagulé.

Liquide céphalo-rachidien : eau de roche. Intact dans tous les cas malgré la forte congestion des méninges.

Encéphale-Cervelet. Bulbe rachidien : léger piqueté hémorragique de l'encéphale. Bulbe et cervelet rien à signaler.

La carcasse est normale, sèche, sans pigmentation anormale des tissus.

IV. — Passage de la toxine dans les divers tissus

Avec les doses de toxine utilisées et en dehors de l'œdème au point d'injection, il n'a été possible de mettre la toxicité en évidence que dans le sérum, et seulement chez les animaux morts par la suite.

Dans un cas (cheval 947, 92.000 DM/souris) la toxicité est apparue avant les premiers symptômes (4 heures avant).

Dans les 2 autres cas, en même temps ou légèrement après le début clinique.

Dans tous, il y avait 1 DM/souris pour 3 cm³ de sérum.

La toxine n'a pu être mise en évidence, ni dans l'encéphale, ni dans le liquide céphalo-rachidien, ni dans l'urine.

V. — Prévention et traitement

Les essais suivants ont eu pour but de préciser les quantités de sérum antitoxique E à employer dans les diverses éventualités pouvant se présenter.

Le sérum antitoxique E est préparé à l'Institut Pasteur de Garches depuis septembre 1931, sur des chevaux hyperimmunisés à l'aide d'anatoxine provenant du Service des Anaérobies de l'Institut, dirigé par M. A.-R. PREVOT.

Cette hyperimmunisation se fait selon le protocole mis au point

depuis plusieurs années par le Service de Sérothérapie de Garches pour la préparation des sérums antitétanique et antidiphthérique et qui nous a déjà donné de très bons résultats dans la production des autres sérums antibotuliques (A, B, C, D).

Le sérum ainsi produit, titre normalement de 1.000 à 2.000 unités au cm^3 .

*
**

Dans ces expériences 5 chevaux ont été utilisés :

1° L'un d'eux a servi de témoin. Ayant reçu 100.000 DM/souris, soit 10 DM/cheval par voie sous-cutanée, les premiers symptômes sont apparus 46 heures après l'injection, la mort survenant 13 heures après.

2° *Dose préventive avant contamination.* Une jument de 370 kg reçoit en sous-cutanée, 100 cm^3 de sérum antibotulique E.

24 heures après est injectée la dose test de toxine : 10 DM/cheval. Réaction locale consécutive avec poussée thermique.

L'animal n'a présenté aucun symptôme de toxi-infection. A la 40^e heure après l'injection de toxine, la courbe de température a seulement marqué un fléchissement léger et éphémère de quelques dixièmes de degré.

La dose de 100 cm^3 de sérum, 24 heures avant la contamination par 10 DM/cheval se révèle donc suffisante pour éviter toute manifestation clinique.

3° *Dose préventive après contamination.* Un mulet de 380 kg reçoit en sous-cutanée, la dose test de 10 DM/cheval; 24 heures après, injection sous-cutanée de 250 cm^3 de sérum antibotulique E.

Aucun symptôme n'apparaît. A peine peut-on noter, ici également, un léger fléchissement de la courbe de température 72 heures après l'injection de toxine.

La dose de 250 cm^3 de sérum, 24 heures après injection de 10 DM/cheval a donc évité l'apparition de l'intoxication.

4° *Dose curative, utilisée après l'apparition des symptômes.* Deux chevaux sont utilisés. Tous deux reçoivent en injection sous-cutanée, 10 DM/cheval de toxine botulique E.

45 heures après, tous deux présentent les premiers symptômes de toxi-infection : début de chute de la température, légère dysphagie. A la 48^e heure, dysphagie complète, sueurs, tremblements; l'un des deux corne légèrement.

a) On injecte alors au premier, cheval de 510 kg, 100 cm³ de sérum antitobotulique E en sous-cutanée.

La température, de 36° au moment de l'injection remonte à la 50^e heure à 36°4, mais retombe bientôt : 55^e heure : 37°7; 60^e heure : 35°. A ce moment, on note de la mydriase, de la dyspnée. L'animal est en décubitus latéral. Mort 62 heures après l'injection de toxine.

A titre curatif, après apparition des symptômes, la dose de 100 cm³ de sérum n'a donc en rien modifié l'évolution, qui n'a même pas été ralentie — par rapport au témoin — et s'est terminée par la mort.

b) Le 2^e cheval, 450 kg, reçoit à la 48^e heure également, 250 cm³ de sérum. A ce moment son état est le même que pour l'animal précédent. Température : 36°6.

La température continue à baisser pendant 4 heures et tombe à 36°2. Puis elle commence à remonter, alors que cliniquement, l'état de l'animal semble encore s'aggraver légèrement.

A la 58^e heure. Température : 37°. Le lendemain elle est aux environs de 38° et s'y maintient désormais.

Parallèlement, l'état clinique s'améliore peu à peu. 72 heures après l'injection de toxine, l'animal peut à nouveau déglutir les liquides et à la 80^e heure quelques bols alimentaires passent dans l'œsophage.

4 jours après l'injection de toxine, l'état est presque normal, seule persiste une gêne de la déglutition. Le lendemain, tout est rentré dans l'ordre.

La dose de 250 cm³ de sérum, après l'apparition des symptômes, a donc bloqué l'évolution de la maladie, et amené une guérison rapide et totale.

CONCLUSIONS

La toxi-infection provoquée par la toxine botulique E comporte une période de latence variant de 24 heures à 72 heures suivant la sévérité de la contamination.

Symptômes et évolution : Sur un animal en état de « paresse » le premier symptôme à apparaître, est une baisse de la température. Elle est accompagnée, ou immédiatement suivie d'un début de dysphagie qui s'aggrave rapidement. En même temps on note une mollesse de la démarche, des sueurs, des tremblements musculaires. Ces symptômes s'aggravent rapidement. La dyspnée et quelquefois du cornage apparaissent. Une mydriase de plus en plus accentuée s'installe. La température continue à

baisser. Il y a paraplégie avec décubitus sterno-abdominal puis latéral. La mort survient en une quinzaine d'heures environ (*).

Lésions : Ce sont des lésions de congestion qui touchent tous les organes : tractus digestif, foie, rate, reins, méninges et encéphale.

La carcasse ne présente pas d'aspect particulier.

Le liquide céphalo-rachidien est limpide.

La toxine n'a pu être mise en évidence en dehors du sérum.

Pronostic : Il est très grave non seulement pour les animaux atteints, mais aussi pour ceux susceptibles d'être contaminés. Il faut agir vite et fort à l'aide de la sérothérapie spécifique.

Traitement : Il réside uniquement dans l'emploi du sérum spécifique. Celui-ci doit être administré le plus tôt possible après l'apparition des premiers symptômes, et à dose massive : au moins 250 cm³, par voie sous-cutanée (ou mieux peut-être par voie veineuse, mais avec toutes les précautions d'usage). Il faut observer le principe de la *dose unique, mais massive*.

Si la guérison survient, elle s'annonce d'abord par la remontée de la température dans les heures qui suivent, les symptômes s'amendant peu à peu en 2 à 3 jours. La guérison est totale et ne semble pas laisser de séquelles.

Prévention : En milieu susceptible de se contaminer, une dose de 100 cm³ de sérum spécifique suffit à mettre les animaux à l'abri de la toxi-infection.

En milieu contaminé, il est prudent d'augmenter notablement les doses avant l'apparition de tout symptôme, et d'utiliser de 200 à 250 cm³ de sérum spécifique par animal.

(Institut Pasteur, annexe de Garches).

Discussion

M. NÉVOT. — On peut être surpris qu'il n'y ait pas de fixation de la toxine sur les centres nerveux.

M. CHEYROUX. — Nous-mêmes avons été surpris de ce résultat. Nous nous attendions à en trouver. Nous avons recherché la toxine dans presque tous les organes, le liquide céphalorachidien, tous les tissus nerveux, le sérum, l'urine, etc. Les souris n'ont manifesté de symptômes botuliques nets qu'avec le sérum.

(*) Nous pouvons dans l'ensemble rapprocher cette symptomatologie de celle donnée par la toxi-infection botulique C (3) chez le cheval. A noter toutefois que dans cette dernière la respiration semble généralement rester calme et que l'animal peut présenter des phénomènes d'excitation (4).

(3) Selon la nouvelle nomenclature (A. R. PRÉVOT. *Bull. Acad. Méd. Vét.*, 1953, p. 421).

(4) A. R. PÉVOT, E. LEMETAYER, L. NICOL, O. GIRARD, R. CORVAZIER ET M. CHEYROUX. — *Bull. Soc. Vét. Pratique*, 1949, 33, 227.

M. NÉVOT. — En principe, on admet, dans ces injections, quand les symptômes nerveux apparaissent, une fixation de toxine déjà sur les autres centres nerveux.

M. CHEYROUX. — PRÉVOT a fait les mêmes constatations dans son expérience.

M. NÉVOT. — Il a dû injecter beaucoup de toxine, car il retrouve la toxine dans le sérum dans les heures qui suivent l'innoculation, mais ensuite les symptômes apparaissent et il ne retrouve plus de toxine dans le sérum.

M. CHEYROUX. — Il est un cas où il a fait ingérer de la toxine botulique C en poudre à un cheval. Au moment de l'autopsie, il a retrouvé de la toxine dans le sérum.

M. NÉVOT. — Si vous avez injecté une grosse quantité, vous avez dû en retrouver à la fois dans le sérum et dans les centres nerveux.

Les injections étaient-elles sous-cutanées ou intraveineuses ?

M. CHEYROUX. — Nous avons fait nos injections de toxine par voie sous-cutanée pour nous mettre dans les conditions les plus favorables à l'intoxication.

M. NICOL. — Cette expérience était intéressante à de nombreux points de vue, tout d'abord pour étudier la toxicité de la toxine botulique E pour le cheval — la symptomatologie de l'intoxication — ensuite pour éclairer la posologie du sérum qui, jusque-là, n'avait pas été étudiée expérimentalement. Si cette expérience a été un peu onéreuse, elle nous a tout de même permis de fixer à la fois la dose préventive et curative de sérum à employer.

En réponse à la question de M. NÉVOT sur la fixation de la toxine sur les centres nerveux, je puis dire que cette expérience a permis de voir que la toxine botulique diffère des toxines tétanique et diphtérique par deux faits :

1° C'est qu'elle répond à la loi « du tout ou rien » : ou on atteint un seuil, qui est la dose mortelle, et on enregistre tous les symptômes dont l'ensemble se déroule jusqu'à la mort; ou on reste au-dessous de cette dose et l'on n'a aucun symptôme, alors qu'avec la toxine tétanique par exemple, il suffit d'un dixième de dose mortelle pour avoir des contractures persistantes et difficilement curables.

2° Que la toxine se fixe très peu sur les tissus nerveux ou, tout au moins, en quantité insuffisante pour être décelée.

Un autre fait qui a frappé tous ceux qui ont utilisé le sérum antitoxique, c'est que ce sérum guérit rapidement les chevaux même très gravement atteints et les guérit complètement sans laisser de séquelles. M. le professeur MARCENAC qui a utilisé ce sérum a constaté qu'un cheval presque mourant, paralysé en décubitus, pouvait encore très rapidement et totalement guéri par ce traitement.

Dans le cas du tétanos et de la diphtérie au contraire, le sérum neutralise la toxine libre, mais ne peut atteindre la toxine fixée sur les centres nerveux ce qui explique les séquelles qui ne disparaissent que lentement. On peut comparer cette action à celle de l'eau dans un incendie qui ne peut sauver que ce que le feu n'a pas encore atteint. Ces faits sont en faveur de la non-fixation de la toxine sur les tissus nerveux.

M. VERGE. — Êtes-vous sûr qu'en donnant une dose de toxine en dessous du seuil vous ne provoquez pas des signes frustrés, quasi inapparents, tels que les paralysies flasques, les symptômes oculaires, etc.

M. NICOL. — Nous n'avons rien observé, avec le botulisme E tout au moins. Tous nos chevaux injectés ont été observés systématiquement à intervalles réguliers toutes les deux heures nuit et jour. Nous avons relevé à chaque fois le pouls, la température, la respiration, la dilatation pupillaire, la contractilité de l'iris, l'absence de dysphagie, etc. En dessous de la dose mortelle nous n'avons trouvé aucun symptôme.

M. NÉVOT. — Il faut admettre que la toxine botulinique n'est pas comme la toxine tétanique ou la toxine diphtérique. Le traitement paraît également curieux, car dans le tétanos il n'y a pas de traitement qui amène une guérison dans les vingt-quatre heures ou dans les trente-six heures.

M. NICOL. — Ceci est d'autant plus frappant que dans les recherches posologiques sur le sérum, chaque cheval a reçu dix doses mortelles de toxine. Ce qu'il y a de remarquable dans le tableau nécroptique chez les chevaux morts d'intoxication botulique c'est la congestion généralisée. Tous les organes, foie, rein, rate, poumon, etc. sont très congestionnés. Il y a donc une action vasculaire très marquée.

M. VERGE. — Parlez-vous de la toxine E ou de la toxine D ?

M. NICOL. — Je parle de la toxine E. Les observations de Prévot sur la toxine D sont d'ailleurs semblables. S'il y a une différence dans la spécificité antigénique, il y a une similitude dans les effets toxiques.