



HAL
open science

Apport des tests PCR quantitatifs de recherche des gènes codant pour les toxines de *Clostridium perfringens* dans la démarche diagnostique des diarrhées aiguës des chiens

Charlotte Petit

► To cite this version:

Charlotte Petit. Apport des tests PCR quantitatifs de recherche des gènes codant pour les toxines de *Clostridium perfringens* dans la démarche diagnostique des diarrhées aiguës des chiens. Sciences du Vivant [q-bio]. 2022. dumas-03765559

HAL Id: dumas-03765559

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03765559>

Submitted on 31 Aug 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ANNEE 2022 - Thèse n°18

**Apport des tests PCR quantitatifs de recherche des gènes codant
pour les toxines de *Clostridium perfringens* dans la démarche
diagnostique des diarrhées aiguës du chien**

THÈSE

pour l'obtention du diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

l'UFR de Médecine de l'Université de Nantes

Le 4 juillet 2022

par

Charlotte Léa Marie PETIT

Sous la direction de

Juan HERNANDEZ-RODRIGUEZ

Président du jury : Monsieur Patrick LUSTENBERGER

Professeur émérite en biochimie à la faculté de médecine de Nantes

Membres du jury : Monsieur Juan HERNANDEZ-RODRIGUEZ

Professeur associé à Oniris

Madame Amandine DRUT

Maître de conférence à Oniris

Membres invités : Monsieur Hervé PREVOST

Professeur à Oniris

ANNEE 2022 - Thèse n°18

**Apport des tests PCR quantitatifs de recherche des gènes codant
pour les toxines de *Clostridium perfringens* dans la démarche
diagnostique des diarrhées aiguës du chien**

THÈSE

pour l'obtention du diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

l'UFR de Médecine de l'Université de Nantes

Le 4 juillet 2022

par

Charlotte Léa Marie PETIT

Sous la direction de

Juan HERNANDEZ-RODRIGUEZ

Président du jury : Monsieur Patrick LUSTENBERGER

Professeur émérite en biochimie à la faculté de médecine de Nantes

Membres du jury : Monsieur Juan HERNANDEZ-RODRIGUEZ

Professeur associé à Oniris

Madame Amandine DRUT

Maître de conférence à Oniris

Membres invités : Monsieur Hervé PREVOST

Professeur à Oniris

Département BPSA Biologie, Pathologie et Sciences de l'Aliment		
Responsable : Emmanuel JAFFRES – Adjointe : Frédérique NGUYEN		
Nutrition et Endocrinologie		
Pharmacologie et Toxicologie	Jean-Claude DESFONTIS (Pr) Yassine MALLEM (Pr) Hervé POULIQUEN (Pr)	Antoine ROSTANG (MC) Meg-Anne MORICEAU (CERC)
Physiologie fonctionnelle, cellulaire et moléculaire	Lionel MARTIGNAT (Pr) Julie HERVE (MC HDR) Grégoire MIGNOT (MC) Adélie SALIN (CERC)	
Histologie et anatomie pathologique	Marie-Anne COLLE (Pr) Jérôme ABADIE (MC)	Laetitia JAILLARDON (MC) Frédérique NGUYEN (MC)
Pathologie générale, microbiologie et immunologie	Hervé SEBBAG (MC)	
Biochimie alimentaire industrielle	Carole PROST (Pr) Joëlle GRUA (MC) Florence TEXIER (MC)	Clément CATANEO (MC) Alix KHALIL (CERC) Laurent LE THUAUT (MC)
Microbiotech	Hervé PREVOST (Pr) Géraldine BOUE (MC) Nabila HADDAD (MC)	Emmanuel JAFFRES (MC) Mathilde MOSSER (mc) Boris MISERY (CERC) Raouf TAREB (MC)
Département SAESP Santé des Animaux d'Élevage et Santé Publique		
Responsable : Raphaël GUATTEO – Adjoint : Jean-Michel CAPPELIER		
Élevage, nutrition et santé des animaux domestiques	Nathalie BAREILLE (Pr) François BEAUDEAU (Pr) Christine FOURICHON (Pr) Lucile MARTIN (Pr)	Juan Manuel ARIZA CHACON (CERC) Ségolène CALVEZ (MC) Aurélien MADOUASSE (MC) Nora NAVARRO-GONZALES (MC)
Infectiologie	Alain CHAUVIN (Pr) François MEURENS (Pr) Emmanuelle MOREAU (Pr) Nathalie RUVOEN-CLOUET (Pr)	Albert AGOULON (MC) Suzanne BASTIAN (MC) Léa LOISEL (CERC) Kenny OBERLE (CERC) Nadine RAVINET (MC)
Médecine des animaux d'élevage	Catherine BELLOC (Pr) Christophe CHARTIER (Pr) Raphaël GUATTEO (Pr) Anne RELUN (MC)	Sébastien ASSIE (MC) Isabelle BREYTON (MC) Mily LEBLANC MARIDOR (MC) Maud ROUAULT (AERC)
Hygiène et qualité des aliments	Jean-Michel CAPPELIER (Pr) Michel FEDERIGHI (Pr) Bruno LE BIZEC (Pr) Marie-France PILET (Pr)	Eric DROMIGNY (MC HDR) Fanny RENOIS-MEURENS (MC HDR) Sofia STRUBBIA (CERC)

Département DSC Sciences cliniques		
Responsable : Catherine IBISCH – Adjoint : Olivier GAUTHIER		
Anatomie comparée	Eric BETTI (MC) Claude GUINTARD (MC) Margarida RIBEIRO DA SILVA NEUNLIST (CERC)	
Pathologie chirurgicale et anesthésiologie	Eric AGUADO (Pr) Olivier GAUTHIER (Pr) Eric GOYENVALLE (MC HDR)	Pierre MAITRE (MC) Caroline TESSIER (MC) Gwénola TOUZOT-JOURDE (MC)
Dermatologie, parasitologie des carnivores et des équidés, mycologie	Jacques GUILLOT (Pr) Emmanuel BENSIGNOR (Pr Ass)	
Médecine interne, imagerie médicale et législation professionnelle vétérinaire	Anne COUROUCE (Pr) Jack-Yves DESCHAMPS (Pr) Françoise ROUX (Pr) Juan HERNANDEZ-RODRIGUEZ (Pr Ass) Nora BOUHSINA (MC)	Nicolas CHOUIN (MC) Amandine DRUT (MC) Marion FUSELLIER-TESSON (MC) Catherine IBISCH (MC) Aurélia LEROUX (MC) Odile SENECAT (MC)
Biotechnologies et pathologie de la reproduction	Jean-François BRUYAS (Pr) François FIENI (Pr)	Djemil BENCHARIF (MC HDR) Lamia BRIAND (MC HDR)
Département GPA Génie des procédés alimentaires		
Responsable : Sébastien CURET-PLOQUIN – Adjointe : Vanessa JURY		
Lionel BOILLEREAUX (Pr) Sébastien CURET-PLOQUIN (Pr) Marie DE LAMBALLERIE (Pr) Francine FAYOLLE (Pr) Michel HAVET (Pr)	Alain LEBAIL (Pr) Olivier ROUAUD (Pr) Kévin CROUVISIER-URION (MC) Vanessa JURY (MC HDR) Emilie KORBEL (MC)	Jean-Yves MONTEAU (MC HDR) Eve-Anne NORWOOD (MC) Raphaël PORYLES (MC) Laurence POTTIER (MC) Cyril TOUBLANC (MC)
Département MSC Management, statistiques et communication		
Responsable : Samira ROUSSELIERE – Adjointe : Evelyne VIGNEAU		
Mathématiques, statistiques, informatique	El Mostafa QANNARI (Pr) Chantal THORIN (Pr Ag) Evelyne VIGNEAU (Pr)	Véronique CARIOU (MC HDR) Philippe COURCOUX (MC) Benjamin MAHIEU (MC) Michel SEMENOU (MC)
Economie, gestion, législation	Jean-Marc FERRANDI (Pr) Pascal BARILLOT (MC) Ibrahima BARRY (MC) Florence BEAUGRAND (MC)	Sibylle DUCHAINE (MC) Sonia MAHJOUR (MC) Samira ROUSSELIERE (MC)
Langues et communication	Marc BRIDOU (PLPA) David GOYLER (Ens. Cont.) Patricia JOSSE (Ens. Cont.)	Shaun MEEHAN (Ens. Cont.) Linda MORRIS (PCEA) Ian NICHOLSON (ENS. Cont.)

Pr Ag : Professeur Agrégé, Pr : Professeur, MC : Maître de Conférence, MCC : MC contractuel,
 PLPA : Professeur Lycée Professionnel Agricole, PCEA : Professeur Certifié Enseignement Agricole,
 HDR : Habilité à Diriger des Recherches, CERC : Chargé d'Enseignement et de Recherche Contractuel,
 Ens. Cont. : Enseignant Contractuel

La reproduction d'extraits de cette thèse est autorisée avec mention de la source. Toute reproduction partielle doit être fidèle au texte utilisé. Cette thèse devra donc être citée en incluant les éléments bibliographiques suivants :

- Nom et prénom de l'auteur : Petit Charlotte
- Année de soutenance : 2022
- Intitulé du diplôme : Thèse de doctorat vétérinaire
- Université de soutenance : Faculté de Médecine de Nantes.
- École de soutenance : ONIRIS, École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique
- Nombres de pages : 106 p.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	5
TABLE DES ANNEXES.....	9
TABLE DES TABLEAUX.....	10
TABLE DES FIGURES	11
TABLE DES ABRÉVIATIONS ET SIGLES	12
INTRODUCTION	13
PARTIE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	15
I. GÉNÉRALITÉS SUR LES DIARRHÉES AIGÜES DU CHIEN	15
A. <i>Histologie et physiologie du tractus intestinal canin</i>	15
1. Histologie du tractus intestinal	15
a. <i>L'intestin grêle.....</i>	16
b. <i>Le côlon.....</i>	19
2. Mouvements intestinaux.....	20
3. Sécrétions digestives	21
4. Système immunitaire.....	23
a. <i>Réaction immunitaire innée et phénomènes protecteurs.....</i>	23
b. <i>Réaction immunitaire spécifique.....</i>	25
c. <i>Phénomène de tolérance.....</i>	26
5. Microbiote du tube digestif du chien	27
B. <i>Mécanismes physiopathologiques de la diarrhée.....</i>	28
1. Diarrhée osmotique.....	28
2. Diarrhée sécrétoire.....	29
3. Diarrhée par altération de la perméabilité intestinale	30

4.	Diarrhée motrice	30
II.	LES DIARRHÉES AIGÜES À <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i>.....	31
A.	<i>Généralités sur Clostridium perfringens et son pouvoir pathogène....</i>	31
1.	Bactériologie.....	31
2.	Toxines produites	32
3.	Implications cliniques chez l'animal et l'homme.....	36
B.	<i>Tableau clinique</i>	38
1.	Diarrhée associée à Clostridium perfringens.....	38
2.	Syndrome de diarrhée hémorragique aiguë (AHDS).....	38
C.	<i>Lésions histologiques</i>	40
D.	<i>Mécanismes physiopathologiques.....</i>	43
1.	Toxines impliquées.....	43
2.	Cause primaire	45
E.	<i>Diagnostic différentiel.....</i>	46
F.	<i>Traitement.....</i>	48
1.	Hospitalisation.....	48
2.	Traitement symptomatique.....	49
3.	Antibiothérapie	51
4.	Prébiotiques et probiotiques.....	53
5.	Transplantation de microbiote fécal.....	53
III.	DIAGNOSTIC D'ENTÉRITE AIGÜE ASSOCIÉE À <i>C. PERFRINGENS</i>.....	54
A.	<i>Tableau clinique</i>	54
1.	Commémoratifs et anamnèse	54
2.	Examen clinique.....	56
B.	<i>Analyses sanguines.....</i>	57
1.	Analyse biochimique.....	57
2.	NFS.....	58

<i>C. Coproscopie</i>	<i>59</i>
<i>D. Imagerie</i>	<i>60</i>
1. Radiographie abdominale	60
2. Échographie	61
<i>E. Coproculture</i>	<i>61</i>
<i>F. Techniques immunologiques</i>	<i>62</i>
1. Exclusion d'autres causes	62
2. Implication de Clostridium perfringens	63
<i>G. Techniques moléculaires</i>	<i>64</i>
1. Exclusion des causes autres.....	64
2. Implication de Clostridium perfringens	65
<i>a. La toxine alpha.....</i>	<i>65</i>
<i>b. L'entérotoxine.....</i>	<i>66</i>
<i>c. La toxine NetF</i>	<i>68</i>
<i>d. L'hybridation in situ fluorescente</i>	<i>70</i>
<i>H. Récapitulatif de la démarche diagnostique</i>	<i>71</i>
PARTIE II : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE	73
I. OBJECTIFS.....	73
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES	75
III. RÉSULTATS.....	77
<i>A. Gène codant pour la toxine alpha.....</i>	<i>77</i>
<i>B. Gène codant pour l'entérotoxine.....</i>	<i>79</i>
<i>C. Autres tests PCR et examens parasitologiques</i>	<i>80</i>
IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	81
<i>A. Méthode de détection</i>	<i>81</i>

<i>B. Gènes et toxines ciblés</i>	<i>82</i>
<i>C. Échantillon prélevé</i>	<i>83</i>
<i>D. Recrutement.....</i>	<i>84</i>
<i>E. Utilisation en pratique</i>	<i>84</i>
<i>F. Perspectives.....</i>	<i>85</i>
CONCLUSION	86
ANNEXES.....	88
BIBLIOGRAPHIE.....	92

TABLE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : ÉCHELLE DE SCORE FÉCAL (ÉCHELLE PURINA PROPLAN).....	88
ANNEXE 2 : EXEMPLE DE FEUILLE DE RÉSULTAT DE L'EXAMEN PARASITOLOGIQUE ET DU BILAN DIARRHÉE REALPCR.....	89
ANNEXE 3 : POSTER PRÉSENTÉ PAR IDEXX EN 2012 « LA QUANTIFICATION DES TOXINES DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS EST UN PRÉDICTEUR DE DIARRHÉE CHEZ LE CHIEN ET LE CHAT »	91

TABLE DES TABLEAUX

TABLEAU I : DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL DE LA DIARRHÉE AIGUË CHEZ LE CHIEN.....	47
TABLEAU II : COMPARAISON DU POURCENTAGE DE DÉTECTION DE LA TOXINE CPE CHEZ LE CHIEN SAIN, DIARRHÉIQUE OU PRÉSENTANT UN AHDS.....	64
TABLEAU III : COMPARAISON DU POURCENTAGE DE DÉTECTION DU GÈNE CPA CHEZ LE CHIEN SAIN, DIARRHÉIQUE OU PRÉSENTANT UN AHDS.....	66
TABLEAU IV : COMPARAISON DU POURCENTAGE DE DÉTECTION DU GÈNE CPE CHEZ LE CHIEN SAIN, DIARRHÉIQUE OU PRÉSENTANT UN AHDS.....	68
TABLEAU V : COMPARAISON DU POURCENTAGE DE DÉTECTION DU GÈNE NET F CHEZ LE CHIEN SAIN, LE CHIEN PRÉSENTANT UNE PARVOVIROSE OU UN AHDS	69
TABLEAU VI : CRITÈRES DE NON-INCLUSION À L'ÉTUDE	75
TABLEAU VII : AGENTS INFECTIEUX TESTÉS DANS LE CANINE DIARRHEA REAL PCRTM PANEL	76
TABLEAU VIII : RÉSULTATS DES TESTS QPCR CIBLANT LES GÈNES CPA ET CPE	77

TABLE DES FIGURES

FIGURE 1 : STRUCTURE HISTOLOGIQUE DE BASE DU TUBE DIGESTIF	16
FIGURE 2 : ORGANISATION DE L'INTESTIN GRÊLE EN PLIS CIRCULAIRES ET VILLOSITÉS	17
FIGURE 3 : ORGANISATION HISTOLOGIQUE DE L'ÉPITHÉLIUM DES CRYPTES DE LIEBERKHÜN DE L'INTESTIN GRÊLE.....	18
FIGURE 4 : ORGANISATION HISTOLOGIQUE COMPARÉE DE L'INTESTIN GRÊLE ET DU CÔLON	20
FIGURE 5 : ORGANISATION DU GALT (CHEVAILLER ET AL. 2018)	26
FIGURE 6 : SYSTÈME DE TOXINOTYPE ACTUEL DE C. PERFRINGENS (GOHARI ET AL. 2021)	33
FIGURE 7 : EFFETS HISTOLOGIQUES DE L'ENTÉROTOXINE DE C. PERFRINGENS SUR LES ANSES INTESTINALES DE LAPIN (A. AVEC ENTÉROTOXINE : RACCOURCISSEMENT DES VILLOSITÉS ET DESQUAMATION ÉPITHÉLIALE, B. GROUPE CONTRÔLE POUR COMPARAISON) (GOHARI ET AL. 2021).....	35
FIGURE 8 : MÉCANISMES D'ACTION DES TOXINES DE C. PERFRINGENS DANS LE CONTEXTE DES INFECTIONS INTESTINALES (KIU, HALL 2018).....	36
FIGURE 9 : COUPES HISTOLOGIQUES DE DUODÉNUM DE CHIEN PRÉSENTANT UN AHDS	41
FIGURE 10 : PRÉSENCE DE BACILLES GRAM POSITIF AU SOMMET DES VILLOSITÉS NÉCROTIQUES DE L'ÉPITHÉLIUM DU DUODÉNUM D'UN CHIEN PRÉSENTANT UN AHDS (LEIPIG-RUDOLPH ET AL. 2018)	42
FIGURE 11 : PRISE EN CHARGE D'UN CHIEN PRÉSENTANT UNE DIARRHÉE AIGUË	72
FIGURE 12: PRINCIPE DE LA MÉTHODE PCR QUANTITATIVE	74
FIGURE 13 : NOMBRE DE COPIES DU GÈNE CPA PAR GRAMME DE FÈCES (ÉCHELLE LOGARITHMIQUE)	78
FIGURE 14 : CLASSEMENT PAR CATÉGORIE DES RÉSULTATS DES CHIENS SAINS À LA PCR CIBLANT LE GÈNE CPA.....	78
FIGURE 15 : NOMBRE DE COPIES DU GÈNE CPE PAR GRAMME DE FÈCES (ÉCHELLE LOGARITHMIQUE)	79
FIGURE 16 : CLASSEMENT PAR CATÉGORIE DES RÉSULTATS DES CHIENS SAINS À LA PCR CIBLANT LE GÈNE CPE.....	80

TABLE DES ABRÉVIATIONS ET SIGLES

ADN	: Acide désoxyribonucléique
AHDS	: Syndrome de diarrhée hémorragique aiguë
AMPc	: Adénosine monophosphate cyclique
<i>cpa</i>	: Gène codant pour la toxine alpha de <i>Clostridium perfringens</i>
CPA	: Toxine alpha de <i>Clostridium perfringens</i>
CPB	: Toxine bêta de <i>Clostridium perfringens</i>
<i>cpe</i>	: Gène codant pour l'entérotoxine de <i>Clostridium perfringens</i>
CPE	: Entérotoxine de <i>Clostridium perfringens</i>
CMM	: Complexes moteurs migrants
CRP	: Protéine C-Réactive
Ct	: Cycle Threshold
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FISH	: Fluorescent In Situ Hybridization
GALT	: Gut Associated Lymphoid Tissue
GMC	: Giant Migrating Contractions
GMPc	: Guanosine Monophosphate cyclique
MICI	: Maladie Inflammatoire Chronique Intestinale
NetF	: Toxine NetF de <i>Clostridium perfringens</i>
<i>netF</i>	: Gène codant pour la toxine NetF de <i>Clostridium perfringens</i>
NFS	: Numération et Formule Sanguine
PAF	: Platelet Activating Factor
PCR	: Polymerase Chain Reaction
qPCR	: quantitative Polymerase Chain Reaction
RPLA	: Reverse Passive Latex Agglutination

INTRODUCTION

La diarrhée est un signe clinique très fréquemment rencontré en consultation vétérinaire. Elle se caractérise par une augmentation de la fréquence, du volume des selles ou encore une diminution de leur consistance. Une diarrhée est qualifiée de « aiguë » lorsque les signes cliniques persistent depuis moins de 2 semaines. Les diarrhées aiguës connaissent des causes extra-digestives telles qu'une maladie pancréatique, hépatique, endocrinienne ou rénale ou une infection systémique. La cause peut aussi être digestive de nature infectieuse, parasitaire, toxique, alimentaire, occlusive, tumorale ou inflammatoire.

Les diarrhées d'origine virale ou bactérienne sont communes particulièrement chez les animaux jeunes, immunodéprimés, vivant en communauté ou dans de mauvaises conditions sanitaires (Ettinger, Feldman, Côté 2017). Les agents en cause sont le plus souvent le parvovirus canin, *Salmonella spp.* ou *Campylobacter spp.*. L'importance du rôle du coronavirus, de *Clostridium perfringens* et d'*Escherichia coli* restent encore à définir. Cependant, il est parfois compliqué de mettre en cause ces agents infectieux car beaucoup de ces bactéries sont commensales dans le tube digestif et donc présentes chez les individus sains. Il n'existe pas toujours de tests fiables pour mettre en cause l'agent à l'origine de la diarrhée.

C. perfringens est un bacille gram positif, anaérobie strict et sporulé qui est fréquemment impliqué dans le développement de maladies dans plusieurs espèces dont le chien (Kiu, Hall 2018). Il produit plusieurs toxines pathogènes différentes selon le biotype et la souche auquel il appartient.

Cependant, *C. perfringens* est aussi fréquemment identifié dans la flore commensale intestinale du chien sain (Weese et al. 2001). Cela rend difficile sa mise en cause dans l'apparition d'une diarrhée. Il n'existe pas à ce jour de méthode de référence permettant d'impliquer *C. perfringens* dans un cas de diarrhée chez un chien. Deux tests basés sur l'immunodétection sont néanmoins commercialisés, un test ELISA et un test RPLA dirigés contre son entérotoxine (Marks et al. 2011). Des tests PCR permettant de déceler les gènes codant pour la toxine alpha (CPA) et l'entérotoxine (CPE) sont aussi disponibles commercialement. Cependant, l'interprétation de ces tests est très délicate du fait de

l'importance du portage asymptomatique (Goldstein et al. 2012). L'évaluation de leur spécificité et de leur sensibilité est nécessaire pour permettre leur interprétation.

La PCR quantitative est une méthode de biologie moléculaire permettant de quantifier l'ADN codant pour d'une séquence d'intérêt grâce à une amplification. Cette méthode est aussi proposée commercialement pour la détection du gène codant pour la CPA et la CPE de *C. perfringens*. L'utilisation de cette technique semblerait présenter une sensibilité et spécificité supérieures aux autres tests lui conférant un rôle diagnostique supérieur (Leutenegger, Marks, Robertson 2012).

L'objet de notre travail est de contribuer à préciser l'intérêt diagnostique des tests PCR quantitatifs de détection des gènes codant pour les CPA et CPE de *Clostridium perfringens* chez le chien.

Nous commencerons par rappeler les mécanismes physiopathogéniques des diarrhées chez le chien. Dans un second temps, l'aspect clinique des diarrhées associées à *C. perfringens* sera abordé. Nous nous intéresserons ensuite aux méthodes diagnostiques utilisées en comparant les différents moyens diagnostiques permettant de présomptivement imputer la diarrhée à *C. perfringens*. Dans une dernière partie expérimentale, nous étudierons les résultats d'analyse à un panel de tests PCR quantitatifs réalisé sur une cohorte de 16 chiens cliniquement sains recrutés dans le cadre de la constitution d'une coprothèque. Cette étude consistera à comparer les résultats des chiens sains à des valeurs seuil retenues par le laboratoire pour les gènes codant de la CPA et de la CPE afin de contribuer à éclairer le lecteur sur l'interprétation possible de ces tests.

PARTIE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur les diarrhées aiguës du chien

A. Histologie et physiologie du tractus intestinal canin

Chez le chien, le tube digestif est constitué de la cavité buccale, le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle et le côlon. Sa fonction principale est l'assimilation de nutriments en 5 étapes successives: ingestion, fragmentation, digestion, absorption et élimination des produits de dégradation. Le tractus gastro-intestinal, composé de l'estomac et des intestins, forme la plus grande partie du tube digestif. (Bacha, Bacha 2000; Young et al. 2015; Mansour-Djaalab 2015; Ettinger, Feldman, Côté 2017)

1. Histologie du tractus intestinal

La structure histologique de base en 4 tuniques concentriques est la même tout le long du tractus gastro-intestinal. Les 4 couches fonctionnelles de l'intérieur vers de l'extérieur sont la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculieuse et l'adventice (figure 1).

La **muqueuse** est la tunique qui varie le plus selon le segment du tube digestif concerné. Il s'agit de la couche la plus importante cliniquement puisqu'elle a une fonction sécrétrice, d'absorption et de barrière. Elle est constituée de l'épithélium de revêtement reposant sur le la *lamina propria* (ou chorion) entourée elle-même d'une musculieuse muqueuse. La musculieuse muqueuse comprend deux couches de cellules musculaires lisses : la couche interne disposée circulairement et la couche externe organisée longitudinalement.

La **sous-muqueuse** est une tunique conjonctive riche en fibres nerveuses formant le plexus de Meissner.

La **musculieuse** se compose d'une couche interne de cellules musculaires lisses organisées circulairement, de fibres nerveuses formant le plexus d'Auerbach, et d'une couche externe de cellules musculaires lisses organisées longitudinalement. Enfin, l'**adventice** de nature conjonctive lâche délimite la paroi. Elle est le tissu de soutien pour les gros vaisseaux

et les nerfs et permet le stockage de tissu adipeux. Dans la cavité abdominale, elle est assimilée à une séreuse (ou au péritoine viscéral) et est revêtue d'un épithélium pavimenteux.

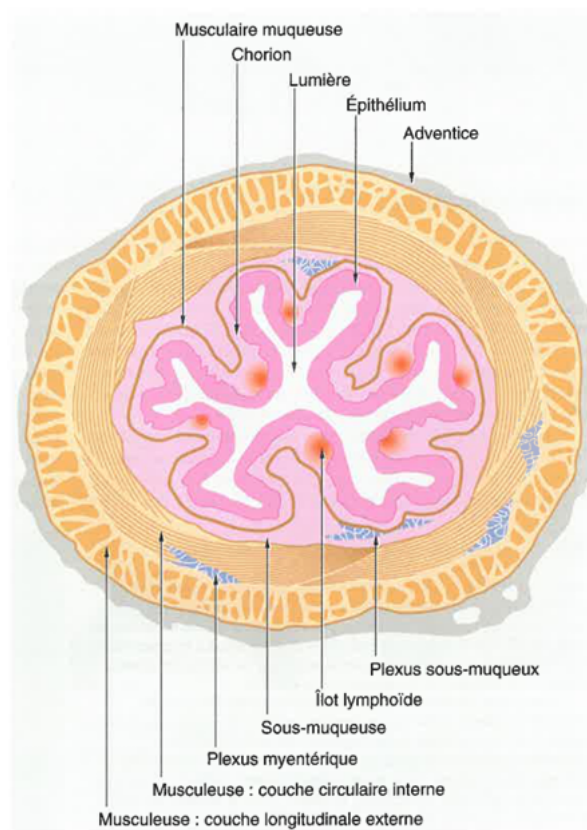
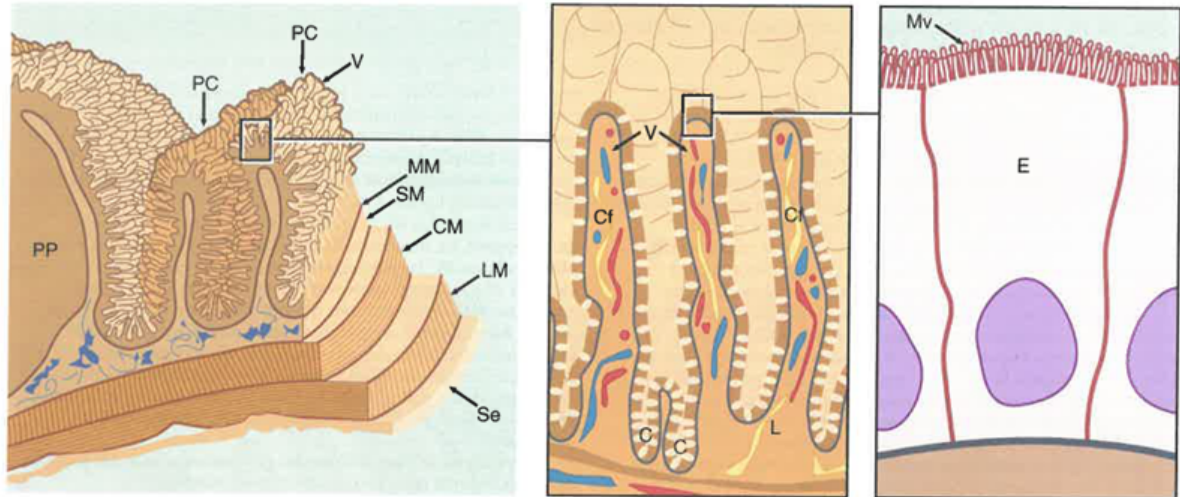


Figure 1: Structure histologique de base du tube digestif (Young et al. 2015)

a. L'intestin grêle

L'intestin grêle est la partie du tube digestif partant du pylore et se terminant à la valvule iléo-caeco-colique. Il est divisé en 3 segments : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Au niveau de l'intestin grêle, la surface de contact est amplifiée de plusieurs centaines de fois en formant des replis et villosités à différentes échelles (figure 2), permettant ainsi à l'intestin de remplir sa fonction première, l'absorption.



C cryptes **Cf** chylifères **Ch** chorion **CM** couche circulaire interne de la musculature **E** entérocytes **LM** couche longitudinale externe de la musculature **MM** musculature muqueuse **Mv** microvillosités **PC** plis circulaires **PP** plaques de Peyer **Se** séreuse **SM** sous-muqueuse **V** villosités intestinales

Figure 2 : Organisation de l'intestin grêle en plis circulaires et villosités (Young et al. 2015)

La muqueuse est constituée d'un épithélium simple qui repose sur la *lamina propria*. La finesse de l'épithélium permet de faciliter les échanges et plus particulièrement l'absorption des nutriments. Les jonctions serrées entre les cellules épithéliales sont composées de complexes multiprotéiques incluant des protéines de la famille des claudines. Elles permettent de limiter les échanges entre la lumière et le milieu interstitiel aux échanges contrôlés par les cellules épithéliales. Les cellules qui composent l'épithélium sont majoritairement des entérocytes, des cellules mucipares ou des cellules de Paneth (figure 3).

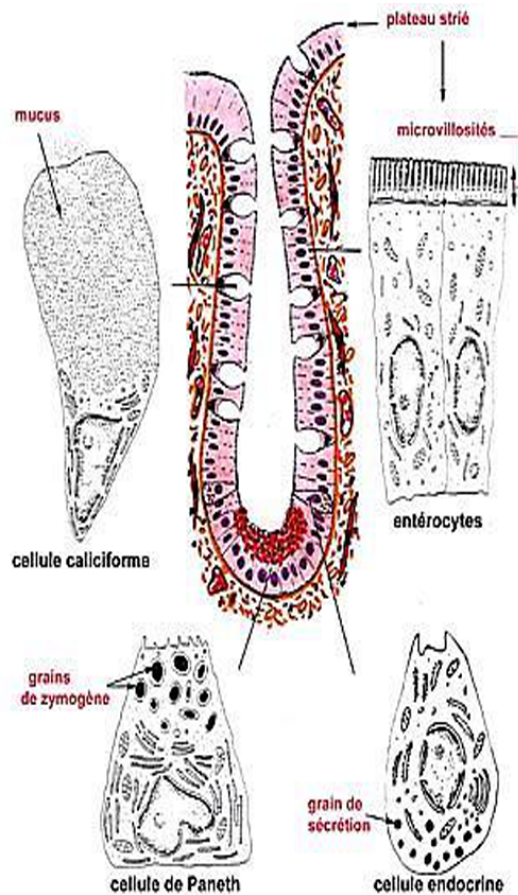


Figure 3 : Organisation histologique de l'épithélium des cryptes de Lieberkühn de l'intestin grêle (Mansour-Djaalab 2015)

Le long de l'intestin grêle, la muqueuse et la sous-muqueuse forment des plis transversaux particulièrement nombreux au niveau du jéjunum, nommés **valvules conniventes** ou **plis circulaires**. De plus, des expansions de la muqueuse sous forme de projections digitiformes nommées **villosités intestinales** accroissent aussi la surface d'échange. Des cryptes de Lieberkühn se situent à la base des villosités intestinales et sont constituées majoritairement d'entéroblastes, cellules cylindriques indifférenciées pouvant se diviser et se différencier. Elles sont à l'origine du renouvellement de l'épithélium en produisant entérocytes et cellules mucipares au niveau de la zone germinative. La plupart de ces entéroblastes se différencient en entérocytes en migrant jusqu'au pôle apical des villosités où ils restent 2 à 3 jours avant d'être éliminés dans la lumière du tube digestif.

Les entérocytes sont des cellules cylindriques polaires dont le pôle luminal est constitué de **microvillosités** qui accroissent la surface d'échange avec la lumière intestinale. Elles sont

responsables du processus d'absorption. On parle de "bordure en brosse" du fait de l'apparence de l'épithélium au microscope. Ces entérocytes jouent aussi un rôle dans la digestion: ils produisent des enzymes digestives telles que les diosidases ou les peptidases entérocytaires permettant la dernière étape de digestion des glucides et des protides avant leur absorption.

Les cellules mucipares ou cellules caliciformes à mucus sont dispersées dans l'épithélium. Elles assurent un rôle protecteur de la muqueuse et lubrifiant en produisant de la mucine qui forme une couche de mucus sur l'épithélium. Les cellules de Paneth, situées à la base des cryptes et distinguées par leurs granules apicaux éosinophiles, ont une fonction de défense. Leurs granules contiennent des peptides antimicrobiens (défensines) et des enzymes protectrices (lysozyme et phospholipase A) qu'elles libèrent afin de protéger les cryptes des agents pathogènes. Les cellules épithéliales reposent toutes sur la *lamina propria*, un tissu conjonctif lâche qui soutient et assure la nutrition de l'épithélium.

Le duodénum se distingue histologiquement des autres portions de l'intestin grêle par la présence importante de glandes tubulaires ramifiées et pelotonnées dans la sous-muqueuse, les glandes de Brunner. Lors du passage de chyme dans le duodénum, ces glandes sécrètent un mucus filant et alcalin afin de neutraliser l'acidité du chyme à la sortie de l'estomac ce qui permet de protéger la muqueuse duodénale.

b. Le côlon

Le côlon est la partie de l'intestin qui fait suite au caecum et s'étend jusqu'au rectum. L'épithélium de sa muqueuse est composé des mêmes cellules principales que l'intestin grêle, les entérocytes et les cellules mucipares, mais la muqueuse ne forme pas de plis circulaires distincts. En effet, le rôle d'absorption du côlon est moindre et se réduit plutôt à l'absorption d'eau et de sels minéraux. Les cellules épithéliales forment de nombreuses glandes tubulaires droites ou cryptes qui sont très proches les unes des autres. Les cellules mucipares prédominent à la base de glandes. Elles sont de plus en plus nombreuses sur la partie distale du côlon afin de produire du mucus en quantité suffisante pour permettre au contenu plus sec de progresser dans le tube digestif.

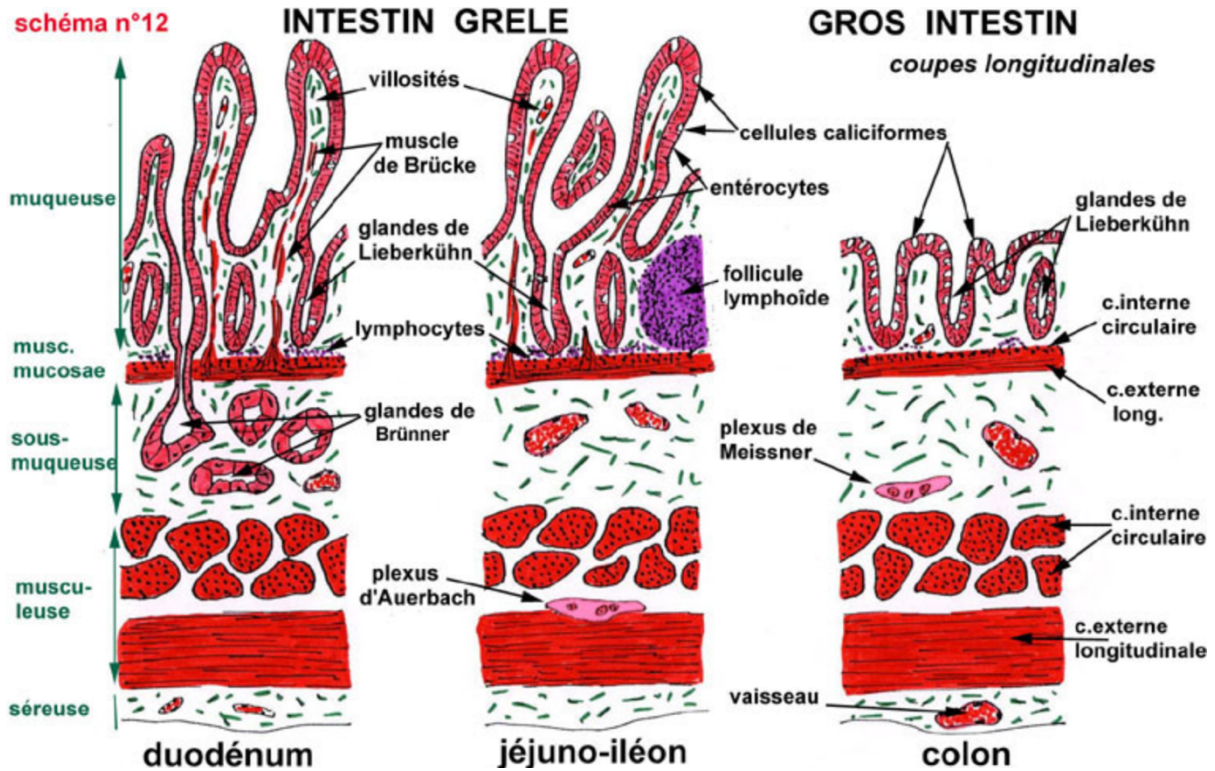


Figure 4 : Organisation histologique comparée de l'intestin grêle et du côlon (Mansour-Djaalab 2015)

À la différence de l'intestin grêle, les parties ascendantes et descendantes du côlon sont fixes dans la cavité péritonéale. Leur séreuse les attache fermement au péritoine pariétal. La musculaire est plus épaisse que dans l'intestin grêle afin d'assurer une activité péristaltique puissante.

2. Mouvements intestinaux

Les mouvements macroscopiques de l'intestin sont longitudinaux et involontaires et sont de 3 natures différentes (Klein 2019; Guyton, Hall 2016; Ettinger, Feldman, Côté 2017) :

- Les mouvements **pendulaires**, de glissement des anses entre elles que l'on retrouve uniquement dans l'intestin grêle.
- Les mouvements de **segmentation rythmique** qui permettent de brasser et de segmenter le contenu intestinal local sans progression dans le tube digestif. Ils sont à l'origine d'une meilleure absorption du contenu

intestinal et sont particulièrement importants dans le côlon afin de déshydrater le contenu intestinal.

- Les mouvements de **péristaltisme** : les fibres musculaires se contractent en amont et se relâchent en aval permettant la progression du contenu dans le tube digestif.

Les contractions intestinales ne sont pas aléatoires mais régulées et organisées selon le schéma spatio-temporel de complexes moteurs migrants (CMM) en 3 phases : absence de contraction, brassage puis péristaltisme. Ces CMM sont initiés par les cellules de Cajal situées dans le tissu interstitiel entre la couche longitudinale et circulaire de la musculature. Cette motricité intestinale est régulée de plusieurs façons :

- Lorsqu'une fibre lisse est étirée lors du passage de contenu intestinal, elle se dépolarise, se contracte et transmet la dépolarisation aux cellules voisines. Ce **contrôle myogène** est à l'origine des mouvements pendulaires et de segmentation rythmique.
- Les plexus d'Auerbach et de Meissner fonctionnant de manière autonome, ils constituent un **contrôle nerveux intrinsèque intrapariétal** stimulant le péristaltisme.
- Le système nerveux autonome régule la motricité gastro-intestinale de façon réflexe. Le système parasympathique active la motricité tandis que le sympathique l'inhibe. Il s'agit d'un **contrôle nerveux extrinsèque**.
- Il existe aussi un **contrôle endocrine, paracrine et métabolique** : la motiline, la gastrine, le glucose (hypoglycémie) et la CCK-PZ stimulent la motricité tandis que la somatostatine, l'adrénaline, la sécrétine et le glucagon l'inhibent.

3. Sécrétions digestives

Afin d'absorber les nutriments présents dans l'alimentation à travers les entérocytes, le bol alimentaire doit être fragmenté en petites molécules afin d'être absorbée dans la circulation. Pour cela, les sécrétions digestives sont indispensables. Elles sont principalement produites par les glandes salivaires, l'estomac, le pancréas et le foie (Klein 2019; Gilles 2006; Rieutort 1999).

La **salive** permet d'humidifier et donc de lubrifier le bol alimentaire mais aussi d'initier la digestion avec des enzymes telles que l'amylase salivaire permettant l'hydrolyse de l'amidon et du glycogène.

L'**estomac** sécrète principalement de l'*acide chlorhydrique* permettant d'acidifier le milieu, et des enzymes protéolytiques. L'acidification du milieu assure plusieurs fonctions: elle détruit la plupart des micro-organismes pathogènes, elle initie la digestion des glucides et dénature les protéines et enfin, elle active certaines enzymes. En effet, les enzymes produites par l'estomac sont très puissantes et sont donc sécrétées sous la forme de précurseurs inactifs. Elles sont activées dans la lumière de l'estomac : ce sont des zymogènes. Par exemple, le *pepsinogène* sécrété par les cellules principales de l'estomac est activé en pepsine dans le milieu acide que constitue la lumière de l'estomac ce qui lui permet de décomposer les protéines en peptides.

Le **pancréas** sécrète un suc aqueux composé de nombreuses enzymes, d'hydrogencarbonates et de mucus qui est déversé dans la partie haute de l'intestin grêle par la papille duodénale accessoire pour la majeure partie chez le chien. Les enzymes principales sont le *trypsinogène* qui poursuit la dégradation des protides une fois activé en trypsine dans l'intestin, la *lipase* qui hydrolyse les lipides en glycérol et acides gras, et l'*amylase pancréatique* qui scinde les osides en oses. Les *hydrogencarbonates* sécrétés permettent de neutraliser l'acidité du chyme alimentaire après son passage dans l'estomac et ainsi éviter l'autodigestion de l'intestin.

La bile produite par le **foie** permet la digestion des lipides en favorisant leur émulsion. Elle contient des phospholipides, du cholestérol mais surtout des acides biliaires. Les acides biliaires sont constitués d'une partie hydrophobe et une partie hydrofuge ce qui lui confère une fonction détergente en rendant les lipides solubles dans l'eau. Les acides biliaires produits par le foie sont dits primaires. Ils sont ensuite transformés en acides biliaires secondaires par le microbiote intestinal et plus particulièrement par *Clostridium hiranonis* chez le chien (Ziese, Suchodolski 2021). Le foie étant un organe avec une fonction de filtre, on retrouve aussi dans la bile des métabolites qui nécessitent d'être excrétés par le corps comme la bilirubine.

Seule la dernière étape de l'hydrolyse des glucides et protéines est réalisée par les entérocytes via la production de diosidase et de peptidase entérocytaires fixées à leur membrane apicale. Les nutriments peuvent ensuite être transportés à travers la muqueuse.

4. Système immunitaire

Étant donné la continuité du tube digestif avec l'extérieur, le tube digestif représente une porte d'entrée pour les agents pathogènes. A l'interface avec la lumière, la muqueuse du tube digestif joue un rôle de barrière. Elle empêche les infections par les agents pathogènes tout en restant tolérante envers les antigènes de la nourriture mais aussi de la flore commensale (Ettinger, Feldman, Côté 2017; Bach 1999; Stokes, Waly 2006).

a. Réaction immunitaire innée et phénomènes protecteurs

Avant même l'intervention du système immunitaire, certains mécanismes physiologiques permettent de prévenir la pénétration des agents pathogènes dans le milieu interstitiel. Tout d'abord, Le **microbiote intestinal** protège l'hôte des pathogènes par le mécanisme de résistance à la colonisation. En effet, la flore résidente entre en compétition avec les pathogènes pour les ressources comme l'oxygène et les nutriments mais aussi pour le milieu notamment pour les sites d'adhésion à la muqueuse (J. S. Suchodolski 2011).

Le **mucus** joue aussi un rôle de barrière en piégeant les micro-organismes. Il est majoritairement constitué de glycoprotéines de haut poids moléculaire nommées mucines présentant de nombreuses chaînes O-glycosylées. Ces chaînes sont très hétérogènes entre elles ce qui rend possible la liaison potentielle à une grande diversité de micro-organismes. Ce gel très hydraté qui tapisse et lubrifie les parois intestinales est ensuite éliminé par les mouvements de **péristaltisme** avec les micro-organismes qui lui sont fixés. Dans sa couche la plus proche de l'épithélium, du lysozyme et les IgA sécrétoires se concentrent et contribuent à l'immunoprotection non spécifique en exerçant des propriétés antibactériennes (Gaudier, Hoebler 2006).

Enfin, l'**épithélium** joue un rôle de barrière physique notamment grâce à ses jonctions serrées qui régulent le passage des molécules et des ions à travers l'espace paracellulaire.

Lorsque ces mécanismes physiologiques sont insuffisants pour lutter contre les agressions, une **réponse immunitaire innée** se met en place. De nombreuses cellules immunes innées sont présentes dans la paroi intestinale de façon à agir rapidement.

Tout d'abord, les **macrophages** présents dans la *lamina propria* et les plaques de Payer exercent une activité de phagocytose très efficace. Ils produisent aussi de nombreuses cytokines, chimiokines et médiateurs de l'inflammation tels que le TNF-alpha, les eicosanoïdes ou les leucotriènes (Ettinger, Feldman, Côté 2017). Ils ont aussi producteurs de l'interleukine 10, un médiateur anti-inflammatoire permettant l'élimination des bactéries franchissant l'épithélium sans déclencher de réponse inflammatoire délétère (Chevailler et al. 2018; Mowat, Bain 2011).

Des **granulocytes neutrophiles** sont présents en faible nombre de façon physiologique dans la *lamina propria* mais en cas d'inflammation, leur nombre augmente de façon importante pour exercer une activité de phagocytose importante (Zindl et al. 2013). Des **mastocytes** et des **granulocytes éosinophiliques** sont aussi présents dans la *lamina propria*. En cas d'inflammation, ils produisent des médiateurs chimiques de l'inflammation tels que l'histamine, l'héparine, des eicosanoïdes ou des cytokines. Les granulocytes éosinophiliques sont un des types de cellules immunitaires les plus représentés dans la *lamina propria* chez le chien. Ils ont un rôle pro-inflammatoire majeur particulièrement lors de phénomènes allergiques (Ettinger, Feldman, Côté 2017).

Certains **lymphocytes** situés au sein de l'épithélium, les lymphocytes intra-épithéliaux, jouent un rôle dans la réaction immunitaire innée. Ils constituent la première ligne de défense contre les agents pathogènes par leur action cytotoxique. D'autres **cellules lymphoïdes innées** dépourvues de récepteurs spécifiques aux antigènes telles que les cellules Natural Killer, sont en contact avec les cellules épithéliales. Malgré leur faible quantité par rapport aux autres cellules hématopoïétiques de l'intestin, elles jouent un rôle important dans l'initiation et l'orientation des réponses immunitaires (Chevailler et al. 2018; Ettinger, Feldman, Côté 2017; Sonnenberg, Artis 2015).

b. Réaction immunitaire spécifique

L'ensemble de ces moyens de défense peut s'avérer parfois insuffisant. Une **réaction immunitaire spécifique** se met alors en place. Elle est assurée par un tissu lymphoïde associé à la muqueuse de l'intestin : le GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue) (figure 5). Il est constitué de tissu lymphoïde agrégé mais aussi d'un tissu lymphoïde diffus (Stokes, Waly 2006; Elwood, Hamblin, Batt 1997; Elwood, Garden 1999)

Le **tissu lymphoïde diffus** se situe majoritairement dans la *lamina propria* de la muqueuse. On y retrouve des plasmocytes, des lymphocytes T et des cellules dendritiques. Il existe aussi des lymphocytes T intra épithéliaux qui représente la première ligne de défense immunitaire spécifique.

Le **tissu lymphoïde agrégé** est composé des follicule clos, des plaques de Peyer et des nœuds lymphatiques mésentériques. En effet, des follicules lymphoïdes de taille importante s'individualisent et s'étendent de la muqueuse à la musculuse : ce sont les follicules clos. Dans l'intestin grêle et plus particulièrement dans l'iléon, ils forment des îlots dans la *lamina propria* nommés plaques de Peyer qui apparaissent comme des dômes entre les villosités de quelques millimètres à quelques centimètres.

En regard des follicules clos et des plaques de Peyer, les villosités intestinales disparaissent et sont remplacées par un épithélium prismatique infiltré de cellules lymphoïdes, de macrophages mais aussi de cellules M qui assurent une forte activité de pinocytose et de transport des antigènes de la lumière intestinale vers les follicules clos.

La présentation des antigènes est alors assurée par les cellules M, les cellules dendritiques de la *lamina propria* mais aussi par les entérocytes. Après la présentation des antigènes aux lymphocytes T, des mécanismes effecteurs sont mis en place. Les lymphocytes T migrent vers les nœuds lymphatiques pour finaliser leur maturation avant de rejoindre la muqueuse intestinale. De leur côté, les lymphocytes B forment des centres germinatifs au sein des plaques de Peyer où ils prolifèrent et changent de classe d'anticorps des IgM vers des IgA. Ils rejoignent ensuite les nœuds lymphatiques pour finir leur maturation puis migrer vers la muqueuse où ils assurent la production d'IgA sécrétés dans la lumière intestinale par transcytose au travers des entérocytes (Hart 1979).

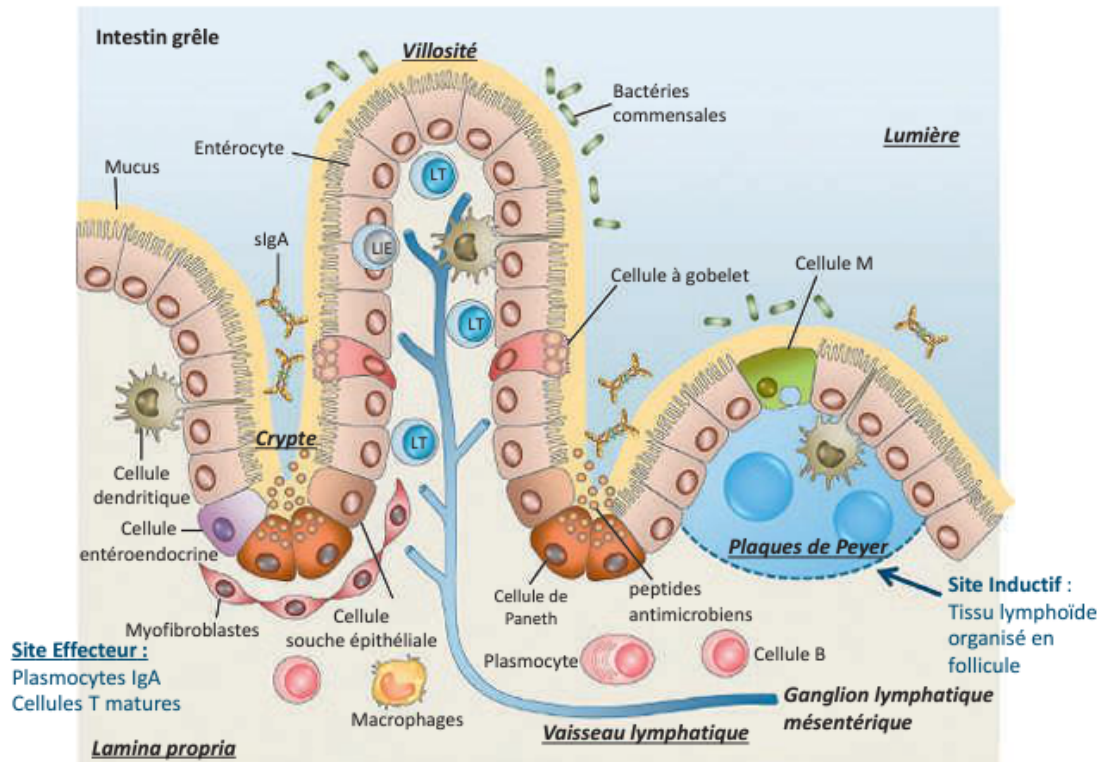


Figure 5: Organisation du GALT (Chevailler et al. 2018)

c. Phénomène de tolérance

Étant donné le grand nombre d'antigènes présents dans le contenu intestinal n'appartenant pas au "soi", les lymphocytes T régulateurs ou encore les cellules dendritiques de la *lamina propria* occupent un rôle majeur pour maintenir une certaine tolérance envers les antigènes non nocifs. La tolérance est un phénomène complexe qui met en jeu de nombreux facteurs tels que le sevrage, des facteurs génétiques, l'alimentation ou la flore microbienne. Le microbiote intestinal joue en effet un rôle important dans l'installation et la régulation de la réaction immunitaire indispensable au maintien de l'homéostasie (Gaboriau-Routhiau, Cerf-Bensussan 2016).

En cas de franchissement de l'épithélium ou d'agression par des bactéries pathogènes, l'équilibre entre le système immunitaire et le microbiote peut être rompu. Les réponses innées mais aussi les réponses adaptatives s'intensifient pour stopper la menace (Goto, Kiyono 2012). Cependant, une réaction immunitaire excessive peut s'avérer délétère pour l'hôte. Par exemple,

un afflux massif de polynucléaires éosinophiles ou neutrophiles est à l'origine de lésions épithéliales graves (Gaboriau-Routhiau, Cerf-Bensussan 2016).

5. Microbiote du tube digestif du chien

Le microbiote intestinal est l'ensemble des micro-organismes qui colonisent le tractus digestif du chien. Il s'agit d'une communauté microbienne riche et très variée composée de bactéries, d'archées, de champignons et de virus (Fonty, Chaucheyras-Durand 2007). Les bactéries représentent plus de 98% des micro-organismes présents. La flore dominante du chien est donc constituée de bactéries nombreuses et variées. Les *phyla* majoritaires sont les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes* et la classe la plus représentée est celle des *Clostridia*. Les champignons, les Archées et les virus représentent chacun 1% ou moins du matériel génétique de cette flore (Suchodolski et al. 2005; Handl et al. 2011; Swanson et al. 2011; Jan S. Suchodolski 2011; Suchodolski, Camacho, Steiner 2008)

La métagénomique est une des méthodes d'étude du microbiote les plus utilisées à ce jour. Elle consiste à analyser par séquençage de l'ADN le microbiome qui est défini comme l'ensemble des génomes des micro-organismes dans le milieu donné. Cette technique a permis de grandes avancées dans l'étude du microbiote par rapport à la culture bactérienne. Elle a notamment permis de mettre en évidence une grande diversité de composition bactérienne entre les individus (Simpson et al. 2002; Suchodolski et al. 2005). Cette variabilité interindividuelle rend l'interprétation des analyses bactériologiques de selles complexe.

Au sein de l'individu, la composition des microbiotes est aussi variable en fonction du segment choisi. L'abondance des bactéries a tendance à s'accroître le long du tube digestif. Le côlon est particulièrement propice à la survie et à la multiplication des bactéries du fait de son pH neutre à acide et du transit qui y est ralenti. Le contenu colique est donc le plus abondant en bactéries de l'ensemble du tube digestif avec 10^{12} organismes par gramme de fèces soit l'équivalent de 50% de la matière fécale (Suchodolski et al. 2005).

Le microbiote intestinal occupe plusieurs rôles majeurs (Flint et al. 2012; Ettinger, Feldman, Côté 2017):

- Il sert de **barrière contre les agents pathogènes**, notamment par un phénomène de compétition pour la niche écologique.
- Il participe de façon importante aux phénomènes de **digestion** en permettant la fermentation des glucides, la biodégradation des protéines et l'absorption des lipides.
- Il se rend aussi indispensable au **métabolisme** de l'hôte en synthétisant de nombreuses vitamines (K, B2, B8, B9, B12) ou encore en neutralisant les toxines alimentaires ou bactériennes dans le tube digestif.
- Ses interactions dynamiques avec les cellules épithéliales et le système immunitaire lui confèrent un rôle **régulateur des mécanismes de défense de l'intestin** notamment sur la production de mucus et de peptides anti-microbiens ou sur la production de chimiokines et de cytokines. Il permet aussi la régulation de réponses inflammatoires pouvant s'avérer délétères pour l'hôte.

B. Mécanismes physiopathologiques de la diarrhée

Quatre mécanismes physiopathologiques principaux à l'origine de diarrhée sont identifiés. Ils peuvent contribuer à l'apparition de la diarrhée de façon isolée mais sont le plus souvent associés (Washabau 2013; Freiche, Hernández 2011; Ettinger, Feldman, Côté 2017).

1. Diarrhée osmotique

Lors de défaut d'assimilation des nutriments, le contenu intestinal devient osmotiquement actif, c'est-à-dire qu'il attire l'eau. C'est le cas lors de changement brutal d'alimentation ou de surcharge alimentaire. De plus, une insuffisance en sels biliaires ou en enzymes pancréatiques engendre souvent une maldigestion à l'origine d'une diarrhée osmotique. La malabsorption lors d'atrophie villositaire, de lymphangiectasie ou de MICI peut aussi provoquer des phénomènes osmotiques.

Les nutriments n'ayant pas été absorbés restent dans le contenu luminal et provoquent un appel d'eau du fait de leur concentration. La capacité de réabsorption du côlon est saturée et les matières fécales sont alors trop hydratées. Ce phénomène peut s'auto-amplifier en

provoquant une dysbiose et des anomalies de conversion des acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires. La fermentation des glucides par cette flore aboutit à une grande quantité d'acides organiques qui renforce le caractère osmotiquement actif du contenu luminal.

Lors de diarrhée osmotique, les électrolytes sont peu affectés par le phénomène. L'eau contenue dans le tractus digestif contient donc peu de sodium et de potassium. Ainsi, le calcul de l'écart osmotique fécal est un bon indicateur de phénomène osmotique. Il s'agit de la différence entre l'osmolalité de la lumière intestinale (égale à celle du plasma soit 290 mOsm/kg) et l'osmolalité de la lumière intestinale dues aux électrolytes (soit deux fois la somme des ions sodium et potassium pour prendre en compte les anions associés à ces cations). Si l'écart osmotique fécal est supérieur à 50 mOsm/kg, une diarrhée d'origine osmotique est probable (Eherer, Fordtran 1992).

2. Diarrhée sécrétoire

De façon physiologique, les entérocytes des cryptes sécrètent des ions et des fluides qui sont réabsorbés par les entérocytes des villosités. Lors de diarrhée sécrétoire, les ions sont transportés de façon anormale dans les entérocytes : la sécrétion basale est augmentée et la réabsorption apicale peut être diminuée. Les ions chlorure et sodium ne sont plus absorbés correctement mais excrétés en excès. L'écart osmotique fécal est donc faible.

Il existe plusieurs causes à ce dérèglement. En premier lieu, on retrouve les entérotoxines bactériennes comme lors de la prolifération des *Escherichia coli* entéropathogènes (Popoff 1998). La présence d'acides biliaires primaires déconjugués non réabsorbés en amont ou d'acides gras hydroxylés sont aussi à l'origine de diarrhée sécrétoire. Enfin, les médiateurs endocrines de l'inflammation tels que les eicosanoïdes, l'histamine, le PAF, l'interleukine-1 ou la bradykinine provoquent ces dérèglements ioniques (Banwell 1990). La présence de ces médiateurs résulte en des changements dans la concentration intracellulaire de l'AMPc, de la GMPc, du calcium ou des protéines kinases des entérocytes à l'origine du dérèglement ionique.

Une particularité de la diarrhée sécrétoire est qu'elle persiste même en cas de diète contrairement aux autres mécanismes physiopathologiques de diarrhée.

3. Diarrhée par altération de la perméabilité intestinale

L'augmentation de la perméabilité de la muqueuse cause une fuite d'eau, d'électrolytes mais aussi de protéines et d'hématies dans la lumière de l'intestin. La muqueuse de l'intestin peut perdre sa fonction de barrière de deux façons principales :

- Par des **lésions pariétales graves** de l'intestin lors de phénomène inflammatoire ou néoplasique. Il peut s'agir d'infection virale ou bactérienne, de l'administration d'AINS, d'une tumeur, d'amyloïdose digestive, de MICI ou d'hypersensibilité locale.
- Par une **augmentation de la pression hydrostatique** interstitielle lors de lymphome, d'insuffisance cardiaque congestive droite ou d'obstruction lymphatique.

4. Diarrhée motrice

Des troubles moteurs de l'intestin peuvent être à l'origine de diarrhée. Ils ne sont pas primitifs mais secondaires à une inflammation ou à une infiltration néoplasique.

En effet, l'inflammation provoque une diminution de la fréquence des CMM et une augmentation de la fréquence des GMC. Les GMC sont des contractions propulsives puissantes qui se propagent sans interruption de l'intestin grêle à l'iléon terminal voire au côlon. Un des médiateurs de l'inflammation, le PAF (platelet-activating factor) semble être un des médiateurs stimulant les GMC. Il est synthétisé par de nombreuses cellules immunitaires tels que les granulocytes, les monocytes, les macrophages et les mastocytes (Jouet et al. 1995).

L'augmentation de la fréquence des CMM accélère largement le transit intestinal provoquant la présence de contenu alimentaire non digéré et de sécrétions pancréatiques et biliaires dans le côlon à l'origine d'une composante osmotique. Par ailleurs, l'augmentation de fréquence des CMM implique une diminution des mouvements de segmentation rythmique qui favorise la prolifération bactérienne et aggrave la diarrhée.

II. Les diarrhées aiguës à *Clostridium perfringens*

A. Généralités sur *Clostridium perfringens* et son pouvoir pathogène

1. Bactériologie

C. perfringens est une bactérie décrite pour la première fois en 1891 par William H. Welch au cours d'une autopsie d'un homme dans lequel des bulles de gaz ont été retrouvées dans des vaisseaux infectés (Welch, Nuttall 1892). Fréquemment associée à des cas de gangrène gazeuse chez des soldats pendant la première guerre mondiale, elle a d'abord reçu le nom de *Bacillus aerogenes capsulatus* pour sa capacité à produire du gaz (Lucey, Hutchins 2004).

C. perfringens est une bactérie bacille Gram-positive. C'est une bactérie anaérobie stricte qui peut tout de même survivre à la présence d'une faible quantité de dioxygène ce qui facilite sa transmission. Elle est ubiquitaire, on la retrouve largement dans l'environnement : dans le sol, la nourriture ou les eaux usées (Kiu, Hall 2018) mais aussi dans la composition du microbiote intestinal sain de l'homme et de nombreuses espèces animales.

Cette bactérie a la capacité de produire des spores lorsqu'elle rencontre des conditions de privation nutritionnelle. Lors du processus de sporulation, des entérotoxines, toxines jouant un rôle pathogène notamment lors d'intoxication alimentaire chez l'homme, sont produites (Li et al. 2016). Les spores produites sont des structures dormantes résistantes à de hautes température et pouvant survivre dans l'environnement à long terme (Paredes-Sabja, Sarker 2009).

Sa croissance est une des plus rapides parmi les bactéries. Cette capacité lui permet de proliférer très vite lors d'infection chez son hôte. Son temps de génération (12 à 17 minutes à 37°C) (Li, McClane 2006) est deux fois plus court que des bactéries intestinales commensales telles que *Escherichia coli* ce qui représente un avantage non négligeable pour *C. perfringens* lors de sa colonisation du tube digestif (Mehdizadeh Gohari et al. 2021).

La germination des spores, c'est-à-dire leur retour à la phase de cellules végétatives, est activée par des molécules de petite taille nommées « germinants » (Kiu, Hall 2018). Chez l'homme, les acides biliaires primaires sont suspectés jouer ce rôle pour la famille des

Clostridiaceae (Wang et al. 2015). A l'inverse, les acides biliaires secondaires ont montré un rôle inhibiteur de la prolifération de *C. perfringens in vitro* (Sorg, Sonenshein 2008).

2. Toxines produites

C. perfringens sécrète de nombreuses toxines. Plus d'une vingtaine de toxines ont été identifiées comme facteurs de pathogénicité principaux et sont classées en toxines majeures ou mineures. Les toxines majeures sont la toxine alpha, la toxine bêta, la toxine epsilon, la toxine iota, l'entérotoxine et la toxine NetB. Comme leur nom l'indique, elles jouent un rôle majeur dans la pathogénicité de *C. perfringens*.

Selon la souche, la bactérie produit une combinaison de toxines différentes (Mehdizadeh Gohari et al. 2021). Initialement, les souches étaient classées en 5 toxinotypes de A à E selon la combinaison de toxines majeures produites. Ce système est encore parfois utilisé mais à ce jour, deux nouvelles classes F et G ont été ajoutées (figure 6). La classe F est composée de souches appartenant anciennement à la classe A mais présente la particularité de produire des entérotoxines (Rood et al. 2018).

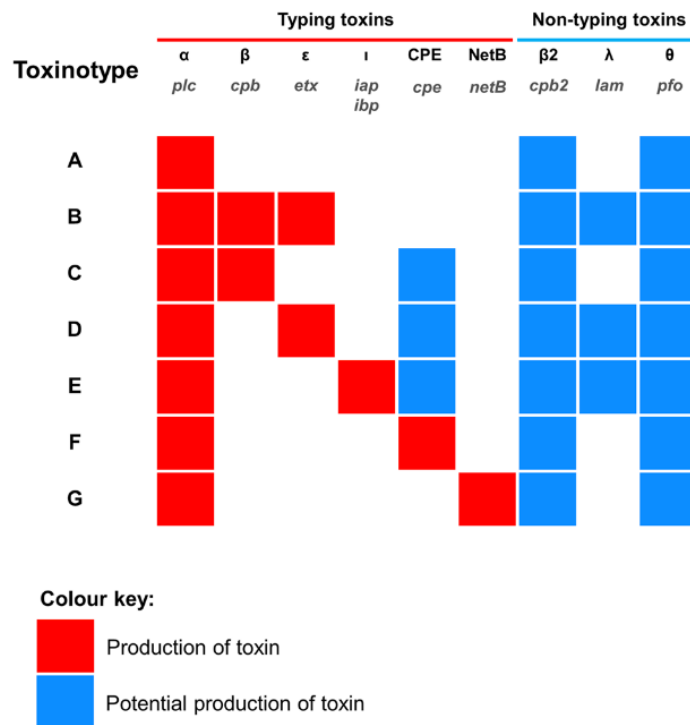


Figure 6 : Système de toxinotype actuel de *C. perfringens* (Gohari et al. 2021)

Les nombreuses autres toxines produites comme les collagénases, neuraminidases, les caséinases, les deoxyribonucléases, les hyaluronidases ou les uréases sont des toxines mineures. Seules, leur rôle pathogène est réduit mais elles sont essentielles dans la dégradation des tissus de l'hôte afin d'apporter à la bactérie les nutriments qu'elle ne peut pas produire (Rood, Cole 1991; Revitt-Mills et al. 2015).

La CPA est une toxine produite par toutes les souches de *C. perfringens* qui joue un rôle pathogène important lors de gangrène gazeuse (Mehdizadeh Gohari et al. 2021). Il s'agit d'une toxine qui hydrolyse la phosphatidylcholine et la sphingomyéline des membranes phospholipidiques des cellules. Elle stimule aussi la production d'enzymes aux activités phospholipase et sphingomyélinase chez son hôte. Les conséquences biologiques de liaison de l'alpha-toxine à la cellule peut aller jusqu'à la mort de cellule mais ses effets sont différents selon le type et le statut de la cellule concernée (Oda et al. 2015).

Comme évoqué plus tôt, la **CPE** est une toxine libérée lors du processus de sporulation de *C. perfringens* au moment de la lyse de la cellule mère (Freedman, Shrestha, McClane 2016). Seules 5% des souches isolées produisent la CPE. La plupart sont des souches appartenant au toxinotype F et moins communément aux toxinotypes C, D et E (Mehdizadeh Gohari et al. 2021). Leur action consiste à fixer les claudines, des protéines des jonctions serrées en région apicale des cellules épithéliales. Une fois fixées, elles forment des micropores dans les membranes des entérocytes. Ces pores sont à l'origine d'altérations de la perméabilité de la membranes et laissent entrer des cations comme le calcium. L'entrée de calcium provoque l'apoptose voir la nécrose des entérocytes. Certaines jonctions serrées sont aussi détruites dans un second temps augmentant alors la perméabilité paracellulaire. *In vivo*, l'action de la toxine se manifeste par un raccourcissement sévère des villosités de l'intestin grêle, une nécrose et une desquamation de l'épithélium (figure 7). Ces modifications sont à l'origine d'une perte de perméabilité de l'épithélium mais aussi d'un défaut d'absorption. Chez le chien, une étude a montré que l'administration orale ou dans la lumière intestinale de la CPE engendrait l'accumulation de liquide et une diarrhée (Bartlett, Walker, Ziprin 1972). L'importance de la CPE est majeure chez l'homme car celle-ci est responsable des intoxications alimentaires par *C. perfringens* type A, la quatrième cause en nombre de cas d'intoxications alimentaires en France en 2013 et 2014 (Cauteren et al. 2018; Freedman, Shrestha, McClane 2016)

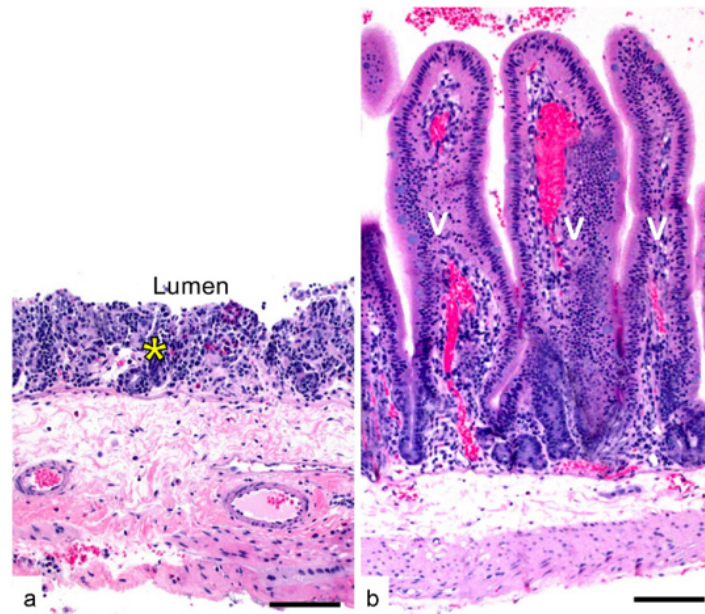


Figure 7 : Effets histologiques de l'entérotoxine de C. perfringens sur les anses intestinales de lapin (a. avec entérotoxine : raccourcissement des villosités et desquamation épithéliale, b. groupe contrôle pour comparaison) (Gohari et al. 2021)

La toxine **Net F** a été récemment mise en cause dans l'apparition du syndrome de diarrhée aiguë hémorragique chez le chien et de la gastroentérite nécrosante fatale du poulain (Gohari et al. 2015; Leipig-Rudolph et al. 2018). Cette toxine cytotoxique est aussi à l'origine de la création de pores dans la membrane des entérocytes (figure 8) mais son mécanisme d'action nécessite plus de recherches.

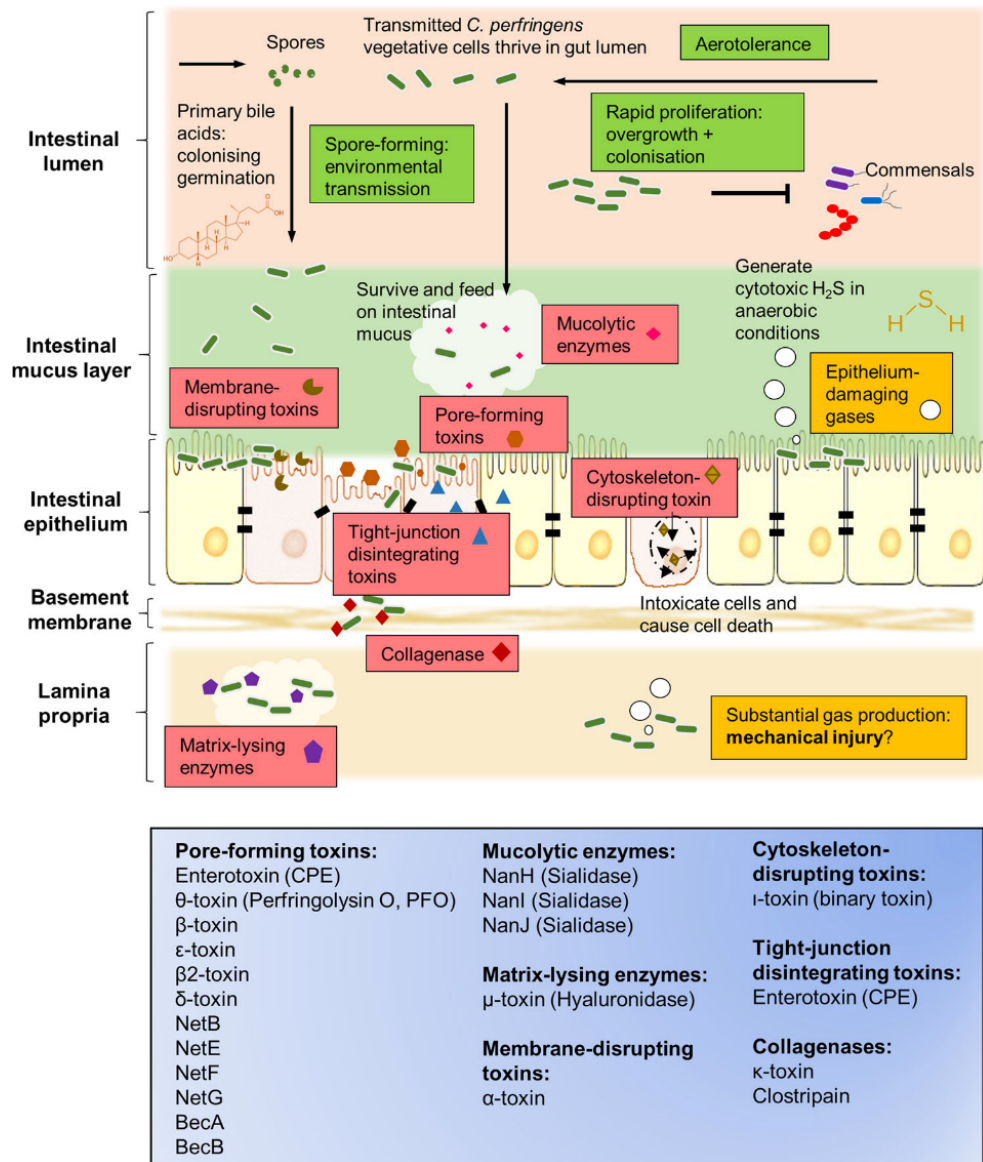


Figure 8 : Mécanismes d'action des toxines de *C. perfringens* dans le contexte des infections intestinales (Kiu, Hall 2018)

3. Implications cliniques chez l'animal et l'homme

Du fait de ces divers facteurs de pathogénicité, *C. perfringens* est associé à plusieurs maladies systémiques et entériques telles que des cas de gangrène, d'intoxication alimentaire ou encore d'entérocolite (Kiu, Hall 2018).

Chez l'homme, *C. perfringens* de type F constitue la seconde cause **d'intoxication alimentaire** bactérienne aux Etats-Unis en causant avec 1 million de cas par an (Mehdizadeh Gohari et al. 2021). Les personnes atteintes, souvent des personnes âgées, présentent des crampes intestinales et une diarrhée aqueuse sans fièvre ni vomissements. La plupart des symptômes sont auto-limitants ce qui serait à l'origine d'une sous-estimation des cas. *C. perfringens* est également associé à des diarrhées sporadiques ou liées à la **prise d'antibiotiques**. Les symptômes sont une douleur abdominale et une diarrhée prolongée qui peut durer plusieurs semaines. *C. perfringens* de type F et son entérotoxine serait responsable de 15% des cas de diarrhée associée aux antibiotiques (Asha, Tompkins, Wilcox 2006). *C. perfringens* de type A est aussi la cause des **entérites nécrotiques du nouveau-né prématuré** qui représente la plus sévère et la plus létale des urgences gastro-intestinales du nouveau-né dans le monde entier (Rees, Eaton, Pierro 2010).

De nombreux animaux présentent aussi des maladies gastro-intestinales associées à *C. perfringens*. L'**entérite nécrotique du poulet** est caractérisée par des lésions gazeuses et de la nécrose de la muqueuse par distension par le gaz. Elle est associée au toxinotype G du fait de la production de la toxine NetB par les clostridies. Chez le **porc**, les toxinotypes A, C et F affectent les jeunes porcelets qui présentent une diarrhée sévère accompagnée d'une nécrose de la muqueuse intestinale et une atrophie des villosités.

L'**entérocolite nécrosante aiguë du cheval** et du poulain est une maladie sévère qui rassemble des signes caractéristiques des infections à *C. perfringens* : une apparition brutale et une nécrose de l'intestin. Ses symptômes et son origine sont très proches du syndrome de diarrhée hémorragique aiguë chez le chien. Le poulain présente généralement une diarrhée hémorragique ainsi qu'une nécrose de l'intestin pouvant mener à la mort de l'animal. Les souches infectantes sont de type F et produisent souvent des entérotoxines et des toxines β_2 (Gohari et al. 2014). Tout comme chez le chien, les toxines NetE, NetF et NetG nouvellement découvertes sont aujourd'hui envisagées comme causes sous-jacentes de la maladie (Gohari et al. 2020).

B. Tableau clinique

1. Diarrhée associée à *Clostridium perfringens*

La diarrhée est définie comme l'émission de selles hyperhydratées associée à une augmentation de la fréquence de défécation. La consistance des selles est variable de molles à complètement liquides. Il est possible de décrire la diarrhée avec un score fécal pour plus d'objectivité (annexe 1). On parle de diarrhée aiguë lorsque l'épisode de diarrhée dure moins de 14 jours (Hall, Williams, Kathrani 2020). La diarrhée est chronique lorsque l'épisode excède cette durée ou que la diarrhée récidive périodiquement. A l'examen clinique, on peut parfois mettre en évidence du poil souillé par les défécations.

Il n'existe pas de signe clinique pathognomonique d'infection par *C. perfringens*. La diarrhée peut présenter des caractéristiques orientant vers une localisation grêle, colique ou mixte lors d'infection à *C. perfringens* (Marks et al. 2002). D'autres signes cliniques accompagner la diarrhée comme des vomissements, une anorexie, une déshydratation... En effet, la présentation clinique des diarrhées à *C. perfringens* peut être plus ou moins intense, allant de la diarrhée auto-limitante sans complication à l'entérite hémorragique fatale (Marks et al. 2011).

2. Syndrome de diarrhée hémorragique aiguë (AHDS)

Il existe une forme clinique particulière de diarrhée aiguë associée à *C. perfringens* chez le chien : le **syndrome de diarrhée hémorragique aiguë (AHDS)** (Hall, Williams, Kathrani 2020; Ettinger, Feldman, Côté 2017; Unterer, Busch 2021). Il est possible que ce syndrome ne soit qu'une forme grave d'entérite à *C. perfringens*. Cette présentation clinique n'est pas rare et est caractérisée par une diarrhée hémorragique sévère et soudaine accompagnée d'une hémococoncentration. Historiquement, un hémocrite supérieur à 60% était diagnostique de AHDS (Burrows 1977) mais une étude prospective de 2015 a montré que les chiens atteints pouvaient avoir un hémocrite compris entre 33 et 76% avec une moyenne de 57% (Mortier et al. 2015a).

Dans la 80% des cas de cette étude, les premiers signes sont des **vomissements** qui devenaient **hémorragiques** dans 50% des cas. Ces vomissements avaient valu à ce syndrome le nom de « gastro-entérite hémorragique » dans un premier temps. Cependant, ce terme n'est plus utilisé car il implique la présence d'inflammation gastrique, or des analyses histologiques de biopsies menées sur des chiens présentant un AHDS, n'ont pas mis en évidence de lésion aiguë de l'estomac (Leipig-Rudolph et al. 2018; Unterer et al. 2014).

En ce qui concerne la **diarrhée**, elle est importante, aqueuse et hémorragique et est souvent accompagnée d'une atteinte de l'état général caractérisée par de la **léthargie** et de l'**anorexie**. Des signes d'hypovolémie ou d'hypoperfusion comme une **hypothermie**, ou une **tachycardie** peuvent apparaître du fait de la déshydratation. Une **douleur abdominale** est présente dans 20% des cas. La diarrhée apparaît en moyenne 10 heures après les premiers vomissements mais parfois plus de 2 jours après dans certains cas.

L'AHDS touche plutôt des animaux d'**âge moyen** et de **petite race** avec une prédisposition des Yorkshire terrier, du pinscher miniature, du bichon maltais et du schnauzer miniature (Mortier et al. 2015a; Dupont et al. 2021). L'âge moyen des chiens déclarant le syndrome est de 5 ans mais il peut tout de même toucher des animaux de tout âge (0,3 à 16 ans) (Mortier et al. 2015a). Il ne semble pas y avoir de prédisposition de sexe.

La prédisposition des chiens de petite taille peut s'expliquer par plusieurs hypothèses. Il a été suggéré que la tendance à l'hyperexcitabilité et au stress des petits chiens (McGreevy et al. 2013) pourrait mener à des troubles gastro-intestinaux du fait de leur influence sur la motilité et la perméabilité de l'intestin. Par ailleurs, les catécholamines libérées lors de stress pourraient être la cause d'une augmentation de la croissance et de la virulence de la flore pathogène et commensale de l'intestin (Konturek, Brzozowski, Konturek 2011) menant à l'AHDS. Une autre hypothèse (Gohari et al. 2015) pouvant expliquer la surreprésentation des petits chiens lors d'AHDS, est leur prédisposition aux pancréatites (Chase et al. 2009). En effet, lors de pancréatite, la trypsine contenue dans le suc est produite en quantité moindre et ne pourrait plus exercer son action protéolytique sur les toxines (Songer 1996).

L'hiver, le nombre de cas est significativement plus élevé que pendant les autres saisons probablement du fait de la température extérieure basse ou de l'ingestion de neige par le chien.

En effet, le froid a des effets directs sur la motilité gastro-intestinale (Lei, Chen 2009) mais cette association nécessite plus d'investigations.

Le **pronostic** est généralement **favorable** pour l'animal sous couvert de réhydratation. La plupart des épisodes se résolvent en 48h et nécessitent une hospitalisation de 2 à 3 jours en moyenne (Dupont et al. 2021; Mortier et al. 2015b). Cependant, les selles sont encore de consistance molle 5 jours après le déclenchement de la maladie pour 1/3 des cas. Le taux de mortalité est faible, 2% des chiens sont décédés dans cette étude prospective où ils recevaient le traitement adéquat (Mortier et al. 2015a). Étant donné le faible taux de mortalité, aucun facteur pronostic défavorable n'a pu être identifié.

C. Lésions histologiques

En 2014, Unterer et al. ont mené une étude afin de mettre en évidence les lésions gastro-intestinales à l'origine de l'AHDS (Unterer et al. 2014). L'étude a été menée sur 10 chiens présentant un épisode de diarrhée hémorragique aiguë pour lesquels les causes autres de diarrhée hémorragique ont été exclues. L'endoscopie a mis en évidence des lésions d'hyperhémie, d'hémorragie, d'érosion et d'hémorragie de la muqueuse intéressant le tractus intestinal sur son ensemble à des localisations variées selon l'individu. L'histologie des biopsies ont mis en évidence chez tous les chiens des lésions aiguës et nécrosante de la muqueuse ainsi qu'une infiltration neutrophilique dans l'intestin (figure 9). Ces lésions étaient retrouvées dans différentes portions de l'intestin mais les lésions muqueuses étaient généralement plus sévères dans le côlon. Une étude de 2018 publiée par une équipe similaire mène les mêmes conclusions sur 9 chiens atteints d'AHDS à la différence près que les lésions de l'intestin grêle et du côlon étaient de sévérité similaire (Leipig-Rudolph et al. 2018).

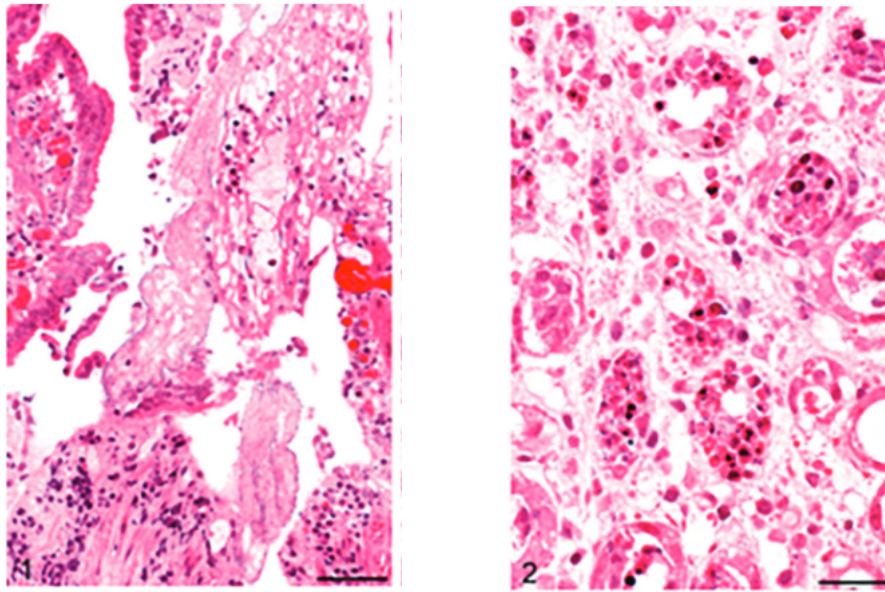


Figure 9 : Coupes histologiques de duodénum de chien présentant un AHDS
(Leipig-Rudolph et al. 2018)

1 Nécrose épithéliale avec hyperémie du sommet des villosités (Leipig-Rudolph et al. 2018)

2 Nécrose aiguë des cryptes épithéliales

Dans ces 2 études, l'histologie met aussi en évidence la présence d'une couche épaisse de bacilles adhérentes à la surface des zones de nécrose de la muqueuse. A l'immunohistologie, ces bactéries se sont révélées appartenir aux *Clostridium spp.* (figure 10). Dans 2/3 des cas, *C. perfringens* a pu être isolé dans les cultures provenant des biopsies duodénales des lésions. Chez les chiens témoins, *C. perfringens* n'a été isolé que dans les biopsies duodénales d'un chien sur 11 dans la première étude (0/9 dans l'étude de 2018).

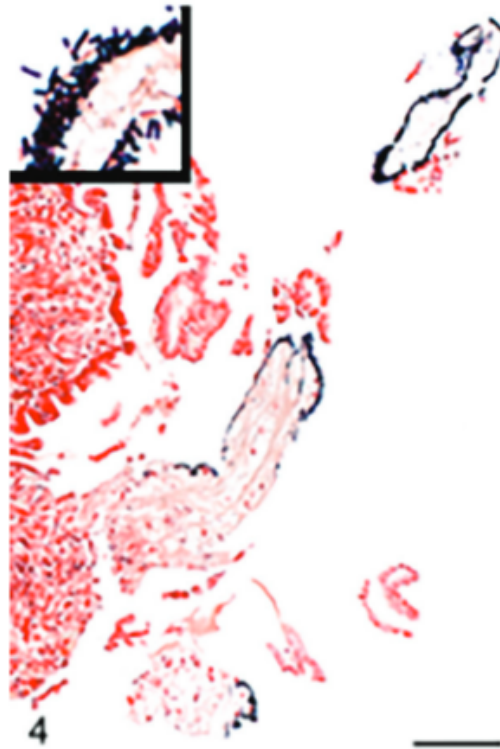


Figure 10 : Présence de bacilles Gram positif au sommet des villosités nécrotiques de l'épithélium du duodénum d'un chien présentant un AHDS (Leipig-Rudolph et al. 2018)

Une destruction aiguë de la muqueuse intestinale comme celle observée peut s'expliquer par 4 mécanismes connus : l'ischémie, l'hyperthermie, une infection à parvovirus ou par l'action des entérotoxines. Les 2 premières causes ont été exclues par l'anamnèse et l'examen clinique des chiens. L'infection à parvovirus a elle aussi été exclue par les résultats négatifs des test ELISA et des analyses immunohistochimiques sur les biopsies. L'action des entérotoxines serait donc la cause la plus probable pour expliquer les lésions histologiques observées.

Par ailleurs, même si les clostridies font partie de la flore commensale du tube digestif du chien, *C. perfringens* est rarement retrouvé à la culture du contenu duodéal (Benno et al. 1992). De plus, les couches de bactéries ne sont pas normalement retrouvées à l'histologie chez le chien sain (Davis et al. 1977). Les résultats des cultures des chiens atteints d'AHDS semblent donc mettre en évidence un phénomène de **prolifération de *C. perfringens*** sur les muqueuses intestinales en regard des lésions nécrotiques.

Cependant, une question réside sur le fait que cette prolifération de *C. perfringens* soit la cause ou une séquelle de la maladie. Toute inflammation mène en effet à une dysbiose et la diarrhée aiguë chez le chien entraîne des altérations importantes du microbiome intestinal (Suchodolski et al. 2012). Plusieurs éléments sont tout de même en faveur d'un **rôle primaire de *C. perfringens*** (Unterer et al. 2014):

- Les lésions histologiques mises en évidence sont des lésions caractéristiques d'infection à *C. perfringens* chez d'autres espèces.
- *C. perfringens* a été isolé dans la plupart des biopsies intestinales des chiens présentant un AHDS.
- La présence de bactéries et les lésions de la muqueuse sont fortement associées.
- Aucune autre cause ne permet d'expliquer la nécrose de l'épithélium de la muqueuse.

D. Mécanismes physiopathologiques

Alors que *C. perfringens* était déjà suspecté d'être impliqué dans l'apparition de l'AHDS, la publication de l'équipe de S. Unterer à propos des lésions histologiques *in vivo* à l'origine du symptôme renforce très fortement cette hypothèse comme nous avons pu le voir précédemment (Unterer et al. 2014). Cependant, le mécanisme physiopathologique de l'apparition de la diarrhée reste encore à déterminer.

1. Toxines impliquées

L'entérotoxine (CPE) étant à l'origine de lésions similaires de nécrose intestinale chez d'autres espèces, elle a été une des premières toxines à être envisagée en tant qu'agent causal des lésions d'AHDS. Par ailleurs, dans une étude de 2002, une corrélation avait été rapportée entre l'apparition d'AHDS et la détection de la CPE par RPLA (Marks et al. 2002). En effet, sur les 12 chiens présentant un AHDS, la CPE était détectée par ELISA dans les fèces de chez 8 d'entre eux et particulièrement chez les 4 présentant des symptômes suraigus menant à la mort. Cependant, le rôle de la CPE dans l'apparition du syndrome a été écarté par une étude prospective de 2014. Même si la prévalence de chien positif à la CPE dans leur fèces par la méthode ELISA était plus élevée chez les chiens présentant un AHDS (13 sur 54) que chez les

chiens témoins (0 sur 23), cette prévalence reste très basse ce qui rend peu probable la mise en cause de la CPE seule dans l'apparition du syndrome.

En 2015, un nouveau toxinotype de type A a été identifié chez des chiens ayant présenté un AHDS qui leur a été fatal. Trois nouveaux gènes codant pour trois toxines différentes nommées NetE, NetF et NetG appartenant à la superfamille des leucocidines, ont été découverts (Gohari et al. 2015). La culture des souches isolées a montré qu'elles présentaient une cytotoxicité importante pour les cellules ovariennes équines.

De nombreuses expériences *in vitro* ont permis d'identifier le rôle de ces toxines dans la cytotoxicité de la souche isolée (Gohari et al. 2015). D'abord, cette étude montre que l'inactivation du gène NetF fait perdre à la souche son pouvoir cytotoxique et que la réinsertion du gène *netF* lui rend son pouvoir cytotoxique. Par ailleurs, seul l'antisérum dirigé contre la toxine NetF a permis de neutraliser la cytotoxicité de cette souche. Ces données indiquent clairement que la toxine NetF est responsable de la cytotoxicité envers les cellules ovariennes équine de la souche isolée. Cependant, le fait que la souche soit cytotoxique uniquement envers les cellules ovariennes équines sur le panel de lignées testées rend l'extrapolation *in vivo* chez le chien compliquée. Il semblerait qu'un récepteur soit présent sur la cellule hôte pour que NetF puisse former des pores dans sa membrane. De plus, il est possible que la lignée de cellules ovariennes équine soit particulièrement sensible à NetF et que NetE et NetG jouent un rôle aussi important voire plus important que NetF *in vivo*. Par ailleurs, toutes les souches portant le gène *netF* étaient aussi porteuses du gène *cpe*. Cette donnée est indirectement en faveur de l'implication de la CPE dans l'apparition de la maladie.

Par ailleurs, d'autres études étudiant la prévalence de *C. perfringens* possédant le gène codant la toxine NetF chez les chiens atteints d'AHDS semblent confirmer l'importance de la celle-ci dans le mécanisme physiopathologique de l'AHDS. Chez les 9 chiens présentant un AHDS d'une étude de 2018, *C. perfringens* a pu être isolé chez 6 d'entre eux. Parmi les 6 souches de *C. perfringens*, 5 étaient porteuses du gène *cpa* sans porter le gène d'autre toxines majeures. Les gènes *cpe* et *cpb2* étaient présents chez 4/5 de ces souches et *netF* chez 5/5 de ces souches (Leipig-Rudolph et al. 2018). Une seconde étude datant de 2019 confirme que la prévalence de *C. perfringens* possédant les gènes *netF* et *netE* est significativement supérieure chez les chiens présentant un AHDS (48%) que chez les chiens sains (12%) ou que les chiens souffrant d'une parvovirose (0%) (Sindern et al. 2019a). La présence de gènes codant pour

NetF et NetE chez les souches de *C. perfringens* semble donc spécifique à l’AHDS lors de diarrhée aiguë du chien. L’étude suggère que l’AHDS est le résultat de la prolifération de souches de *C. perfringens* possédant les gènes *netF* et *netE*.

Ainsi, il semble assez probable que les lésions retrouvées lors d’AHDS soient issues de l’action des toxines NetF produites par une infection à *C. perfringens* de type A (voire F) possiblement associée à l’action des toxines NetE, NetG ou encore de la CPE.

2. Cause primaire

Cependant, l’origine de la prolifération de *C. perfringens* n’est pas élucidée. Il est communément suspecté qu’une dysbiose soit impliquée et autorise la prolifération de la bactérie (Ziese, Suchodolski 2021).

D’autres agents infectieux pourraient aussi être impliqués dans l’apparition de ce syndrome. Le circovirus canin ayant été isolé chez des chiens présentant un AHDS, des études ont cherché à identifier son potentiel rôle dans la pathologie mais celles-ci écartent un rôle primaire du virus (Dowgier et al. 2017; Anderson et al. 2017).

En 2019, une épidémie de diarrhée hémorragique en Norvège a fait l’objet d’une étude sur les changements du microbiote associés par une analyse métagénomique sur amplicon ciblé sur 50 chiens malades et 11 chiens sains (Herstad et al. 2021). Dans cette étude, la présentation clinique des chiens était très proche de celle de l’AHDS. Le diagnostic d’AHDS a été réalisé par exclusion par la mise en œuvre de différents tests à la discrétion de chaque vétérinaire. Si une augmentation du nombre de *C. perfringens* a été mise en évidence dans les selles de ces chiens, la bactérie *Providencia spp.* pourrait avoir un rôle primaire dans l’épidémie en question. La bactérie n’est retrouvée chez aucun chien sain de l’étude alors qu’elle est retrouvée en abondance chez les chiens atteints d’AHDS (Herstad et al. 2021).

Dans une seconde étude sur cette épidémie, suite à la mort de 18 chiens, une analyse histologique de l'intestin grêle et du côlon a montré des changements importants de la muqueuse avec une perte diffuse de l'épithélium de surface et de la structure en couche avec l'effondrement de la *lamina propria* des villosités (Jørgensen et al. 2021). De nombreux bacilles Gram-négatifs ont pu être observés à la surface ou groupés au sein même de la *lamina propria*. L'hybridation *in situ* fluorescente réalisée sur des sections de l'intestin grêle et du côlon de 5 chiens chez lesquels *Providencia alcalifaciens* avait été cultivée, a montré que ces bacilles correspondaient à la bactérie *P. alcalifaciens* au niveau des lésions décrites. De plus, le séquençage du génome des isolats de *P. alcalifaciens* chez 77 chiens a montré par analyse phylogénétique basée sur le polymorphisme nucléotidique, que chez 51 chiens les isolats étaient étroitement proches et avaient très probablement une origine commune. Même si l'étude épidémiologique n'a pas pu mettre en évidence de source de contamination chez les chiens, ces éléments tendent à attribuer à *P. alcalifaciens* un rôle primaire dans l'épidémie. D'autres études sont nécessaires pour identifier le rôle de cette bactérie dans l'AHDS en général. Étant donnée les caractéristiques épidémiologiques de ces épisodes, il est possible que les signes cliniques de ces chiens ne soient pas liés à un AHDS. Par ailleurs, il faut garder à l'esprit que si la prolifération de *C. perfringens* fait réellement suite à une dysbiose, l'origine de celle-ci n'est pas nécessairement identique pour tous les chiens malades.

E. Diagnostic différentiel

Comme nous l'avons déjà évoqué, la présentation clinique d'une infection entérique à *C. perfringens* est peu spécifique. Un diagnostic différentiel large est à établir dans le but de pouvoir exclure les causes nécessitant une prise en charge différente (tableau I).

Tableau I : Diagnostic différentiel de la diarrhée aiguë chez le chien

ATTEINTE	NATURE DE LA CAUSE	CAUSE
DIGESTIVE	Causes mécaniques	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Corps étranger ▪ Intussusception intestinale
	Causes alimentaires	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Intolérance alimentaire (Intoxication alimentaire, intoxication alimentaire, changement brutal d'alimentation, réaction pharmacologique, indiscretion alimentaire) ▪ Réaction alimentaire indésirable d'origine immunologique
	Causes infectieuses	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Parasitaire (<i>Ancylostomes</i>, <i>Trichures</i>, <i>Toxocara</i>, <i>Strongyloides</i>, <i>Cystoisospora</i>, <i>Cryptosporidium</i>, <i>Giardia</i>) ▪ Viral (<i>Parvovirus</i>, <i>Adénovirus</i>, <i>Paramyxovirus</i>, <i>Coronavirus</i>, <i>Rotavirus</i>, <i>Coronavirus</i>, <i>Circovirus</i>) ▪ Bactérien (<i>Salmonella</i>, <i>Campylobacter</i>, <i>Escherichia coli</i>, <i>Clostridium difficile</i>, <i>Clostridium perfringens</i>)
	Causes néoplasiques	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Lymphome, adénocarcinome, léiomyosarcome...
EXTRA-DIGESTIVE	Causes inflammatoires	<ul style="list-style-type: none"> ▪ MICI ▪ Lymphangiectasie
	Causes métaboliques	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Crise addisonnienne ▪ Pancréatite ou autre atteinte pancréatique ▪ Atteinte hépatique ▪ Atteinte rénale
	Intoxication	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Plomb, inhibiteurs des cholinestérases
	Néoplasies extra-digestives	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Syndrome paranéoplasique

F. Traitement

1. Hospitalisation

Au cours de la consultation, il est important de déterminer si les répercussions générales justifient une hospitalisation. La déshydratation et le choc hypovolémique sont les motifs d'hospitalisation les plus fréquents. Soixante-treize pourcent des chiens sont déshydratés d'au moins 5% lors de leur admission (Dupont et al. 2021). Cependant, lorsque le chien atteint d'AHDS est présenté très tôt après l'apparition de vomissements et/ou de diarrhée hémorragiques, il ne présente pas toujours de signe clinique de déshydratation. Dans ce cas, il est tout de même conseillé d'hospitaliser l'animal du fait de la détérioration clinique souvent très rapide pouvant mener à la mort.

L'objectif premier de l'hospitalisation est la réhydratation de l'animal par **fluidothérapie** avec des solutés cristalloïdes isotoniques (Unterer, Busch 2021). Dans les cas les plus graves, des bolus de 30 mL/kg sur 10 minutes peuvent être répétés jusqu'à 3 fois de suite si besoin. Une perfusion à un débit de 40 à 60 mL/kg/h peut aussi être nécessaire jusqu'à ce que l'hématocrite revienne dans les valeurs de référence. La réponse à la fluidothérapie peut aussi être évaluée cliniquement. L'objectif est de retrouver une fréquence cardiaque inférieure à 120 bpm chez le petit chien et 100 bpm chez le grand chien, un temps de recoloration des muqueuses inférieur à 2 secondes, une pression artérielle dans les normes et un état de conscience normal. La fluidothérapie est à poursuivre jusqu'à que le chien soit capable de subvenir à ses besoins hydriques seul (50 mL/kg/24h), tout en prenant en compte les pertes hydriques par la diarrhée et les vomissements (jusqu'à 10 mL/kg/h dans les cas sévères). En moyenne, 12 heures de fluidothérapie permettent à l'animal d'être réhydraté (Dupont et al. 2021).

En cas de besoin, la **douleur** du chien doit être gérée médicalement. La buprénorphine doit être favorisée car elle n'affecte pas l'intégrité du tube digestif et son action sur la motilité du tube digestif reste minime. Les AINS et autres morphiniques doivent être évités.

Le second objectif de l'hospitalisation est la **surveillance rapprochée** afin d'agir rapidement si des complications apparaissent. Il peut s'agir de d'une hypoalbuminémie sévère, d'un sepsis ou encore d'une coagulation intravasculaire disséminée. Dans ce cas, la prise en charge doit être plus spécifique et très rapide. Le suivi biochimique de l'animal par la mesure régulière des lactates peut s'avérer utile. En effet, lors d'hypovolémie, la perfusion du foie est diminuée et une hyperlactatémie significative est observée à l'admission (Unterer, Busch 2021). La sévérité de l'hyperlactatémie est généralement associée avec un pronostic plus défavorable pour l'animal. Cependant, si l'hyperlactatémie est ordinairement corrélée avec la sévérité de la maladie et un taux de mortalité plus élevée au sein d'une population, ce n'est pas toujours le cas à l'échelle individuelle (Gillespie, Rosenstein, Hughes 2017). La cinétique des lactates sur plusieurs mesures est un meilleur indicateur pronostique qu'une mesure seule. Une diminution significative des lactates est en faveur d'une bonne réponse à la fluidothérapie.

Dans une étude récente sur 123 chiens présentant un AHDS, le dosage de la Protéine C réactive (CRP) a montré une corrélation positive avec la sévérité de l'atteinte de l'animal mais une absence de corrélation significative avec la durée d'hospitalisation. Ces résultats tendent à montrer que la CRP seule n'est pas un indicateur pronostique suffisant (Dupont et al. 2021). Cependant, d'autres études sont nécessaires pour évaluer l'intérêt pronostique d'un suivi biochimique de la CRP.

2. Traitement symptomatique

Que l'animal soit hospitalisé ou non, les traitements symptomatiques additionnels ont pour objectif de soulager l'animal, de diminuer l'intensité des signes cliniques et d'accélérer la résolution de l'épisode.

Lorsque des vomissements sont associés à la diarrhée, l'administration d'**anti-vomitifs** à action centrale comme le maropitant ou le métoclopramide, permet de soulager l'animal, de diminuer les pertes hydriques et les désordres électrolytiques et une réalimentation plus précoce.

Des **inhibiteurs de la pompe à proton** ou des **antihistaminiques H2**, peuvent aussi être prescrits en cas de vomissements importants de façon à réduire les risques de lésion

d'œsophagite liés à l'acidité du contenu. Pour les mêmes raisons, le **sucralfate** peut être administré afin de former une barrière protectrice de l'œsophage contre l'acidité des vomissements. Celui-ci doit être distribué à distance (au moins 2h) des repas et des autres médicaments (Hall, Williams, Kathrani 2020).

Une courte période de **jeûne** est traditionnellement recommandée afin de mettre le tractus gastro-digestif au « repos ». Cependant, le jeûne peut avoir des conséquences néfastes sur l'animal. S'il dure plus de 48h, il peut être à l'origine d'un retard de récupération de la fonction intestinale, de malnutrition ou de l'apparition de troubles dus au manque de nutrition entérale comme un iléus, une dysbiose ou une translocation bactérienne (Chan, Freeman 2006). Le jeûne doit donc être limité au juste temps nécessaire à réhydrater l'animal soit de 12 à 36h maximum. Chez le chiot de petite race, le risque d'hypoglycémie est accru, ce qui conduit à suivre la glycémie dès le début de l'hospitalisation. La **réalimentation** est réalisée graduellement en distribuant régulièrement de petites quantités de nourriture pendant 3 à 5 jours (Ettinger, Feldman, Côté 2017). Elle doit être appétente, très digestible et plutôt pauvre en graisses. Si le chien refuse de s'alimenter, la mise en place d'une sonde naso-oesophagienne doit être envisagée.

Des **protecteurs du tube digestif** peuvent être administrés régulièrement tels que l'association de kaolin et de pectine, la smectite, le sous-salicylate de bismuth, le charbon activé, les sels d'aluminium ou de baryum. Leur efficacité n'est pas prouvée mais le concept de leur utilisation repose sur leur action probable d'adsorption des bactéries et des toxines et de protection des muqueuses inflammées (Bengmark, Jeppsson 1995; Ettinger, Feldman, Côté 2017; Hall, Williams, Kathrani 2020). Il est recommandé d'espacer leur prise de 2h par rapport aux autres médicaments pour éviter les défauts d'absorption intestinale (Washabau 2013; Peyron, Toulza 2013).

Des **modificateurs de la motricité** (Ettinger, Feldman, Côté 2017; Freiche, Hernández 2011) tels que des anticholinergiques, des opiacés ou des anti-muscariniques peuvent aussi être utilisés. Ils agissent par la voie de contrôle extrinsèque de la motilité intestinale et permettent généralement une amélioration rapide de la diarrhée et des douleurs abdominales. Cependant, il faut se montrer prudent sur leur utilisation particulièrement avec les spasmolytiques qui ralentissent le transit et pourraient augmenter les risques de surpopulation bactérienne (Hall, Williams, Kathrani 2020).

3. Antibiothérapie

La diarrhée aiguë est un motif de consultation fréquent et un antibiotique est fréquemment prescrit en première intention particulièrement lors de diarrhée hémorragique. En effet, la présence de sang dans les selles est souvent le reflet d'une destruction importante de la barrière intestinale pouvant aboutir à une translocation bactérienne. De plus, en cas d'AHDS, l'hypovolémie à l'origine d'un débit splanchnique réduit est un facteur favorisant la survenue de phénomènes de translocation bactérienne (Deitch 1993). L'amoxicilline associée à l'acide clavulanique est généralement l'antibiotique choisi en première intention du fait de son large spectre, la rareté de ses effets secondaires et sa marge de sécurité importante (Weese 2007).

Cependant, l'antibiothérapie peut parfois avoir des effets néfastes supérieurs à ses effets bénéfiques. Un usage inapproprié peut induire une perturbation de la flore intestinale protectrice permettant la prolifération de pathogènes (Suchodolski et al. 2009; Grønvold et al. 2010). Des résistances aux antibiotiques peuvent aussi être présentes ce qui pose à la fois un problème de réponse thérapeutique chez l'animal concerné et un problème de santé publique (Costelloe et al. 2010).

Une étude prospective contrôlée contre placebo menée en aveugle sur 60 chiens, a permis d'évaluer l'intérêt de la mise en place d'une antibiothérapie en cas d'AHDS (Unterer et al. 2011). Le premier groupe de 29 chiens a reçu de l'amoxicilline associée à l'acide clavulanique ainsi qu'un traitement symptomatique, tandis que le second groupe de 24 chiens ne recevait que le traitement symptomatique. Aucune différence significative de sévérité des signes cliniques, du taux de mortalité, ou de la durée d'hospitalisation n'a été mise en évidence.

En parallèle, une hémoculture a été réalisée sur chaque animal dès l'admission afin de révéler une éventuelle bactériémie. Cinq pourcent des chiens présentaient une culture positive mais n'ont pas présenté de signe de sepsis même sans traitement antibiotique. Ces résultats suggèrent qu'une bactériémie est peu fréquente en cas d'AHDS et que celle-ci est naturellement transitoire. Son importance clinique est donc mineure d'autant plus qu'une bactériémie est parfois observée chez le chien sain.

Un second essai clinique réalisé prospectivement en aveugle contre placebo sur 34 chiens a montré que l'ajout de métronidazole en plus de l'amoxicilline et l'acide clavulanique n'apportait pas d'amélioration par rapport à l'acide clavulanique seul en cas de diarrhée hémorragique chez le chien (Ortiz et al. 2018).

Une troisième étude menée sur 237 chiens de façon rétrospective ne montre pas de différence clinique ni de différence de durée d'hospitalisation entre les chiens sous antibiotiques ou non (Dupont et al. 2021).

Finalement, ces études semblent indiquer qu'une antibiothérapie n'est pas nécessaire en cas d'AHDS sans signe de sepsis associé. Un traitement de soutien et une surveillance rapprochée permettent à eux seuls d'obtenir un taux de mortalité faible et un rétablissement rapide (Mortier et al. 2015b; Unterer et al. 2011).

Cependant, l'antibiothérapie reste indiquée dans certains cas. Si l'animal présente des signes cliniques systémiques importants (hypotension, tachypnée, tachycardie, état comateux) qui persistent après la réhydratation, le traitement symptomatique et la gestion de la douleur alors l'antibiothérapie est indiquée. Il faut toutefois noter que certains de ces signes cliniques sont présents à l'admission mais ils ne sont pas toujours liés à un sepsis mais plutôt à l'état de déshydratation important de l'animal (Dupont et al. 2021).

De la même façon, un chien présentant des signes d'inflammation systémique (hyperthermie, leucocytose ou leucopénie importante, déplacement à gauche de la courbe important) doit aussi être mis sous antibiotiques. De manière préventive, une antibiothérapie est nécessaire chez un animal immunodéprimé ou ayant une maladie hépatique l'empêchant de filtrer correctement les bactéries.

Par ailleurs, le dosage CRP a été évoqué comme critère de décision pour la mise en place d'une antibiothérapie. Dans une étude rétrospective, la concentration de la CRP était supérieure chez les chiens ayant reçu une antibiothérapie. Cette observation semble montrer que les cliniciens ont utilisé la CRP pour décider de mettre en place l'antibiothérapie (Dupont et al. 2021). Cependant, une étude prospective est nécessaire afin d'évaluer si la concentration de la CRP doit être utilisée comme critère de décision en faveur d'une antibiothérapie.

4. Prébiotiques et probiotiques

Les **prébiotiques** sont des substrats sélectifs utilisés par les micro-organismes « bénéfiques », ils favorisent donc leur croissance à l'instar des autres micro-organismes. Les **probiotiques** sont des organismes vivants à administrer par voie orale ayant des effets sur la santé au-delà de leur fonction nutritive.

Suchodolski et al. ont montré que les chiens atteints d'AHDS présentaient des altérations de la composition de leur microbiote intestinal lors de leur épisode de diarrhée (Suchodolski et al. 2012). Cependant, nous ne pouvons déterminer à ce jour s'il s'agit-là d'une cause ou d'une conséquence de la maladie. Il semblerait tout de même que la dysbiose joue un rôle dans les mécanismes physiopathologiques de la diarrhée aiguë ou chronique. Un ré-équilibrage du microbiote par l'administration de pré- et/ou probiotiques serait donc bénéfique à l'animal.

Une étude prospective contrôlée contre placebo menée en aveugle chez 25 chiens atteints d'AHDS, a montré en 2018 que l'administration de probiotiques peut avoir des effets bénéfiques sur le rétablissement des animaux (Ziese et al. 2018). En effet, le groupe recevant les probiotiques s'est rétabli en moyenne un jour plus tôt que celui recevant le placebo. Aucune autre différence dans la sévérité et durée des signes cliniques n'a été mise en évidence. Même si les effets restent réduits, cette étude encourage donc l'administration de probiotiques en cas d'AHDS afin d'accélérer le rétablissement du chien.

5. Transplantation de microbiote fécal

La transplantation de microbiote fécal (TMF) est un transfert de fèces d'un animal sain dans l'intestin d'un receveur malade dans le but de moduler le microbiote du receveur. Elle peut être envisagée en cas de diarrhée aiguë infectieuse. Une étude montre qu'une TMF unique chez des chiots présentant une parvovirose diminuait significativement leur durée d'hospitalisation et accélérât la résolution de la diarrhée (Pereira et al. 2018). De plus, il a été prouvé qu'une TMF était supérieure à un traitement au métronidazole lors de diarrhée aiguë sans complication puisqu'elle permettait d'obtenir un meilleur score fécal à moyen terme et

une normalisation du microbiote plus rapide (Chaitman et al. 2020). Une étude pilote menée sur des chiens présentant un AHDS a cherché à évaluer l'impact d'une unique TMF sur leur rétablissement (Gal et al. 2021). Aucune différence clinique n'a pu être notée entre les 2 groupes mais des changements du microbiote sont notables à 30 jours post-TMF. En effet, la TMF a le potentiel d'augmenter le nombre de bactéries produisant des acides gras à courte chaîne (SCFA) et donc d'améliorer la santé intestinale jusqu'à 30 jours post TMF (Tan et al. 2014).

Même si d'autres investigations sur les effets et les complications de la TMF sont nécessaires, la réalisation d'une TMF pourrait avoir un intérêt bénéfique en cas de diarrhée aiguë associée à *C. perfringens* (Chaitman, Gaschen 2021).

III. Diagnostic d'entérite aiguë associée à *C. perfringens*

Étant donné l'isolement de *C. perfringens* dans les selles de 70 à 80% des chiens sains (Weese et al. 2001; Marks et al. 2002; Goldstein et al. 2012) et la méconnaissance de son mécanisme physiopathologique, le diagnostic de diarrhée associée à *C. perfringens* est difficile. Le diagnostic différentiel étant large en cas de diarrhée aiguë, plusieurs examens complémentaires sont généralement nécessaires pour permettre d'identifier la cause de la diarrhée ou au moins d'exclure certaines causes nécessitant une prise en charge spécifique.

A. Tableau clinique

1. Commémoratifs et anamnèse

Comme pour tout autre motif de consultation, lorsqu'un chien est amené en consultation pour diarrhée, l'anamnèse et les commémoratifs nous apportent des informations indispensables pour établir un diagnostic différentiel et pour hiérarchiser les hypothèses.

Tout d'abord, l'**âge** de l'animal peut orienter les hypothèses cliniques. Les affections tumorales sont plus fréquentes chez l'animal âgé. Par exemple, l'âge moyen au diagnostic du lymphome intestinal est autour de 9 ans (Sogame, Risbon, Burgess 2018). Certaines maladies infectieuses telles que la parvovirose sont plus fréquentes chez le jeune chien. En effet, l'infection par un parvovirus atteint classiquement des chiots de 4 à 12 semaines (Decaro, Buonavoglia 2012). La **race** peut aussi nous orienter vers certaines affections à prédisposition raciale : les chiens de petite taille particulièrement le yorkshire terrier, le pinscher miniature, le bichon maltais et le schnauzer miniature sont notamment prédisposés à l'AHDS (Mortier et al. 2015a).

Le **mode de vie** et les **conditions d'élevage** de l'animal peuvent nous aiguiller dans notre diagnostic différentiel. Les causes infectieuses sont à privilégier lors d'atteinte simultanée de plusieurs animaux vivant en collectivité.

Le **statut vaccinal**, particulièrement vis-à-vis de la parvovirose mais aussi de la maladie de Carré et l'hépatite de Rubarth, nous permet de renforcer ou de diminuer la probabilité d'infection par ces agents. Cependant, la vaccination ne permet pas d'exclure l'atteinte par l'agent infectieux en question. D'après une étude menée en Australie sur 1451 chiens ayant développé une parvovirose, 3,3% de ses chiens étaient correctement vaccinés (Decaro, Buonavoglia, Barrs 2020). La fréquence, la spécialité utilisée et la date de la dernière **vermifugation** sont aussi à noter afin d'évaluer le risque d'affection parasitaire.

Le type de **ration alimentaire**, les changements récents ou le mode d'administration peuvent être à l'origine d'une diarrhée suite à une intolérance alimentaire par exemple. La **possibilité d'ingestion de produits toxiques** permet de renforcer les suspicions d'intoxication. L'ingestion de corps étranger est aussi à noter.

Les informations concernant les **traitements médicaux ou topiques récents** peuvent nous orienter vers une diarrhée iatrogène et sont à prendre en compte dans la prise en charge de l'affection.

L'**aspect des selles** observées par le propriétaire peut mettre en évidence des facteurs de gravité tels que du méléna. La fréquence des défécations est aussi un indicateur objectif de la sévérité de la diarrhée.

Enfin, la **présence de signes cliniques chez les êtres humains vivant avec l'animal** peut nous orienter vers des agents zoonotiques comme la giardiose.

2. Examen clinique

D'**autres signes cliniques** sont généralement **associés à la diarrhée** (Freiche, Hernández 2011) tels que de la dysorexie voire de l'anorexie ou de la polyphagie, de la douleur ou une distension abdominale, des borborygmes et des flatulences. En cas de vomissements, il faut exclure un processus métabolique ou encore un état occlusif. L'altération de l'état général, la déshydratation, l'hypo- ou l'hyperthermie et la prostration sont des facteurs de gravité. Un amaigrissement ou une altération de la qualité de la peau et/ou du poil nous oriente plutôt vers une affection chronique. Si les muqueuses sont pâles, l'animal peut être anémique ou en état de choc. Une tachycardie peut refléter un état de choc, un sepsis ou une hyperthermie. Lors d'entéropathie avec perte de protéine, on retrouve parfois un œdème périphérique. Si de la polydipsie est associée à la diarrhée, des causes métaboliques sont fréquemment en cause. Ces signes cliniques associés priorisent certaines hypothèses. Dans le cas de l'AHDS, des vomissements précèdent la diarrhée dans 80% des cas et sont hémorragiques dans 50% des cas (Mortier et al. 2015a).

La **palpation abdominale** doit être douce et graduelle, à une ou deux mains selon la taille du chien. Il est possible de détecter une masse abdominale, un corps étranger ou des anses intestinales dilatées ou de mettre en évidence une douleur abdominale généralisée ou plus localisée. Surélever le thorax du chien peut permettre de sentir une masse normalement située sous le cercle de l'hypochondre mais la palpation abdominale est un examen peu sensible. Les résultats de la palpation sont très dépendants de la patience et de l'expérience du manipulateur mais aussi de la condition et de la coopération de l'animal. Par exemple, selon une étude rétrospective menée à l'Université de Pennsylvanie, la palpation d'un corps étranger est peu commune : seulement 13 à 15% des corps étrangers ont pu être palpés (Hobday et al. 2014).

Le **toucher rectal** doit aussi être systématique. Il permet d'apprécier la granularité de la muqueuse ou encore d'exclure une sténose, une masse ou un polype dans les zones atteignables du canal rectal. Il peut permettre aussi de recueillir des selles pour apprécier leur aspect.

Les signes cliniques nous permettent généralement de **différencier** une diarrhée provenant de **l'intestin grêle ou du côlon**. Une fréquence de défécation fortement augmentée avec urgence, une dyschésie, la présence de mucus dans les selles ou d'hématochézie sont indicateurs d'une atteinte recto-colique. A l'inverse, un volume fécal augmenté, du méléna, de

la stéatorrhée, une perte de poids ou l'association à des vomissements orientent vers une diarrhée de l'intestin grêle (Washabau 2013).

B. Analyses sanguines

Les analyses de sang sont généralement réalisées en première intention lorsque l'atteinte de l'animal est importante. Ce sont des tests préliminaires qui permettent d'orienter le clinicien vers des tests plus spécifiques.

1. Analyse biochimique

L'analyse biochimique sanguine sert majoritairement à exclure des causes métaboliques (Villiers, Ristic 2016). Lorsque les enzymes hépatiques, les transaminases (**ALAT**) et phosphatases alcalines (**PAL**) sont dans les normes de l'espèce, ils permettent d'écarter une atteinte hépatique. Toutefois, les activités des enzymes hépatiques peuvent être modérément augmentées lors d'atteinte gastro-intestinale primaire par passage d'antigènes, de bactéries ou de toxines dans la circulation porte provoquant une hépatite réactive modérée. Dans ce cas, la mesure des **acides biliaires** peut permettre de faire la distinction entre atteinte hépatique ou gastro-intestinale primaire.

Une azotémie caractérisée par une **hyperurémie** et une **hypercréatininémie** est révélatrice d'une atteinte pré-rénale, rénale ou post-rénale. Des paramètres normaux permettent d'écarter l'origine rénale de la diarrhée. Cependant, l'urémie et la créatinémie peuvent augmenter en cas de déshydratation sans atteinte rénale ou post-rénale. De plus, une augmentation de l'urémie comparativement à la créatininémie peut être consécutive à un repas riche en protéine récent ou à un saignement gastrique et/ou de l'intestin grêle proximal.

La concentration des **protéines totales** et de l'**albumine** dans le sang sont aussi à mesurer. Une hyperprotéïnémie par hyperalbuminémie associé à un hémocrite augmenté sont indicateurs d'une déshydratation. Une hyperglobulinémie peut apparaître lors d'inflammation chronique importante ou encore de lymphome digestif.

Un **ionogramme** doit aussi être réalisé pour évaluer les répercussions de l'affection mais aussi dans un but diagnostique. Des anomalies électrolytiques peuvent être présentes en cas de vomissements, d'obstruction intestinale ou de diarrhée sécrétoire. En cas d'anomalies importantes, elles sont à corriger par la mise en place d'une fluidothérapie et peuvent donc nécessiter une hospitalisation. Une hyponatrémie associée à une hyperkaliémie est évocatrice d'une maladie d'Addison mais est compatible avec d'autres affections digestives telles que la salmonellose ou une infestation par des trichures.

Lorsque le diagnostic différentiel inclut une crise addisonnienne, une mesure de la concentration basale de cortisol peut être réalisée pour l'exclure car ce test a une très bonne sensibilité. Une concentration inférieure à 2µg/dL nous permet d'exclure une maladie d'Addison (Lennon et al. 2007).

En cas de suspicion de pancréatite, un dosage de la lipase spécifique pancréatique canine peut être réalisé. La sensibilité de ce test est évaluée à 80% lors de pancréatite aiguë (Trivedi et al. 2011; Xenoulis 2015). Ce test reste tout de même la méthode la plus sensible existante (Ettinger, Feldman, Côté 2017). Cependant, même si la concentration reste dans les normes de l'espèce, l'exclusion de la pancréatite doit se faire conjointement avec le tableau clinique et les autres données cliniques telles qu'une échographie abdominale (Xenoulis 2015).

2. NFS

La numération et formule sanguine (NFS) est une analyse généralement peu spécifique mais permettant d'orienter le diagnostic. Dans le cas de diarrhée hémorragique, la NFS permet de confirmer le saignement digestif et d'en évaluer la sévérité.

La présence d'**anémie** et sa caractérisation sont des éléments importants (Villiers, Ristic 2016). Elle peut être signe de maladie extradigestive comme une maladie rénale chronique, un hypoadrénocorticisme ou une maladie hépatique, ou de maladie primitivement digestive. Lors d'inflammation chronique, l'anémie est généralement modérée, normocytaire à microcytaire, normochrome à hypochrome et hyporégénérative à non-régénérative. Lors de saignement digestif, la sévérité de l'anémie dépend des pertes sanguines dans l'intestin. Les premiers jours, l'anémie est hyporégénérative mais peut devenir très régénérative les jours qui suivent.

Lors d'AHDS, on observe plutôt à une **hémococoncentration** importante c'est-à-dire une augmentation de la concentration de toutes les cellules sanguines et donc une hyperviscosité sanguine (Mortier et al. 2015a). En effet, une perte de fluide importante et rapide vers la lumière intestinale à l'origine d'une augmentation de l'hématocrite accompagnée d'une baisse des protéines totales proportionnellement moins marquée.

Un **leucogramme inflammatoire** caractérisé par une neutrophilie légère à marquée pouvant être associée à une monocytose modérée et à une lymphocytose, est en faveur d'une inflammation mais ne nous indique pas son origine. Plus les anomalies sont marquées, plus l'inflammation est susceptible d'être sévère. C'est le cas notamment de l'AHDS où le leucogramme de stress est accompagné d'un déplacement à gauche de la courbe dans 50% des cas. Cette modification de la courbe s'explique par la circulation de neutrophiles immatures du fait de leur demande en trop importante notamment lors d'extension importante des lésions muqueuses et de l'inflammation qui l'accompagne.

D'autres éléments peuvent être indicateurs que *C. perfringens* n'est pas à l'origine de la diarrhée. Une **éosinophilie** oriente plutôt le diagnostic vers une cause parasitaire ou une maladie d'Addison. Il faut tout de même être prudent car certaines races comme le berger allemand et le rottweiler ont physiologiquement un nombre d'éosinophiles légèrement supérieur à la norme chez le chien. Une **leucopénie** peut être occasionnellement observée lors d'AHDS mais une parvovirose doit être suspectée.

C. Coproscopie

En ce qui concerne les parasites intestinaux, leur détection peut se faire par examen microscopique d'un échantillon de fèces frais au microscope (Hall, Williams, Kathrani 2020). La sensibilité de l'examen est largement améliorée par des techniques de concentration telle que la flottation ou la sédimentation. La technique de flottation par une solution saturée en sucre ou en sel permet de révéler la plupart des parasites dont les coccidies et *Cryptosporidium spp.* mais la présence de graisse dans les fèces la rend peu sensible. Lors de stéatorrhée, il faudra donc préférer la technique de sédimentation plus difficile à mettre en place.

La méthode utilisée pour la recherche de parasites est très importante car elle conditionne la sensibilité du test. Si l'on cherche à exclure la présence de ces parasites, une sensibilité importante est attendue. Pour cela, il est recommandé de recueillir plusieurs échantillons de selles car les œufs et les oocystes sont excrétés de façon intermittente. Dans le cas de la giardiose, l'examen de 3 échantillons distincts collectés sur 3 à 5 jours est nécessaire pour obtenir une sensibilité du test supérieure à 90%. Avec un échantillon unique, l'absence d'oocystes dans les fèces ne permet pas de conclure. De la même façon, l'identification de *Cryptosporidium spp.* nécessite une coloration de la lame et une observation microscopique de l'échantillon à l'objectif à immersion afin d'être suffisamment sensible pour être interprétable.

La coproscopie n'est généralement pas une méthode de référence pour les parasites intestinaux notamment pour la giardiose. Cependant, bien réalisée, sa sensibilité reste acceptable et elle permet d'explorer plusieurs causes parasitaires à la fois. Son interprétation doit être prudente, la mise en évidence d'un parasite ne prouve pas toujours sa mise en cause dans la maladie.

D. Imagerie

Les examens d'imagerie médicale sont nécessaires pour exclure de nombreuses causes telles que les causes mécaniques, néoplasiques, inflammatoires et extradigestives. Ils peuvent être réalisés en première intention si le tableau clinique fait fortement suspecter les causes préalablement citées notamment les (sub-)obstructions qui nécessitent une prise en charge chirurgicale rapide.

1. Radiographie abdominale

La radiographie abdominale est un examen facilement réalisable et interprétable et particulièrement adapté en cas de suspicion d'obstruction ou de masse abdominale de taille importante. Cependant, en dehors de ces cas, son intérêt diagnostique est réduit. Un liquide de contraste peut être administré per os afin de confirmer une (sub-)obstruction et de préciser sa localisation.

2. Échographie

L'échographie abdominale est un examen non-invasif souvent plus sensible et plus spécifique que la radiographie. Elle présente un intérêt diagnostique supérieur particulièrement pour les néoplasies du tube digestif, les intussusceptions et les infiltrations de la paroi du tube digestif (Washabau 2013). Elle permet aussi de réaliser des ponctions échoguidées dans le même temps si nécessaire. L'échographie permet donc d'exclure un nombre important de causes de diarrhée aiguë du chien (Mapletoft, Allenspach, Lamb 2018). Cependant, cet examen est fortement opérateur-indépendant et nécessite d'être suffisamment qualifié pour pouvoir être concluant.

Il faut tout de même garder à l'esprit que les intussusceptions sont majoritairement secondaires à une infection du tube digestif et sont rarement primaires (Rallis et al. 2000). La présence d'une intussusception ne permet donc pas d'exclure mais plutôt de renforcer une hypothèse infectieuse. Cela peut s'expliquer à la fois par les désordres de la motilité intestinale lors d'inflammation importante mais aussi par l'hyperplasie lymphoïde accompagnant l'infection. Ces follicules hyperplasiques notamment au niveau des plaques de Peyer pourraient servir de point de départ pour l'intussusception. (Nylund, Denson, Noel 2010)

E. Coproculture

La coproculture est un examen consistant à isoler certaines bactéries réputées pathogènes chez le chien par mise en culture d'un échantillon de fèces. Il s'agit principalement de *Clostridium difficile*, *C. perfringens*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* et des *Escherichia coli* adhérents et invasifs (AIEC) (Werner et al. 2021).

Le prélèvement de fèces doit être conservé dans un pot étanche, de préférence sur un milieu de transport à une température comprise entre 4 et 10°C et doit être analysé dans les meilleurs délais. Si des bactéries anaérobies sont recherchées, l'idéal est de placer l'échantillon immédiatement dans un milieu anaérobie (par exemple, dans un sachet accompagné du dispositif Oxoid™ Anaerogen™). L'interprétation des résultats d'une coproculture est toutefois problématique. Un résultat positif ne prouve pas systématiquement la causalité de la

bactérie dans l'apparition de la maladie. A l'inverse, un résultat peut être faussement négatif par manque de sensibilité. Lorsque la sensibilité de la méthode est supérieure ou égale à 45%, trois résultats consécutifs sont nécessaires pour être sûr à 90% que le résultat est vraiment négatif ce qui semble peu réalisable en pratique (Marks et al. 2011).

En ce qui concerne *C. perfringens*, les taux d'isolement de la bactérie sont similaires chez le chien sain et le chien diarrhéique : chez 70 à 80% des chiens sains, la culture permet l'isolement de *C. perfringens* (Marks et al. 2002; Weese et al. 2001; Goldstein et al. 2012). Un résultat positif à la culture ne permet donc pas de conclure sur l'implication de *C. perfringens*.

F. Techniques immunologiques

1. Exclusion d'autres causes

Afin d'exclure certaines hypothèses infectieuses lors de diarrhée aiguë du chien, des tests utilisant des techniques immunologiques existent. Certains peuvent être réalisés directement à la clinique tandis que d'autres nécessitent un envoi au laboratoire.

Pour exclure la giardiose, la technique de référence est actuellement l'immunofluorescence directe mais celle-ci n'est pas disponible en médecine vétérinaire. Des tests ELISA détectant les antigènes de *Giardia duodenalis* à réaliser en clinique peuvent être utilisés. Ce sont des tests simples et rapides réalisés sur échantillon fécal. En comparaison à l'immunofluorescence, leur spécificité et sensibilité sont respectivement supérieure à 82% et 90% (Saleh et al. 2019). Par ailleurs, lors de diarrhée associée à *C. perfringens*, la suspicion de giardiose est généralement faible étant donnée sa présentation clinique généralement chronique. Ces éléments donnent au test ELISA une bonne valeur prédictive négative qui permet d'exclure la giardiose en cas de résultat négatif.

Un test antigénique ELISA est aussi disponible pour détecter le parvovirus dans les selles de chien. Cependant, la sensibilité de ce test est faible, elle est estimée entre 18 et 81% selon les études (Schmitz et al. 2009; Desario et al. 2005; Markovich et al. 2012). Cela entraîne de nombreux faux négatifs, plus de 50% des cas testés positifs à la PCR sont négatifs au test

antigénique (Proksch et al. 2015). En effet, la sensibilité du test est diminuée lorsque la charge virale est faible ou le taux d'anticorps important. Un résultat négatif au test ELISA ne permet en aucun cas l'exclusion d'une infection par le parvovirus. Le test ELISA permet uniquement la détection précoce de la moitié des animaux infectés.

2. Implication de *Clostridium perfringens*

Afin d'impliquer *C. perfringens* dans l'apparition d'une diarrhée, des études se sont intéressées à la détection des toxines produites pouvant être impliquées dans son mécanisme physiopathologique (tableau II).

La mise en évidence de la CPE par des techniques immunologiques a été particulièrement étudiée. Deux techniques de tests immunologiques recherchant la CPE sont disponibles en médecine vétérinaire : la méthode ELISA et la RPLA (Reverse Passive Latex Agglutination). Les résultats des différentes études ne sont pas tous en accord sur l'utilité de ce test. Une première étude de 2001 et une seconde de 2002 utilisent la technique ELISA et mettent en évidence une différence significative entre la détection de la CPE chez les chiens sains (5% et 14% respectivement) et diarrhéiques (12% et 34% respectivement) (Weese et al. 2001; Marks et al. 2002). Dans une troisième étude, la différence entre les 2 groupes testés par ELISA n'est pas statistiquement significative (12% chez les chiens sains, 14% chez les chiens diarrhéiques) mais les résultats obtenus par RPLA chez les mêmes chiens sont significativement différents entre les chiens sains et diarrhéiques (respectivement 25 et 45%) (Cave et al. 2002). Ces données sont en faveur d'une sensibilité accrue mais une spécificité réduite de la RPLA par rapport à l'ELISA.

Finalement, les résultats de ces tests immunologiques ciblant la CPE sont peu informatifs en cas de suspicion de diarrhée à *C. perfringens*. En effet, dans les études évoquées, *C. perfringens* n'a jamais été mis en cause préalablement chez les chiens « diarrhéiques » testés. La détection accrue de la CPE chez les chiens diarrhéiques pourrait donc être due à une dysbiose secondaire accompagnant la diarrhée de l'animal et non à une prolifération de *C. perfringens* primitive à l'origine de la diarrhée.

Une étude similaire a été menée sur des chiens présentant un AHDS (Busch et al. 2015). Une différence significative de détection de la CPE par ELISA était présente entre les chiens sains (0%) et les chiens atteints d’AHDS (24%). Cependant, la toxine CPE étant détectée chez 12% des chiens sains dans une des études précédemment citées (Marks et al. 2002), un résultat positif à un test immunologique ciblant la CPE ne permet pas d’impliquer *C. perfringens* dans la maladie.

Étude	Chiens sains	Chiens diarrhéiques	Chiens présentant un AHDS
Weese, 2001 <i>ELISA</i>	5% ¹	28% ¹	
Marks, 2002 <i>ELISA</i>	12% ²	34 % ²	
Cave, 2002 <i>ELISA</i>	12% ³	14% ³	
Cave, 2002 <i>RPLA</i>	25% ⁴	45% ⁴	
Busch, 2015 <i>ELISA</i>	0% ⁵		24% ⁵

^{1, 2, 3, 4, 5} Différence significative

Tableau II : Comparaison du pourcentage de détection de la toxine CPE chez le chien sain, diarrhéique ou présentant un AHDS

G. Techniques moléculaires

1. Exclusion des causes autres

La méthode PCR est utilisée pour détecter le parvovirus canin (CPV-2). Cette méthode est plus sensible et plus spécifique que la méthode ELISA utilisée à la clinique (Mazzaferro 2020). Étant donné la sensibilité moyenne à faible du test ELISA, un test PCR doit être réalisé lorsque la suspicion clinique reste importante notamment lorsqu’une leucopénie est mise en évidence à la NFS. Il doit aussi être réalisé lorsqu’une suspicion faible persiste malgré un test

ELISA négatif et que l'animal atteint doit être logé en communauté (hospitalisation, chenil, élevage...) afin d'éviter la propagation de cette maladie très contagieuse. Ce test peut donc s'avérer utile dans la démarche diagnostique lors de diarrhée aiguë.

De la même façon, les tests PCR disponibles pour détecter la présence de *Cryptosporidium spp.* dans les selles du chien ne sont pas à privilégier dans un premier temps. Leur spécificité n'ayant pas été évaluée, ces tests ne sont pas à utiliser en première intention dans la démarche diagnostique dans le cas d'une diarrhée aiguë (Scorza, Tangtrongsup 2010; Ettinger, Feldman, Côté 2017).

Des panels de tests PCR peuvent parfois être proposés par les laboratoires pour explorer l'origine d'une diarrhée. Ils peuvent inclure les tests PCR giardiose et parvovirus mais aussi des tests PCR détectant *Salmonella spp.*, le coronavirus canin ou encore le paramyxovirus responsable de la maladie de Carré. Ces derniers sont des tests fiables possédant une bonne sensibilité et une bonne spécificité (Kurowski et al. 2002; Wang et al. 2018).

2. Implication de *Clostridium perfringens*

A ce jour, la méthode PCR a été étudiée comme test diagnostique pour les gènes codant pour 3 de ses toxines déjà évoquées : la CPA, la CPE et plus récemment la toxine NetF.

a. La toxine alpha

La recherche par PCR du gène codant pour la toxine alpha (*cpa*) a fait l'objet de plusieurs études (tableau III). Cependant, le gène *cpa* est retrouvé par méthode PCR chez 100% des souches de *C. perfringens* isolées chez les chiens sains et diarrhéiques soit 84% des chiens sains et 89% des chiens diarrhéiques (Goldstein et al. 2012). Dans cette étude, il n'existe donc pas de différence significative de détection entre les chiens sains et les chiens diarrhéiques.

Par ailleurs, deux autres études se sont intéressées à la prévalence du gène *cpa* chez les chiens présentant un AHDS. La première de 2019 ne met pas évidence de différence

significative entre les chiens présentant un AHDS (59%), les chiens présentant une parvovirose (67%) ou les chiens sains (65%) (Sindern et al. 2019b). La seconde de 2021 compare les résultats de chiens atteints d'un AHDS avec des chiens présentant une diarrhée hémorragique ne s'apparentant pas à un AHDS et des chiens hospitalisés pour une raison différente. De la même façon, elle ne met pas en évidence de différence significative de détection du *cpa* entre les différents groupes (Allen-Deal, Lewis 2021).

Étude	Chiens sains	Chiens diarrhéiques	Chiens présentant un AHDS
Goldstein, 2012 <i>coproculture avant PCR</i>	84%	89%	
Sindern, 2019	65%	67% (Parvovirose)	59%
Allen-Deal, 2021	60% (Animaux hospitalisés)	58% (Diarrhée hémorragique, AHDS exclu)	44%

^{1, 2, 3, 4, 5} Différence significative

Tableau III : Comparaison du pourcentage de détection du gène *cpa* chez le chien sain, diarrhéique ou présentant un AHDS

La détection qualitative du gène codant pour la toxine alpha par PCR classique ne permet donc pas d'impliquer *C. perfringens* dans l'apparition de la diarrhée puisque celle-ci sera positive dans la majorité des cas peu importe que l'animal soit diarrhéique ou non.

b. L'entérotoxine

En ce qui concerne le gène *cpe*, les études obtiennent des résultats assez différents (tableau IV).

L'étude menée par S. L. Marks et al. met en évidence une différence significative de détection du gène *cpe* suite à l'isolement et la culture de *C. perfringens* dans les selles de chiens sains en comparaison à des chiens diarrhéiques (Marks et al. 2002). Cependant, le fait que la cause de la diarrhée chez les chiens classés « diarrhéiques » reste inconnue reste une limite de cette étude. Il est difficile de savoir si la détection du gène *cpe* est réellement liée à l'implication de *C. perfringens* dans l'apparition d'une diarrhée ou si ce n'est que la conséquence de la dysbiose secondaire à l'apparition de la diarrhée. En effet, certains chiens diarrhéiques pourraient obtenir un résultat positif à la PCR ciblant le gène *cpe* du fait d'une dysbiose faisant suite à une diarrhée de cause initiale différente. La différence de détection du gène *cpe* entre les chiens sains et les chiens diarrhéiques ne s'explique donc pas forcément par l'obtention de résultats positifs par les chiens atteints d'une diarrhée associée à *C. perfringens*. Il est possible que cette différence soit due à la probabilité plus importante d'obtenir un résultat positif chez les chiens diarrhéiques pour des causes variées.

En cas d'AHDS, les résultats diffèrent selon les études. L'étude de K. Busch et al. montre une différence significative de détection du gène *cpe* entre les chiens sains et les chiens présentant un AHDS (Busch et al. 2015) contrairement aux études plus récentes de 2019 et de 2021. L'étude de N. Sindern et al. montre que le pourcentage de détection est significativement inférieur chez les chiens atteints d'une parvovirose que chez les chiens sains ou les chiens souffrant d'AHDS mais la différence n'est pas significative entre les chiens sains et chiens souffrant d'AHDS (Sindern et al. 2019a). De la même façon, l'étude de A. Allen-Dean ne montre pas de différence significative de détection de *cpe* entre les chiens sains, les chiens présentant une diarrhée hémorragique de cause autre que l'AHDS, et les chiens présentant un AHDS (Allen-Dean, Lewis 2021).

Ces résultats semblent indiquer que la détection du gène *cpe* dans les fèces d'un chien diarrhéique ne permettent pas de différencier une diarrhée associée à *C. perfringens* des autres causes de diarrhée aiguë. Par ailleurs, le taux de détection chez le chien sain n'est pas négligeable (jusqu'à 39%). Ces éléments sont en faveur d'une faible spécificité de la méthode PCR ciblant le gène *cpe*.

Étude	Chiens sains	Chiens diarrhéiques	Chiens présentant un AHDS
Marks, 2002 <i>coproculture avant PCR</i>	12% (<i>chiens sains</i>) ¹ 14% (<i>hospitalisés</i>) ²	41% ^{1,2}	
Busch, 2014	39% ³		65% ³
Sindern, 2019	32% ⁴	4% ^{4,5} (<i>Parvovirose</i>)	42% ⁵
Allen-Deal, 2021	20% (<i>Animaux hospitalisés</i>)	12% (<i>Diarrhée hémorragique, AHDS exclu</i>)	19%

^{1,2,3,4,5} Différence significative

Tableau IV : Comparaison du pourcentage de détection du gène cpe chez le chien sain, diarrhéique ou présentant un AHDS

Comme nous avons pu le voir précédemment, la détection de la toxine CPE dans les fèces ne permettait pas non plus d'identifier l'implication de *C. perfringens* dans l'apparition de la diarrhée. Cependant, en recherchant à la fois la toxine CPE et son gène codant *cpe* chez des chiens sains et diarrhéique, S. L. Marks et al. ont mis en évidence une association statistique forte entre les 2 résultats positifs et la présence de diarrhée. Seulement 4% des chiens diarrhéiques étaient positifs pour la toxine CPE et le gène *cpe* contre 28% des chiens diarrhéiques (Marks et al. 2002). En 2011, il était donc recommandé de combiner un test ELISA de détection de la toxine CPE et un test PCR pour le gène *cpe* afin de diagnostiquer une diarrhée associée à *C. perfringens* (Marks et al. 2011). Cependant, l'étude portant sur la cause de la diarrhée n'étant pas identifiée chez les chiens diarrhéiques, il n'est pas possible d'affirmer que la différence entre les 2 groupes est due à une atteinte à *C. perfringens*. Le diagnostic ne peut donc pas se reposer sur la combinaison de ces 2 tests.

c. La toxine NetF

Récemment impliquée dans le mécanisme physiopathologique de la diarrhée associée à *C. perfringens* chez le chien (Gohari et al. 2015), l'intérêt diagnostique de la détection de la toxine NetF est en cours d'investigation (tableau V).

L'étude de N. Sintern a montré en 2019 qu'il existait une différence importante de détection du gène *netF* dans les fèces de chiens sains et de chiens présentant un AHDS. Pratiquement 50% des chiens présentant un AHDS étaient positifs à *netF* contre seulement 12% des chiens sains. De plus, aucun des chiens atteint de parvovirose ne présente de gène *netF* dans les selles. Ce résultat est en faveur d'une spécificité élevée du test PCR ciblant *netF*. La méthode PCR de détection du gène codant pour la toxine NetF serait donc plus spécifique que celles détectant la CPA ou la CPE, ce qui lui confère un intérêt supérieur dans le diagnostic de l'AHDS.

Étude	Chiens sains	Chiens diarrhéiques	Chiens présentant un AHDS
Sintern, 2019	12% ¹	0% ² (Parvovirose)	48% ^{1,2}
Ziese, 2018			57% à J0 4% à J7

^{1,2} Différence significative

Tableau V : Comparaison du pourcentage de détection du gène *net F* chez le chien sain, le chien présentant une parvovirose ou un AHDS

Il faut tout de même rester prudent sur l'interprétation de ce test PCR qualitatif visant *netF*. En effet, 12% des chiens sains présentaient un résultat positif ce qui rend l'obtention d'un faux positif possible. De plus, une étude de 2018 montre que les résultats positifs à la PCR détectant *netF* ne sont obtenus qu'à très court terme après apparition de l'AHDS. Si 57% des chiens présentant un AHDS étaient positifs le jour de leur présentation, seul 4% l'étaient encore 7 jours plus tard (Ziese et al. 2018). Ainsi, un faux négatif est probable si le délai entre le test et l'apparition des premiers signes est trop long.

d. *L'hybridation in situ fluorescente*

L'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) est une méthode de cytogénétique moléculaire permettant de détecter et de localiser une séquence d'ADN spécifique sur une coupe histologique (Tagu, Jaubert-Possamai, Méreau 2018). En pratique, la coupe histologique est préparée puis déshydratée pour rendre l'ADN accessible. Des sondes spécifiques de la séquence ciblée sont ensuite appliquées sur la lame et l'ensemble des sonde et de l'ADN est dénaturé puis hybridé. Les sondes se fixent ainsi aux séquences ciblées et émettent de la fluorescence. Après lavage, la lame est ensuite observée au microscope pour évaluer l'intensité et localiser la fluorescence. Contrairement à l'immunohistochimie, la FISH permet de cibler de l'ADN.

Cette technique pourrait s'avérer intéressante pour impliquer *C. perfringens* dans la pathogénie de la diarrhée. En effet, en conditions physiologiques, les bactéries commensales sont présentes uniquement dans la couche supérieure du mucus intestinal (Van der Waaij et al. 2005). Le franchissement ou l'adhérence à l'épithélium de bactéries en quantité importante peut être un signe de pathogénicité. Cependant, une étude portant sur 51 porcs diarrhéiques et 50 porcs sains a montré qu'il n'existait pas de différence significative entre les 2 groupes de détection de *C. perfringens* de type C à la surface de la muqueuse. Pourtant, *C. perfringens* est considérée comme une bactérie entéropathogène majeure chez le porc. Seule l'association avec des lésions d'entérite a permis d'identifier *C. perfringens* comme la cause de la diarrhée chez un porcelet (Jonach et al. 2014). Chez le porc, la détection de *C. perfringens* à la surface de la muqueuse n'aurait donc pas d'intérêt diagnostique, seul le franchissement de celle-ci et l'association à des lésions histologiques permettrait de révéler son rôle pathogène. Chez le chien, l'identification de gènes codant pour des facteurs de pathogénicité tels que la toxine NetF pourrait permettre d'obtenir une méthode diagnostique plus spécifique. En attendant, l'identification par FISH de *C. perfringens* adhérents à la muqueuse voire présents en son sein, associés localement à des lésions d'entérite, semble être un outil diagnostique spécifique mais dont la sensibilité reste à évaluer. De plus, l'application de cette méthode passe par la réalisation de biopsies intestinales sous anesthésie générale ce qui semble peu réalisable particulièrement lors d'AHDS.

H. Récapitulatif de la démarche diagnostique

A ce jour, il n'existe pas à ce jour de méthode de référence permettant le diagnostic d'un AHDS ou plus largement d'une diarrhée associée à *C. perfringens*. Les techniques immunologiques et moléculaires évoquées présentent en effet une spécificité et une sensibilité faible rendant leur utilisation peu pertinente. Leur diagnostic passe donc par une exclusion des autres causes possibles.

Lorsque l'atteinte est peu marquée, un diagnostic précis n'est pas toujours nécessaire et un traitement symptomatique permet généralement la résolution de l'épisode. Cependant, si l'anamnèse ou l'examen clinique montrent des anomalies orientant vers une suspicion importante de pathologie plus grave comme un corps étranger, une parvovirose ou une pancréatite, des examens complémentaires spécifiques sont nécessaires.

Si l'atteinte de l'animal est plus marquée, des tests de base comme la NFS, l'examen biochimique sanguin ou encore une analyse coproscopique sont nécessaires pour évaluer l'état de l'animal et orienter le diagnostic. En fonction du résultat de ces premiers tests, des tests spécifiques peuvent être envisagés pour identifier la cause de la maladie (figure 11). Dans le cas de diarrhée associée à *C. perfringens*, l'ensemble des tests indiqués ci-dessous doivent être réalisés pour exclure toutes les autres causes possibles. L'évolution de l'état de l'animal peut aussi orienter le diagnostic à posteriori puisque l'état de la plupart des chiens présentant un AHDS s'est amélioré sous 48h.

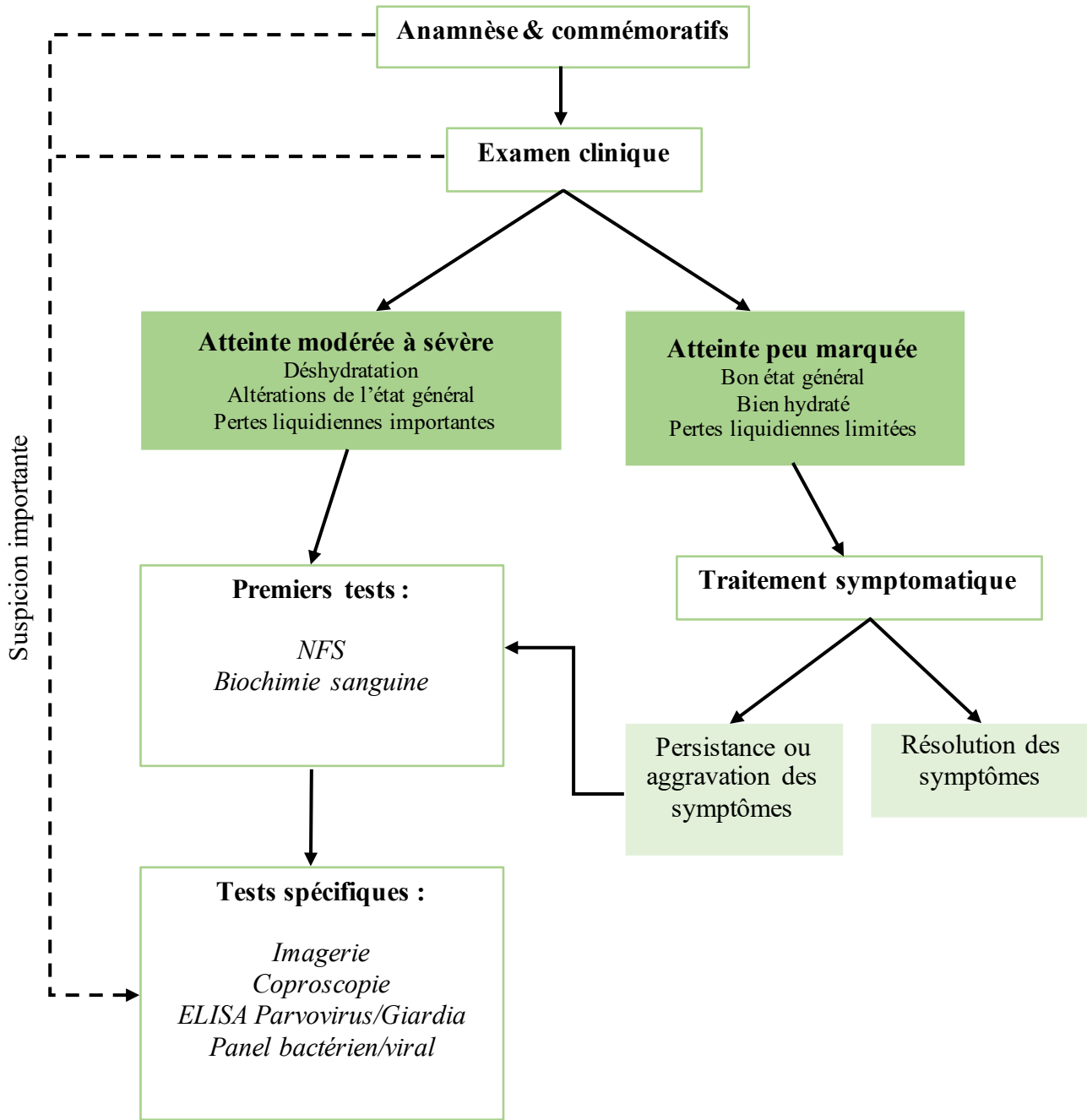


Figure 11 : Prise en charge d'un chien présentant une diarrhée aiguë

PARTIE II : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

I. Objectifs

Au vu des tests qPCR disponibles en France pour la détection des gènes codant pour les toxines CPA et CPE des études s'intéressant à la quantification du nombre de copies des gènes *cpa* et *cpe* chez le chien sain s'avèrent nécessaire pour établir des normes chez le chien sain. En effet, l'existence d'un seuil à partir duquel le nombre de copies de *cpa* ou *cpe* serait indicateur du rôle pathogène dans l'apparition d'une diarrhée aiguë a été soulevé.

Dans une étude menée par le laboratoire IDEXX et l'université de Californie (annexe 3), la quantification par PCR des gènes *cpa* et *cpe* a été menée sur une cohorte de 48 chiens sains et de 16 chiens diarrhéiques (Leutenegger, Marks, Robertson 2012). L'étude semble indiquer que la quantité de gènes *cpa* et *cpe* soient plutôt bien corrélés à l'état diarrhéique ou non de l'animal. En utilisant une valeur seuil de 300 000 copies par gramme pour le gène *cpa*, 47,3% des chiens diarrhéiques présentaient un résultat positif contre 4,2% des chiens sains. De la même façon avec la CPE, en utilisant une valeur seuil de 300 000 copies par gramme, 32,6% des chiens diarrhéiques présentaient un résultat positif contre 8,3% des chiens sains. Ces résultats tendent à donner à la qPCR ciblant les gènes *cpa* et *cpe*, un potentiel rôle dans la démarche diagnostique lors de diarrhée.

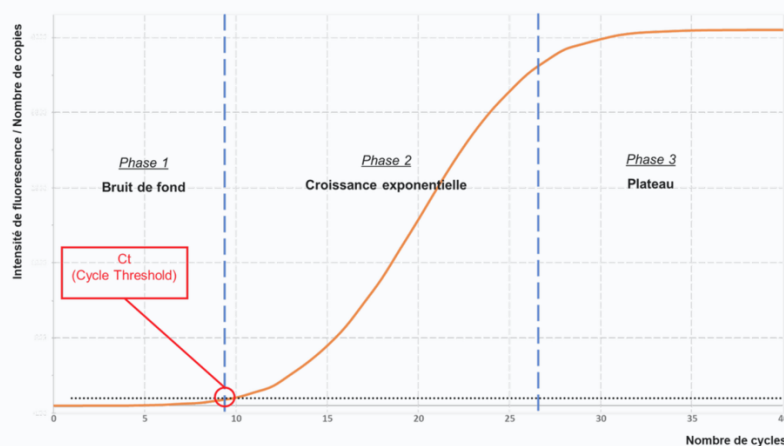
Dans le cadre d'une campagne de recrutement de chiens pour la constitution d'une coprothèque à l'école vétérinaire Oniris, les selles de plusieurs chiens sains ont entre autres été soumis à ces tests PCR de détection et de quantification des gènes *cpa* et *cpe*. Nous chercherons donc à quantifier le nombre de copies de chacun des 2 gènes dans une population de chiens sains afin de la comparer aux résultats obtenus à l'étude précédemment citée. L'objectif général de cette étude est de juger de l'intérêt diagnostique de ces tests PCR quantitatifs ciblant les gènes *cpa* et *cpe*.

La **PCR en temps réel** ou **PCR quantitative** (qPCR) est une technique dérivée de la PCR classique permettant de quantifier l'ADN. En effet, l'amplification de l'ADN est monitorée en temps réel par de techniques de fluorescence. La réaction de polymérisation en chaîne est réalisée dans un thermocycleur pourvu d'un détecteur de fluorescence et des marqueurs fluorescents sont ajoutés au mix classique de PCR .

Ces **marqueurs fluorescents** peuvent être de différentes natures. Les plus utilisés sont les sondes fluorescentes, comme la sonde Taqman, qui sont spécifiques du produit amplifié et libèrent leur fluorescence lors de la phase d'élongation, et les agents intercalants fluorescents comme le technologie SYBR green, qui deviennent fluorescents lorsqu'ils s'incorporent dans une molécule d'ADN double brin.

Lors de réaction PCR classique, 3 phases se succèdent :

- La phase initiale pendant laquelle les produits amplifiés sont en quantité inférieure au bruit de fond.
- La phase exponentielle pendant laquelle les produit amplifiés dépassent le bruit de fond et sont doublés à chaque cycle.
- La phase de plateau pendant laquelle certains composés telles que la Taq polymérase sont épuisés ce qui stoppe l'amplification des produits.



Différentes phases de la réaction PCR et détermination du Ct (Douablin s.d.)

Lors de qPCR, la valeur de fluorescence est évaluée à chaque cycle afin de déterminer le Ct, c'est-à-dire le nombre de cycle nécessaire pour la valeur de fluorescence soit supérieure au bruit de fond. La **détermination du Ct** permet de quantifier la quantité de transcrits dans l'échantillon de départ puisqu'il est directement dépendant de cette quantité (Tagu, Jaubert-Possamai, Méreau 2018).

Figure 12: Principe de la méthode PCR quantitative

II. Matériel et méthodes

Le recrutement des chiens pour les analyses effectuées a été réalisé dans le cadre de la constitution d'une coprothèque pour transplantation de microbiote fécal. Ce travail s'inscrit donc dans le prolongement de celui du Dr Yann BOSSY dans le cadre de sa thèse « Constitution d'une coprothèque pour le traitement des entéropathies chroniques chez le chien par transplantation de microbiote fécal » (Bossy 2019). Pour cela, deux campagnes de recrutement ont eu lieu, une première de juin à septembre 2018 et une seconde en septembre 2020 ayant permis de recruter respectivement 6 et 10 chiens pour cette étude.

Pour les deux campagnes de recrutement, une affiche a été diffusée par mail et sur les réseaux sociaux au sein de l'école d'ONIRIS destinée aux étudiants, professeurs et membres du personnel. Un questionnaire sous la forme d'un Google form a permis de faire une présélection des chiens qui ont ensuite été présenté en consultation pour un examen clinique complet. Des critères menant à la non-inclusion du chien de l'étude ont été définis (tableau VI).

Critères de non-inclusion à l'étude
<ul style="list-style-type: none">○ Chien de moins de 12 mois○ Obésité○ Atopie canine / Hypersensibilités alimentaires○ Vaccination non à jour○ Protocole de vermifugation non à jour○ Présence de signes cliniques○ Historique de maladie gastro-intestinales○ Administration récente d'antibiotiques (< 6 mois)

Tableau VI : Critères de non-inclusion à l'étude

Lorsque le chien ne présentait aucun de ces critères de non inclusion, ses selles ont été prélevées lors de défécation spontanée pendant 3 jours. Les selles ont été saisies juste après la défécation naturelle et déposées dans un pot en plastique hermétique identifié. Aucun débris organique n'est introduit avec la selle. Le pot de prélèvement est ensuite placé au réfrigérateur à +4°C et envoyé par Chronopost au laboratoire dans la journée.

Elles ont ensuite été envoyées au laboratoire IDEXX. Les selles du jour 1 ont été soumises à un examen parasitologique et à un dépistage par PCR commercialisé sous le nom Canine Diarrhea Real PCR™ Panel (tableau VII) tandis que celles des jours 2 et 3 ont uniquement été soumises à un examen parasitologique. L'examen parasitologique consiste en une analyse coproscopique et un test ELISA de détection de l'antigène fécal de *Giardia* spp.

Canine Diarrhea Real PCR™ Panel
<ul style="list-style-type: none">○ <i>Giardia</i> spp.○ <i>Cryptosporidium</i> spp.○ <i>Salmonella</i> spp.○ Gène codant pour l'entérotoxine de <i>C. perfringens</i> (PCR quantitative)○ Gène codant pour la toxine alpha de <i>C. perfringens</i> (PCR quantitative)○ Coronavirus entérique canin○ Parvovirus canin 2 (CPV2)○ Paramyxovirus (maladie de Carré)

Tableau VII : Agents infectieux testés dans le Canine Diarrhea Real PCRTM Panel

Les analyses ont été réalisées par le laboratoire IDEXX. Les tests qPCR ont donc été réalisés selon la méthode utilisée par le laboratoire qui ne peut pas être détaillée pour des raisons de confidentialité.

III. Résultats

Les résultats des analyses du panel PCR (tableau VIII) ont été reçus sous la forme d'un document par chien avec les résultats des tests réalisés et accompagné de recommandations d'interprétation (Annexe 2).

Collecte	Chien	Toxine alpha	Entérotoxine
Première collecte	A1	1,21 .10 ⁵	Non détectable
	A2	4,11 .10 ⁶	Non détectable
	A3	4,36 .10 ⁶	2,43 .10 ⁶
	A4	9,85 .10 ⁷	1,87 .10 ⁶
	A5	2,25 .10 ⁵	Non détectable
	A6	3,38 .10 ⁴	Non détectable
Seconde collecte	B1	4,74 .10 ⁷	Non détectable
	B2	2,76 .10 ⁶	7,98 .10 ⁴
	B3	8,04 .10 ⁵	Non détectable
	B4	Non détectable	Non détectable
	B5	1,58 .10 ⁵	1,25 .10 ⁵
	B6	4,73 .10 ⁵	Non détectable
	B7	1,91 .10 ⁷	Non détectable
	B8	1,35 .10 ⁷	Non détectable
	B9	Non détectable	Non détectable
	B10	5,58 .10 ⁵	Non détectable

Tableau VIII : Résultats des tests qPCR ciblant les gènes cpa et cpe

A. Gène codant pour la toxine alpha

Sur les 16 chiens testés, 14 d'entre eux (88%) présentaient des quantités détectables de gène codant pour la CPA (figure 13). Le seuil de détection de la méthode utilisée est de 2500 copies par gramme de matière.

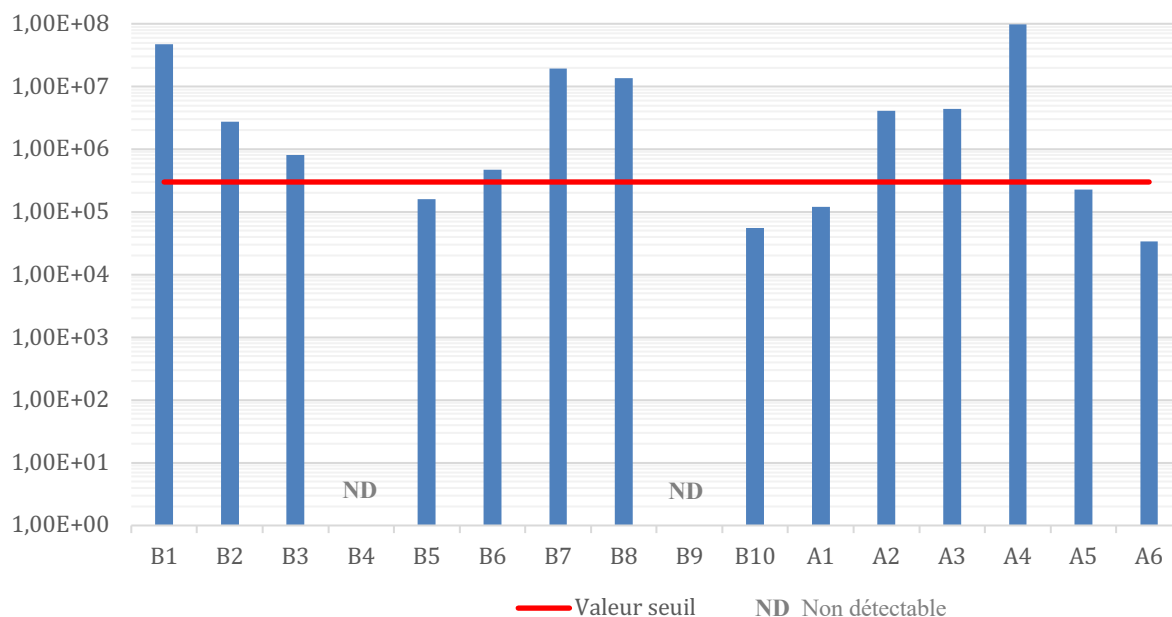


Figure 13 : Nombre de copies du gène *cpa* par gramme de fèces (échelle logarithmique)

Lors de diarrhée chez le chien, IDEXX recommande d'utiliser un seuil de 300 000 copies par gramme pour pouvoir impliquer la toxine alpha dans le tableau clinique. Ici, 9 des 16 chiens sains soit 56% d'entre eux ont un nombre de copies de *cpa* supérieur à ce seuil (figure 14).

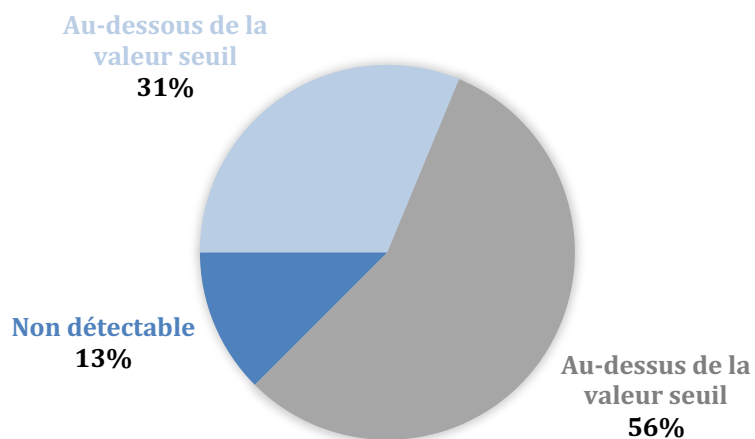


Figure 14 : Classement par catégorie des résultats des chiens sains à la PCR ciblant le gène *cpa*

De façon à pouvoir décrire de façon quantitative les résultats de la population étudiée, les résultats « non détectables » ont été remplacés par la moyenne de 0 et du seuil de détection de la méthode PCR. Ainsi, la moyenne géométrique du nombre de copies de *cpa* chez ce groupe de chiens sains est de 600 000 copies soit deux fois la valeur seuil proposée pour mettre en cause la toxine alpha dans l'apparition d'une diarrhée.

B. Gène codant pour l'entérotoxine

Sur les 16 chiens testés, 12 ne présentaient pas de quantité détectable de gène codant pour la CPE c'est-à-dire un résultat inférieur à 2500 copies du *cpe* par gramme (figure 15). Ainsi, le gène *cpe* n'a pas été détecté chez 75% des chiens cliniquement sains de cette étude.

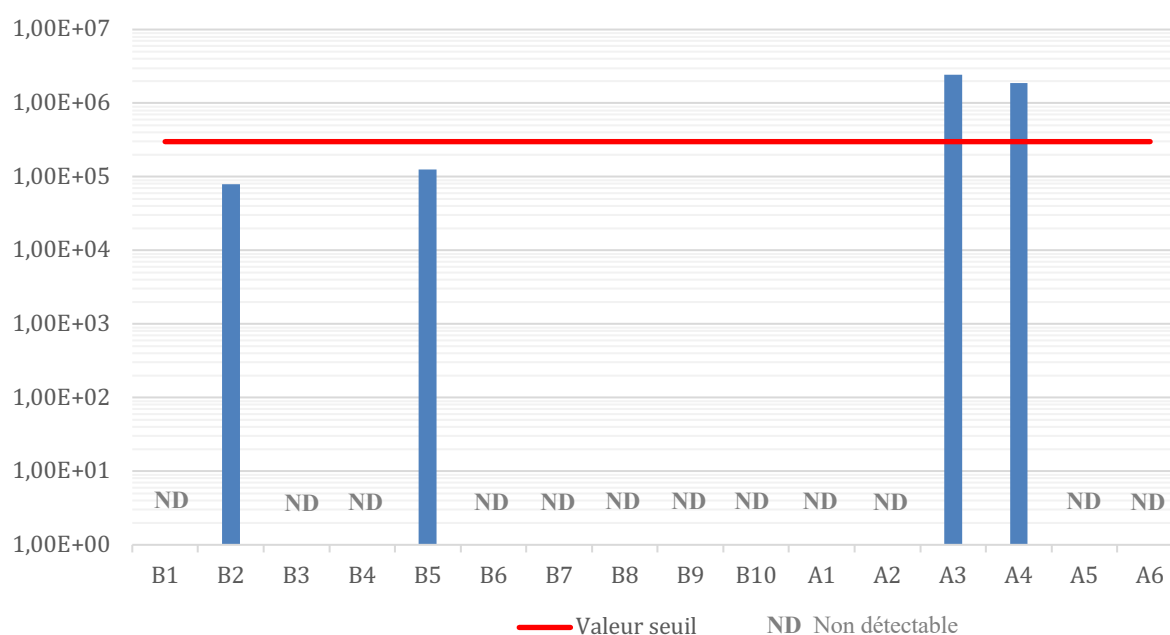


Figure 15 : Nombre de copies du gène *cpe* par gramme de fèces (échelle logarithmique)

De la même façon que pour la CPA, IDEXX recommande d'utiliser un seuil de 300 000 copies par gramme pour pouvoir impliquer la CPE dans le tableau clinique d'une diarrhée. Ici, 2 des 16 chiens sains soit 13% d'entre eux ont un nombre de copies de *cpe* supérieur à ce seuil (figure 16).

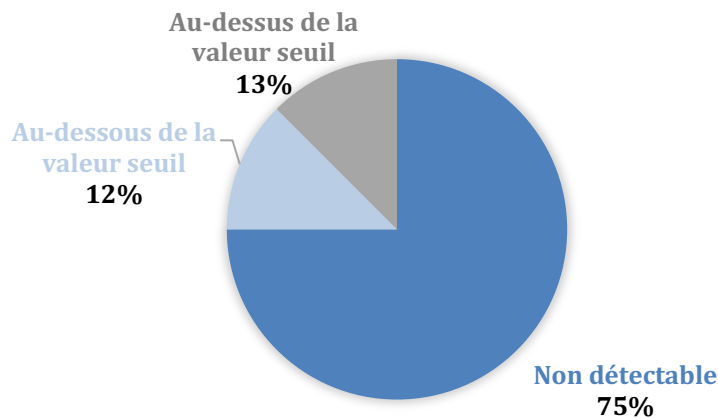


Figure 16 : Classement par catégorie des résultats des chiens sains à la PCR ciblant le gène *cpe*

C. Autres tests PCR et examens parasitologiques

Pour l'ensemble des autres tests PCR et examens parasitologiques réalisés, les résultats étaient négatifs en dehors des cas suivants :

- Le chien A2 était faiblement positif à la PCR cryptosporidiose.
- Le chien A3 était positif à la PCR cryptosporidiose et positif au test ELISA Giardia.
- Le chien A4 était positif à la PCR et au test ELISA Giardia.
- Le chien B4 était positif à la PCR Giardiose. Des ookystes d'*Isospora canis* et des œufs de *Toxocara spp.* ont été retrouvés à l'analyse coproscopique

IV. Discussion et perspectives

A. Méthode de détection

La PCR temps réel encore appelée PCR quantitative (qPCR) est une technique qui consiste en une amplification et une quantification simultanée d'une portion d'ADN ciblée permettant ainsi de quantifier le nombre de copies dans un échantillon donné. Cette méthode a l'avantage d'être très sensible et de quantifier la portion d'ADN ciblée sur une large plage de valeurs avec une bonne précision (Singh, Roy-Chowdhuri 2016).

Pour la suite de cette discussion, nous utiliserons les termes « spécificité » et « sensibilité » au sens clinique c'est-à-dire :

$$\text{Spécificité du test} = \frac{\text{Nombre de chiens négatifs au test et non atteints de diarrhée associée à } C. \text{ perfringens}}{\text{Nombre de chiens non atteints de diarrhée associée à } C. \text{ perfringens}}$$

$$\text{Sensibilité du test} = \frac{\text{Nombre de chiens positifs au test et atteint de diarrhée associée à } C. \text{ perfringens}}{\text{Nombre de chiens atteints de diarrhée associée à } C. \text{ perfringens}}$$

Dans notre cas, l'intérêt d'utiliser la méthode q-PCR est la possibilité de définir une valeur seuil pour interpréter les résultats plutôt que d'utiliser le seuil de détection comme critère de positivité comme en PCR classique. Le but d'utiliser une valeur seuil est d'améliorer l'utilité clinique d'un résultat positif (IDEXX 2012), c'est-à-dire d'augmenter la spécificité du test.

En ce qui concerne la détection du gène *cpa*, si l'on considère le chien positif lorsque le nombre de copies du gène est détectable alors la prévalence est 87% chez les chiens sains. Si l'on considère le chien positif lorsque le nombre de copies du gène est supérieur à la valeur seuil alors la prévalence est de 56% chez les chiens sains. Le fait d'utiliser un seuil permet donc de diminuer le nombre de chiens sains considérés positifs.

De manière similaire avec le gène *cpe*, en fixant une valeur seuil, le nombre d'animaux sains obtenant un résultat positif passe de 25% à 13%. La spécificité du test qPCR est donc améliorée par l'établissement d'une valeur seuil de positivité.

B. Gènes et toxines ciblés

Malgré le fait que la spécificité des tests soit améliorée par l'établissement d'une valeur seuil de positivité, elle reste faible. En effet, 56% des chiens sains sont positifs au test qPCR ciblant la *cpa* et 13% des chiens sains sont positifs au test qPCR ciblant la *cpe*. La spécificité semble donc très insuffisante dans le cas de la détection du *cpa* et plutôt basse dans le cas de la détection du *cpe*.

Dans leur poster présenté en 2012, IDEXX donne au tests qPCR ciblant les gènes *cpa* et *cpe* un rôle de marqueur diagnostique des diarrhées associées à *C. perfringens*. Cette affirmation s'appuie sur la différence de positivité à ces tests entre les chiens sains et les chiens diarrhéiques. En utilisant la valeur seuil de 300 000 copies pour le gène *cpa*, 47,3% des chiens diarrhéiques présentaient un résultat positif contre 4,2% des chiens sains. De la même façon en utilisant la valeur seuil de 300 000 copies pour le gène *cpe*, 19,6% des chiens diarrhéiques présentaient un résultat positif contre 2,1% des chiens sains.

Néanmoins, une problématique importante dans la composition des groupes doit être notée. En donnant à ces tests un rôle diagnostique pour les diarrhées associées à *C. perfringens*, les auteurs font implicitement l'hypothèse que les chiens diarrhéiques sont des chiens dont la diarrhée est associée à *C. perfringens*. Cependant, d'autres causes sont très probablement associées à la diarrhée de ces chiens pour au moins une partie d'entre eux.

Ainsi, deux hypothèses sont possibles pour expliquer le taux de positivité plus élevé chez les chiens diarrhéiques que chez les chiens sains :

- 1) Les chiens pour lesquels la diarrhée est associée à *C. perfringens* ont plus de chances que les autres d'obtenir un test positif et représentent une proportion importante des chiens diarrhéiques.
- 2) L'ensemble des chiens diarrhéiques présentent plus de chances que les chiens sains de présenter un test positif peu importe la cause de la diarrhée.

Dans le second cas où l'ensemble des chiens diarrhéiques présentent plus de chances à présenter un test positif, l'intérêt de tester le chien par qPCR ciblant les gènes *cpa* et *cpe* pour identifier le rôle de *C. perfringens* serait faible.

Par ailleurs, dans notre étude, 3 chiens étaient positifs au test PCR et/ou ELISA Giardia. Parmi eux, 2 des chiens (A3 et A4) ont obtenus des résultats supérieurs à la valeur seuil du nombre de copies des gènes *cpa* et *cpe*. Il s'agit d'ailleurs des 2 seuls chiens sains de l'étude à présenter un résultat positif au test qPCR ciblant le *cpe*. Pour expliquer ces données, il est possible que la présence de parasites *Giardia spp.* soit à l'origine d'une dysbiose entre autre caractérisée par une prolifération des *C. perfringens* expliquant les résultats des tests. Même si dans ce cas, les animaux étaient cliniquement sains, on peut se demander si des chiens atteints de giardiose pourraient présenter des résultats positifs aux tests qPCR ciblant les gènes *cpa* et *cpe*. Ces éléments sont à nouveau en faveur d'un manque de spécificité de ces tests pour mettre en cause *C. perfringens*.

Ce manque de spécificité peut s'expliquer par le fait que la CPA et la CPE ne sont pas des toxines impliquées de façon importante dans l'apparition de la maladie. Le gène *cpa* est retrouvé dans la très grande majorité des souches de *C. perfringens* ce qui explique le grand nombre d'animaux sains positifs et donc la spécificité très faible du test. D'après les dernières études, la CPE ne semble pas non plus jouer de rôle majeur dans le mécanisme physiopathologique des diarrhées associées à *C. perfringens* même si celle-ci est fréquemment isolée chez les souches responsables d'AHDS.

C. Échantillon prélevé

Les tests ici réalisés sont des tests qui portent sur des échantillons de fèces prélevés par défécation naturelle comme pour la très grande majorité des tests commercialisés à fin diagnostique lors de diarrhée. Il faut garder en tête que la diversité du microbiote varie de façon importante le long du tube digestif. La composition des selles est donc différente de celle du contenu intestinal en regard des lésions associées à *C. perfringens*. Il est possible que cela engendre une perte de prédictivité positive et négative du test par rapport à un prélèvement par endoscopie en regard des lésions. Cependant, pour des raisons pratiques évidentes, les selles restent tout de même le prélèvement le plus à-même d'être utilisé en clinique vétérinaire au vu de ses avantages pratiques supérieurs à ses inconvénients.

D. Recrutement

Dans cette étude, il existe un biais de sélection dans le recrutement des chiens. En effet, les chiens ont été recrutés pour la constitution d'une coprothèque avec de nombreux critères de non-inclusion. Certains critères sont indésirables pour notre étude tels que le critère « protocole de vermifugation à jour ». En effet, l'intérêt de cette étude est d'obtenir une certaine diversité de profil de chiens sains pour pouvoir comparer les résultats d'un chien diarrhéique quelconque qui n'est pas forcément à jour dans sa vermifugation. De la même façon, le fait d'exclure les animaux de moins de 12 mois rend difficile la comparaison avec des résultats d'un chiot diarrhéique.

Par ailleurs, les chiens ayant été recrutés pour la constitution d'une coprothèque, la nécessité de disponibilité et d'engagement du propriétaire ainsi que le nombre de critères de non-inclusion a rendu le recrutement difficile. Ainsi, le nombre de cas pour cette étude reste réduit ce ne permet pas d'obtenir des résultats significativement représentatifs de l'ensemble de la population étudiée mais plutôt un ordre de grandeur chez le chien sain.

E. Utilisation en pratique

Étant données la spécificité et la sensibilité insuffisante des tests qPCR ciblant les gènes *cpa* et *cpe* proposés aujourd'hui pour la détection de *C. perfringens*, l'utilisation de ces tests n'est pas recommandée à l'échelle individuelle puisque leur interprétation ne permet pas de conclure sur la nature de la maladie.

De plus, l'intérêt de diagnostiquer une maladie est majoritairement d'adapter la prise en charge du patient. À ce jour, pour les formes sans complications de diarrhée associée à *C. perfringens*, le traitement est uniquement symptomatique. Par ailleurs, le diagnostic en cas d'AHDS est un diagnostic d'exclusion qui permet d'écartier des causes qui nécessiteraient une prise en charge plus spécifique. Mettre en cause *C. perfringens* dans l'apparition de la diarrhée a donc un intérêt réduit pour la prise en charge de l'animal.

Cependant, l'obtention d'une méthode de diagnostic fiable fait encore l'objet de recherche. Celle-ci pourrait permettre de simplifier le diagnostic et la prise en charge de la maladie puisque le diagnostic d'exclusion est généralement long et fastidieux pour le vétérinaire et coûteux pour le propriétaire. Par ailleurs, la définition d'une méthode de référence serait d'un grand intérêt pour le secteur de la recherche. Une telle avancée permettrait de faciliter les études sur la prévention, les facteurs de risques ou encore la prise en charge des diarrhées associées à *C. perfringens*.

F. Perspectives

Dans le but d'obtenir un test fiable pour mettre en cause *C. perfringens* lors de diarrhée, la recherche s'orientera probablement vers des tests ciblant une toxine impliquée de façon majeure dans l'apparition de la maladie. La toxine NetF semble aujourd'hui être la meilleure candidate pour mettre en cause *C. perfringens*. L'hypothèse que l'apparition de diarrhée hémorragique lors d'AHDS fait suite à une prolifération de *C. perfringens* NetF positifs est encore à démontrer mais la toxine semble assez spécifique de la maladie. Des recherches sont nécessaires pour permettre d'identifier et probablement de caractériser le rôle de cette toxine dans le mécanisme physiopathologique menant aux signes cliniques.

En comparaison aux techniques immunologiques et à la méthode PCR classique, la PCR quantitative semble faire preuve d'une meilleure spécificité et sensibilité dans le cas des tests ciblant la CPA, la CPE ou leurs gènes. Le problème de ces tests qPCR ne semble pas résider dans la technique utilisée mais dans le gène recherché trop peu spécifique de ces diarrhées. Il serait donc intéressant de tester la différence de positivité par qPCR ciblant le gène codant pour NetF, entre des chiens sains et des chiens atteints d'AHDS. L'intérêt de comparer d'utiliser des chiens présentant un AHDS plutôt que des chiens diarrhéiques, est d'obtenir une interprétation plus fiable de l'étude puisque l'implication de *C. perfringens* est couramment admise dans l'apparition d'AHDS. L'intégration à l'étude d'un groupe de chiens diarrhéiques pour des causes autres permettrait aussi de préciser la spécificité du test. Il est à noter que le test qPCR doit être réalisé dès le jour de la présentation de l'animal puisque le taux de détection de *netF* décroît rapidement après l'apparition de la maladie. Un prélèvement plus tardif conduirait alors à une augmentation des cas faux négatifs et donc de la sensibilité.

CONCLUSION

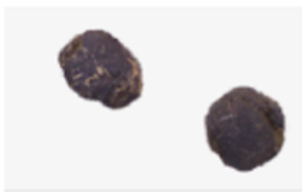






Afin de lutter contre les infections du tube digestif, le chien présente de nombreux mécanismes de défense, de nature immunitaire ou non. Cependant, ceux-ci sont parfois insuffisants, une diarrhée peut alors se déclencher par plusieurs mécanismes physiopathologiques agissant simultanément. Les diarrhées associées à *C. perfringens* chez le chien sont primitivement dues à des lésions pariétales intestinales. Si le mécanisme physiopathologique chez le chien n'est pas totalement élucidé, les nombreuses toxines produites par la clostridie telles que la toxine alpha et l'entérotoxine, semblent vraisemblablement impliquées comme c'est le cas chez diverses espèces animales. Ces diarrhées associées à *C. perfringens* chez le chien peuvent revêtir plusieurs formes cliniques d'intensité plus ou moins importante. Si certains animaux présentent uniquement une diarrhée auto-limitante de courte durée, d'autres animaux présentent des signes cliniques plus graves. De nombreuses études démontrent le rôle de cette bactérie dans l'apparition d'un syndrome de diarrhée hémorragique aiguë (AHDS). Il se manifeste généralement par des vomissements hémorragiques suivis d'une diarrhée hémorragique importante pouvant causer une déshydratation sévère. Le chien nécessite alors une hospitalisation et un traitement symptomatique critique qui permet dans la grande majorité des cas d'obtenir une résolution des symptômes majeurs sous 48h.

C. perfringens étant très communément isolé dans le microbiote du chien sain, sa mise en cause dans la maladie s'avère difficile. A ce jour, il n'existe pas de méthode de référence pour diagnostiquer les diarrhées associées à *C. perfringens*. Les méthodes immunologiques de recherche des toxines à *C. perfringens* se révèlent peu utiles du fait de leur manque de spécificité importante. En effet, une partie importante des animaux sains présentent des résultats positifs à ces tests. La méthode PCR classique a aussi fait l'objet de recherche pour les gènes codant pour la toxine alpha et pour l'entérotoxine mais son manque de spécificité, quoique supérieure aux tests immunologiques, ne permet pas une interprétation fiable. En cas de corrélation importante entre la production de toxine et l'apparition de la diarrhée, l'utilisation d'un test qPCR et d'une valeur-seuil pourrait théoriquement permettre d'augmenter la spécificité du test. Chez les chiens sains testés dans cette étude, une grande partie d'entre eux obtiennent des résultats supérieurs à la valeur-seuil pour le gène codant de la toxine alpha. Une partie non négligeable d'entre eux obtient aussi des résultats supérieurs à la

valeur-seuil pour le gène codant de l'entérotoxine. Même si ces données sont en faveur d'une meilleure spécificité des tests qPCR particulièrement pour le gène codant pour l'entérotoxine, leur valeur diagnostique à l'échelle individuelle reste limitée. Le développement d'autres tests diagnostiques doivent être encouragés : des tests qPCR ciblant des toxines jouant un rôle plus important dans la pathogénie des diarrhées associées à *C. perfringens* telles que la toxine Net F peuvent être envisagés.

ANNEXES

Annexe 1 : échelle de score fécal (échelle PURINA ProPlan)

TYPE	CARACTERISTIQUES	EXEMPLE
1	<ul style="list-style-type: none"> - Très dures et sèches - Souvent expulsées sous forme de boulettes individuelles - Difficiles à expulser du corps - Ne laissent pas de résidus sur le sol au ramassage 	
2	<ul style="list-style-type: none"> - Fermes, mais malléables - Fragmentation visible - Peu ou pas de résidus visibles sur le sol au ramassage 	
3	<ul style="list-style-type: none"> - Forme cylindrique, surface humide - Peu ou pas de fragmentation visible - Laissent des résidus sur le sol, mais gardent leur forme au ramassage 	
4	<ul style="list-style-type: none"> - Très humides et molles - Forme cylindrique - Laissent des résidus sur le sol et se déforment au ramassage 	
5	<ul style="list-style-type: none"> - Très humides, de forme distincte - Se présentent plutôt en amas que sous forme cylindrique - Laissent des résidus sur le sol et se déforment au ramassage 	
6	<ul style="list-style-type: none"> - Texturées, mais pas de forme définie - Se présentent sous forme d'amas ou d'éclaboussures - Laissent des résidus sur le sol au ramassage 	
7	<ul style="list-style-type: none"> - Liquides - Aucune texture - Se présentent sous forme de flaques 	

Annexe 2 : Exemple de feuille de résultat de l'examen parasitologique et du bilan diarrhée RealPCR



Laboratoire IDEXX
84 rue Charles Michels
93200 Saint Denis

☎ 01.73.431.333
☎ 0810 433 990

✉ laboratoire@idexx.com
🌐 www.idexx.fr

Code client : MICROB	Propriétaire : BANQUE	Numéro d'analyse : XXX
	Patient : XXX	Date : 09.09.2020
Dr Hernandez MICROBIOTE Canin- INRA,MICALIS,Moez Rhimi 78352 JOUY EN JOSAS	Espèce : CHIEN Race : Sexe : Age : 00 A	Echantillon(s) : Selles

Votre compte rendu d'analyses:  **XXX**

Résultats définitifs

Analyse	Résultat	Intervalle de référence	
Echantillon: Selles			
Examen parasitologique:			1)
Procédé de flottation	négatif		
Giardia (ELISA)	négatif		2)
Bilan Diarrhée RealPCR (Chien)			
Parvovirus Canin type 2 (CPV2) (real-time PCR)	négatif		3)
Coronavirus Entérique Canin (ARN) (real-time PCR)	négatif		4),5)
Maladie de carré (ARN) (real-time PCR)	négatif		
Clostridium perfringens Gène de l'alpha-toxine	4.74E7	< 300 000	/ g fèces
	PCR quantitative (ADN)		6),7)
Clostridium perfringens Gène de l'entérotoxine	non détectable	< 300 000	/ g fèces
	PCR quantitative (ADN)		8),9)
Cryptosporidium sp. (ADN) (real-time PCR)	négatif		
Salmonella sp. (ADN) (real-time PCR)	négatif		
Giardia sp. (ADN) (real-time PCR)	négatif		

Commentaires

1)

A l'examen macroscopique il est possible que certains parasites ou larves n'aient pas été mis en évidence (par exemple proglottis de ténias). Au cas où vous auriez trouvé certaines structures suspectes, merci de le préciser sur le bon de commande.

2)

Attention : pour des raisons d'hygiène, aucune analyse supplémentaire ne peut être effectuée après un délai de 48h.

Propriétaire : BANQUE MICROBIOTE

Patient : XXX

Numéro d'analyse : XXX

3)

Pas de mise en évidence d'ADN de Parvovirus de type 2.
Cela suggère que la diarrhée de ce chien n'incombe à priori pas au Parvovirus de type 2. Toutefois, de rares cas de résultats faussement négatifs par PCR restent possibles lorsque la concentration du prélèvement en agent pathogène est inférieure au seuil de détection de la méthode, ou dans les rares cas où d'autres types de parvovirus seraient incriminés.

4)

Ce test est spécifique du coronavirus entérique canin et ne détecte pas le SARS-CoV-2 qui est l'agent causal du COVID-19. Le coronavirus entérique canin est spécifique de l'espèce canine et n'affecte pas les humains.

5)

Pas de mise en évidence d'ARN de Coronavirus Entérique Canin

Cela signifie qu'aucune particule virale n'a été détectée dans le prélèvement envoyé. La responsabilité de la diarrhée de ce chien ne peut donc, à priori, pas incomber au Coronavirus Entérique Canin.
Il existe de rares cas de résultats faussement négatifs par le méthode PCR, lorsque la concentration du prélèvement en agent pathogène est inférieure au seuil de détection de la méthode. Un faible pourcentage d'animaux cliniquement malades présentent ainsi des résultats négatifs.

6)

Mise en évidence d'ADN de l'alpha-toxine de *Clostridium perfringens*. Chez les animaux pour lesquels la nombre de copies du gène CPA détectés dans l'échantillon est supérieur à 300 000(=3E5)copies/g de fécès, la toxine contribue vraisemblablement au tableau clinique diarrhéique. En revanche, dans le cas où le nombre de copies est inférieur à 300 000 (=3E5) /g de fécès, l'implication de la toxine est moins probable.

7)

Attention, la concentration en ADN est donnée en puissance de 10.
Par exemple : 573 = 5,73E2
15600 = 1,56E4

8)

Mise en évidence d'ADN de l'alpha-toxine de *Clostridium perfringens*. Chez les animaux pour lesquels la nombre de copies du gène CPA détectés dans l'échantillon est supérieur à 300 000(=3E5)copies/g de fécès, la toxine contribue vraisemblablement au tableau clinique diarrhéique. En revanche, dans le cas où le nombre de copies est inférieur à 300 000 (=3E5) /g de fécès, l'implication de la toxine est moins probable.

9)

Attention, la concentration en ADN est donnée en puissance de 10.
Par exemple : 573 = 5,73E2
15600 = 1,56E4

Validé par:

Dr. XXX

Les prélèvements sont conservés 7 jours (4 jours pour les analyses bactériologiques et 2 jours pour les selles) à compter de la date de réception. Veuillez nous contacter dans ce délai pour un ajout d'analyse.



Toxin Quantification of *Clostridium perfringens* is a Predictor for Diarrhea in Dogs and Cats

C.M. Leutenegger¹, S.L. Marks², J. Robertson¹,
 1. IDEXX Laboratories, Inc., Sacramento CA, 2. School of Veterinary Medicine, University of California, Davis

INTRODUCTION

Toxigenic *Clostridium perfringens* strains are believed to be important contributors to gastroenteral disease, and acute hemorrhagic diarrhea has been well documented in association with infection. Members of the species *C. perfringens* can be subtyped into five toxin types (A, B, C, D and E) based on the production of four major toxins: alpha, beta, epsilon and iota. Alpha toxin (A toxin, CPA), the main lethal toxin of *C. perfringens*, is a multifunctional phospholipase, produced in varying amounts by almost all *C. perfringens* isolates. It causes hydrolysis of membrane phospholipids in different cells, resulting in lysis. The beta toxin (B toxin, CPB) is a highly trypsin-sensitive protein. It causes mucosal necrosis resulting in central nervous system observed in domestic animals. Epsilon toxin (E toxin) is a potent toxin responsible for lethal enterotoxaemia in livestock. The iota toxin (I toxin) consists of two proteins, one active component (Ia) and a binding protein (Ib). The Iota toxin is known to increase vascular permeability and is demoneurotic and lethal to mice at higher doses. Along with the major toxins, enterotoxin (CPE) and beta 2 toxin (B2-toxin, CPB2), play the major role in several severe diseases. The beta 2 toxin was identified recently and has been associated with enteric diseases in domestic animals, especially piglets and horses. Fisher et al. suggested a synergistic role of beta 2 along with enterotoxin of *C. perfringens* in the etiology of antibiotic associated diarrhea (AAD) and sporadic diarrhea (SD). Enterotoxin (CPE) is the most studied of the *C. perfringens* toxins. It interacts with epithelial cell tight junction proteins, causing diarrhea and intestinal cramping due to leakage of water and ions.

Two toxins, the *C. perfringens* alpha toxin (CPA) and *C. perfringens* enterotoxin (CPE) are most frequently detected in dogs and cats, although questions have been raised regarding their toxicogenic potential when detected in healthy animals.

OBJECTIVE

The objective of this work was to evaluate the relationship of toxin quantification with disease severity in diarrheic and apparently healthy dogs and cats.

PCR testing is a service performed pursuant to an agreement with Roche Molecular Systems, Inc.
 © 2012 IDEXX Laboratories, Inc. All rights reserved.

STUDY DESIGN AND MATERIALS & METHODS

A total of 181 healthy and diarrheic dogs and cats were selected based on fecal scoring and analysis of clinical history. The quantity of DNA and mRNA from genes for both CPA (alpha toxin gene) and CPE (cpa) were measured with commercial real-time PCR tests (IDEXX Laboratories, Inc.). The presence or absence of CPE was determined using a commercially available enterotoxin ELISA (TechLab, Inc).

RESULTS

A total of 181 fecal specimens were evaluated, including, 48 from healthy dogs, 39 from healthy cats and 46 from diarrheic dogs and 48 from diarrheic cats, respectively. Presence of diarrhea was verified by using a questionnaire completed by the referring veterinarian. Animals with antibiotic therapy prior to PCR testing were excluded from the study. By comparing the quantity of toxin genes in the feces from dogs and cats in both diseased and healthy groups it was found that toxin gene numbers correlated with disease state. Using a cutoff value determined by real-time PCR for toxin gene DNA quantification, the alpha toxin and cpe genes were found to be significantly associated with diarrhea. The alpha toxin gene was detected in 47.8% of diarrheic dogs vs. 4.2% of healthy dogs (OR=25.2, p<0.0001), whereas the alpha toxin gene was detected in 37.5% of diarrheic cats vs. 12.8% of healthy cats (OR 4.08, p=0.01). Cpe gene was detected in 19.5% of diarrheic dogs vs. 2.1% of healthy dogs (OR=11.43, p=0.006), whereas cpe was detected in 8.3% of diarrheic cats vs. none of healthy cats (OR=7.99, p=0.1). CPE protein was detected via ELISA in 21.7% of diarrheic dogs vs 10.4% of healthy dogs (OR=2.5, p=0.16), whereas CPE was detected in 8.3% of diarrheic cats vs. 7.7% of healthy cats (OR=1.1, p=1). Quantification of DNA from both toxin genes in diarrheic and healthy animals was significantly different in dogs and cats (Mann-Whitney test); alpha toxin dogs: p<0.001; alpha toxin cats: p=0.0098; CPE dogs: p<0.02; CPE cats: p<0.0001. All fecal specimens positive for toxin gene DNA were also positive for toxin gene mRNA indicating active transcription of the gene. This indicates that both the alpha toxin and cpe genes are actively transcribing and synthesizing toxin proteins in toxigenic *C. perfringens* strains. The Pearson correlation between PCR and ELISA indicated a weak post-the value of 0.59.

SUMMARY & CONCLUSIONS

In conclusion, we found that quantitative toxin gene analysis by real-time PCR for alpha toxin and CPE correlates with presence of diarrhea and has the potential to be used as a diagnostic marker.

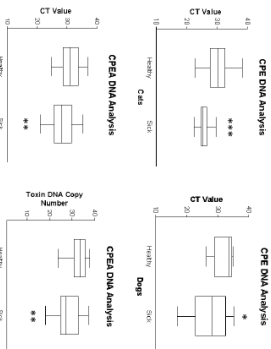


Figure 1: CPE toxin gene amount in healthy vs sick cats (A) and dogs (B); C. perfringens alpha toxin gene amount in healthy vs sick cats (C) and dogs (D). In all cases, toxin gene amount is correlated to presence or absence of GI disease.

Table 1: Frequency of toxin detection in sick cats with A/E or viral/B) a quantitative cpe value. Disease association is correlated to quantity of toxin gene detected.

A. With Cutoff	Sick	Healthy
C. perfringens alpha toxin	27/39	4/29
C. perfringens enterotoxin	15/39	2/29
C. perfringens beta 2 toxin	0/39	0/29

B. Without Cutoff	Sick	Healthy
C. perfringens alpha toxin	75.2%	54.2%
C. perfringens enterotoxin	37.5%	6.9%
C. perfringens beta 2 toxin	0.0%	0.0%

Table 2: Frequency of toxin detection in sick cats with A/E or viral/B) a quantitative cpe value. Disease association is correlated to quantity of toxin gene detected.

A. With Cutoff	Sick	Healthy
C. perfringens alpha toxin	37/39	12/29
C. perfringens enterotoxin	0/39	0/29
C. perfringens beta 2 toxin	0/39	0/29

B. Without Cutoff	Sick	Healthy
C. perfringens alpha toxin	77.1%	54.2%
C. perfringens enterotoxin	0.0%	0.0%
C. perfringens beta 2 toxin	0.0%	0.0%

REFERENCES

- Matsudaira K, Makiyama K, Kamitani S, Fukui M, Hayashi A, Yoshida H, Abe H, Kozuka Y, Sugita K, Kouchi S, Kurekawa H, Horikawa Y. Crystal structure of Clostridium perfringens enterotoxin displays features of beta-pore-forming toxins. J Biol Chem. 2008;283(12):8123-32.
- Schickel U, Terenzi U, Mutschler H. Significance of beta 2-toxin gene. Clostridium perfringens infections in animals and their predisposing factors—a review. Vet Med J Small Anim Clin. 2008;103(10):423-6.
- Unger J, M.V. Hepler, B.C. Long, B.M. Jayaram. Real-time multiplex PCR assay for rapid detection and typing of Clostridium perfringens toxin producing strains in feces of dairy cattle. Molecular and Cellular Probes, Volume 22, Issue 4, April 2008, Pages 263-267.
- Smolinski JE 3rd, Fisher DJ, Samuel S, Chalmers G, McClure BA. The enteric toxins of Clostridium perfringens. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 2004;152:183-204. Epub 2004 Dec. Review. (Smolinski describes the toxin gene distribution) (Table 2) indicating CPE alpha (or A) is mostly associated with "veterinary diarrheas". Dogs can have also E toxin)
- Patel DJ, Maysara K, Harrison B, Adams S, Sarker PK, McClure BA. Association of beta 2 toxin production with Clostridium perfringens type A human gastrointestinal disease isolates carrying a plasmid enterotoxin gene. Mol Microbiol. 2002;50:79-92.

BIBLIOGRAPHIE

ALLEN-DEAL, A. et LEWIS, D., 2021. Prevalence of *Clostridium perfringens* alpha toxin and enterotoxin in the faeces of dogs with acute haemorrhagic diarrhoea syndrome. *The Journal of Small Animal Practice*. mai 2021. Vol. 62, n° 5, pp. 373-378. DOI 10.1111/jsap.13281.

ANDERSON, A., HARTMANN, K., LEUTENEGGER, C. M., PROKSCH, A. L., MUELLER, R. S. et UNTERER, S., 2017. Role of canine circovirus in dogs with acute haemorrhagic diarrhoea. *The Veterinary Record*. 3 juin 2017. Vol. 180, n° 22, pp. 542. DOI 10.1136/vr.103926.

ASHA, N. J., TOMPKINS, D. et WILCOX, M. H., 2006. Comparative analysis of prevalence, risk factors, and molecular epidemiology of antibiotic-associated diarrhea due to *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*. août 2006. Vol. 44, n° 8, pp. 2785-2791. DOI 10.1128/JCM.00165-06.

BACH, Jean-François, 1999. *Immunologie*. Paris, France : FLAMMARION MEDECINE-SCIENCES. ISBN 2-257-13590-3.

BACHA, William J. et BACHA, Linda M., 2000. *Color atlas of veterinary histology*. Baltimore, Maryland : J.B. LIPPINCOTT COMPANY. ISBN 0-683-30618-9.

BANWELL, J. G., 1990. Pathophysiology of diarrheal disorders. *Reviews of Infectious Diseases*. février 1990. Vol. 12 Suppl 1, pp. S30-35. DOI 10.1093/clinids/12.supplement_1.s30.

BARTLETT, M. L., WALKER, H. W. et ZIPRIN, R., 1972. Use of dogs as an assay for *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Applied Microbiology*. janvier 1972. Vol. 23, n° 1, pp. 196-197. DOI 10.1128/am.23.1.196-197.1972.

BENGMARK, S. et JEPSSON, B., 1995. Gastrointestinal surface protection and mucosa reconditioning. *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition*. octobre 1995. Vol. 19, n° 5, pp. 410-415. DOI 10.1177/0148607195019005410.

BENNO, Y., NAKAO, H., UCHIDA, K. et MITSUOKA, T., 1992. Impact of the advances in age on the gastrointestinal microflora of beagle dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science*. août 1992. Vol. 54, n° 4, pp. 703-706. DOI 10.1292/jvms.54.703.

BOSSY, Yann, 2019. *Constitution d'une coprothèque pour le traitement des entéropathies chroniques chez le chien par transplantation de microbiote fécal*. Oniris - Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation, Nantes Atlantique.

BURROWS, C. F., 1977. Canine hemorrhagic gastroenteritis [Diseases of unknown etiology, dogs]. *Journal - American Animal Hospital Association (USA)* [en ligne]. 1977. [Consulté le 3 avril 2022]. Disponible à l'adresse : https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Canine+h hemorrhagic+gastroenteritis+%5BDiseases+of+unknown+etiology%2C+dogs%5D&author=Burrows%2C+C.F.&publication_year=1977

BUSCH, K., SUCHODOLSKI, J. S., KÜHNER, K. A., MINAMOTO, Y., STEINER, J. M.,

MUELLER, R. S., HARTMANN, K. et UNTERER, S., 2015. Clostridium perfringens enterotoxin and Clostridium difficile toxin A/B do not play a role in acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dogs. *The Veterinary Record*. 7 mars 2015. Vol. 176, n° 10, pp. 253. DOI 10.1136/vr.102738.

CAUTEREN, D. van, STRAT, Y. le, SOMMEN, C., BRUYAND, M., TOURDJMAN, M., JOURDAN-DA SILVA, N., COUTURIER, E., FOURNET, N., VALK, H. de et DESENCLOS, J. C., 2018. Estimates of food-related morbidity and mortality in metropolitan France, 2008-2013. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire*. 2018. N° No.1, pp. 2-10.

CAVE, Nicholas J., MARKS, Stanley L., KASS, Philip H., MELLI, Ann C. et BROPHY, Melissa A., 2002. Evaluation of a routine diagnostic fecal panel for dogs with diarrhea. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1 juillet 2002. Vol. 221, n° 1, pp. 52-59. DOI 10.2460/javma.2002.221.52.

CHAITMAN, Jennifer et GASCHEN, Frédéric, 2021. Fecal Microbiota Transplantation in Dogs. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*. janvier 2021. Vol. 51, n° 1, pp. 219-233. DOI 10.1016/j.cvsm.2020.09.012.

CHAITMAN, Jennifer, ZIESE, Anna-Lena, PILLA, Rachel, MINAMOTO, Yasushi, BLAKE, Amanda B., GUARD, Blake C., ISAIAH, Anitah, LIDBURY, Jonathan A., STEINER, Jörg M., UNTERER, Stefan et SUCHODOLSKI, Jan S., 2020. Fecal Microbial and Metabolic Profiles in Dogs With Acute Diarrhea Receiving Either Fecal Microbiota Transplantation or Oral Metronidazole. *Frontiers in Veterinary Science*. 2020. Vol. 7, pp. 192. DOI 10.3389/fvets.2020.00192.

CHAN, Daniel L. et FREEMAN, Lisa M., 2006. Nutrition in critical illness. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*. novembre 2006. Vol. 36, n° 6, pp. 1225-1241, v- vi. DOI 10.1016/j.cvsm.2006.08.009.

CHASE, Kevin, JONES, Paul, MARTIN, Alan, OSTRANDER, Elaine A. et LARK, Karl G., 2009. Genetic mapping of fixed phenotypes: disease frequency as a breed characteristic. *The Journal of Heredity*. août 2009. Vol. 100 Suppl 1, pp. S37-41. DOI 10.1093/jhered/esp011.

CHEVAILLER, Alain, FOURNEL, Sylvie, GUBLER, Brigitte, LELIÈVRE, Jean-Daniel, SEILLÈS, Estelle, VITTE, Joana, CARCELAIN, Guislaine et FRANÇAISE, Association des collèges des enseignants d'immunologie des universités de langue, 2018. *Immunologie fondamentale et immunopathologie : tissu lymphoïde et sanguin, immunopathologie et immuno-intervention*. Issy-les-Moulineaux, France : Elsevier Masson. ISBN 978-2-294-75658-0.

COSTELLOE, Céire, METCALFE, Chris, LOVERING, Andrew, MANT, David et HAY, Alastair D., 2010. Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed.)*. 18 mai 2010. Vol. 340, pp. c2096. DOI 10.1136/bmj.c2096.

DAVIS, C. P., CLEVEN, D., BALISH, E. et YALE, C. E., 1977. Bacterial association in the gastrointestinal tract of beagle dogs. *Applied and Environmental Microbiology*. août 1977. Vol. 34, n° 2, pp. 194-206. DOI 10.1128/aem.34.2.194-206.1977.

DECARO, N., BUONAVOGLIA, C. et BARRS, V. R., 2020. Canine parvovirus vaccination

and immunisation failures: Are we far from disease eradication? *Veterinary Microbiology*. 1 août 2020. Vol. 247, pp. 108760. DOI 10.1016/j.vetmic.2020.108760.

DECARO, Nicola et BUONAVOGLIA, Canio, 2012. Canine parvovirus--a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Veterinary Microbiology*. 24 février 2012. Vol. 155, n° 1, pp. 1-12. DOI 10.1016/j.vetmic.2011.09.007.

DEITCH, E. A., 1993. Nutrition and the gut mucosal barrier. *Current Opinion in General Surgery*. 1993. pp. 85-91.

DESARIO, Costantina, DECARO, Nicola, CAMPOLO, Marco, CAVALLI, Alessandra, CIRONE, Francesco, ELIA, Gabriella, MARTELLA, Vito, LORUSSO, Eleonora, CAMERO, Michele et BUONAVOGLIA, Canio, 2005. Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus? *Journal of Virological Methods*. juin 2005. Vol. 126, n° 1-2, pp. 179-185. DOI 10.1016/j.jviromet.2005.02.006.

DOUABLIN, Alexandre, s.d. qPCR - RTqPCR. *Biomnigene* [en ligne]. s.d. [Consulté le 8 juin 2022]. Disponible à l'adresse : <https://www.biomnigene.fr/fr/nos-solutions/qpcr.html>

DOWGIER, Giulia, LORUSSO, Eleonora, DECARO, Nicola, DESARIO, Costantina, MARI, Viviana, LUCENTE, Maria Stella, LANAVE, Gianvito, BUONAVOGLIA, Canio et ELIA, Gabriella, 2017. A molecular survey for selected viral enteropathogens revealed a limited role of Canine circovirus in the development of canine acute gastroenteritis. *Veterinary Microbiology*. mai 2017. Vol. 204, pp. 54-58. DOI 10.1016/j.vetmic.2017.04.007.

DUPONT, Nana, JESSEN, Lisbeth Rem, MOBERG, Frida, ZYSKIND, Nathali, LORENTZEN, Camilla et BJØRNVAD, Charlotte Reinhard, 2021. A retrospective study of 237 dogs hospitalized with suspected acute hemorrhagic diarrhea syndrome: Disease severity, treatment, and outcome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. mars 2021. Vol. 35, n° 2, pp. 867-877. DOI 10.1111/jvim.16084.

EHERER, Andreas J. et FORDTRAN, John S., 1992. Fecal osmotic gap and pH in experimental diarrhea of various causes. *Gastroenterology*. 1 août 1992. Vol. 103, n° 2, pp. 545-551. DOI 10.1016/0016-5085(92)90845-P.

ELWOOD, C. M. et GARDEN, O. A., 1999. Gastrointestinal immunity in health and disease. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*. mars 1999. Vol. 29, n° 2, pp. 471-500, vi- vii.

ELWOOD, C. M., HAMBLIN, A. S. et BATT, R. M., 1997. Quantitative and qualitative immunohistochemistry of T cell subsets and MHC class II expression in the canine small intestine. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 19 septembre 1997. Vol. 58, n° 3-4, pp. 195-207. DOI 10.1016/s0165-2427(97)00037-8.

ETTINGER, Stephen J., FELDMAN, Edward C. et CÔTÉ, Etienne, 2017. *Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and the cat*. Eighth edition. St. Louis, Missouri : Elsevier. ISBN 978-0-323-31211-0. SF991 .T48 2017

FLINT, Harry J., SCOTT, Karen P., LOUIS, Petra et DUNCAN, Sylvia H., 2012. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*.

octobre 2012. Vol. 9, n° 10, pp. 577-589. DOI 10.1038/nrgastro.2012.156.

FONTY, Gérard et CHAUCHEYRAS-DURAND, Frédérique, 2007. *Les écosystèmes digestifs*. Paris, France : LAVOISIER. ISBN 978-2-7430-0989-2.

FREEDMAN, John C., SHRESTHA, Archana et MCCLANE, Bruce A., 2016. Clostridium perfringens Enterotoxin: Action, Genetics, and Translational Applications. *Toxins*. 16 mars 2016. Vol. 8, n° 3, pp. E73. DOI 10.3390/toxins8030073.

FREICHE, Valérie et HERNÁNDEZ, Juan, 2011. *Gastro-entérologie canine et féline: de la clinique à la thérapeutique* [en ligne]. Issy-les-Moulineaux [France : Elsevier/Masson. [Consulté le 24 janvier 2021]. ISBN 978-2-9941001-5-7. Disponible à l'adresse : <http://site.ebrary.com/id/10537562>

GABORIAU-ROUTHIAU, Valérie et CERF-BENSUSSAN, Nadine, 2016. [Gut microbiota and development of the immune system]. *Medecine Sciences: M/S*. novembre 2016. Vol. 32, n° 11, pp. 961-967. DOI 10.1051/medsci/20163211011.

GAL, Arnon, BARKO, Patrick C., BIGGS, Patrick J., GEDYE, Kristene R., MIDWINTER, Anne C., WILLIAMS, David A., BURCHELL, Richard K. et PAZZI, Paolo, 2021. One dog's waste is another dog's wealth: A pilot study of fecal microbiota transplantation in dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome. *PloS One*. 2021. Vol. 16, n° 4, pp. e0250344. DOI 10.1371/journal.pone.0250344.

GAUDIER, Estelle et HOEBLER, Christine, 2006. [Physiological role of mucins in the colonic barrier integrity]. *Gastroenterologie Clinique Et Biologique*. septembre 2006. Vol. 30, n° 8-9, pp. 965-974. DOI 10.1016/s0399-8320(06)73358-9.

GILLES, R., 2006. *Physiologie animale*. DE BOECK & LARCIER S.A. ISBN 978-2-8041-4893-5.

GILLESPIE, Íde, ROSENSTEIN, Patricia G. et HUGHES, Dez, 2017. Update: Clinical Use of Plasma Lactate. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*. mars 2017. Vol. 47, n° 2, pp. 325-342. DOI 10.1016/j.cvsm.2016.10.011.

GOHARI, Iman Mehdizadeh, ARROYO, Luis, MACINNES, Janet I., TIMONEY, John F., PARREIRA, Valeria R. et PRESCOTT, John F., 2014. Characterization of Clostridium perfringens in the feces of adult horses and foals with acute enterocolitis. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*. janvier 2014. Vol. 78, n° 1, pp. 1-7.

GOHARI, Iman Mehdizadeh, PARREIRA, Valeria R., NOWELL, Victoria J., NICHOLSON, Vivian M., OLIPHANT, Kaitlyn et PRESCOTT, John F., 2015. A novel pore-forming toxin in type A Clostridium perfringens is associated with both fatal canine hemorrhagic gastroenteritis and fatal foal necrotizing enterocolitis. *PloS One*. 2015. Vol. 10, n° 4, pp. e0122684. DOI 10.1371/journal.pone.0122684.

GOHARI, Iman Mehdizadeh, UNTERER, Stefan, WHITEHEAD, Ashley E. et PRESCOTT, John F., 2020. NetF-producing Clostridium perfringens and its associated diseases in dogs and foals. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* mars 2020. Vol. 32, n° 2,

pp. 230-238. DOI 10.1177/1040638720904714.

GOLDSTEIN, Michael R., KRUTH, Stephen A., BERSENAS, Alexa M. E., HOLOWAYCHUK, Marie K. et WEESE, J. Scott, 2012. Detection and characterization of *Clostridium perfringens* in the feces of healthy and diarrheic dogs. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*. juillet 2012. Vol. 76, n° 3, pp. 161-165. DOI 10.1111/j.1939-1676.2002.tb02383.x.

GOTO, Yoshiyuki et KIYONO, Hiroshi, 2012. Epithelial barrier: an interface for the cross-communication between gut flora and immune system. *Immunological Reviews*. janvier 2012. Vol. 245, n° 1, pp. 147-163. DOI 10.1111/j.1600-065X.2011.01078.x.

GRØNVOLD, Anne-Mette R., L'ABÉE-LUND, Trine M., SØRUM, Henning, SKANCKE, Ellen, YANNARELL, Anthony C. et MACKIE, Roderick I., 2010. Changes in fecal microbiota of healthy dogs administered amoxicillin. *FEMS microbiology ecology*. février 2010. Vol. 71, n° 2, pp. 313-326. DOI 10.1111/j.1574-6941.2009.00808.x.

GUYTON, Arthur Clifton et HALL, John Edward, 2016. *Textbook of medical physiology*. Philadelphia : Elsevier. ISBN 978-1-4557-7016-8.

HALL, Edward J., WILLIAMS, David A. et KATHRANI, Aarti, 2020. *BSAVA manual of canine and feline gastroenterology*. Gloucester, Royaume-Uni : British small animal veterinary association. ISBN 1-905319-96-7.

HANDL, Stefanie, DOWD, Scot E., GARCIA-MAZCORRO, Jose F., STEINER, Jörg M. et SUCHODOLSKI, Jan S., 2011. Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. *FEMS microbiology ecology*. mai 2011. Vol. 76, n° 2, pp. 301-310. DOI 10.1111/j.1574-6941.2011.01058.x.

HART, I. R., 1979. The distribution of immunoglobulin-containing cells in canine small intestine. *Research in Veterinary Science*. novembre 1979. Vol. 27, n° 3, pp. 269-274. DOI 10.1016/S0034-5288(18)32790-5.

HERSTAD, Kristin M. V., TROSVIK, Pål, HAALAND, Anita Haug, HAVERKAMP, Thomas H. A., DE MUINCK, Eric J. et SKANCKE, Ellen, 2021. Changes in the fecal microbiota in dogs with acute hemorrhagic diarrhea during an outbreak in Norway. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. septembre 2021. Vol. 35, n° 5, pp. 2177-2186. DOI 10.1111/jvim.16201.

HOBDAY, M. M., PACHTINGER, G. E., DROBATZ, K. J. et SYRING, R. S., 2014. Linear versus non-linear gastrointestinal foreign bodies in 499 dogs: clinical presentation, management and short-term outcome. *The Journal of Small Animal Practice*. novembre 2014. Vol. 55, n° 11, pp. 560-565. DOI 10.1111/jsap.12271.

IDEXX, 2012. *IDEXX Canine and Feline Diarrhea RealPCR Profiles include the quantitative measurement of Clostridium perfringens alpha-toxin gene (cpa) and Clostridium perfringens enterotoxin gene (cpe)*. juin 2012.

JONACH, Beata, BOYE, Mette, STOCKMARR, Anders et JENSEN, Tim Kåre, 2014. Fluorescence in situ hybridization investigation of potentially pathogenic bacteria involved in

neonatal porcine diarrhea. *BMC veterinary research*. 14 mars 2014. Vol. 10, pp. 68. DOI 10.1186/1746-6148-10-68.

JØRGENSEN, Hannah Joan, VALHEIM, Mette, SEKSE, Camilla, BERGSJØ, Bjarne Asbjørn, WISLØFF, Helene, NØRSTEBØ, Simen Foyn, SKANCKE, Ellen, LAGESEN, Karin, HAALAND, Anita Haug, RODRIGUEZ-CAMPOS, Sabrina, SJURSETH, Siri Kulberg, HOFSHAGEN, Merete, JARP, Jorun, TRONERUD, Ole-Herman, JOHANNESSEN, Gro Skøien, HEGGELUND, Monica, RYGG, Sasja, CHRISTENSEN, Ellen, BOYE, Mette, GJERSET, Britt, SANDVIK, Morten, SOLTVEDT, Eiril Moen et WOLFF, Cecilia, 2021. An Official Outbreak Investigation of Acute Haemorrhagic Diarrhoea in Dogs in Norway Points to *Providencia alcalifaciens* as a Likely Cause. *Animals: an open access journal from MDPI*. 9 novembre 2021. Vol. 11, n° 11, pp. 3201. DOI 10.3390/ani11113201.

JOUET, P., SARNA, S. K., SINGARAM, C., RYAN, R. P., HILLARD, C. J., TELFORD, G. L., FINK, J. et HENDERSON, J. D., 1995. Immunocytes and abnormal gastrointestinal motor activity during ileitis in dogs. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* [en ligne]. 1 décembre 1995. [Consulté le 14 décembre 2021]. DOI 10.1152/ajpgi.1995.269.6.G913. Disponible à l'adresse : <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajpgi.1995.269.6.G913> Bethesda, MD

KIU, Raymond et HALL, Lindsay J., 2018. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. *Emerging Microbes & Infections*. 6 août 2018. Vol. 7, n° 1, pp. 141. DOI 10.1038/s41426-018-0144-8.

KLEIN, Bradley G., 2019. *Cunningham's textbook of veterinary physiology*. St. Louis, Missouri : Elsevier. ISBN 978-1-4377-2361-8.

KONTUREK, Peter C., BRZOZOWSKI, T. et KONTUREK, S. J., 2011. Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*. décembre 2011. Vol. 62, n° 6, pp. 591-599.

KUROWSKI, P. Brett, TRAUB-DARGATZ, Josie L., MORLEY, Paul S. et GENTRY-WEEKS, Claudia R., 2002. Detection of *Salmonella* spp in fecal specimens by use of real-time polymerase chain reaction assay. *American Journal of Veterinary Research*. septembre 2002. Vol. 63, n° 9, pp. 1265-1268. DOI 10.2460/ajvr.2002.63.1265.

LEI, Yong et CHEN, Jiande, 2009. Inhibitory effects of various types of stress on gastric tone and gastric myoelectrical activity in dogs. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2009. Vol. 44, n° 5, pp. 557-563. DOI 10.1080/00365520902767538.

LEIPIG-RUDOLPH, Miriam, BUSCH, Kathrin, PRESCOTT, John F., MEHDIZADEH GOHARI, Iman, LEUTENEGGER, Christian M., HERMANN, Walter, WOLF, Georg, HARTMANN, Katrin, VERSPOHL, Jutta et UNTERER, Stefan, 2018. Intestinal lesions in dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome associated with netF-positive *Clostridium perfringens* type A. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* juillet 2018. Vol. 30, n° 4, pp. 495-503. DOI 10.1177/1040638718766983.

LENNON, Elizabeth M., BOYLE, Tonya E., HUTCHINS, Rae Grace, FRIEDENTHAL, Arit, CORREA, Maria T., BISSETT, Sally A., MOSES, Lorra S., PAPICH, Mark G. et

BIRKENHEUER, Adam J., 2007. Use of basal serum or plasma cortisol concentrations to rule out a diagnosis of hypoadrenocorticism in dogs: 123 cases (2000-2005). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1 août 2007. Vol. 231, n° 3, pp. 413-416. DOI 10.2460/javma.231.3.413.

LEUTENEGGER, C.M., MARKS, S. L. et ROBERTSON, J., 2012. Toxin Quantification of *Clostridium perfringens* is a predictor for diarrhea in dogs and cats. In : *Proceedings of the American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM)*. New York: Curran Associates, Inc. 2012.

LI, Jihong et MCCLANE, Bruce A., 2006. Further comparison of temperature effects on growth and survival of *Clostridium perfringens* type A isolates carrying a chromosomal or plasmid-borne enterotoxin gene. *Applied and Environmental Microbiology*. juillet 2006. Vol. 72, n° 7, pp. 4561-4568. DOI 10.1128/AEM.00177-06.

LI, Jihong, PAREDES-SABJA, Daniel, SARKER, Mahfuzur R. et MCCLANE, Bruce A., 2016. *Clostridium perfringens* Sporulation and Sporulation-Associated Toxin Production. *Microbiology Spectrum*. juin 2016. Vol. 4, n° 3. DOI 10.1128/microbiolspec.TBS-0022-2015.

LUCEY, Brendan P. et HUTCHINS, Grover M., 2004. William H. Welch, MD, and the discovery of *Bacillus welchii*. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. octobre 2004. Vol. 128, n° 10, pp. 1193-1195. DOI 10.5858/2004-128-1193-WHWMAT.

MANSOUR-DJAALAB, Hardria, 2015. *Histologie de l'appareil digestif et de ses glandes annexes* [en ligne]. [Consulté le 22 mars 2022]. Disponible à l'adresse : chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=https%3A%2F%2Ffac.umc.edu.dz%2Fvet%2FCours_Ligne%2FCours%2FHistologieA2%2FHistologie_Appareil_Digestif.pdf&clen=7031588&chunk=true

MAPLETOFT, E. K., ALLENSPACH, K. et LAMB, C. R., 2018. How useful is abdominal ultrasonography in dogs with diarrhoea? *The Journal of Small Animal Practice*. janvier 2018. Vol. 59, n° 1, pp. 32-37. DOI 10.1111/jsap.12780.

MARKOVICH, Jessica E., STUCKER, Karla M., CARR, Alaina H., HARBISON, Carole E., SCARLETT, Janet M. et PARRISH, Colin R., 2012. Effects of canine parvovirus strain variations on diagnostic test results and clinical management of enteritis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1 juillet 2012. Vol. 241, n° 1, pp. 66-72. DOI 10.2460/javma.241.1.66.

MARKS, S. L., RANKIN, S. C., BYRNE, B. A. et WEESE, J. S., 2011. Enteropathogenic Bacteria in Dogs and Cats: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Control. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2011. Vol. 25, n° 6, pp. 1195-1208. DOI 10.1111/j.1939-1676.2011.00821.x.

MARKS, Stanley L., KATHER, Elizabeth J., KASS, Philip H. et MELLI, Ann C., 2002. Genotypic and phenotypic characterization of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in diarrheic and healthy dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. octobre 2002. Vol. 16, n° 5, pp. 533-540. DOI 10.1892/0891-6640(2002)016<0533:gapcop>2.3.co;2.

MAZZAFERRO, Elisa M., 2020. Update on Canine Parvoviral Enteritis. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*. novembre 2020. Vol. 50, n° 6,

pp. 1307-1325. DOI 10.1016/j.cvsm.2020.07.008.

MCGREEVY, Paul D., GEORGEVSKY, Dana, CARRASCO, Johanna, VALENZUELA, Michael, DUFFY, Deborah L. et SERPELL, James A., 2013. Dog behavior co-varies with height, bodyweight and skull shape. *PloS One*. 2013. Vol. 8, n° 12, pp. e80529. DOI 10.1371/journal.pone.0080529.

MEHDIZADEH GOHARI, Iman, A NAVARRO, Mauricio, LI, Jihong, SHRESTHA, Archana, UZAL, Francisco et A MCCLANE, Bruce, 2021. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. *Virulence*. décembre 2021. Vol. 12, n° 1, pp. 723-753. DOI 10.1080/21505594.2021.1886777.

MORTIER, F., STROHMEYER, K., HARTMANN, K. et UNTERER, S., 2015a. Acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dogs: 108 cases. *The Veterinary Record*. 13 juin 2015. Vol. 176, n° 24, pp. 627. DOI 10.1136/vr.103090.

MORTIER, F., STROHMEYER, K., HARTMANN, K. et UNTERER, S., 2015b. Acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dogs: 108 cases. *The Veterinary Record*. 13 juin 2015. Vol. 176, n° 24, pp. 627. DOI 10.1136/vr.103090.

MOWAT, Allan McI et BAIN, Calum C., 2011. Mucosal macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Journal of Innate Immunity*. 2011. Vol. 3, n° 6, pp. 550-564. DOI 10.1159/000329099.

NYLUND, Cade M., DENSON, Lee A. et NOEL, James M., 2010. Bacterial enteritis as a risk factor for childhood intussusception: a retrospective cohort study. *The Journal of Pediatrics*. mai 2010. Vol. 156, n° 5, pp. 761-765. DOI 10.1016/j.jpeds.2009.11.026.

ODA, Masataka, TERAOKA, Yutaka, SAKURAI, Jun et NAGAHAMA, Masahiro, 2015. Membrane-Binding Mechanism of *Clostridium perfringens* Alpha-Toxin. *Toxins*. 3 décembre 2015. Vol. 7, n° 12, pp. 5268-5275. DOI 10.3390/toxins7124880.

ORTIZ, V., KLEIN, L., CHANNELL, S., SIMPSON, B., WRIGHT, B., EDWARDS, C., GILBERT, R., DAY, R. et CADDY, S. L., 2018. Evaluating the effect of metronidazole plus amoxicillin-clavulanate versus amoxicillin-clavulanate alone in canine haemorrhagic diarrhoea: a randomised controlled trial in primary care practice. *The Journal of Small Animal Practice*. juillet 2018. Vol. 59, n° 7, pp. 398-403. DOI 10.1111/jsap.12862.

PAREDES-SABJA, Daniel et SARKER, Mahfuzur R., 2009. *Clostridium perfringens* sporulation and its relevance to pathogenesis. *Future Microbiology*. juin 2009. Vol. 4, n° 5, pp. 519-525. DOI 10.2217/fmb.09.31.

PEREIRA, Giorgio Q., GOMES, Lucas A., SANTOS, Iago S., ALFIERI, Alice F., WEESE, J. S. et COSTA, Marcio C., 2018. Fecal microbiota transplantation in puppies with canine parvovirus infection. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. mars 2018. Vol. 32, n° 2, pp. 707-711. DOI 10.1111/jvim.15072.

PEYRON, Clémence et TOULZA, Olivier, 2013. Traitements des gastro-entérites aiguës : adaptations selon les cas - La Semaine Vétérinaire n° 336 du 01/06/2013. *Le Point Vétérinaire.fr* [en ligne]. 1 juin 2013. [Consulté le 18 mars 2022]. Disponible à l'adresse : <https://www.lepointveterinaire.fr/publications/le-point-veterinaire/sommaire-du-point->

veterinaire-expert-canin/n-336/traitements-des-gastro-enterites-aigues-adaptations-selon-les-cas.html

POPOFF, M. R., 1998. Interactions between bacterial toxins and intestinal cells. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*. avril 1998. Vol. 36, n° 4, pp. 665-685. DOI 10.1016/s0041-0101(97)00100-1.

PROKSCH, A. L., UNTERER, S., SPECK, S., TRUYEN, U. et HARTMANN, K., 2015. Influence of clinical and laboratory variables on faecal antigen ELISA results in dogs with canine parvovirus infection. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*. juin 2015. Vol. 204, n° 3, pp. 304-308. DOI 10.1016/j.tvjl.2015.03.009.

RALLIS, T. S., PAPAZOGLU, L. G., ADAMAMA-MORAITOU, K. K. et PRASSINOS, N. N., 2000. Acute enteritis or gastroenteritis in young dogs as a predisposing factor for intestinal intussusception: a retrospective study. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine*. octobre 2000. Vol. 47, n° 8, pp. 507-511. DOI 10.1046/j.1439-0442.2000.00318.x.

REES, Clare M., EATON, Simon et PIERRO, Agostino, 2010. National prospective surveillance study of necrotizing enterocolitis in neonatal intensive care units. *Journal of Pediatric Surgery*. juillet 2010. Vol. 45, n° 7, pp. 1391-1397. DOI 10.1016/j.jpedsurg.2009.12.002.

REVITT-MILLS, Sarah A., ROOD, Julian I., ADAMS, Vicki, REVITT-MILLS, Sarah A., ROOD, Julian I. et ADAMS, Vicki, 2015. Clostridium perfringens extracellular toxins and enzymes: 20 and counting. *Microbiology Australia*. 14 août 2015. Vol. 36, n° 3, pp. 114-117. DOI 10.1071/MA15039.

RIEUTORT, Michel, 1999. *Physiologie animale. les grandes fonctions*. Paris, France. 2-225-82994-2 : Masson. ISBN 2-225-82994-2.

ROOD, J. I. et COLE, S. T., 1991. Molecular genetics and pathogenesis of Clostridium perfringens. *Microbiological Reviews*. décembre 1991. Vol. 55, n° 4, pp. 621-648. DOI 10.1128/mr.55.4.621-648.1991.

ROOD, Julian I., ADAMS, Vicki, LACEY, Jake, LYRAS, Dena, MCCLANE, Bruce A., MELVILLE, Stephen B., MOORE, Robert J., POPOFF, Michel R., SARKER, Mahfuzur R., SONGER, J. Glenn, UZAL, Francisco A. et VAN IMMERSEEL, Filip, 2018. Expansion of the Clostridium perfringens toxin-based typing scheme. *Anaerobe*. octobre 2018. Vol. 53, pp. 5-10. DOI 10.1016/j.anaerobe.2018.04.011.

SALEH, Meriam N., HEPTINSTALL, Jack R., JOHNSON, Eileen M., BALLWEBER, Lora R., LINDSAY, David S., WERRE, Stephen, HERBEIN, Joel F. et ZAJAC, Anne M., 2019. Comparison of diagnostic techniques for detection of Giardia duodenalis in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. mai 2019. Vol. 33, n° 3, pp. 1272-1277. DOI 10.1111/jvim.15491.

SCHMITZ, Silke, COENEN, Christina, KÖNIG, Matthias, THIEL, Heinz-Jürgen et NEIGER, Reto, 2009. Comparison of three rapid commercial Canine parvovirus antigen detection tests with electron microscopy and polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory*

Diagnosticians, Inc. mai 2009. Vol. 21, n° 3, pp. 344-345.
DOI 10.1177/104063870902100306.

SCORZA, Valeria et TANGTRONGSUP, Sahatchai, 2010. Update on the diagnosis and management of *Cryptosporidium* spp infections in dogs and cats. *Topics in Companion Animal Medicine*. août 2010. Vol. 25, n° 3, pp. 163-169. DOI 10.1053/j.tcam.2010.07.007.

SIMPSON, J. M., MARTINEAU, B., JONES, W. E., BALLAM, J. M. et MACKIE, R. I., 2002. Characterization of fecal bacterial populations in canines: effects of age, breed and dietary fiber. *Microbial Ecology*. août 2002. Vol. 44, n° 2, pp. 186-197. DOI 10.1007/s00248-002-0001-z.

SINDERN, Natalie, SUCHODOLSKI, Jan S., LEUTENEGGER, Christian M., MEHDIZADEH GOHARI, Iman, PRESCOTT, John F., PROKSCH, Anna-Lena, MUELLER, Ralf S., BUSCH, Kathrin et UNTERER, Stefan, 2019a. Prevalence of *Clostridium perfringens* netE and netF toxin genes in the feces of dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. janvier 2019. Vol. 33, n° 1, pp. 100-105. DOI 10.1111/jvim.15361.

SINDERN, Natalie, SUCHODOLSKI, Jan S., LEUTENEGGER, Christian M., MEHDIZADEH GOHARI, Iman, PRESCOTT, John F., PROKSCH, Anna-Lena, MUELLER, Ralf S., BUSCH, Kathrin et UNTERER, Stefan, 2019b. Prevalence of *Clostridium perfringens* netE and netF toxin genes in the feces of dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. janvier 2019. Vol. 33, n° 1, pp. 100-105. DOI 10.1111/jvim.15361.

SINGH, Charanjeet et ROY-CHOWDHURI, Sinchita, 2016. Quantitative Real-Time PCR: Recent Advances. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. 2016. Vol. 1392, pp. 161-176. DOI 10.1007/978-1-4939-3360-0_15.

SOGAME, Naoko, RISBON, Rebecca et BURGESS, Kristine E., 2018. Intestinal lymphoma in dogs: 84 cases (1997-2012). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 15 février 2018. Vol. 252, n° 4, pp. 440-447. DOI 10.2460/javma.252.4.440.

SONGER, J. G., 1996. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clinical Microbiology Reviews*. avril 1996. Vol. 9, n° 2, pp. 216-234. DOI 10.1128/CMR.9.2.216.

SONNENBERG, Gregory F. et ARTIS, David, 2015. Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nature Medicine*. juillet 2015. Vol. 21, n° 7, pp. 698-708. DOI 10.1038/nm.3892.

SORG, Joseph A. et SONENSHEIN, Abraham L., 2008. Bile salts and glycine as cogerminants for *Clostridium difficile* spores. *Journal of Bacteriology*. avril 2008. Vol. 190, n° 7, pp. 2505-2512. DOI 10.1128/JB.01765-07.

STOKES, Chris et WALY, Nashwa, 2006. Mucosal defence along the gastrointestinal tract of cats and dogs. *Veterinary Research*. juin 2006. Vol. 37, n° 3, pp. 281-293. DOI 10.1051/vetres:2006015.

SUCHODOLSKI, J. S., 2011. Companion animals symposium: microbes and gastrointestinal health of dogs and cats. *Journal of Animal Science*. mai 2011. Vol. 89, n° 5, pp. 1520-1530.

DOI 10.2527/jas.2010-3377.

SUCHODOLSKI, Jan S., 2011. Intestinal Microbiota of Dogs and Cats: a Bigger World than We Thought. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 1 mars 2011. Vol. 41, n° 2, pp. 261-272. DOI 10.1016/j.cvsm.2010.12.006.

SUCHODOLSKI, Jan S., CAMACHO, Jennifer et STEINER, Jörg M., 2008. Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis. *FEMS microbiology ecology*. décembre 2008. Vol. 66, n° 3, pp. 567-578. DOI 10.1111/j.1574-6941.2008.00521.x.

SUCHODOLSKI, Jan S., DOWD, Scot E., WESTERMARCK, Elias, STEINER, Jörg M., WOLCOTT, Randy D., SPILLMANN, Thomas et HARMOINEN, Jaana A., 2009. The effect of the macrolide antibiotic tylosin on microbial diversity in the canine small intestine as demonstrated by massive parallel 16S rRNA gene sequencing. *BMC microbiology*. 2 octobre 2009. Vol. 9, pp. 210. DOI 10.1186/1471-2180-9-210.

SUCHODOLSKI, Jan S., MARKEL, Melissa E., GARCIA-MAZCORRO, Jose F., UNTERER, Stefan, HEILMANN, Romy M., DOWD, Scot E., KACHROO, Priyanka, IVANOV, Ivan, MINAMOTO, Yasushi, DILLMAN, Enricka M., STEINER, Jörg M., COOK, Audrey K. et TORESSON, Linda, 2012. The fecal microbiome in dogs with acute diarrhea and idiopathic inflammatory bowel disease. *PloS One*. 2012. Vol. 7, n° 12, pp. e51907. DOI 10.1371/journal.pone.0051907.

SUCHODOLSKI, Jan S., RUAUX, Craig G., STEINER, Jörg M., FETZ, Kathrin et WILLIAMS, David A., 2005. Assessment of the qualitative variation in bacterial microflora among compartments of the intestinal tract of dogs by use of a molecular fingerprinting technique. *American Journal of Veterinary Research*. septembre 2005. Vol. 66, n° 9, pp. 1556-1562. DOI 10.2460/ajvr.2005.66.1556.

SWANSON, Kelly S., DOWD, Scot E., SUCHODOLSKI, Jan S., MIDDELBOSS, Ingmar S., VESTER, Brittany M., BARRY, Kathleen A., NELSON, Karen E., TORRALBA, Manolito, HENRISSAT, Bernard, COUTINHO, Pedro M., CANN, Isaac K. O., WHITE, Bryan A. et FAHEY, George C., 2011. Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *The ISME journal*. avril 2011. Vol. 5, n° 4, pp. 639-649. DOI 10.1038/ismej.2010.162.

TAGU, Denis, JAUBERT-POSSAMAI, Stéphanie et MÉREAU, Agnès, 2018. *Principes des techniques de biologie moléculaire et génomique*. Versailles, France. ISBN 978-2-7592-2885-0.

TAN, Jian, MCKENZIE, Craig, POTAMITIS, Maria, THORBURN, Alison N., MACKAY, Charles R. et MACIA, Laurence, 2014. Chapter Three - The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. In : ALT, Frederick W. (éd.), *Advances in Immunology* [en ligne]. Academic Press. pp. 91-119. [Consulté le 21 avril 2022]. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128001004000039>

TRIVEDI, S., MARKS, S. L., KASS, P. H., LUFF, J. A., KELLER, S. M., JOHNSON, E. G. et MURPHY, B., 2011. Sensitivity and specificity of canine pancreas-specific lipase (cPL) and other markers for pancreatitis in 70 dogs with and without histopathologic evidence of pancreatitis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. décembre 2011. Vol. 25, n° 6,

pp. 1241-1247. DOI 10.1111/j.1939-1676.2011.00793.x.

UNTERER, S., BUSCH, K., LEIPIG, M., HERMANN, W., WOLF, G., STRAUBINGER, R. K., MUELLER, R. S. et HARTMANN, K., 2014. Endoscopically visualized lesions, histologic findings, and bacterial invasion in the gastrointestinal mucosa of dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. février 2014. Vol. 28, n° 1, pp. 52-58. DOI 10.1111/jvim.12236.

UNTERER, S., STROHMEYER, K., KRUSE, B. D., SAUTER-LOUIS, C. et HARTMANN, K., 2011. Treatment of aseptic dogs with hemorrhagic gastroenteritis with amoxicillin/clavulanic acid: a prospective blinded study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. octobre 2011. Vol. 25, n° 5, pp. 973-979. DOI 10.1111/j.1939-1676.2011.00765.x.

UNTERER, Stefan et BUSCH, Kathrin, 2021. Acute Hemorrhagic Diarrhea Syndrome in Dogs. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*. janvier 2021. Vol. 51, n° 1, pp. 79-92. DOI 10.1016/j.cvsm.2020.09.007.

VAN DER WAAIJ, Laurens A., HARMSSEN, H. J. M., MADJIPOUR, M., KROESE, F. G. M., ZWIERS, M., VAN DULLEMEN, H. M., DE BOER, N. K., WELLING, G. W. et JANSEN, P. L. M., 2005. Bacterial population analysis of human colon and terminal ileum biopsies with 16S rRNA-based fluorescent probes: commensal bacteria live in suspension and have no direct contact with epithelial cells. *Inflammatory Bowel Diseases*. octobre 2005. Vol. 11, n° 10, pp. 865-871. DOI 10.1097/01.mib.0000179212.80778.d3.

VILLIERS, Elizabeth et RISTIC, Jelena, 2016. *BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology*. Gloucester, Royaume-Uni : British small animal veterinary association. ISBN 978 1 905319 63 3.

WANG, Jing, LUO, Yakun, LIANG, Lin, LI, Jinxiang et CUI, Shangjin, 2018. A fast and simple one-step duplex PCR assay for canine distemper virus (CDV) and canine coronavirus (CCoV) detection. *Archives of Virology*. décembre 2018. Vol. 163, n° 12, pp. 3345-3349. DOI 10.1007/s00705-018-3982-8.

WANG, S, SHEN, A, SETLOW, P et LI, Yq, 2015. Characterization of the Dynamic Germination of Individual *Clostridium difficile* Spores Using Raman Spectroscopy and Differential Interference Contrast Microscopy. *Journal of bacteriology* [en ligne]. juillet 2015. Vol. 197, n° 14. [Consulté le 7 juin 2022]. DOI 10.1128/JB.00200-15. Disponible à l'adresse : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25939833/>

WASHABAU, Robert J. rft au, 2013. *Canine and feline gastroenterology*. St. Louis, Missouri : Elsevier. ISBN 978-1-4160-3661-6.

WEESE, J. S., STAEMPFLI, H. R., PRESCOTT, J. F., KRUTH, S. A., GREENWOOD, S. J. et WEESE, H. E., 2001. The roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in diarrhea in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. août 2001. Vol. 15, n° 4, pp. 374-378. DOI 10.1111/j.1939-1676.2001.tb02332.x.

WEESE, J Scott, 2007. Infectious Diseases of the Dog and Cat, 3rd ed. *The Canadian Veterinary Journal*. janvier 2007. Vol. 48, n° 1, pp. 75.

WELCH, WH et NUTTALL, GHF, 1892. A gas-producing bacillus (*Bacillus aerogenes*

capsulatus, Nov. spec.) capable of rapid development in the blood-vessels after death. . 1892. Vol. 3, pp. 81-91.

WERNER, Melanie, SUCHODOLSKI, Jan S., LIDBURY, Jonathan A., STEINER, Jörg M., HARTMANN, Katrin et UNTERER, Stefan, 2021. Diagnostic value of fecal cultures in dogs with chronic diarrhea. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. janvier 2021. Vol. 35, n° 1, pp. 199-208. DOI 10.1111/jvim.15982.

XENOULIS, P. G., 2015. Diagnosis of pancreatitis in dogs and cats. *The Journal of Small Animal Practice*. janvier 2015. Vol. 56, n° 1, pp. 13-26. DOI 10.1111/jsap.12274.

YANG, Seung-II, KIM, Jung-Hyun, JEONG, Soon-Wuk et HAN, Hyun-Jung, 2018. Acute hemorrhagic diarrhea syndrome associated with contaminated foreign bodies (used feminine hygiene products) in a Golden Retriever dog. *The Journal of Veterinary Medical Science*. avril 2018. Vol. 80, n° 4, pp. 629-633. DOI 10.1292/jvms.17-0633.

YOUNG, Barbara, O'DOWD, Géraldine, WOODFORD, Phillip, VALIDIRE, Pierre et VALIDIRE-CHARPY, Patricia, 2015. *Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheater*. Paris, France : Deboeck Université.

ZIESE, Anna-Lena et SUCHODOLSKI, Jan S., 2021. Impact of Changes in Gastrointestinal Microbiota in Canine and Feline Digestive Diseases. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*. janvier 2021. Vol. 51, n° 1, pp. 155-169. DOI 10.1016/j.cvsm.2020.09.004.

ZIESE, Anna-Lena, SUCHODOLSKI, Jan S., HARTMANN, Katrin, BUSCH, Kathrin, ANDERSON, Alexandra, SARWAR, Fatima, SINDERN, Natalie et UNTERER, Stefan, 2018. Effect of probiotic treatment on the clinical course, intestinal microbiome, and toxigenic *Clostridium perfringens* in dogs with acute hemorrhagic diarrhea. *PloS One*. 2018. Vol. 13, n° 9, pp. e0204691. DOI 10.1371/journal.pone.0204691.

ZINDL, Carlene L., LAI, Jen-Feng, LEE, Yun Kyung, MAYNARD, Craig L., HARBOUR, Stacey N., OUYANG, Wenjun, CHAPLIN, David D. et WEAVER, Casey T., 2013. IL-22-producing neutrophils contribute to antimicrobial defense and restitution of colonic epithelial integrity during colitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 30 juillet 2013. Vol. 110, n° 31, pp. 12768-12773. DOI 10.1073/pnas.1300318110.

Charlotte PETIT

APPORT DES TESTS PCR QUANTITATIFS DE RECHERCHE DES GÈNES CODANT POUR LES TOXINES DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* DANS LA DÉMARCHE DIAGNOSTIQUE DES DIARRHÉES AIGUËS DU CHIEN

CONTRIBUTION OF QUANTITATIVE PCR TESTS SEARCHING FOR CODING GENES FOR CLOSTRIDIUM PERFRINGENS TOXINS IN THE DIAGNOSTIC APPROACH OF ACUTE DIARRHEA IN DOGS

Thèse d'État de Doctorat Vétérinaire : Nantes, le 4 juillet 2022

RÉSUMÉ

Chez le chien, la diarrhée aiguë est un motif de consultation très fréquent. Le diagnostic différentiel est assez large et inclue les diarrhées associées à *Clostridium perfringens*. En effet, cette bactérie produit de nombreuses toxines impliquées dans l'apparition de signes cliniques plus ou moins sévères. Le traitement est le plus souvent symptomatique en l'absence de complications. Toutefois, le syndrome de diarrhée hémorragique aiguë (AHDS), forme grave de diarrhée associée à *C. perfringens*, nécessite généralement une hospitalisation.

Étant donné la méconnaissance du mécanisme physiopathologique, le diagnostic de diarrhée associée à *C. perfringens* n'est pas évident. Les techniques immunologiques dirigées contre l'entérotoxine mais aussi les tests PCR dirigés comme la toxine alpha et l'entérotoxine de *C. perfringens* font preuve d'un manque important de spécificité mais aussi de sensibilité. Du fait de leur interprétation peu fiable, ces tests ne sont pas recommandés en routine. Suite à une publication prometteuse de l'usage de la PCR quantitative (qPCR), nous avons cherché à quantifier le nombre de copies des gènes codant pour la toxine alpha et l'entérotoxine parmi une population de 16 chiens sains recrutés pour la constitution d'une coprothèque.

Si l'utilisation de la qPCR et d'une valeur seuil a permis d'obtenir une spécificité supérieure à la PCR classique, de nombreux chiens sains obtiennent encore un résultat positif particulièrement pour la toxine alpha. Ce manque de spécificité est un obstacle important à l'utilisation de ces tests qPCR en pratique. Le diagnostic des diarrhées associées à *C. perfringens* se fait donc par exclusion. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour obtenir une méthode diagnostique fiable. Cibler de nouvelles toxines telles que la toxine NetF probablement impliquée dans le développement d'AHDS pourrait permettre d'obtenir des tests plus spécifiques dans le futur.

MOTS CLES : CHIEN, CLOSTRIDIUM PERFRINGENS, DIAGNOSTIC, RÉACTION DE POLYMERISATION QUANTITATIVE, DIARRHÉE AIGUË

DATE DE SOUTENANCE : 04/07/2022