

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE IBN KHALDOUN DE TIARET  
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES  
DEPARTEMENT DE SANTE ANIMALE**

**PROJET DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
DOCTEUR VETERINAIRE**

**SOUS LE THEME**

# **Une reproduction expérimentale d'entérite nécrotique sub-clinique**

**PRESENTE PAR : ENCADRE PAR :**

**M. AZZI MOHAME  
M. BELKEBIR MUSTEPHA**

**DR. MERATI RACHID**



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

*A ALLAH LE TOUT PUISSANT, LE TOUT  
MISERICORDIEUX*

*C'est lui, ALLAH. Nulle divinité autre que lui, le  
connaisseur de l'invisible tout comme du visible, le  
Souverain, Le pur, L'Apaisant, Le Rassurant, Le  
Prédominant, Le Tout Puissant. A Lui les plus beaux  
noms. A ALLAH appartiennent les cieux et la terre.  
Que la Grâce d'ALLAH et Sa Lumière ne cessent de se  
répandre sur l'âme de Son messager et prophète :  
Mohamed (PSL).*

## Liste des figures

**Figure 1 :** sensibilité de l'Homme et des animaux aux toxines et des différentes espèces produites par *Clostridium perfringens*

**Figure 2 :** *Clostridium perfringens* sous microscope électronique (grossissement :  $\times 1600$ )

**Figure 3 :** endospores de *Clostridium perfringens*

**Figure 4 :** évolution de la prolifération de *C. perfringens* et la production de la toxine

**Figure 5 :** relation entre la prolifération et l'incidence de l'entérite nécrotique

**Figure 6 :** lésions d'entérite nécrotique : foyers de nécrose au niveau de jéjunum

**Figure 7 :** lésions d'entérite nécrotique : nécrose diffuse au niveau du jéjunum

**Figure 8 :** lésion d'entérite nécrotique : congestives et pseudomembrane diphtérique verte au niveau du jéjunum

**Figure 9 :** effet de l'entérite clostridienne sur le gain moyen quotidien

**Figure 10 :** Evolution des cas d'entérite nécrotique chez le poulet de chair

**Figure 11 :** évolution des cas d'entérite nécrotique chez le poulet label

**Figure 12 :** fréquence des cas d'entérite nécrotique dans le monde

**Figure 13 :** lésions d'entérite nécrotique .A : foyers de nécrose . B : nécrose diffuse

**Figure 14 :** les poids moyens de chaque lot à j -2, j7 et j12

**Figure 15 :** l'alimentation ingérée, le gain de poids moyen de chaque lot à J7

**Figure 16 :** l'alimentation ingérée, le gain de poids moyen de chaque lot à j12

**Figure 17 :** l'indice de consommation de chaque lot à j7 et j 12

## Liste des tableaux

**Tableau 1:** production de la toxine par les cinq types de *Clostridium perfringens* .

**Tableau2 :** lésions intestinales des poulets immunisés avec différentes protéines et inoculés avec une culture de *Clostridium perfringens* .

**Tableau 3 :** les poids moyens enregistrés à j-2, j7 et j12

**Tableau 4 :** les gains de poids moyens, alimentation ingérée moyenne de chaque lot ainsi que l'indice de consommation à j7 et j12

## Sommaire

|  | Page |
|--|------|
| <b>Introduction</b>  | 1    |
| <br><b>Partie bibliographique</b>  |      |
| L'entérite nécrotique chez le poulet   |      |
| 1. Importance .....  | 02   |
| 2. Etiologie.....  | 02   |
| 3. Taxonomie .....   | 02   |
| 4. Morphologie .....   | 04   |
| 5. Habitat .....   | 04   |
| 6. Forme de résistance : les spores.....                                       | 05   |
| 7. Caractère biochimiques et culturaux .....                                   | 05   |
| 8. Pathogénie de l'entérite nécrotique .....                                   | 06   |
| 9. Clinique.....   | 09   |
| 10. Epidémiologie .....  | 12   |
| 11. Traitement et prophylaxie .....  | 18   |
| <br>Les modèles expérimentaux de l'entérite nécrotique                         |      |
| 1. Utilisation des souches de <i>clostridium perfringens</i>                   | 21   |
| 2. Co-infection avec des coccidies   | 22   |
| 3. Effet favorable de l'immunodépression                                       | 23   |
| 4. Utilisation d'aliment riches en protéines                                   | 23   |
| 5. Modèle expérimental de l'entérite nécrotique établi par l'équipe de l'anses | 24   |
| <br><b>Partie expérimentale</b>  |      |
| Matériels et méthodes  |      |
| 1. périodes d'étude  | 26   |
| 2. Lieu d'étude  | 26   |

|  |    |
|--|----|
| 3. Animaux   | 26 |
| 4. Condition d'élevage                                   | 26 |
| 5. Protocole expérimentale                               | 27 |
| 6. Mise en place des animaux                             | 28 |
| 7. Préparation et inoculation du vaccin anticoccidien    | 28 |
| 8. Préparation et inoculation du clostridium perfringens | 28 |
| 9. Critères suivis                                       | 30 |
| 10. Paramètres cliniques et lésionnels                   | 30 |

## **Résultats**

|  |    |
|--|----|
| 1. les poids moyens enregistrés a j-2, j7 et j12   | 31 |
| 2. les gains de poids moyens, alimentation ingérée moyenne de chaque lot ainsi que l'indice de consommation a j7 et j12. | 32 |
| 3. Taux de morbidité et de mortalité   | 33 |

|                   |    |
|-------------------|----|
| <b>Discussion</b> | 34 |
|-------------------|----|

|                   |    |
|-------------------|----|
| <b>Conclusion</b> | 34 |
|-------------------|----|

|                   |  |
|-------------------|--|
| <b>Références</b> |  |
|-------------------|--|

# *Introduction*

## INTRODUCTION

L'entérite nécrotique est une affection d'origine bactérienne du tube digestif des volailles.

Elle est restée pendant longtemps une maladie sporadique avec une importance économique mineure. Aujourd'hui, elle est considérée comme l'une des maladies émergentes menaçant le plus l'industrie économique avicole. Les experts du terrain considèrent que la recrudescence de cette maladie est liée à l'interdiction des antibiotiques facteurs de croissance qui contrôlaient la flore intestinale.

Malgré l'importance de cette maladie, la pathogénie demeure partiellement méconnue ainsi que les différents facteurs qui interviennent dans le déclenchement de l'entérite nécrotique sur le terrain. Ces lacunes rendent difficile la reproduction expérimentale et l'évaluation objective de l'efficacité des différentes molécules contre l'entérite nécrotique.

Notre étude consiste à tester différentes doses du vaccin anticoccidien comme facteur favorisant la maladie, ainsi que les différentes doses du *Clostridium perfringens* comme étant la bactérie responsable de l'entérite nécrotique afin de choisir un modèle d'infection expérimentale le plus efficace permettant ainsi la reproduction de la maladie.

# **La partie bibliographique**

## **1. Importance**

Décrite pour la première fois en Angleterre par parish en 1961 (**BARNES et al.,2003**), l'entérite nécrotique est la clostridose la plus importante chez le poulet (**KERRY et al .,2009**).

Les clostridiose chez le poulet sont : le botulisme, l'entérite ulcéralive, la dermatite gangréneuse et l'entérite nécrotique (**BRUGERE PICOUX et SILIM , 1992**). L'entérite nécrotique est restée longtemps une affection peu fréquente . dans bon nombre de pays, elle a fait sa recrudescence avec l'interdiction de l'incorporation des antibiotiques comme facteurs de croissance dans l'aliment et est devenue en quelques années une affection digestive majeure .

En 2000, le cout de l'entérite nécrotique était estimé à plus de 5 US cent par oiseau, par plus de 57% de professionnels des productions avicoles à travers le monde ( **VAN DER SLUIS , 2000**), soit un cout global , pour la production mondiale annuelle de poulets, d'environ 2 milliards de dollars (**HOFACRE ,2000**). En 2005, 79% de ces industriels estimaient que la situation était identique ou aggravée (**RIVIER , 2009**).

## **2. Etiologie de L'entérite nécrotique**

Tous les travaux effectués sur l'entérite nécrotique ont démontré que l'agent causal est *Clostridium perfringens* (**JOHANSSON et SARLES , 1948. MANN ,1945. WIJE WANTA et SENEVIRTNA , 1971 , MCGAGHEY , 1959 , AL-SHEIKHLY et TRUSCOTT , 1977**).

## **3. Taxonomie de la bacteria**

L'espèce *C.perfringens* est d'abord rattachée au genre *Bacillus*. Elle est ensuite incluse dans le groupe des *Clostridium* .deus noms d'espèce sont proposés à peu près en meme temps et sont tréutilisé : *C. perfringens* et *C.welchii*. (**PRIBRAM 1929**) , puis (**PREVOT 1938**) incluent cette espèce dans un genre différent , *welchii* , en raison de caractères atypiques pour un clostridium : absence de mobilité et de flagelles . présence d'une capsule (**VERON et LE MINOR , 1989**)

La classification actuelle de clostridium perfringens est la suivante ( [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)):

Phylum : Firmicutes

Classe : Clostridia

Ordre : Clostridiales

Famille : Clostridiaceae

Genre : Clostridium

Espèce : Clostridium perfringens

**L'entérite nécrotique chez le poulet**

Types : *Clostridium perfringens* (A , B, C , D , et E )

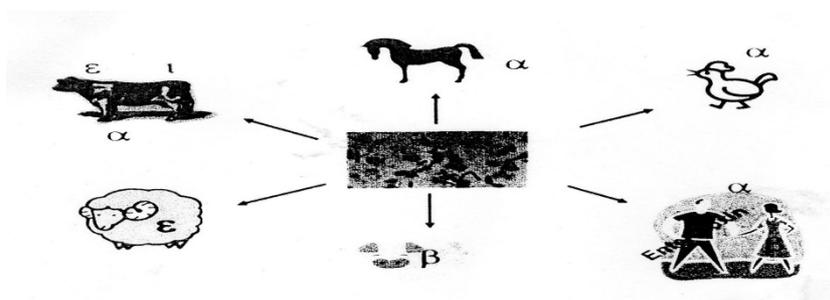
Actuellement , on admet qu'il existe une seule espèce , *Clostridium perfringens* , avec cinq types A à E , le type F préalablement décrit étant maintenant inclus dans le type C , ces cinq toxinotypes sont classés en fonction des sept toxines produites ( alpha ota, entérotoxine beta , beta2 , epsilon , et Netb ) (VAN IMMERSEEL et al ., 2004 )

**Tableau 1** : production de la toxine par les cinq types de *Clostridium perfringens* (VAN

IMMERSEEL et al., 2004)

| Toxinotype | alpha toxine | beta toxine | iota toxine | epsilon toxine | entero toxine | beta 2 toxine |
|------------|--------------|-------------|-------------|----------------|---------------|---------------|
| A          | +            | -           | -           | -              | +             | +             |
| B          | +            | +           | -           | +              | +             | -             |
| C          | +            | +           | -           | -              | +             | +             |
| D          | +            | -           | -           | +              | +             | -             |
| E          | +            | -           | +           | -              | +             | -             |

Il existe des différences de sensibilité de l'Homme et des espèces animales aux différentes toxines

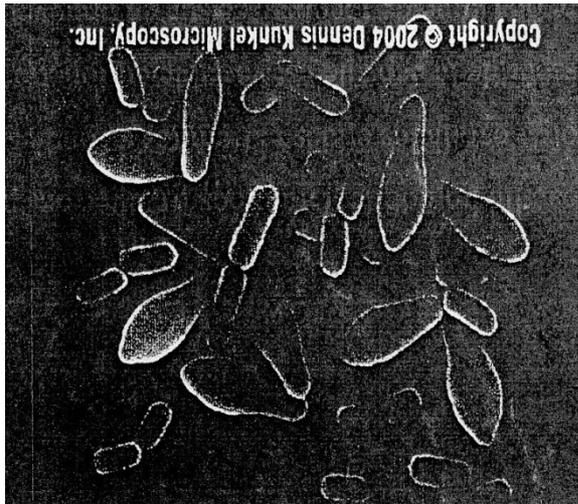


**Figure 1** : sensibilité de l'Homme et des espèces animales aux différentes toxines produites par *Clostridium perfringens* (vanimmerseel et al., 2004)

En production avicole , les souches de *C. perfringens* virulentes appartiennent en grande majorité au type A dans une moindre part au type C .

#### 4. Morphologie

*C. perfringens* est une bactérie bâtonnée, gram négatif, avec des dimensions en moyenne de 4 µm sur 1.5 µm avec des bords parallèles et des extrémités arrondies (DAUBE, 1992; WALKER et al 2004). L'épaisseur de la capsule est variable en fonction des souches et peut être discernée par coloration à l'encre de Chine de façon aisée sur un prélèvement (VERON et al, 1989) les bâtonnets sont généralement isolés, parfois groupés en paires (WALKER et al ; 2004)



**Figure 2 :** Clostridium perfringens sous microscope électronique (grossissement : \*1600)

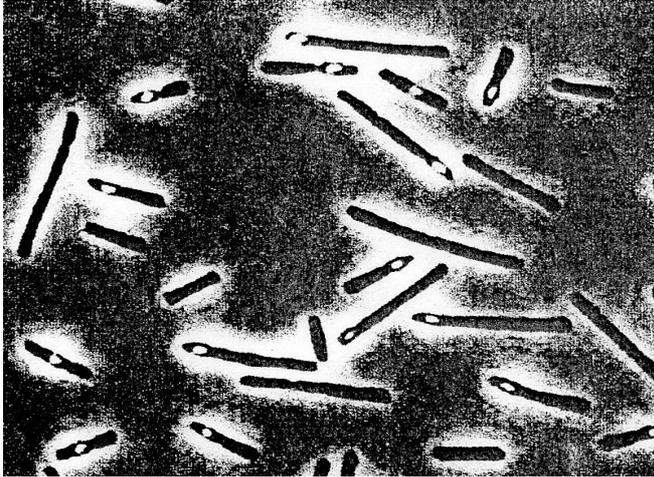
Source : [www.denniskunk.com](http://www.denniskunk.com) (date de consultation : janvier 2012)

#### 5. Habitat

*C. perfringens* est une bactérie tellurique et ubiquitaire. Elle est présente le plus souvent en grand nombre dans l'environnement (sol, boues, litières) (VERON et al ; 1989). En conditions favorables (pH entre 5.5 et 8, température entre 15 et 52°C), la population bactérienne peut doubler toutes les 3 à 5 minutes, ce qui explique la soudaineté des cas cliniques à *C. perfringens* et la nécessité de réagir rapidement. En outre, la plupart des clostridies pathogènes font partie de la flore normale de l'intestin des animaux chez le poulet, *C. perfringens* se localise majoritairement au niveau des caecums et envahit l'intestin grêle lorsque les conditions sont favorables à sa prolifération (U.I et al . 2003)

## 6. Forme de résistance : les spores

Les spores de *C. perfringens* sont ovales et thermorésistantes permet à la bactérie de résister dans le milieu extérieur lorsque les conditions ne sont plus favorables à sa survie, c'est-à-dire lors de modification de pH et de température (VAN IMMERSSEEL et al ;2004)



**Figure 3 :** endospores de *Clostridium perfringens*

Source <http://oregonstate.edu/research/imagersle/sarkerslides.jpg>(2012)

## 7. Caractères biochimique et culturels

Il s'agit d'une bactérie anaérobie stricte, aéro-tolérante (sa croissance est possible en surface avec 5% d'oxygène en présence d'un catalyseur activé par H<sub>2</sub>), déficiente en catalase et en peroxydase produisant des endospores. Elle possède un fort potentiel de réduction du milieu. En effet, la production de divers métabolites, et en particulier d'hydrogène, au cours de la phase de croissance, a un effet réducteur (KOHLER, 2000). Sa température habituelle de croissance dans les milieux de culture est comprise entre 34 et 37°C, mais elle pousse de manière optimale à 46°C. Cette dernière température est utilisée lors de l'incubation pour enrichir les cultures. Son développement est possible à pH compris entre 5 et 9. Elle est saccharolytique et protéolytique, c'est-à-dire qu'elle transforme les glucides et les protéines en différents composés dont quelques-uns sont toxiques (PILET et al 2002). Toutes les souches réduisent les sulfites en sulfures. Ce critère est utilisé pour dénombrer *C. perfringens* dans l'eau, le sol et les fèces. Elle produit des gaz (dioxyde de carbone, dihydrogène) et des acides (acides acétique et butyrique) lors de la fermentation de nombreux glucides, en particulier le glucose (VAN IMMERSSEEL et al ; 2004).

## 8. Pathogénie de l'entérite nécrotique

Malgré l'importance de l'entérite nécrotique, la pathogénie reste partiellement élucidée par les chercheurs.

### - Implication des coccidies

Les coccidies sont considérées comme un facteur majeur dans le déclenchement de l'entérite nécrotique (WILLIAMS, 2005 ; BRADLEY et RADHAKRISHNAN, KIMURA et al, 1976 AL-SHEIKLY ET AL-SAIG, 1980). Les coccidies envahissent et détruisent les cellules épithéliales conduisant à un défaut de perméabilité de la barrière intestinale. S'ensuit alors une fuite des protéines plasmatiques (VAN IMMERSEEL et al ; 2004). L'infection coccidienne induit une réponse immunitaire des cellules T intestinales et une production accrue de mucus au niveau intestinal (COLLIER et al 2008). La présence du mucus et des protéines plasmatiques dans la lumière intestinale favorise la prolifération de *Clostridium perfringens* et le développement de l'entérite nécrotique (TIMBERMONT et al 2011).

### - Production de la toxine

Il y a plus de 20 ans, AL SHEIKLE et al 1977 et FUKATA 1988 ont considéré la toxine alpha comme le facteur de virulence majeur dans l'entérite nécrotique. Leur argument était que le surnageant d'une culture pure de *C. perfringens* type A induisant des lésions typiques d'entérite nécrotique, que la majorité des souches de *C. perfringens* isolées d'animaux malades d'entérite nécrotique étaient toutes de types A et que les anticorps produits contre des souches de *C. perfringens* type A empêchent le développement des lésions d'entérite nécrotique chez les poussins.

VAN IMMERSEEL et al 2009 considèrent que ces résultats ne sont pas clairs, et qu'un surnageant d'une culture pure de souche de *C. perfringens* de type A peut contenir des molécules autres que la toxine alpha, capable de favoriser ou d'induire le développement des lésions de l'entérite nécrotique.

L'hypothèse que la toxine alpha soit le facteur de virulence majeur a été largement discutée. SI et al 2007 favorisent cette hypothèse et ils ont démontré une corrélation positive entre le développement de l'entérite nécrotique et l'augmentation de la concentration de la toxine alpha au niveau intestinal.

L'entérite nécrotique chez le poulet

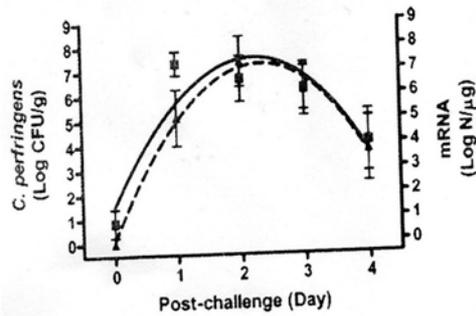


Figure 4 : évolution de la prolifération de *C.perfringens*

Et la production de la toxine (SI et al ., 2007)

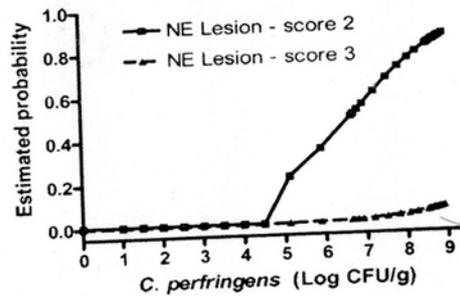


Figure 5 : relation entre la prolifération de

l'incidence de l'entérite nécrotique (S.I ., al 2007)

L'immunité contre l'entérite nécrotique n'est induite que par des souches virulents de *C perfringens* . suite au développement des lésion d'entérite nécrotique , il y a production de cinq protéines immunogènes qui sont : la toxine alpha , la glyceraldehyde – 3 phosphate dehydrogenase (**GPD**) la pyruvate ferredoxinoreductase (**PFOR**) ? LA FRUCTOSE 1.6 biphosphatealdolase (**FBA**) et une protéine hypothétique (**HP**) (**KULKARNI al 2006** )

En 2007 , ces memes chercheurs ont testé l'injection intramusculaire des protéines immunogènes : la toxine alpha seul , la toxine alpha avec son anatoxine , la GPD , la PFOR et la HP , après une inoculation de 10<sup>8</sup> UFC/ml d'une souche virulente de C perfringens à des poussins , ils obtenaient une bonne protection contre l'entérite nécrotique avec l'association toxine alpha /anatoxine , la HP et la PFOR (tableau 2 )

**Tableau 2** : lésions intestinales des poulets immunisés avec différentes protéines et inoculés avec une culture de C perfringens (**KULKARNI et al 2006** )

| Protein                           | No. of chickens | No. of chickens with the following lesion scores: |    |    |    |    |    | Mean no. of chickens |
|-----------------------------------|-----------------|---|----|----|----|----|----|----------------------|
|                                   |                 | 0   | 1+ | 2+ | 3+ | 4+ | 5+ |                      |
| Vehicle-only controls             | 22              | 0   | 5  | 5  | 6  | 4  | 2  | 2.68                 |
| Alpha toxoid/toxin <sup>a,b</sup> | 19              | 10  | 8  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0.53                 |
| HP <sup>a</sup>                   | 20              | 8   | 6  | 4  | 2  | 0  | 0  | 1.0                  |
| GPD                               | 18              | 4   | 4  | 6  | 1  | 1  | 1  | 1.64                 |
| tPFOR <sup>a</sup>                | 19              | 9   | 2  | 6  | 2  | 0  | 0  | 1.05                 |
| GPD + HP                          | 19              | 5   | 5  | 7  | 1  | 1  | 0  | 1.36                 |

Certains chercheurs ne favorisent pas l'idée impliquant la toxine alpha dans le développement de l'entérite nécrotique, car ils avaient trouvé que les niveaux de production de la toxine alpha étaient similaires entre les souche de *C perfringens* type A, isolées d'animaux atteints d'entérite nécrotique et les souches de *C perfringens* type A d'animaux sains.

(**GHOLAIANDEHKORDI et al 2006**), l'entérite nécrotique peut être reproduite par la toxine alpha isolée de souche *C perfringens* de poulet atteint de la maladie, tandis qu'elle n'est pas reproduite avec la toxine alpha isolée de souche *C perfringens* de poulet sain ou isolée des cas d'entérite hémorragique chez le veau (**TIMBERMONT et al 2008**),

**Keyburn et al 2006** ont montré que des mutants négatifs de la toxine alpha isolés des souches *C perfringens* peuvent induire des lésions spécifiques d'entérite nécrotique. Ces résultats sont à prendre avec précaution car l'étude a été réalisée sur des poulets standards avec une flore intestinale non contrôlée. Ces mêmes chercheurs (**2008, 2010**) ont décrit une nouvelle toxine NetB isolée de cas d'entérite nécrotique. Ils ont montré que les mutants négatifs de la toxine NetB n'induisent pas des lésions d'entérite nécrotique, alors que le mutant négatif de la toxine NetB complété d'un gène exprimant la NetB induisant des lésions typiques d'entérite nécrotique chez le poulet. Ils ont également démontré que la toxine NetB était présente dans la majorité des souches de *C perfringens* isolées d'animaux atteints d'entérite nécrotique alors qu'elle est toujours absente dans des souches de *C perfringens* isolées d'animaux sains.

#### **- Sécrétion des enzymes collagénolytiques**

Certains chercheurs suggèrent que les premières modifications pathologiques dues à l'entérite nécrotique sont causées par l'activité des enzymes collagénolytiques. **OLKOWSKI et al 2006, 2008** ont montré que la destruction des villosités intestinales commence initialement au niveau de la membrane basale puis par les membranes latérales et la *Lamina propria*, et que la destruction de l'épithélium se fait plus tardivement. La nature de ces changements morphologiques indique que l'initiation du processus de destruction implique des facteurs protéolytiques affectant la matrice extracellulaire et les jonctions cellulaires. Ces chercheurs ont constaté que lorsqu'ils inoculaient à des poulets des souches de *C perfringens* isolées de cas de terrain, ils trouvaient des niveaux élevés d'enzymes collagénolytiques dans l'intestin contrairement aux lots témoins non inoculés. Ils suggèrent alors que le processus de destruction est dû soit aux collagénases bactériennes dont l'action est stimulée lorsqu'il y a destruction de l'épithélium intestinal (ex : par les coccidies), soit aux métalloprotéases qui sont activées par interaction hôte-agent pathogène (**OLKOWSKI et al 2008**)

### **- Adhésion de Clostridium perfringens aux entérocytes**

Clostridium perfringens adhère aux entérocytes en se liant à quelque molécules de la matrice extracellulaire, une stratégie utilisée par de nombreuses entérobactéries (**MARTIN et SMYTH, 2010, WADE et al., 2010**).

Ces molécules de la matrice extracellulaire ne sont pas présentes dans un épithélium intestinal sain, On les retrouve en grande quantité lorsqu'il y a une destruction de l'épithélium intestinal (par les coccidies, toxines ou enzymes callagénolytiques secrétées par Clostridium perfringens). Il a été montré que les souches pathogènes, au collagène type I, type II, au fibrinogène, à la laminine et la vitronectine. Le mutant (produisant l'anatoxine) d'une souche de Clostridium perfringens pathogène et productrice de NetB n'est pas capable d'adhérer in vivo à ces molécules de la matrice extracellulaire. Les chercheurs ont suggéré que cette capacité d'adhésion aux molécules extracellulaire propre aux souches pathogènes forme un facteur clé dans le développement de l'entérite nécrotique (**Wade et al., 2010**).

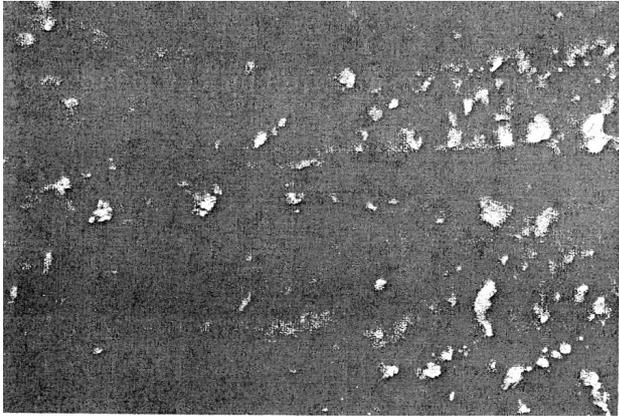
### **9- Clinique :**

La description des infections à C. perfringens chez la volaille s'est longtemps limitée à la description de la forme aiguë de la maladie, l'entérite nécrotique. Certains auteurs (**VAN IMMERSEEL et al., 2004 ; KOHLER, 2000 ; VAN DER SLUIS, 2000**) considèrent que l'entérite nécrotique peut se présenter sous forme subclinique et que les clostridies jouent un rôle dans l'apparition des dybactérioses et des cholangio-hépatites.

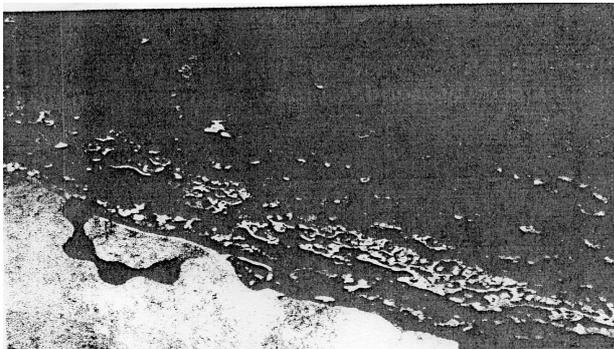
#### **9-1- Forme aiguë :**

L'entérite nécrotique est particulièrement fréquente chez les jeunes individus, âgés de 15 à 40 jours pour le poulet de chair et de 25 à 40 jours pour la dinde (**doucet, 1999**). Quelques cas ont été rapportés chez des oiseaux plus âgés, notamment des poules pondeuses aulos ou en cage (**BARNES, 2003**). Les signes cliniques associés à l'évolution de cette maladie sont la prostration et l'anorexie, parfois accompagnées de diarrhées. Dans bon nombre de cas toutefois, les symptômes restent très frustes et le signe d'alerte est une mortalité brutale, avec putréfaction rapide des cadavres. Les lésions observées se situent majoritairement au niveau de jéjunum et de l'iléon. Les intestins apparaissent friables, distendus par des gaz. La muqueuse intestinale, parfois congestive, présente des foyers de nécrose (figure 8). Dans les cas les plus sévères, elle est recouverte d'une pseudomembrane diphtérique jaune ou verte (figure 9 et 10). On observe parfois des lésions.

Hépatique associées , correspondant à une hypertrophie et la présence de foyers de nécrose punctiformes .

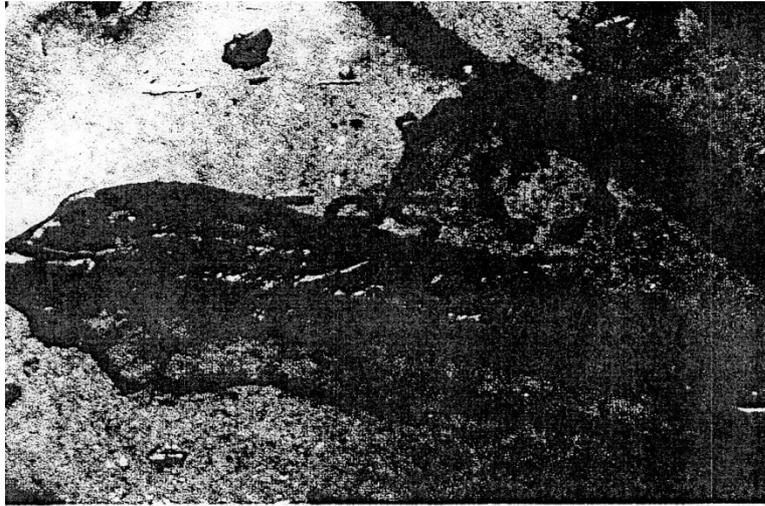


**Figure 6** : lésions d'entérite nécrotique : foyers de nécrose au niveau de jéjunum ( **photo prise durant l'étude à l'anses février 2012** )



**Figure 7**: lésions d'entérite nécrotique : nécrose diffuse au niveau du jéjunum ( photo prise durant l'étude à l'anses , octobre 2011 )

## L'entérite nécrotique chez le poulet



**Figure 8** : lésion d'entérite nécrotique : congestives et pseudomembrane diphthérique verte qu niveau du jéjunum (**photo prise durant l'étude à l'anse, octobre 2011**)

Sur le plan histo-pathologique , on observe une nécrose apicale des villosités intestinales associée à une colonisation de la Lamina Propria par les corps bactériens. Auteur des foyers de nécrose, de nombreux granulocytes hétérophiles sont présents. La progression des lésions se fait ensuite vers les cryptes. Dans les cas les plus sévères, des lésions de nécrose de la sous de la sous-muqueuse de la musculuse peuvent être observées (**RIVIERE ,2008**).

### **9-2- Forme subclinique :**

La forme subclinique de l'entérite nécrotique fait partie d'un syndrome qui effectue l'ensemble de la production de poulets de chair et qui se caractérise par une inflexion de la courbe des gains moyens quotidiens entre l'age de 24 et 30 jours (**VANS IMMENSEEL et al.,2004**).

Ce syndrome porte différentes appellations selon la zone géographique : entérite clostridienne, dybactérioses ou SIBO (small intestinal bacterialovergrowth).

Les signes cliniques majeurs observés sont une dégradation des fientes et une augmentation du ratio eau/aliment. Les fientes sont volumineuses, moulées, et grasses. *C. perfringens*est aussi associé à l'évolution d'un autre trouble, la cholangio-hépatite, dont les signes ne sont en général détectés qu'à l'abattage avec saisie des carcasses ou des foies (**VAN IMMENSEEL et al., 2004 ; VAN DER SLUIS, 2000**). Histologiquement on observe une hyperplasie du conduit biliaire, des nécroses fibroïnes associées à des foyers d'inflammation granulomateuse. Ces lésions sont probablement dues à une diffusion, par les conduits biliaires ou le système porte, des *C. perfringens* en nombre important dans l'intestin moyen.

L'entérite nécrotique chez le poulet

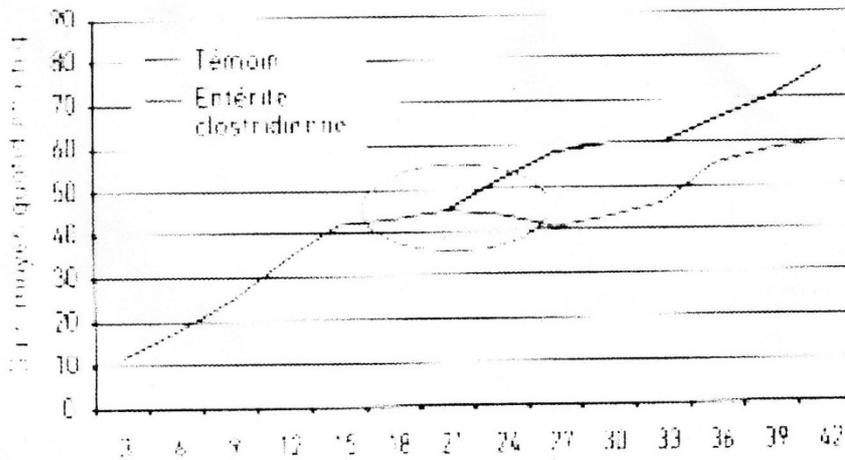


Figure 9 : effet de l'entérite clostridienne sur le gain moyen quotidien (RIVIER ,2008 )

10. Epidémiologie

En France , les fréquences de signalement de l'entérite nécrotique par les vétérinaires , pour l'année 2010 ont atteint 2.1% en poulet de chair et 62% en poulet label sur plusieurs milliers d'observations cliniques effectués .

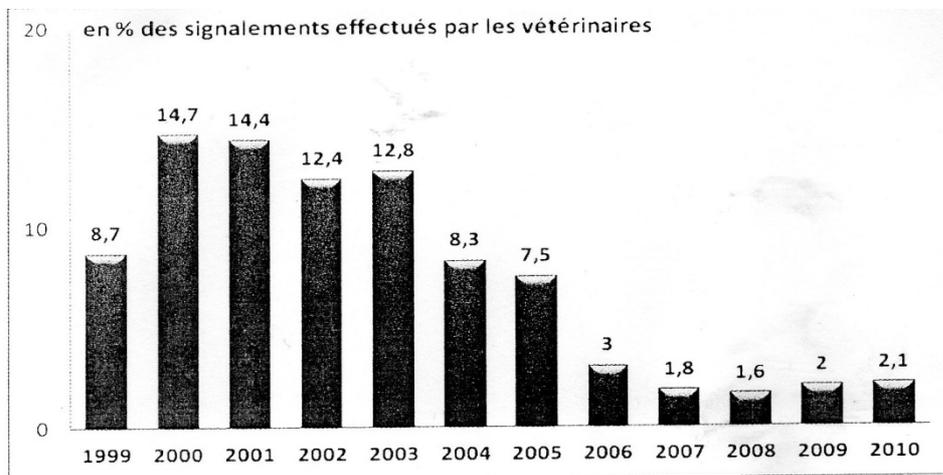


Figure 10 : Evolution des cas d'entérite nécrotique chez le poulet de chair (RNOEA –Ploufrangan ,2010)

L'entérite nécrotique chez le poulet

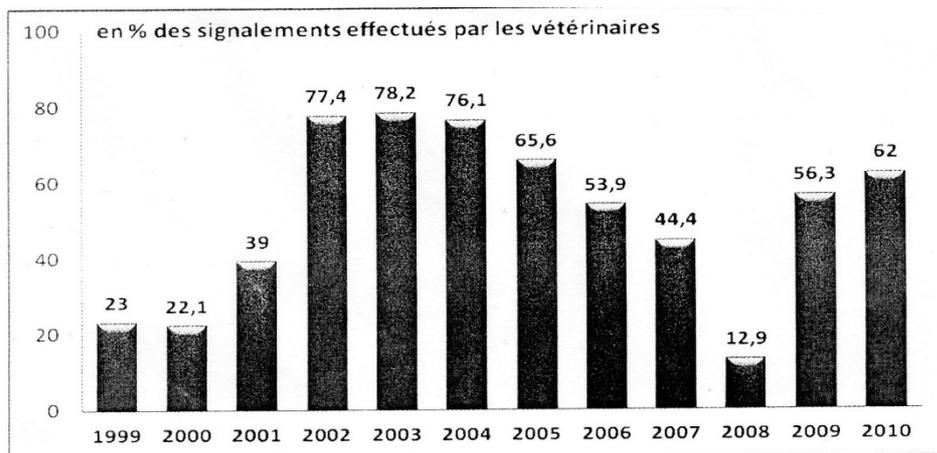


Figure 11 : évolution des cas d'entérite nécrotique chez le poulet label (RNOEA –Ploufragan, 2010)

Bien que l'agent pathogène responsable de l'entérite ait été bien défini, toutefois l'épidémiologie reste assez complexe plusieurs paramètres interviennent dans sa manifestation.

10-1-Répartition géographique :

L'entérite nécrotique a été rapportée dans la majorité des pays producteurs de volailles, à travers le monde. Cette maladie a causé beaucoup de problèmes surtout dans les pays nordiques comme la suède en 1986 (WIERUP, 2005)



Figure 12 : fréquence des cas d'entérite nécrotique dans le monde (VAN DER SLUIS, 2000)

Une recrudescence des cas d'entérite nécrotique a été signalée en 2000, dans le Royaume-Uni, la Hollande. L'Europe, l'Asie et le continent Nord-Américain (**TICE, 2002 ; WILLIAMS, 2005**). Par la suite, des poussées d'entérite nécrotique ont été rapportées par **GRAVE et al.(2001)** en Norvège entre 1995 et 2001, chez le poulet de chair.

**10-2- Saison :**

Ce facteur semble très controversé, puisque des cas d'entérite nécrotique ont été rencontrés en période hivernale en Norvège, tandis qu'au Canada, la maladie avait une incidence estivale (**WILLIAMS, 2005**).

D'autre part, il a été noté des variations régionale d'incidence dans un même pays, comme en Australie où la maladie était surtout hivernale dans de Victoria et estivale au Queensland, alors qu'elle ne semblait pas être liées à la saison dans l'Australie Occidentale (**KALDHUSDAL, 2001**). Ces informations son à relativiser car les températures hivernale différent d'un pays à un autre ; ainsi les températures de l'hiver en Australie ne sont pas forcément les même en France.

**10-3- Espèces et âge :**

L'entérite nécrotique affect la majorité des espèces de volailles, elle semble plus la filière chair, poulet de chair, dinde, poulet label, ainsi que leurs reproducteurs, Elle a aussi été observée chez les poules pondeuses.

Chez le poulet de chair, la plupart des publications s'accordent sur le fait que cette maladie effectue les oiseaux entre 2 et 6 semaines d'âge (**AL-SHEIKLY et TRUSCOTT, 1976 ; KALDHUSDAL LOVLAND et, 1999 ; WILLIAMS, 2005**).

La relation âge et maladie peut dépendre de certains facteurs comme l'immunité et la gestion de l'élevage, ainsi que les types et les programme d'additifs utilisés à la mise en place.

**10-4- Mode de transmission :**

Alors que la plupart des auteurs s'accordent sur le fait que l'entérite nécrotique ne se manifeste qu'à partir de la deuxième semaine **SHANE et al.,(2004)** rapportent que la maladie peut toucher les poussins et suggèrent ainsi que la transmission semble possible.

La transmission horizontale est la plus fréquente, car souvent l'environnement de l'élevage est impliqué (**WALK et al., 1998**) et l'aliment peut être contaminé par les spores de *Clostridium perfringens*, qui peuvent résister à une température de 100°C (**PARISH, 1961**).

#### **10-5- Facteurs de risque :**

##### **10-5-1- Interdiction de l'utilisation des antibiotiques facteurs de croissance :**

En 1986, la Suède a interdit l'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance dans l'alimentation des volailles. La liste des interdictions n'a cessé de s'allonger ensuite dans européenne.

L'une des premières conséquences signalées en élevage, en particulier les élevages de poulet de chair ou les pertes causées par l'entérite nécrotique ont été significativement plus importantes.

C'est le cas de l'Espagne, la France et de la Norvège qui ont assisté à des poussées d'entérite nécrotique suite au bannissement de ces antibiotiques (**WILLIAMS, 2005 ; VAN IMMERSEEL et al., 2004**).

En 2001, 31% des élevages de volailles au Royaume-Uni ont présenté des cas d'entérite nécrotique. Pour leur part, les éleveurs américains ont enregistré des élevés des différents types de clostridioses (entérite nécrotique de ces antibiotiques facteurs de croissance dans l'alimentation (**Williams, 2005**).

Ainsi, l'expérience suédoise indique que le retrait des antibiotiques facteurs de croissance a un impact négatif sur la santé des animaux, le bien-être et le rendement économique des élevages. Ceci a entraîné une augmentation de l'utilisation des antibiotiques à titre curatif et préventif qui peut être un facteur favorisant l'émergence d'antibiorésistances. Ainsi, des souches de *Clostridium perfringens* type A semblent manifester des résistances contre certaines molécules utilisées en thérapeutique aviaire, telles que l'exytétracycline, et la flavomycine (**KNARREBORG et al., 2002**).

##### **10-5-2- Litière humide :**

L'entérite nécrotique et la dybactérioses sont principaux désordres digestifs susceptibles d'être favorisés par une litière de mauvaise qualité (**KENNY 2003 ? KALDHUSDAL et al., 1999**).

Quelques paramètres tels que des fuites au niveau des abreuvoirs, des températures élevées, une augmentation de l'hygrométrie, une mauvaise ventilation et une forte densité aboutissent tous à une litière de mauvaise qualité perturbant le confort des animaux et favorisant le développement de certaines maladies comme l'entérite nécrotique.

### **10.5.3. Hygiène défailante**

L'absence des bonnes pratiques d'hygiène et de décontamination facilitent la persistance des spores de *Clostridium perfringens* qui peut constituer une source de contamination permanente pour les oiseaux à travers la litière, le sol, le matériel d'élevage, les lieux de stockage des aliments, les bottes et tous les éléments pouvant véhiculer ces spores .

### **10.5.4. L'alimentation**

L'alimentation peut jouer un rôle important dans le déclenchement de l'entérite nécrotique, d'ailleurs plusieurs chercheurs utilisent ce facteur pour induire expérimentalement des lésions d'entérite nécrotique.

La contamination de l'aliment par des spores de *Clostridium perfringens* : il est extrêmement difficile d'assurer une alimentation exempte de spores, étant donné que le processus de traitement des aliments ne dure que quelques minutes à une température de 85°C, et les spores de *Clostridium perfringens* tolèrent une température qui peut aller jusqu'à 100°C pendant 2 heures selon **WILLIAMS (2005)**.

La contamination de l'aliment par les mycotoxines : les mycotoxines peuvent être responsables de la perturbation des fonctions digestives, en détruisant les villosités intestinales, et en diminuant la sécrétion de la bile qui a une action destructrice sur les toxines de *Clostridium perfringens*. D'un autre côté les mycotoxines sont responsables de la diminution des mécanismes de réponse immunitaire, rendant ainsi l'animal plus enclin à développer une entérite nécrotique (**APAJALAHITI et al., 1998, 2004**).

Certains régimes alimentaires riches en céréales sont utilisés expérimentalement dans le déclenchement de l'entérite nécrotique, principalement le blé, l'orge et l'avoine (**AL-SHEIKLY et TRUSCOTT ?1977a : BRANTON et al. 1987 : RIDDELL et KONG ,1992 ;HOF SILAGEN et KALDHUSDAL ,1992**). Cela est expliqué par la présence de

### **L'entérite nécrotique chez le poulet**

Polysaccharides non amylacés (PSNA) dans ce type de céréale, qui sont indigestibles chez les poulets faute d'enzymes spécifiques. Ils entraînent une augmentation de la viscosité intestinale, un ralentissement du transit et des désordres de la flore

digestive, susceptibles de favoriser la fermentation et la croissance de germes anaérobies dont *Clostridium perfringens*.

Les protéines jouent un rôle non négligeable dans les manifestations de l'entérite nécrotique.

D'abord, les protéines d'origine végétale contiennent des carbohydrates (glucides) peu digestibles tels que les oligochaccharides qui diminuent l'absorption des nutriments et perturbe ainsi la flore intestinale en favorisant la flore pathogène et le développement de l'entérite nécrotique (**WILLIAMS ,2005**). Quant aux protéines d'origine animale telles que les farines de poisson, elles sont utilisées expérimentalement pour l'induction des lésions d'entérite nécrotique (**L.U et al.,2006**). ceci est lié aux taux élevés de glycine et de méthionine dans les farines de poisson ,car ces deux acides aminés stimulent la croissance de *Clostridium perfringens in vitro* et risquent d'augmenter le taux d'azote. D'après **KALDHUSDAL et SKERJERVE (1996)**.les clostridies ont besoin d'être exposées à des taux levés d'azote pour qu'elles deviennent virulentes.

les études réalisé par **KNARREBORG et al 2002** ont montré que les graisses animales favorisent la multiplication de *C .perfringens* au niveau intestinal, principalement au niveau de l'iléon. Les matières grasses sont sujettes à des oxydation, et la présence de radicaux libres risque de nuire à la muqueuse intestinale en la rendant plus vulnérable à la multiplication des germes tels que *C.perfringens*.

D'après les travaux de **BABA et al 1992**, une alimentation riche en zinc prédispose à l'apparition des cas d'entérite nécrotique. Le zinc protège les toxines de *C perfringens* contre l'action de trypsine.

Une transition brutale de la composition de l'aliment distribué aux animaux peut perturber non seulement la motilité intestinale mais aussi la flore intestinale en favorisent la multiplication des anaérobies telles que *C .perfringens* (**BRANTON et al1997**) la taille des particules composant le régime alimentaire peut également jouer un role dans l'entérite nécrotique mais ce facteur reste toujours discuté par les chercheurs . certaines études ont montré que les grosses particules dans l'aliment ont engendré un taux de mortalité élevé lié à l'entérite nécrotique par rapport à l'utilisation de particules plus fines (**BRANTON et al 1987 ; ENGBERG et al 2002**) . Cependant **RIDDELL et KONG 1992** ont constaté qu'il n'y avait pas de corrélation entre l'entérite nécrotique et la taille des particules de blé allant de 1.5 mm à 6 mm.

## **L'entérite nécrotique chez le poulet**

### **10.5.5. Maladies intercurrentes**

Les coccidioses, les salmonelloses, les mycoses du gésier, la bursite infectieuse, l'anémie infectieuse du poulet et la maladie de Marek sont considérées comme des maladies prédisposantes à l'entérite nécrotique (**SHIVARAMAIAH et al., 2011 ; WILLIAMS et al., 2003 ; GHOLAMIANDEHKORDI et al., 2007 ; MC REYNOLDS et al., 2007 ; STINGFELLOW et al., 2009 ; TIMBERMONT et al., 2009**). Le lien salmonellose-entérite nécrotique a été décrit récemment par **SHIVARAMAIAH et al. (2011)**. Ces chercheurs ont induit expérimentalement des lésions d'entérite nécrotique avec une infection à *Salmonella typhimurium* chez des poussins âgés d'un jour. Ils suggèrent le rôle de la paratyphose chez le poulet dans le développement de l'entérite nécrotique sur le terrain. Les liens coccidioses-entérite nécrotique, maladies immunodépressives-entérite nécrotique seront décrits dans le chapitre : modèles expérimentaux d'entérite nécrotique.

## **11. Traitement et prophylaxie**

### **11.1. Administration des antibiotiques**

Par le passé, la prévention des atteintes clostridiennes était assurée par l'utilisation d'additifs antibiotiques couramment appelés "facteur de croissance" comme par exemple la bacitracine, l'avoparcine et la virginiamycine.

L'interdiction par l'Union Européenne de l'utilisation de ces additifs a rendu nécessaire l'exploration de nouvelles méthodes de contrôle (**WILLIAMS, 2005**). Lors d'un épisode clinique avec mortalité, l'administration d'antibiotique (pénicilline A, tylosine, lincomycine) permet de stopper l'évolution de la maladie. D'autre part, les molécules coccidiostatiques de type ionosphères sont considérées comme efficaces pour réduire le nombre des bactéries anaérobies (et notamment *Clostridium perfringens*) dans le contenu intestinal (**HOFACRE, 2000**). L'administration préventive, lors des périodes à risque, des molécules utilisables lors des épisodes cliniques est aussi parfois pratiquée. Ces méthodes peuvent paraître satisfaisantes à court terme, notamment sur les plans économique et du bien-être animal.

## L'entérite nécrotique chez le poulet

### 11.2. Maitrise des facteurs favorisants

#### 11.2.1. L'alimentation

La modification des formules et des programmes alimentaires (diminution de l'incorporation des céréales à risque, contrôle des digestibilités et de la viscosité des aliments durant la période à risque) ainsi que l'incorporation d'enzymes, peuvent aider à la prévention des entérites clostridiennes. Les apports de fructo-oligosaccharides ou de Mano-oligosaccharides donnent quant à eux des résultats controversés (HOFACRE et al. 2003 ; WILLIAMS, 2005).

#### 11.2.2 L'hygiène

Une bonne maîtrise de l'hygiène permettra de minimiser les problèmes liés à d'autres maladies, surtout d'ordre digestif, facilitant le déséquilibre de la flore intestinale en faveur de *Clostridium perfringens* comme la salmonellose et les coccidioses.

#### 11.2.3 Probiotiques

Maintenir la stabilité de la flore digestive est essentiel pour prévenir les dybactérioses et l'apparition d'entérite nécrotique. Les probiotiques ont récemment été définis ; un probiotique est une préparation de micro-organismes vivants, consommés par les humains ou les animaux, qui ont un effet bénéfique par leur influence quantitative sur la microflore intestinale et/ou sur le statut immunitaire (FULLER, 1999).

Une étude réalisée au Caire a montré que l'administration alimentaire de *Pediococcus acidilactici*, pendant 49 jours, réduit significativement la colonisation intestinale et caecale chez les animaux infectés expérimentalement par *C. perfringens*, comparativement aux témoins traités (AWWAD et al. 2005).

#### 11.2.4. Acides organiques

Les propriétés antimicrobiennes in vitro de nombreux acides organiques sont bien connues, particulièrement pour leur action sur les bactéries sensibles aux pH acides, comme *Salmonella* spp, *Amylobacter* spp, *Listeria* spp et *Clostridium* spp. Cependant, l'effet antimicrobien des acides est très variable d'un acide à l'autre et dépend de la concentration et du pH. L'acidification de l'aliment avec un ou plusieurs acides est utilisée chez le porc depuis plusieurs années et semble donner des résultats satisfaisants dans la maîtrise des affections digestives bactériennes. Des recherches complémentaires sur les effets des acides organiques en élevage de volailles semblent toutefois nécessaires pour conclure (RIVIERE, 2008).

## L'entérite nécrotique chez le poulet

### 11.2.5. Maitrise des coccidies

Les additifs coccidiostatiques ,particulièrement les ionophores , sont mentionnée comme limitant l'expression des entérites nécrotiques .C es molécules étant contre –indiquées dans les lots vaccinés par des vaccins atténués , la perception générale est que la vaccination anticoccidienne pourrait favoriser l'expression des *Clostridium spp.*

Dans un essai publié en 2003, **WILLIAMS** montre que la contamination par *Eimeria maxima* d'animaux non immunisés occasionne des lésions qui favorisent le développement des clostridies présentes dans le tube digestif (meme dans des lots qui ne sont pas exposés expérimentalement aux clostridies ). L'absence des lésion clostridiennes dans les lots vacciné contre la coccidiose ,qu'ils subissent ou non un challenge coccidien , établit clairement que la vaccination n'exacerbe pas les effets d'une infection expérimentale par les clostridies . cet essai permet ,par ailleurs de démontrer quel'immunisation des animaux vis-à-vis des coccidiose subcliniques diminue l'impact des challenge clostridiens . la vaccination anticoccidienne n'est pas un facteur favorisant de l'entérite nécrotique et est meme considérée par certains producteurs comme un moyen de prévention des ces affections .

### 11.2..6 Prophylaxie vaccinale

L'utilisation des toxine inactivée ( anatoxine) pour stimuler l'immunité d'un individu vis-à-vis d'une clostridiose est très largement répandue (vaccination antitétanique ) . Des expérimentation réalisées sur le modèle murin ont permis de démontré le pouvoir neutralisant des anticorps dirigés contre les toxines alpha produites par *C perfringens* . par ailleurs . l'immunisation maternelleest communément utilisée pour la prévention des clostridiose néonatales des veaux et des porcelets . Le problème apparait différent chez la volaille , ou la transmission d'anticorps maternels ne concerne que les IgY à demi-vie court. Il n'existepas comme dans les autres espèce de transfert d' IgY .

L'immunisation maternelle est utilisée avec succès pour d'autre maladies des volailles ( maladie de Gumboro) et permet des protéger un grand nombre de sujet ( amplification ) . la vaccination par les anatoxines ,ou à 10 et 23 semaines , entraine une augmentation significative des taux d'anticorps circulants dans le sérum des poules jusqu'aux ages respectifs de 49 et 55 semaines . ces augmentation sont corrélées aux concentration d'anticorp présent dans le sac vitellin ou dans le sérum des poussins agés de 1 jours . (**LOVLAND et al , 2004**) .

### Les modèles expérimentaux de l'entérite nécrotique

plusieurs modèles de reproduction expérimentale de l'entérite nécrotique ont été décrits dans la bibliographie (WILLIAMS et al 2003 ; REYNOLDS et al 2004) . en raison de lacunes dans les connaissances concernant les facteurs prédisposant et la pathogénie exacte de l'entérite nécrotique, aucun modèle actuel n'arrive à refléter la déclaration et le développement de la maladie sur le terrain.

La plupart des études ont soit porté sur une co-infection avec les coccidies , soit régime riche en blé et en farine de poisson .

**LONG et TRUSCOTT 1976** ont établi le premier modèle expérimental de reproduction de l'entérite nécrotique en distribuant à des lots de poulets un aliment contaminé avec une concentration de  $10^7$  UFC /g de *C. perfringens* . la mortalité variait entre 11 et 26%.

Ce modèle a ensuite été modifié en incluant des concentrations élevées de farines de poisson dans l'alimentation avant l'inoculation par voie orale de *C. perfringens*( **AL SHEIKHLY et TRUSCOTT. 1977.**)

( **AL SHEIKHLY et AL-SAIEG 1980** ) ont amélioré le modèle en induisant une coccidiose clinique qui provoque des lésions d'entérite nécrotique et ont obtenu un taux de mortalité variant entre 28 et 53%.

Ces modèles expérimentaux permettent le développement de l'entérite nécrotique mais ne constituent pas une explication des causes d'apparition sur le terrain puisque des cas d'entérite nécrotique peuvent apparaître en l'absence de tout déséquilibre alimentaire et pas forcément après un épisode de coccidiose.

#### 1- Utilisation des souches de *Clostridium perfringens*

En générale les souches *C. perfringens* utilisées pour la reproduction de l'entérite nécrotique sont sélectionnées sur la base des études *in vivo*. dans la plupart des modèles, ces souches ont été isolées lors de cas d'entérite nécrotique clinique. Cependant , certains isolats de *C. perfringens* obtenus des cas d'entérite nécrotique ne sont pas capables d'induire la maladie expérimentalement ( **KHALDHUSDAL et 1999 ; BARBARA et 2008 et COOPER et SONGER ,2009** )

**CHALMERS et al 2007** ont comparé cinq souches de *C. perfringens* isolées de cas d'entérite nécrotique terrain ( SNECP43 ,SNECP44 , SNECP47 , SNECP49 et SNECP50) . Ils ont constaté que les poulets inoculés avec la souche SNECP50 ont causé une baisse du gain

### **Les modèles expérimentaux de l'entérite nécrotique**

de poids , des scores lésionnels spécifiques et des taux de mortalité très élevé par rapport aux oiseaux inoculés avec les autres souches.

La reproduction expérimentale de l'entérite nécrotique s'est faite soit avec une seule souche de *C. perfringens* (généralement la souche type A) (**THOMPSON et al 2006 ; GHOLAMLANDEHKORDI et al 2007**) ou bien avec une association de deux souches (souche type A +souche type b) de *C. perfringens* (**McREYNOLDS et al 2007 ; PARK et al 2008 STINGFELLOW et al 2009**)

Certains auteurs ont attribué la difficulté de reproduire la maladie à l'origine plasmidique des loci responsables de la pathogénicité du *C. perfringens* (**LEPP et al 2010**)

L'infection peut se faire par inoculation orale , par contamination de l'aliment ou de la litière avec des spores de *C. perfringens*(**HAMDY et al 1983, BARBARA et al 2008 ; PEDERSEN et al 2008.**)

La concentration et la durée d'exposition à *C. perfringens* sont différentes selon le modèle utilisé .**PARK et al 2008** ont inoculé une seule dose ( $10^9$ CFU/oiseau) à 26 jours d'âge, d'autres équipes ont utilisé plusieurs doses de  $10^6$  à  $10^9$ UFC/oiseau , la durée d'inoculation pouvant aller jusqu'à 8 jours (**DAHIYA et al 2005 ;OLKOWSKI et al 2006 ; BARBARA et al 2008 ; COLLIER et al 2008 ; MIKKELSEN et al 2009 ; TIMBERMONT et al 2009**). L'infection à *C. perfringens* peut être réalisée entre l'âge de 1 à 26 jours , le plus souvent entre 17 et 19 jours d'âge avec des administrations des bactéries pendant 3 à 4 jours (**LEE et al 2010**) .

#### **2- CO-infection avec des coccidiose**

L'espèce coccidienne la plus utilisée pour induire l'entérite nécrotique expérimentalement est *Eimeria maxima* (**WILLIAMS et al 2003 ; PARK et al 2008 ; MILLER et al 2010**) .

D'autres espèces coccidiennes telles qu'*Eimeria acervulina*, *Eimeria tenella* et *Eimeria mitis* ont également permis d'induire une entérite nécrotique expérimentalement ( **TIMBERMONT et al 2009**) . par ailleurs , certains chercheurs ont administré à des poulets des vaccins anticoccidiens avec des doses 10 à 24 fois plus élevées que les doses recommandées par les fabricants trois jours avant l'inoculation de *C. perfringens* ou un jour après l'inoculation des clostridiés , afin d'induire des lésions d'entérite nécrotique ( **McREYNOLDS et al 2004 ; PEDERSEN et al 2008 . TIMBERMONT et al 2009**) .

### **Les modèles expérimentaux de l'entérite nécrotique**

Les coccidies seules dans les conditions d'un modèle expérimental ne sont pas capables d'induire des lésions spécifiques d'entérite nécrotique, mais en utilisant l'association coccidies-C.perfringens, il y'a induction des lésions d'entérite nécrotique (**COLLIER et al. 2008 ; PARK et al ., 2008**).

#### **3- Effet favorable de l'immunodépression**

Certains auteurs ont suggérer que le développement de l'entérite nécrotique sur le terrain est du à la coinfection avec C. perfringens et des virus immunodépresseurs tel que le virus de la bursite infectieuse (IBDV), le virus de l'anémie infectieuse aviaire et le virus de la maladie de Marek. La reproduction expérimentale de l'entérite nécrotique a été établi en utilisant la coinfection C perfringens et virus de la bursite infectieuse (**WILLIAMS et al. ; 2003 ; GHOLAMI ANDEHKORDI et al..2007 ; MC REYNOLDS et al..2007 ; STRINGFELLOW et al. 2009 ; TIMBERMONT et al ., 2009**).

**MC REYNOLDS et al. (2004)** ont utilisé une coinfection de C perfringens avec des vaccins contre la bursite infectieuse à des doses dix fois plus élevées que les doses recommandées par les fabricants. Ils ont démontré que ces vaccins avaient augmenté la gravité des lésions spécifiques d'entérite nécrotique par rapport aux lots recevant les vaccins seuls ou uniquement l'inoculation de C .perfringens.

Le stress thermique est connu pour son exacerbation des différentes maladies chez les volailles, notamment l'entérite nécrotique. **TSIOURIS et al. '2009a.b)** ont mené une série d'expérience en utilisant différentes températures afin d'évaluer l'effet de la chaleur ou du froid sur le développement expérimental de l'entérite nécrotique. Ces chercheurs ont utilisé un modèle d'entérite nécrotique avec une vaccination coccidienne et un régime alimentaire riche en protéine. Ils ont observé que le stress thermique produit avec une température élevée (35°C-12 heures/jour) pendant cinq jours a augmenté la gravité de la maladie. De plus, ils ont observé que le froid est susceptible d'induire des lésions d'entérite nécrotique.

#### **4- Utilisation d'aliments riches en protéines**

Afin d'induire expérimentalement des lésions nécrotiques, certains chercheurs ont utilisé des régimes alimentaires riches en céréales (blé, seigle, orge, avoine) ou un changement brutal de la composition alimentaire (passage d'un aliment pauvre en protéines à un aliment riche en protéines) (**WILLIAMS et al., 2005 ; DAHIYA et al.,2006 ; MCDEVITT et al. 2006 ; COOPER et SONGER ,2009**).

### **Les modèles expérimentaux de l'entérite nécrotique**

Une teneur comprise entre 24 et 38% de protéines dans l'aliment augmente le risque de développement de l'entérite nécrotique (**PARK et al 2008 ; mikkelsen et al 2009**).

**PALLIYEGURU et al 2010** ont comparé l'effet de différentes rations (pomme de terre, farine de poisson et tourteau de soja) sur l'entérite nécrotique. Bien que les différentes rations aient la même teneur en protéines et la même composition en acides aminés, les lots de poulets nourris avec de la pomme de terre ont présenté des lésions plus sévères d'entérites nécrotiques. Ces auteurs ont attribué cet effet à la présence d'un facteur antinutritionnel (forte activité inhibitrice de la trypsine) et à la faible teneur en lipides dans la pomme de terre.

#### **5- Modèle expérimental de l'entérite nécrotique établi par l'équipe de l'anses**

Ce modèle utilise une Co- infection coccidies - *C. perfringens* sans engendrer un déséquilibre alimentaire. L'équipe a constaté qu'une co-infection *Eimeria acervulina* - *C. perfringens* favorisait l'apparition de lésions en foyers de nécrose, alors qu'une Co infection *E. maxima* - *C. perfringens* favorisait le développement de lésions diffuses typiques des cas de terrain (figure 18)



**Figure 13** : lésions d'entérite nécrotique .A : foyers de nécrose . B : nécrose diffuse (**Photos prises à l'anses durant l'étude en février 2012**)

Ils ont observé aussi une induction des lésions de nécrose plus marquée lorsque l'inoculation était réalisée par un mélange de deux souches de *C. perfringens*, notées A et B ( $10^8$  UFC /ml souche A + souche B, volume par volume). Isolées de cas d'entérite nécrotique du terrain.

**Les modèles expérimentaux de l'entérite nécrotique**

L'équipe a démontré que le lien entre coccidiose et entérite nécrotique n'était pas absolu. En effet, l'induction de lésion typique d'entérite nécrotique se produit avec des faibles quantités de coccidies (2000 oocystes /poulet d'*Eimeria maxima* et 4000 oocystes /poulet d'*Eimeria acervulina*). Incapables d'engendrer une coccidiose clinique à elles seules. Lorsque les doses infectieuses de coccidies sont augmentées. Les lésions d'entérite nécrotique n'apparaissent pas, dans ce modèle, ce n'est donc pas la coccidiose mais la présence de coccidies, se développant de façon non clinique, qui permet l'apparition des lésions d'entérite nécrotique après administration des clostridies.

# **La partie expérimentale**

# **Matériels & méthodes**

#### 1 \_Période d'étude :

L'étude s'étend sur une période de vingt deux jours, du 14 novembre au 5 décembre 2016.

#### 2-Lieu de l'étude :

L'étude est menée au niveau de l'animalerie de l'institut des sciences vétérinaires de Tiaret.

#### 3 -Animaux :

Un effectif de 120 poussins âge d'un jour issus de la souche Arbore Acres venant d'un couvoir situé à Tizi-Ouzou.

#### 4 -Condition d'élevage :

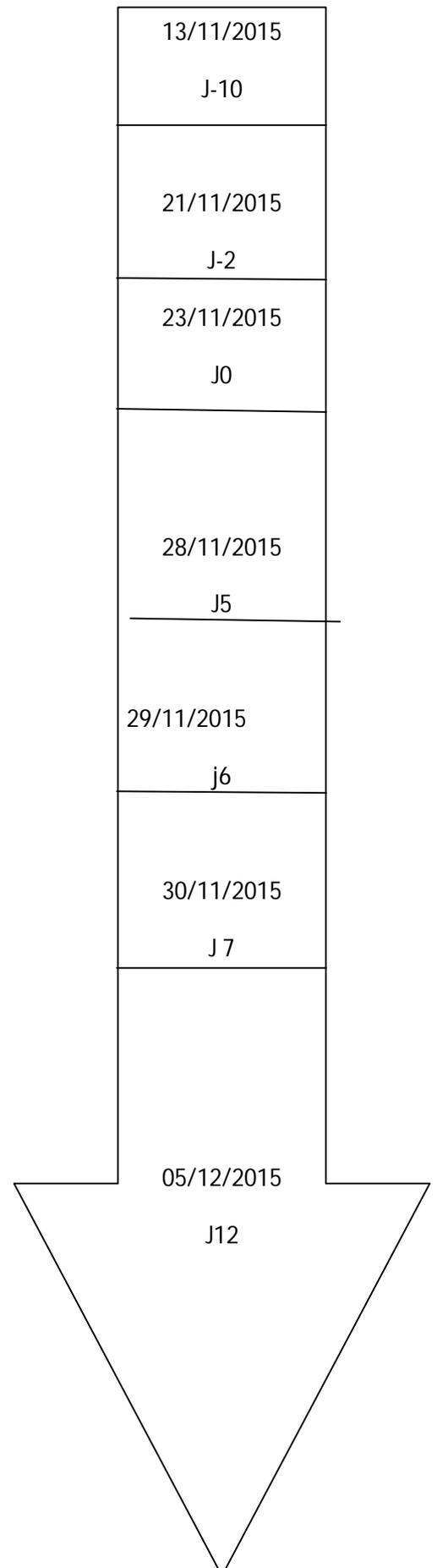
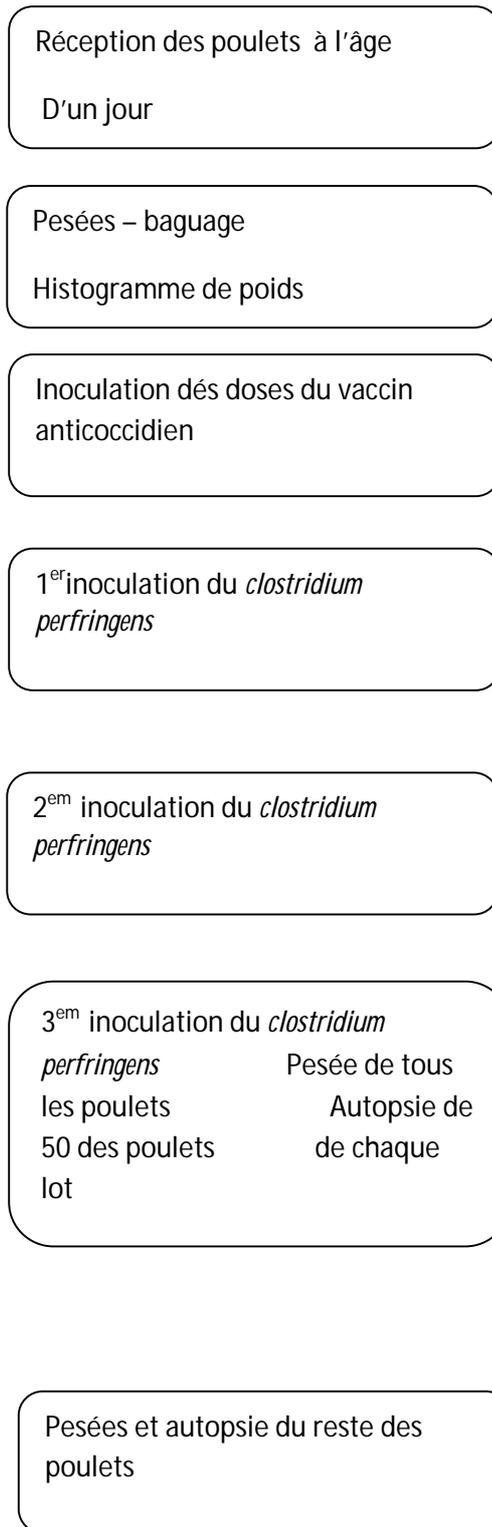
Une animalerie d'une superficie de 20 m<sup>2</sup> a été utilisée pour la réalisation de notre travail contenant 30 cages d'une superficie de 0.25 m<sup>2</sup> qui permet d'accueillir 04 poussins. Un papier cartonné est mis en place sur un plancher afin de récupérer les fientes. Des abreuvoirs automatiques sont installés sur le côté de chaque cage. Avec une mangeoire linéaire. D'une longueur de 0.5 m.

Tous les poussins reçoivent le même aliment fabriqué dans une usine située au niveau de la zone industrielle de Tiaret .aliment standard sous forme de farine .sans supplémentations.

L'aliment et l'eau sont distribués sans restriction (ad libitum) pendant la phase de démarrage, les conditions d'ambiance sont contrôlées.

La température ambiante est maintenue à 33 C à l'arrivée des poussins. Puis réduite progressivement de 3 C chaque semaine. Un nettoyage complet de l'animalerie est réalisé tous les jours ; les fientes sont éliminées tous les deux jours.

5 Protocole expérimental :



## La distribution des lots pour cette expérimentation

| Intitulé | Description  |
|----------|--|
| 1        | Lot non infecté  |
| 2        | Lot infecté avec 10 fois la dose du vaccin anticoccidien + $10^7$ ufc du clostridium perfringens |
| 3        | Lot infecté avec 20 fois la dose du vaccin anticoccidien + $10^7$ ufc du clostridium perfringens |
| 4        | Lot infecté avec 10 fois la dose du vaccin anticoccidien + $10^9$ ufc du clostridium perfringens |
| 5        | Lot infecté avec 20 fois la dose du vaccin anticoccidien + $10^9$ ufc du clostridium perfringens |

### 6- Mise en place des animaux :

Les

poulets sont répartis en cinq lots à raison de 24 poussins par lot. Chaque lot occupe six cages : quatre poussins jusqu'au 1<sup>er</sup> abattage à 17 jours puis deux poulets par cage jusqu'à 22 jours. Il y donc au total 30 cages.

La répartition des poussins dans les cages se fait de sorte que le poids moyen soit identique dans chaque cage.

### 7- préparation et inoculation du vaccin anticoccidien :

Le vaccin paracox5 a été utilisé de la manier suivant

Une ampoule de 1000 doses a été diluée dans 30ml d'eau physiologie. La dose administrée représente 0.03ml l'inoculation du vaccin anticoccidien a été réalisée sur les différents sites (intraoculaire ; intra-nasale ; par voie orale) afin d'éviter une irritation de ces dernières

### 8- préparation et inoculation de clostridium perfringens :

La préparation de l'inoculum de clostridium perfringens est illustrer dans le tableau suivant

|  |   |  |
|--|---|--|
| 1. Pré-culture                         | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Les souches de clostridium perfringens sont conservées au niveau du laboratoire d'hygiène et pathologie animal sous forme lyophilisée.</li> <li>2. La souche a étéensemencée à partir du tube dans 10 ml de bouillon thioglycolate, incubation des tubes à 37°C pendant 24 heures.</li> <li>3. L'anaérobiose est réalisé dans des jarres avec l'utilisation du papier anaérobiose (AnaeroGen™).</li> </ol>  |  |
| 2. Culture                             | <ol style="list-style-type: none"> <li>3. Les tubes thioglycolate incubés sont récupérés et ensemencés individuellement dans deux flacons contenant 100ml et 200ml de thioglycolate respectivement.</li> <li>4. Incubation des deux flacons à 37°C en anaérobiose pendant 24 heures.</li> </ol>   |  |
| 3. Inoculum                            | <ol style="list-style-type: none"> <li>5. Après incubation des deux flacons, un volume de 10ml de chaque flacon est récupéré et conservé à +4°C pour la réalisation du dénombrement bactérien.</li> <li>6. Les deux flacons contenant la suspension sont placés dans deux sacs en plastique et sortis du laboratoire d'hygiène et pathologie animale pour être amenés à l'animalerie de l'institution des sciences vétérinaires.</li> </ol>   |  |
| 4. Dé<br>5. Dénombrement de l'inoculum | <ol style="list-style-type: none"> <li>7. Le milieu de culture utilisé pour le dénombrement de clostridium perfringens est la gélose TSC, Tryptone Sulfite Cyclo sérine Oxid c'est un milieu sélectif qui contient un critère de différenciation des anaérobies : le sulfite de sodium dont la réduction est révélée par le fer. Le milieu est reconstitué par l'ajout de D-cyclo sérine qui permet l'inhibition des autres bactéries.</li> <li>8. Les boîtes de pétri sont coulées (15 ml du milieu TSC + D-cyclo sérine par boîte) sous hotte à flux laminaire.</li> <li>9. Une série de dilution décimale (de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-7</sup>) est réalisée dans de l'eau peptone à partir des deux tubes conservés à +4°C, contenant 10ml de l'incubation de chaque flacon.</li> <li>10. Ensemencement des boîtes de pétri à partir des tubes contenant les dilutions 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> et 10<sup>-7</sup> par chaque flacon.</li> <li>11. Incubation des boîtes de pétri en anaérobiose à 37°C pendant 24 heures.</li> <li>12. Lecture et comptage des colonies.</li> </ol> |  |

## 9\_Critères suivis :

### 1) Paramètre zootechnique :

#### 1.1) Poids moyen :

Une pesée individuelle de toutes les poules est effectuée à J7, Le poids moyen de chaque lot est calculé.

#### 1.2) Gain de poids :

La moyenne des gains de poids est calculée pour chaque lot après obtention des poids à J6. Le gain de poids est calculé pour chaque oiseau (= poids à J7 – Poids initial), et la moyenne calculée par la suite.

#### 1.3) Indice de consommation :

L'indice de consommation (IC) est le rapport de la consommation alimentation sur la croissance. IC = quantité d'aliment ingérée par lot/gain de poids total pour chaque lot

## 10- Paramètres cliniques et lésionnels :

### 2.1) Notation de la morbidité :

La morbidité est notée quotidiennement de J6 à J8, selon le barème présent dans le tableau.

Après être entré dans l'animalerie, l'observateur se tient immobile dans la salle jusqu'à ce que les oiseaux reprennent un comportement non influencé par sa présence. L'examen porte sur une cage de chaque lot.

|   |   |
|---|---|
| 0 | Attitude normale des animaux  |
| 1 | Plumes ébouriffées (surtout celles du cou)  |
| 2 | Débuts de frilosité et de prostration   |
| 3 | Frilosité et prostration marquées animaux apathiques                              |
| 4 | Position en boule des animales ailes tombantes station debout pénible yeux fermés |

### 2.2) Taux de mortalité

Un suivi matin et soir est effectué durant tout l'essai afin de noter et récupérer les sujets morts.

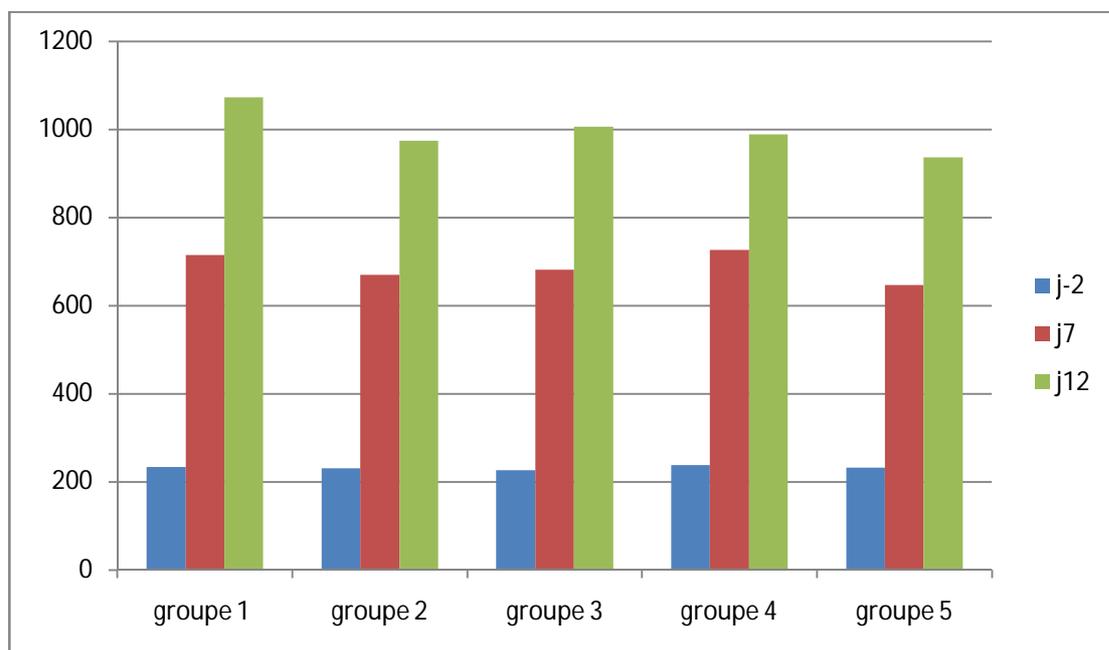
Taux de mortalité par lot = (nombre de morts par lot / effectif de départ dans chaque lot) X100.

# **Résultats & Discussion**

1. les poids moyens enregistrés a j-2, j7 et j12 sont illustrés dans le tableau suivant :  
Tableau (3)

|          | J-2    | J7     | J12     |
|----------|--------|--------|---------|
|          | M      | M      | M       |
| Groupe 1 | 234.04 | 714.20 | 1072.75 |
| Groupe 2 | 230.58 | 669.87 | 973.58  |
| Groupe 3 | 226    | 681    | 1006.41 |
| Groupe 4 | 238.12 | 726.04 | 988.54  |
| Groupe 5 | 231.70 | 645.70 | 936.25  |

M : moyenne



**Figure (14) :** les poids moyens de chaque lots à j -2, j7 et j12

2. les gains de poids moyens, alimentation ingérée moyenne de chaque lot ainsi que l'indice de consommation a j7 et j12 sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau ( 4) :

|          | J 7    |        |      | J 12   |        |      |
|----------|--------|--------|------|--------|--------|------|
|          | GPM    | AIM    | IC   | GPM    | AI     | IC   |
| Groupe 1 | 480.16 | 819.91 | 1.7  | 825.16 | 1224.9 | 1.48 |
| Groupe 2 | 430.95 | 801.12 | 1.85 | 743.91 | 1198.8 | 1.61 |
| Groupe 3 | 456.34 | 796.04 | 1.74 | 781.33 | 1201.7 | 1.53 |
| Groupe 4 | 430.47 | 780.41 | 1.81 | 750.63 | 1187.1 | 1.58 |
| Groupe 5 | 405.66 | 774.04 | 1.9  | 706.52 | 1177.6 | 1.66 |

GPM : gain de poids moyen

AIM : alimentation ingérée moyenne de chaque lot

IC : indice de consommation

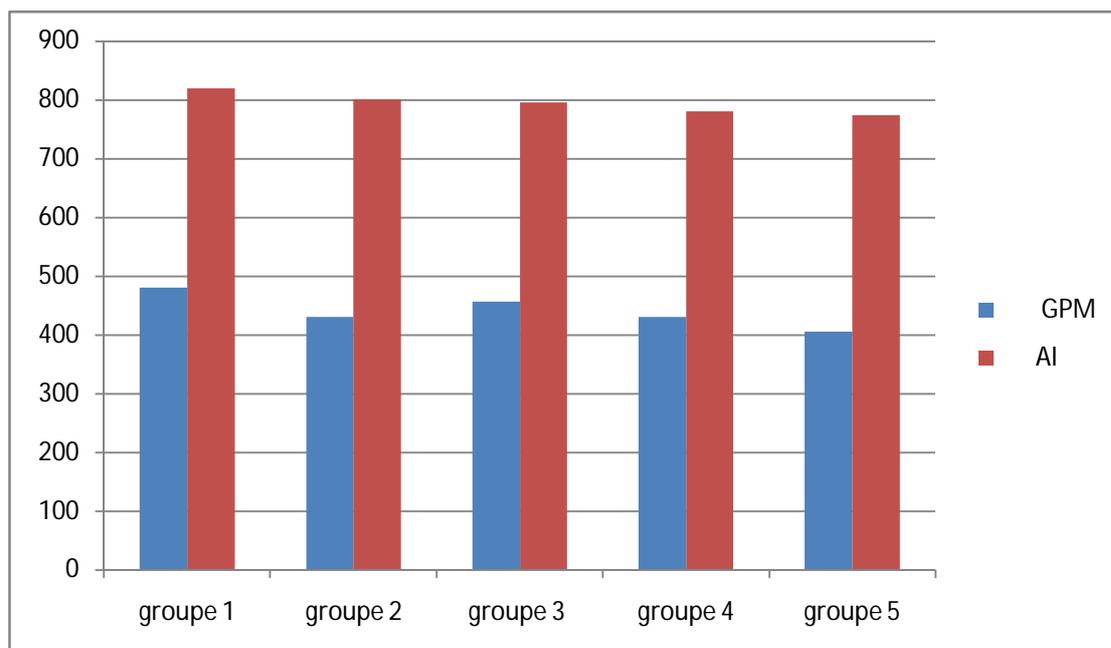
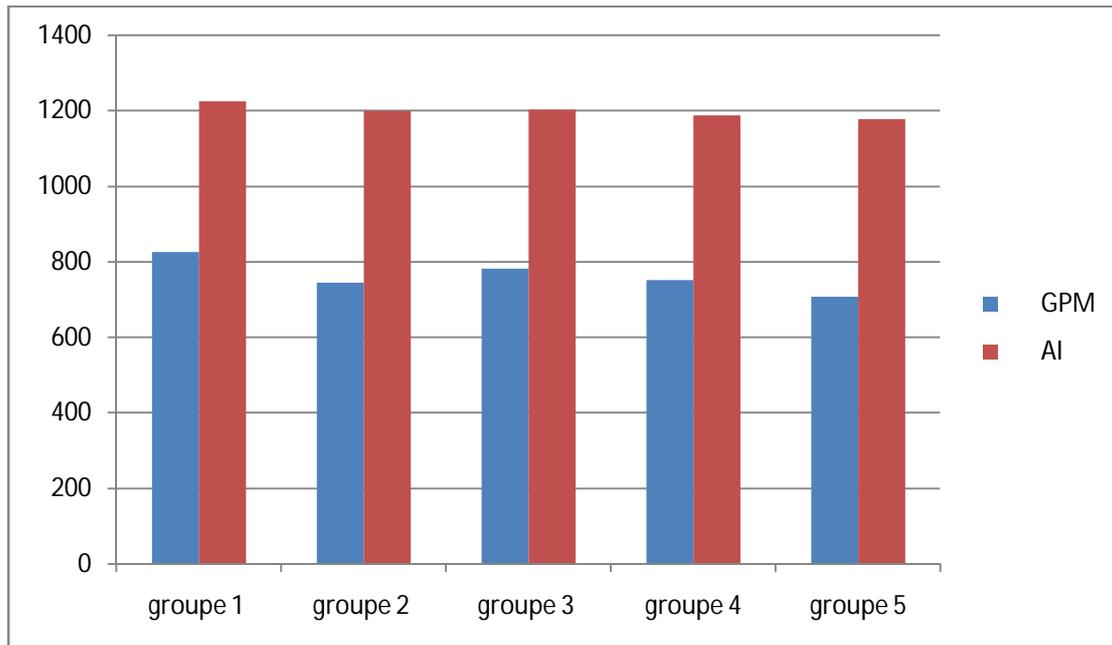
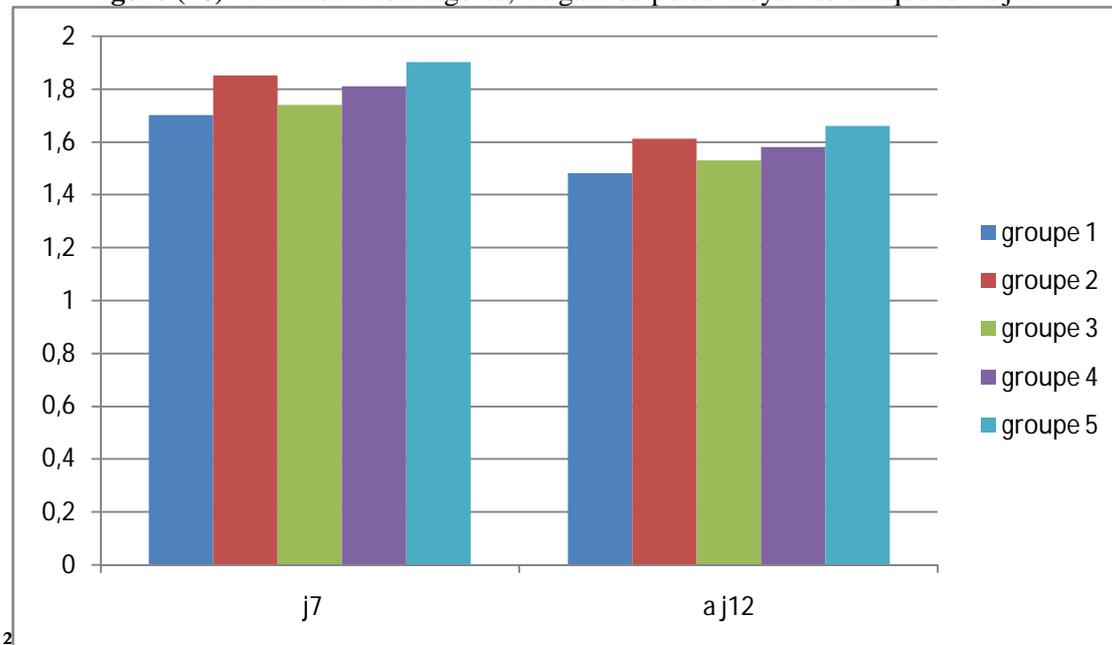


figure (15) : l'alimentation ingérée, le gain de poids moyen de chaque lot a J7



**figure (16) :** l'alimentation ingérée, le gain de poids moyen de chaque lot a j12



**figure (17):** l'indice de consommation de chaque lot a j7 et j 12

3. taux de morbidité et de mortalité :

Aucun signe clinique ni mortalité n'a été enregistrés durant l'expérience

**Discussion :**

d'après les résultats obtenus concernant les poids moyens enregistrés j-2 nous avons constatés que tous les groupes présentés presque les mêmes poids et il n y avait pas de grande différence et cela nous confirme la bonne croissance et uniformité des différents groupes avant de recevoir les différents traitements , alors que a partir de j7 et surtout a j12 on a constatés une différence entre les poids moyens enregistrés , ainsi le groupe 05 présenté le poids le plus faible suivi par groupe 02,04 et 03, alors que le groupe contrôle présenté le meilleure poids cela peut être expliquer par le fait que le groupe 05 a reçu la plus grande dose de vaccin anticoccidien ainsi que la plus grande dose bactérienne , la même chose a été constaté concernant le gain de poids moyen a j 7 et a j12

on se qui concerne l' indice de consommation le groupe 05 a présenté la plus grande valeur a j 7 ainsi qu' a j12 suivi par le groupe 02,04 et 03 alors que le groupe contrôle a présentée l'indice de consommation le plus faible cela explique que les fortes doses utilisées on induit une baisse de performance.

**Conclusion :**

Notre étude a démontré que l'utilisation d'une over dose (20 fois la dose) du vaccin anticoccidien comme facteur favorisant et une dose de  $10^9$  CFU/ml de clostridium perfringens peuvent être utilisés afin d'induire une entérite nécrotique sub-clinique.

# **Références**

# **Bibliographiques**

## Références bibliographiques

- 1. Al-sheikly F ; et Al-Saieg, 1980** : Role of coccidia in the occurrence of necrotic enteritis of chickens. Avian Diseases..24,324,333.
  
- 2. Al-shiekly f., et Truscott R.B., 1976** :The pathology of necrotic enteritis of chickens following infusion of crude toxins of *Clostridium perfringens* into the duodenum.21,241-255. Avian Dis.21,241-255.
  
- 3- Al-Sheikly F., Truscott RB., 1977a** ;The pathology of necrotic enteritis of chickens following infusion of broth cultures of *Clostridium perfringens* into the duodenum. Avian Dis.21,230-240.
  
- 4- Al-Sheikly F., Truscott RB., 1977b**;The interaction of *Clostridium perfringens* and its toxin in the production of necrotic enteritis of chickens. Avian Dis 21(2):256-63.
  
- 5- Apalajahti J.H.A., Sarkilahti L.K., Maki B.R.E., Heikinen J.P, Nurminen P.H., et Holben William E., 1998**;“Effective Recovery of Bacterial DNA and percent-Guanine-Plus-Cytose-Based. Analysis of community Structure in the Gastrointestinal Tract of Broiler Chickens” Applied and Environmental Microbiology.  
  
p.4048-4048. Vol.64.No.10.
  
- 6. AWWAD M.H.H. Afify M.A., ZoualFakar S.A., Shalaby B., Chevaux E.; Delforge J., Dusset L., Khetoum M.; 2005**. Effet de l’addition de *pediococcus acidilactici* sur l’infection à *Escherichia coli* et sur la colonisation par *Clostridium perfringens* et *Salmonella typhimurium* chez le poulet. Sixième journée de recherche avicole.
  
- 7. Baba E. Fuller A.L ; Gilbert .JM.. Thayer S.G.; McDougald I.r.. 1992**: Effects of *Eimeria brunetti* infection and dietary zinc on experimental induction of necrotic enteritis in broiler chickens. Avian Dis. 36,59-62.
  
- 8. Barnes H.J.; Wages D.P.. Qpengart k.. Dohms J.E.. 2003** ; Diseases of poultry 11 th edition. United states Iowa, Blackwell publishing professional ; 775-791.

- 9.Branton S.L .;Reece F.N; Hgler Jr.;W.M.;1987** ;Influence of a wheat diet on mortality of broiler chickens associated with necrotic enteritis.Poult.Sci. 66,1326-1330.
- 10.Branton S.L.;Lott B.D.; Deaton J.W.; Martin W.R.; Autin F.W.; Pote L.M.;Keirs RW.;LatourM.A.;Day E.J.;1997**; The affect of added complex carbohydrates or added dietary fiber on necrotic enteritis lesions in boiler chickens. Poult.Sci.76,24-28.
- 11.Brugère –picoux .;J.,Silim A.;1992**; Clostridioses aviaires. In; Manuel de pathologie aviaire. EdsBrugère-Picoux J.et Silim A. ; Imprimerie du cercle des élèves de l'ENV d'Alfort.Paris. France.pp 257-260.
- 12Chalmers G. ;Bruce H.L. ; Toole D.L. ;Barnum D.A. ; et Boerlin P. :2007** ;Nécroticentéritispotential in a model system using *Clostridium perfringens* isolated from field outbreaks.Avian.Dis.51.834-839.
- 13.Collier C.T.;HofacreC.L.;PayneA.M.;Anderson D.B.;Kaiser.P.;Mackie.R.I; Gaskins H.R.;2008**; Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis by supporting *Clostridium perrfingens* growth. Veterinary immunologie and immunopathology 122; 104-115.
- 14.Dahiya J.P.;Hoehler D.;WilkieD.C.;Vankessel A.G.; et drew M.D.;2005**; Dictary Glycine concentration affects intestinal *Clostridium perfringins* and lactobacilli population in boiler chickens. Poult. Sci.84:1875-1885.
- 15.Daube G.;1992** : *Clostridium perfringins* et pathologies digestives. Ann.Med.Vet.136 :5-30
- 16.Doucet R. ;1999** ; Enterite nécrotique des volailles de chair. Des pistes pour contrer sa recrudescence. Semaine Vétérinaire. 948.
- 17.Fuller, R. ;1999** : **Probiotics for farm animals. In :Tannock. G.W. (Ed).Probiotics: A Critical Review.** Horison scientific Press.Wymondham.UK.pp.15-22.
- 18.GholamiandekhordiA.R.;et al. 2006**: Moléculair and phénotypical characterization of *clostridium perfringins* isolates from poultry flocks with different disease status. Vet.Microbiol.113.143.152.
- 19.Gholamiandekhordi A.R.;et al. 2007** : quantification of gut in a subclinical necrotic enteritis model. Avian.36,375\_382
- 20.Grave K, Kaldhusdal M; Kruse H; Harr L.M.F .; Flatlandsmo K ;30 January 2004**; What has happened in Norway after the ban of avoparcin ? consumption of antimicrobials by poultry , .preventive veterinary medicine . volume 62 Number 1 . pp. 59-72 (14 ).
- 21.Hamdy A.H Thomas R.W ., Kratzer D.D .,et Davis R.B .,1983** : lincomycin dose response for treatment of necrotic enteritis in broilers . Poult.Sci .62: 585-588.

- 22.Hofacre C.,2000** ; necrotic enteritis affects modern broiler production .feedstuffs 77 (10) .
- 23.Johansson K.R . SarlesW.B ,1948** :Bacterial population changes in the ceca of young chickens infected with *Eimeriatenella* .J Bacteriol ; 56 (5) :635-47
- 24.Kaldhusdal M .,Skjerve E., 1996** ; association between cereal contents in the diet and incidence of necrotic enteritis in broiler chickens in Norway .prev . vet . Med .28 ,1\_16
- 25. Kenny M., et Oct 2003** :“Nutrition and litter quality “ *courtesy of poultry word* .
- 26. Kulkarni R.R ., Parreira V.R Sharif S ., Prescott J.F ., 2006** : *clostridium perfringens* antigens recognized by broiler chickens immune to necrotic enteritis . clin. Vaccine immunol. 13, 1358-1362
- 27.long J.R .Truscott R.B .1976** : Necrotic enteritis in broiler chickens  
3.reproduction of the disease. Can .J.comp. med. 40.53-59
- 28.lu J ., Hofacre C.L Lee M.D . 2006** : Emerging technologies in microbial ecology aid in understanding the complex disease Necrotic enteritis .J Appl. Poultry .Res .15. 145-153 .
- 29. Martin T.G ,et Smyth J.A 2010**: the ability of disease and non disease producing strains of *clostridium perfringens* from chickens to adhere to extracellular matrix molecules and Caco -2 cells. *Anaerobe*,16,533-539 .
- 30. OlkowskiA.A ., et al ., 2008** : Sub-clinical necrotic enteritis in broiler chickens : novel etiological consideration based on ultra-structural and molecular changes in the intestinal tissue . Res .Vet .Sci .21.21
- 31.Parish ,W.E .1961**: Necrotic enteritis in the fowl (*Gallus gallusdomesticus* ) .1. histopathology of the disease and isolation of a strain of *Clostridium welchii*. J. comp. pathol.71,377-393.
- 32.Pressman B.C ., 1976** : Biological application of ionophores .Ann , biochemn 45.501
- 33.Rivière B.A ., 2008** : *Clostridium Perfringens* , un nouveau défé sanitaire pour la production avicole . Billetn des GTV (43) ; 49-55

- 34. Shane S.M ., 2004** : update on the poultry disease situation in the USA . *poult .Int* .43.10-15
- 35. Shivaramaiah S ., Wolfenden R.E ., Barta J.R ., Morgan M.J ., Wolfenden A.D Hargis B.M . Téllez G ., 2011 jun** : *Avian dis* 55(2): 319-23 .
- 36. Thompson ,D.R Parreira V.R . Kulkarni R.R ., et Prescott J.F .2006** :live attenuated vaccine-based control of necrotic enteritis of broiler chickens. *Vet. Microbiol.*113,25-347
- 37. Tice George ., 2002** : “ Clostridial proliferation and intestinal instability “ *Elanco Globalenteritis Symposium* \_ Cambridge , UK .
- 38. Van der Sluis W., 2000** : Clostridial enteritis \_ a syndrome emerging worldwide. *World poultry* . 16 (5) : 56-57 .
- 39. Veron M ., Le Minor L., 1989** : Clostridium , *Bactériologie médicale* end édition , p 1107.
- 40. Wade B .Keyburn A.L ford M.E . Rood J.I et Moore R.J. 2010** : clostridium perfringens genes with implication for both virulence and colonization during necrotic enteritis . *In proceeding of the prato Conference on the pathogenesis of Bacterial Disease of Animals* .Prato .Italy .72.
- 42. Wilker R.I ., Hirsch D.C .? Maclachlan N.J .2004** : Clostridium , *Veterinary microbiology end edition* .535p
- 43. Wierup M.,2005** : “ l’expérience suédoise quant a la restriction de l’utilisation d’antimicrobiens “ . *Words of poultry science journal* ,volume 61 , Number 1 pp 95-104(10) .
- 44. Williams R.B ,2005** : *intercurrence coccidiois and necrotic enteritis of chickens rational ,integrated disease management by maintenance of gut integrity* . *Avian pathology* . 34; 159-180.