



UNIVERSITE DE LIEGE
FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE
DEPARTEMENT DES SCIENCES CLINIQUES
SERVICE DE MEDECINE DES OISEAUX, LAGOMORPHES ET RONGEURS

**Analyses bactériologiques traditionnelles et moléculaires de
l'inoculum de référence de l'entéropathie épizootique du
lapin (TEC4) et de ses fractions.**

Nathalie HUYBENS

**MEMOIRE PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME
D'ETUDES APPROFONDIES EN SCIENCES VETERINAIRE
ORIENTATION MEDECINE VETERINAIRE**

ANNEE ACADEMIQUE 2006-2007

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier mon promoteur Didier Marlier pour l'aide qu'il m'a apporté dans l'orientation de mes travaux ainsi que pour le temps passé aux diverses et nombreuses corrections de ce mémoire.

Un grand merci également à Mihai Szalo qui a su m'aiguiller dans la recherche et l'interprétation des résultats de biologie moléculaire.

Merci à Julien pour toutes les manipulations effectuées, on aura appris que rien ne fonctionne jamais du premier coup (ni même du second), surtout dans la recherche !

Je remercie également l'ensemble du service d'aviation : Aline, Anastassios, Charlie et Marc pour l'accueil et la bonne ambiance qui règnent ici.

Je n'oublie pas le service de bactériologie qui a supporté nos visites et nos questions incessantes ainsi que les « emprunts » de divers réactifs et matériel.

Un tout grand merci à Dominique Licois pour avoir effectué les inoculations dans ses installations

Il me reste à remercier tous ceux qui n'ont pas besoin d'être nommés pour se reconnaître :

- ma femme qui, pour des raisons qui m'échappent parfois, m'aide et me supporte, puissions nous continuer ainsi le reste de notre vie ;
- mes amis et co-locataires qui ont toujours l'art de remonter le moral ;
- ma famille pour leur approbation inconditionnelle dans tous ce que j'entreprends ;
- ma correctrice pour sa fructueuse chasse aux fautes d'orthographe.

Liste des abréviations

DMEM : Dulbecco Modified Eagle's Medium

EEL : Entéropathie Epizootique du Lapin

EOPS : Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques

GQM : Gain Quotidien Moyen

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PLA : Inoculum obtenu par adhérence de la fraction 50 % sur boîte de culture cellulaire vide

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

RIN : Dernier liquide de rinçage lors du fractionnement par adhérence cellulaire

RK13 : Lignée cellulaire de reins de lapin immortalisée

RK501 : Inoculum obtenu par adhérence de la fraction 50 % sur des cellules RK13 (un passage)

RK502 : Inoculum obtenu par adhérence de la fraction 50 % sur des cellules RK13 (deux passages)

RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

TEM1 : Contenu caecal de lapin EOPS traité comme le TEC, témoin négatif

TEM2 : Contenu caecal de lapin de compagnie non mort de pathologie digestive traité comme le TEC, témoin négatif

TEM3 : Contenu caecal de lapin d'élevage non mort de pathologie digestive traité comme le TEC, témoin négatif

TEC : Inoculum de référence de l'EEL, obtenu après dilution, centrifugation et filtration de contenu digestif de lapin malade.

TEC4 : 4^{ème} inoculum de référence, obtenu après 4 passages sur lapins.

Résumé

L'entéropathie épizootique du lapin est une pathologie du système digestif causant de lourdes pertes économiques à la cuniculture européenne. L'agent étiologique reste inconnu à ce jour mais un inoculum de référence (TEC4) permet de reproduire la pathologie. L'objectif de ce travail est de mettre en évidence une bactérie ou une séquence d'ADN bactérien spécifique à cet inoculum. Les espèces bactériennes présentes dans cet inoculum ont été séparées par centrifugation sur gradient de sucrose suivi ou non d'un tri par adhérence sur culture de cellules. Ces fractions adhérentes aux cellules de reins de lapins permettent de reproduire la pathologie par inoculation sur lapins sensibles. Les analyses bactériologiques classiques et bactérioscopiques des fractions permettent de mettre en évidence une sélection de la flore au cours des fractionnements. L'analyse par Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) des différentes fractions avec l'enzyme Acc I permet de mettre en évidence une bande d'intérêt spécifique aux inoculums reproduisant la maladie.

Mots clés : EEL, fractionnement, bactériologie, restriction, profil

Abstract

Epizootic rabbit enteropathy is a digestive disease that induces huge economic losses in European rabbit production units. Its aetiology is still unknown but a reference inoculum (TEC4) can reproduce the pathology. The aim of the study is to find a bacteria or a bacterial DNA sequence specific to this inoculum. The bacterial species found in TEC4 were separated by centrifugation on discontinuous sucrose gradient followed or not by a cellular adhesion sorting. The rabbit kidney cells adhering fractions can reproduce the pathology by inoculation on sensitive rabbits. The classical bacteriological and bacterioscopic analyses show a variation and a selection of the flora in the course of the fractionation. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis with Acc I show a specific pattern for the fraction able to reproduce the pathology.

Keywords : ERE, fractionation, bacteriology, restriction, profil

Introduction

La cuniculture

Le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*), à l'inverse de nombreuses espèces d'animaux de rentes, n'a été domestiqué que tardivement. Les premiers rapports de reproduction en captivité datent de la fin du Moyen-Âge mais, les gourmets de l'époque préférant le lapin sauvage ou de garenne au lapin d'élevage (Lebas, sans date), l'essor de l'élevage rationnel a réellement commencé à la fin du 19^{ème} siècle. Au siècle dernier, des sociétés d'élevage sont créées, des races mutantes non adaptées à la vie sauvage sont sélectionnées (Lebas, *et al.*, 1997). En Belgique, plusieurs races locales sont créées telles que le Géant des Flandres, le Bleu de Beveren, le Blanc de Termonde,... (Filière avicole et cunicole, sans date).

Dès les années 50, les petits élevages et les élevages familiaux ont tendance à disparaître suite à l'apparition de la vente de viande congelée et surtout à cause de l'épidémie de myxomatose. Les éleveurs professionnels sont sortis plus ou moins indemnes de cette crise, essentiellement grâce à la vaccination efficace de leur cheptel (Lebas, sans date). Alors que l'industrialisation de l'élevage prend forme vers la fin des années cinquante, les races locales sont remplacées par deux races importées des Etats-Unis : le Néo-Zélandais blanc et le Californien dont la conformation des pattes est plus adaptée au grillage des cages et dont la productivité est supérieure. Les progrès en management et en automatisation des années septante permettent aux éleveurs de gagner du temps sur le nettoyage et l'alimentation. Ayant plus de temps pour s'occuper des animaux, ils mettent en place le sevrage précoce et un hybride néo-zélandais/californien (Lebas, *et al.*, 1997). Dans les années quatre-vingt, quelques grosses unités de productions comportant environ 500 femelles voient le jour en Belgique (Filière avicole et cunicole, sans date). Leur gestion est facilitée par l'insémination artificielle rendue possible par la synthèse d'analogue de la GnRh. La conduite en bandes est mise en place dans beaucoup d'élevages permettant l'égalisation des tailles des portées par adoption des nouveaux-nés (Bolet, 1998).

La consommation annuelle mondiale de viande de lapin est de 280g par personne. Une grande variation est remarquée en fonction des pays, de 30g par an et par personne au Japon à 8,8kg par an et par personne à Malte. La viande de lapin est soumise à très peu d'interdits religieux mais, le lapin étant de plus en plus considéré comme un animal de compagnie, sa consommation n'est plus aussi appréciée que par le passé. Vingt pays produisent plus de 80 % de la production mondiale (Lebas, *et al.*, 1997). L'Europe latine est le plus grand producteur et consommateur, l'Italie en tête avec une

production de 300 000 tonnes et une consommation annuelle de 5,71 kg par habitant. La Belgique reste le douzième plus grand producteur avec 24 000 tonnes de carcasses par an (Lebas, *et al.*, 1997) grâce à ses 240 000 femelles reproductrices (Filière avicole et cunicole, sans date). La production interne n'étant pas suffisante pour la consommation (5^{ème} mondial) la Belgique importe de la viande de lapin. Les importations proviennent surtout de Hongrie et de Chine (respectivement 95 et 40 % de leur production étant destinée à l'exportation).

La consommation de viande de lapin, bien qu'en déclin, reste encore élevée surtout dans les pays d'Europe latine. Il en est de même pour la recherche scientifique, la moitié des communications du 8ème Congrès Mondial de Cuniculture (Puebla - Mexique - Septembre 2004) provenait d'équipes italienne, française et espagnole ! La production belge actuelle est, comme en France, répartie entre les élevages industriels et « artisanaux ». Ces derniers sont relativement difficiles à quantifier mais représentent une portion non négligeable de la production, un quart à un tiers en Belgique (Colin et Lebas, 1995). Malheureusement la production cunicole et spécialement la production vivrière est en déclin dans nos pays ce qui risque d'entraîner une augmentation des importations.

Apparition de l'Entéropathie Epizootique du Lapin (EEL)

Fin de l'année 1996, début 1997, les premiers cas d'une nouvelle pathologie digestive apparaissent en France en Poitou-Charentes (Duval, 1998). A l'époque, la maladie est improprement appelée entérocolite épizootique du lapin. Certains chercheurs utilisent encore ce terme aujourd'hui, alors qu'en l'absence de complication bactérienne secondaire, une des caractéristiques de cette pathologie est l'absence de signe d'inflammation macroscopique et microscopique notamment du tractus digestif (Licois, 1998, Marlier et Vindevogel, 1998, Dewrée, *et al.*, in press). En moins d'un an, l'entéropathie épizootique (EEL) se répand un peu partout en Europe de l'ouest. Il est difficile d'évaluer la proportion des élevages touchés par cette pathologie car il existe peu d'études épidémiologiques. En Angleterre, 13 éleveurs sur 17 ayant répondu au questionnaire du *British Commercial Rabbit Association*, prétendent avoir relevé les symptômes d'entéropathie dans leur élevage depuis janvier 1996 (Jones et Duff, 2001). En France, 95 % des élevages ont été ou sont actuellement touchés par l'EEL (Jacquinet, *et al.*, 2001). Il est certain que l'Angleterre, les Pays-Bas, l'Allemagne, la Belgique, la France, l'Italie, la Hongrie et l'Espagne sont touchés de manière importante.

La situation épidémiologique s'aggrave en 1999, lorsque la bacitracine de zinc, seul antibiotique relativement efficace pour contrôler les signes cliniques de l'EEL, est interdite

d'utilisation chez les animaux destinés à la consommation humaine. Aujourd'hui, à nouveau disponible sur le marché belge, la bacitracine est autorisée en France, en Espagne et aux Pays Bas comme substance médicamenteuse et traitement de l'EEL. Elle est interdite en Italie et en Hongrie.

Description de la maladie

Les animaux touchés sont, principalement, ceux âgés de 6 à 14 semaines (Marlier et Vindevogel, 1998) mais des cas ont été décrits chez des animaux plus jeunes (Boisot, *et al.*, 2005) et plus âgés, notamment parmi le cheptel reproducteur (Licois, *et al.*, 2000). Les lapins sauvages ne semblent pas touchés contrairement à d'autres pathologies spécifiques du lapin comme la myxomatose et la maladie hémorragique virale. Les signes cliniques retenus pour l'identification de l'EEL en élevage sont : une mortalité importante (30 à 80 %) chez des animaux âgés de 6 à 14 semaines, précédée d'une chute de consommation d'aliment et d'eau ainsi que des ballonnements et bruits d'eau (Duval, 1998). Des symptômes plus inconstants peuvent être retrouvés, comme des impactions caecales, des faibles diarrhées et l'excrétion de mucus.

La confirmation de la suspicion d'EEL s'obtient à l'autopsie. Les lésions retrouvées sont une dilatation de tout le tractus digestif y compris de l'estomac (Duval, 1998, Marlier et Vindevogel, 1998). Le contenu digestif est souvent anormalement liquide. Le contenu caecal peut être liquide ou impacté. La présence d'une grosse quantité de mucus peut être remarquée dans le colon voir moins fréquemment dans l'intestin grêle (Coudert, *et al.*, 1997). En l'absence de surinfection, aucun signe d'inflammation n'est remarqué (Licois, 1998) contrairement aux autres pathologies digestives du lapin (Marlier, *et al.*, 2003a). L'EEL est également la seule pathologie dans laquelle une atteinte de l'estomac est systématique. De manière irrégulière, certaines lésions microscopiques peuvent être retrouvées au niveau intestinal, par exemple : des infiltrations leucocytaires de la *tunica muscularis*, la présence de cellules apoptiques et de débris nucléaires, un atrophie des villosités, un amincissement de la paroi,... (Licois, 1998, Licois et Coudert, 1999, Dewrée, *et al.*, in press). Une forte présence de mucus et de bactéries est mise en évidence après coloration à l'hématoxyline et éosine. Au microscope électronique à transmission des bactéries intra cytoplasmique et intercellulaire de type gram - peuvent être mises en évidence (Dewrée, *et al.*, in press).

Sur le terrain, l'EEL s'observe souvent conjointement à d'autres pathologies. En effet, elle perturbe grandement l'équilibre de la flore digestive du lapin (Dewree, *et al.*, 2003). Une augmentation du nombre d'*Escherichia coli* et de *Clostridium* spp est régulièrement remarquée chez les lapins atteints. En ce qui concerne les *Clostridium*, les seules toxines retrouvées sont les toxines de type A et C (Dewree, *et al.*, 2003, Marlier, *et al.*, 2006), responsables d'entérite nécrotique chez la

volaille et le porc. En plus de perturber l'équilibre de la flore bactérienne, l'EEL augmente l'excrétion des coccidies (Coudert, 2003, Marlier, *et al.*, 2006) pathologie fréquente chez le lapin (Marlier, *et al.*, 2003a), avec lesquels elle agit en synergie, entraînant une mortalité plus élevée (Coudert, *et al.*, 2000a). Le diagnostic final de l'EEL n'est donc pas évident sur le terrain. Il repose essentiellement sur l'aspect épidémiologique dans l'élevage, l'observation des lésions typiques chez un grand nombre d'individus et l'absence d'isolement d'agent pathogène digestif primaire du lapin (Marlier et Vindevogel, 1998).

Dès le début de l'épidémie, l'EEL a montré une forte contagiosité (Duval, 1998, Le Gall, *et al.*, 1998, Boisot, *et al.*, 2005). Cette observation a vite permis d'éliminer les causes non biologiques comme étiologie de la pathologie. Il a été démontré que l'agent peu survivre jusqu'à 3 à 4 mois dans l'aliment (Licois, *et al.*, 2000), le rôle vecteur de celui-ci est soulevé par plusieurs auteurs (Licois, *et al.*, 2000, Jobert, *et al.*, 2001, Duperray, *et al.*, 2003).

L'enquête de Larour (2004) a permis d'évaluer les facteurs de risques en élevage. La conduite en bande multiple qui entraîne le contact avec des animaux d'âges différents, le transfert des lapereaux au sevrage, l'alimentation *ad libitum*, l'atteinte de l'élevage par de la pasteurellose chronique, des traitements antibiotiques systématiques ont été reconnu comme des facteurs de risques majeurs. A l'inverse, le lavage des mains de l'éleveur entre la maternité et l'engraissement, une densité faible d'animaux (< à 17 lapins/m²) et le transfert des lapines plutôt que des jeunes au sevrage semblent être des facteurs de protection.

Aucun traitement ne permet la disparition totale de l'EEL d'un élevage infecté. Les deux seuls antibiotiques permettant un contrôle de la pathologie sont la bacitracine (Duperray, *et al.*, 2003, Boisot, *et al.*, 2004, Maertens, *et al.*, 2005) et la tiamuline (Coudert, *et al.*, 2000b, Licois, *et al.*, 2000). Dès l'arrêt de ces traitements, les mortalités reprennent (Maertens, *et al.*, 2005). L'addition d'un immunostimulant (MacroGard) entraîne une meilleure réponse au traitement antibiotique, même si, utilisé seul, il n'a aucun effet sur la mortalité et la morbidité (Coudert, *et al.*, 2000b). Le traitement de la coccidiose est un point important dans le contrôle de la mortalité (Coudert, *et al.*, 2000a).

L'utilisation systématique de bacitracine permet d'éviter l'apparition de signes cliniques (Richard, *et al.*, 2000, Boisot, *et al.*, 2004) mais est peu recommandée que ce soit au niveau du coût que des réglementations européennes. Le plus important est d'éviter les facteurs de risque décrits par Larour (2004), de respecter les mesures d'hygiène élémentaire et de traiter toute pathologie sous jacente, spécialement la coccidiose. Une immunisation après infection a été décrite par Boisot (2005), de même qu'une transmission d'immunité de la mère au jeune. L'observation d'un élevage infecté et non traité permet de mettre en évidence cette immunité. En effet, les jeunes semblent être immunisés

pendant les deux premières semaines post sevrage, peu importe l'âge auquel celui-ci a lieu (Macchioni, *et al.*, 2000). Rochambeau et collaborateurs (2006) quant à eux ont démontré une corrélation entre les animaux résistants à l'EEL et leur origine génétique. Bien que ce lien statistique ait été confirmé par Garreau et collaborateurs (2005), l'héritabilité de cette résistance semble faible. Une sélection génétique pour favoriser la résistance des lapins à l'engraissement serait possible mais ne semble actuellement pas être une solution réalisable en exploitation.

Lorsque la pathologie est reproduite sur des lapins exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS), le taux de mortalité est beaucoup plus faible que sur le terrain, 20 à 25 % au lieu de 30 à 80 %. Ceci pourrait s'expliquer par l'absence d'agents pathogènes opportunistes dans la flore de lapin EOPS, qui sont par contre, présents chez les lapins conventionnels (Licois, 1998, Marlier, *et al.*, 2006). Si les animaux sont immunodéprimés par des injections de corticoïde, le taux de mortalité post infection est semblable à celui du terrain. L'indicateur le plus intéressant pour juger la reproduction expérimentale est l'évolution du gain quotidien moyen (Licois, 1998). L'évaluation de celui-ci a permis de mettre en évidence une phase précoce de la maladie. Une chute du gain quotidien moyen (GQM) est remarquée dès 18h post inoculation. Il revient à la normale au deuxième ou troisième jour pour chuter à nouveau au jour 5. Lorsque l'inoculum est chauffé 10 minutes à 55°C, seule la phase précoce est retrouvée (Marlier, *et al.*, 2003b, Coudert et Licois, 2005).

L'entéropathie épizootique apparue en 1996 présente des ressemblances avec une pathologie décrite depuis la moitié du vingtième siècle : l'entéropathie ou entérite mucoïde. Cette pathologie touche essentiellement les animaux entre 7 et 10 semaines. Les symptômes sont : une profusion de mucus, une dilatation de tout le tractus digestif et une mortalité élevée (Badiola, *et al.*, 2000). L'entéropathie mucoïde sévit essentiellement aux Etats-Unis et en Angleterre, les cas sont plutôt de type sporadique et non épizootique comme l'EEL (Whitwell et Needham, 1996). Cette pathologie est également présente en Belgique (Peeters, 1989). Lors de l'apparition des premiers cas d'EEL en Europe, plusieurs chercheurs ont suspecté l'apparition de l'entéropathie mucoïde en Europe (Badiola, *et al.*, 2000, Guitan, *et al.*, 2000). Aujourd'hui, il est admis que ce sont deux pathologies différentes.

Aspect économique

En Belgique, les pertes économiques annuelles dues à l'EEL sont évaluées à plus de 10 millions d'euros (Dewree, *et al.*, 2003). Bien que le taux de mortalité semble diminuer (Macchioni, *et al.*, 2000) les éleveurs belges perdent en général, environ 10 % de leur cheptel à cause de l'EEL (De Hertefelt, communication personnelle).

Recherches effectuées à ce jour

Les premières exploitations touchées par l'EEL avaient comme point commun le même fournisseur d'aliments (Licois, *et al.*, 2005). C'est donc tout naturellement que la première hypothèse développée fut celle de l'intoxication alimentaire. Cette hypothèse fut contestée par différentes études, notamment celle de Lebas sur le rôle de l'aliment (1998) mais également par celle de Le Gall sur la reproduction du syndrome (1998). Une étiologie infectieuse de l'EEL est la conclusion de ces premiers travaux. La pathologie a pu être reproduite grâce à du contenu digestif de lapin malade (Le Gall, *et al.*, 1998, Licois et Coudert, 2003). Un inoculum de référence appelé « TEC » a été créé à partir de ces contenus digestifs (Licois et Coudert, 2003). Cet inoculum a été passé de manière successive sur lapins EOPS tout en conservant son pouvoir infectieux, donnant lieu à une succession d'inoculum caractérisé par leur nombre de passages (TEC1, TEC2, TEC3,...). Aujourd'hui en quatrième passage, l'un de TEC4 reproduit toujours la maladie par voie digestive (Licois et Coudert, 2005). Aucune autre voie d'infection n'a pu être démontrée à ce jour, à l'exception d'un essai à partir de broyat de poumon non confirmé par la suite (Licois et Coudert, 1999). Les tentatives d'inoculation à des souris n'ont pas permis de reproduire le syndrome (Marlier, communication personnelle).

L'hypothèse de l'agent étiologique viral fut envisagée ensuite. Les éléments favorables à cette hypothèse, étaient le développement épidémique de la maladie, l'inefficacité de la plupart des antibiotiques et la contagiosité élevée. Des particules virales ont été observées dans les intestins d'animaux malades mais l'inoculation de ces particules n'a pas permis la reproduction de la pathologie (Licois et Coudert, 1999). Des rotavirus sont présents chez 30 % des animaux de terrain et dans le TEC mais une fois isolés, ne reproduisent pas l'EEL (Marlier, *et al.*, 2003b). Une inoculation d'un TEC modifié, ne contenant plus de rotavirus a permis la reproduction de la pathologie (Szalo et Marlier, 2006). L'absence de calicivirus, pestivirus, circovirus, adénovirus, coronavirus et parvovirus dans le TEC a été démontrée par PCR ou RT-PCR (Licois, *et al.*, 2005). La cause virale a donc été abandonnée.

Les pathologies parasitaires ont été relativement vite écartées elles aussi. En effet, même si la présence de nombreuses coccidies est remarquée sur le terrain (Marlier, *et al.*, 2006), celles-ci sont absentes du TEC ; aucun examen direct ou par technique de flottaison ne permet de mettre en évidence des œufs de parasites (Licois et Coudert, 2003, Marlier, *et al.*, 2006).

La flore bactérienne présente dans le TEC est très riche en bactéries réagissant positivement à la coloration de Gram, il ne contient pas de *Clostridium spiroforme* ou *piliforme* (Licois, *et al.*, 2005) qui sont les agents pathogènes primaires du tractus digestif chez le lapin (Marlier, *et al.*, 2003a). En outre la flore colibacillaires tant entéropathogène que commensale est totalement absente. Aucune des espèces bactériennes isolées à partir du TEC ou d'animaux malades n'a permis de reproduire la pathologie (Marlier, *et al.*, 2003b, Marlier, *et al.*, 2006). L'agent serait donc une bactérie non cultivable ou tout au moins non cultivable sur des milieux conventionnels tant en aérobie qu'en anaérobie. La phase précoce de la pathologie peut être reproduite en chauffant le TEC 10 minutes à 55°C (Coudert et Licois, 2005), en le filtrant sur une membrane de 0,45µ (Marlier, *et al.*, 2003b), ou en inoculant le surnageant d'une centrifugation sur coussin de sucrose (Szalo, *et al.*, 2006). Cette phase précoce serait vraisemblablement due à une toxine.

Afin d'appauvrir la flore de TEC, Szalo (2006) a fractionné l'inoculum sur un gradient de sucrose. Cette manipulation sera le point de départ de l'étude abordée dans ce mémoire.

Objectifs de la recherche

Les tentatives de mise en évidence de l'agent par des méthodes de bactériologie classique ne se sont pas révélées concluantes. La bactérie responsable semblant être une bactérie non cultivable sur milieux ordinaires et la flore du TEC étant relativement complexe, une étude moléculaire semble la plus appropriée. Le but de la recherche est d'obtenir une séquence nucléotidique caractéristique de l'EEL clinique. Cette séquence devra se retrouver la plupart du temps dans le TEC, ses différentes fractions reproduisant la pathologie et chez les animaux malades. Elle devra être absente des fractions de TEC ne reproduisant pas la pathologie ainsi que chez les lapins sains. Au départ de cette séquence une espèce bactérienne sera identifiée puis isolée afin d'être « *in fine* » réinoculée à des animaux sensibles pour vérifier le premier postulat de Koch.

Dans un premier temps, un fractionnement du TEC est nécessaire. Le nombre d'espèces bactériennes présentes sera réduit, ce qui facilitera la mise en évidence d'une ou plusieurs séquence(s) d'intérêt. Pour ce faire, nous utiliserons la centrifugation sur gradient discontinu de sucrose développé par Szalo et collaborateurs (2006) suivie par un test d'adhérence sur tapis cellulaire (Szalo et Marlier, 2006). Ce test a été choisi pour sélectionner au maximum les bactéries pathogènes, en effet, celles-ci sont généralement capables d'adhésion (Niemann, *et al.*, 2004). Dans un second temps, des profils de restrictions seront réalisés sur les différentes fractions reproduisant ou non la pathologie. Les séquences présentes dans les fractions infectieuses mais absentes des autres seront séquencées,

analysées dans des bases de données nucléotidiques et recherchées sur des lapins d'élevage atteints ou non d'EEL.

L'établissement d'un lien statistique entre la présence de la séquence d'intérêt et la présence de la pathologie permettra de mettre en place un test de diagnostique, une étude facilitée des mises en cultures du TEC et ouvrira des perspectives intéressantes dans l'étude de la pathologie.

Matériel et méthode

Fractionnement sur gradient discontinu de sucrose

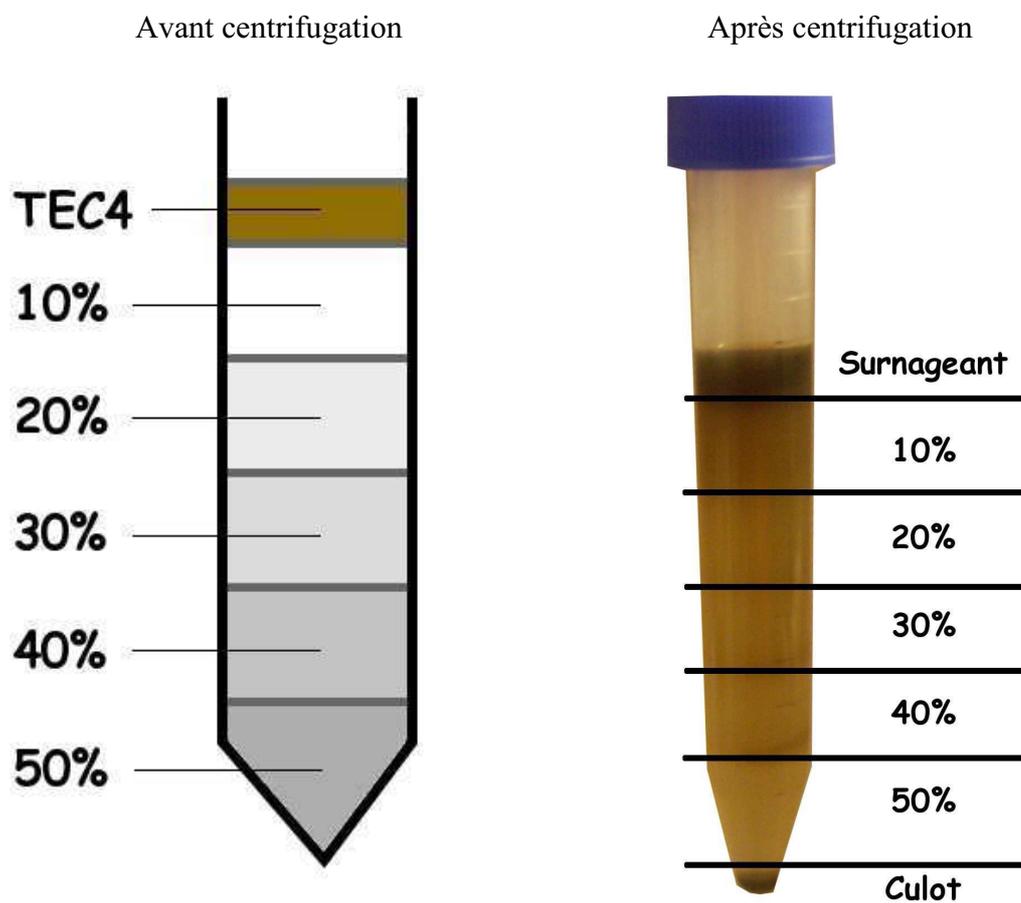
TEC 4 a été fractionné en suivant la méthode développée par Szalo et collaborateurs (2006) sur coussin de sucrose. Cinq solutions de sucrose (10 %, 20 %, 30 %, 40 % et 50 % poids / volume) ont été préparées dans de l'eau distillée puis filtrées au travers d'une membrane de 0,2 µm. Les différentes solutions sont délicatement superposées dans un tube de 15 ml, les fractions les plus denses en dessous. Un millilitre de TEC4 est déposé par-dessus. Le tube est ensuite centrifugé à 1780 g pendant 20 minutes à 4°C. Les fractions surnageant, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % et culots (figure 1) sont séparées. Elles sont ensuite centrifugées à 20 000 g pendant 3 minutes à 4°C. Les surnageants sont jetés et les culots suspendus dans 2 ml de NaCl à 0,09 % pour être lavés par centrifugation (20 000 g, 3 min, 4°C). Les culots sont re-suspendus dans 0,5 ml de NaCl à 0,09 % afin que la concentration initiale en bactéries soit analogue à celle du départ.

Fractionnement par adhérence cellulaire

Des cellules de la lignée RK13 sont cultivées de manière classique dans du Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) supplémenté de 5 % de sérum fœtal de veau, 100 000 UI/l de pénicilline, 100 mg/l de streptomycine, 0,1mM d'acides aminés non essentiels et 2,5 mg/l de piramicine, à 37°C sous 5 % CO₂

Pour le fractionnement par adhérence cellulaire, une boîte de culture de RK13 de 75 cm² à confluence est utilisée. Vingt-quatre heures avant l'inoculation, le milieu de culture est remplacé par du DMEM, sans antibiotique, afin d'éviter toute action anti-microbienne sur le TEC. Après 24h, le milieu est retiré entièrement et 1 ml de la fraction 50 % est inoculé sur le tapis cellulaire. Après 4h

Figure 1 : Visualisation des différentes fractions de la centrifugation sur gradient discontinu de sucrose



d'incubation à 37°C, l'inoculum est aspiré et le tapis cellulaire est rincé trois fois au PBS stérile afin d'éliminer les bactéries non adhérentes. Les cellules et les bactéries adhérentes sont raclées et suspendues dans 1 ml de milieu de culture sans antibiotique puis congelées afin d'éclater les cellules eucaryotes. L'inoculum obtenu est dénommé RK501.

Un second passage identique est alors réalisé avec la fraction RK501 décongelée, permettant d'obtenir la fraction RK502. Le dernier liquide du rinçage (2 ml) au PBS stérile est gardé comme témoin (RIN). Un fractionnement témoin a été réalisé sur des boîtes de cultures cellulaires vides traitées exactement de la même façon. Un seul passage a été effectué pour réaliser la fraction « PLA ».

Afin de visualiser les bactéries adhérentes, des cellules RK13 ont été cultivées sur des lames compartimentées (Lab-tek™) et inoculées dans les mêmes conditions. Elles ont été observées au microscope après fixation de 12h à -20°C dans une solution d'acétone/éthanol (1/1) et coloration de gram et Hemacolor®.

Inoculation des fractions de TEC sur lapins sensibles

Les inoculations ont été réalisées en collaboration avec l'unité de recherche d'Infectiologie Animale et Santé Publique de l'Institut National de Recherche Agronomique à Tours. Pour la première inoculation, cinquante-quatre lapereaux néo-zélandais EOPS de 4 semaines ont été répartis en trois lots de 18 à raison de 6 cages de 3 lapins. Tous les animaux ont été pesés 7 jours et 4 jours avant l'inoculation. Dix-huit lapins ont été inoculés per os avec 100 µl de la fraction 50 % par animal, dix-huit avec 100 µl de la fraction RK501 par animal et dix-huit avec 100 µl de contenu caecal de lapin EOPS par animal. Ce dernier groupe a servi de témoin. Un suivi clinique quotidien des animaux a été effectué sur la base du nombre de lapins atteints de diarrhée et sur base du taux de mortalité. Les animaux ont été pesés à J0, J3, J6 et J8 après inoculation.

Pour la seconde inoculation, septante-six lapereaux néo-zélandais EOPS âgés de 4 à 6 semaines ont été inoculés. Dix-huit lapins ont été inoculés par voie orale au moyen de 100 µl de contenu caecal de lapin EOPS par animal (groupe témoin), 21 lapins au moyen de 200 µL de RIN par animal, 18 lapins au moyen de 100 µL de RK502 par animal et 19 lapins au moyen de 100 µL de PLA par animal. Un suivi clinique quotidien des animaux a été effectué sur la base du nombre de lapins atteints de diarrhée et sur base du taux de mortalité. Les animaux ont été pesés à J-7, J-4, J0, J1, J2, J3, J6 et J8 par rapport à la date d'inoculation.

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel SAS (Statistical Analysis System, 2000). Le modèle linéaire avec données répétées a été utilisé. Les effets considérés, étaient le traitement, le jour ainsi que l'interaction entre les deux. La corrélation entre mesures successives a été modélisée.

Etude bactérioscopique des fractions 50 % et RK501

Une coloration de gram a été effectuée sur 10 µl de chaque fraction. Quatre photos ont été capturées au hasard pour chaque lame à un grossissement de 1000 fois. Toutes les bactéries présentes sur les photos ont été comptées et réparties en fonction de leurs caractéristiques tinctoriales (réaction positive ou négative à la coloration de Gram) et de leur forme (coque, bacille de petite, moyenne ou grande tailles et spores) selon le protocole décrit par Szalo et collaborateurs (2006). Une répartition moyenne en pourcentage des différents types bactériens a été calculée à partir des quatre comptages.

Etude bactériologique des fractions 50 %, RK501 et RK502

Les bactéries cultivables en aérobiose (gélose au sang de mouton et MacConkey) et en anaérobiose (gélose au sang de mouton et Schaedler) dans les fractions ont été déterminées par un protocole standard (Marlier, *et al.*, 2006). Brièvement, dix microlitres ont été inoculés sur les boîtes qui ont été ensuite incubées (à 37°C pendant 24h). Les différentes colonies ont été identifiées sur base de leur morphologie, puis repiquées et identifiées selon des procédures « standard » (Barrow et Feltham, 1993). Des identifications précises ont été obtenues par les galeries API 20NE, Api 20 Strep et Rapid ID 32A (BioMérieux) selon les instructions du fabricant.

Etude des profils de restriction des fractions de TEC4

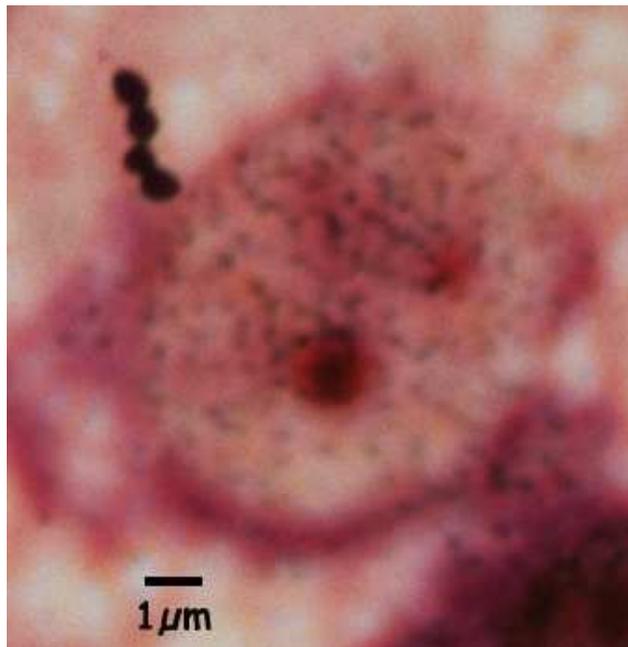
L'ADN total a été extrait des 7 fractions de la centrifugation sur gradient discontinu de sucrose, des fractions RK501, RK502, du TEC3 et TEC4, d'un contenu caecal d'un lapin EOPS (TEM1), du contenu caecal d'un lapin de compagnie non mort de pathologie digestive (TEM2) et du contenu caecal d'un lapin d'élevage non contaminé par l'EEL (TEM3) par le QIAamp DNA Stool Mini Kit (QUIAGEN®) selon les recommandations du fabricant.

La séquence codant pour l'ARN 16S a été amplifiée par PCR grâce à des amorces universelles aux eubactéries : 5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3' et 5' TAC GGY TAC CTT GTT ACG

Tableau I : Enzymes de restrictions utilisées

	Site de restriction	Température
Acc I	G T ↓ (A,C) (T,G) A C	37°C
Ava II	G ↓ G (A,T) C C	37°C
Cfo I	G C G ↓ C	37°C
Rsa I	G T ↓ A C	37°C
Sau3A I	↓ G A T C	37°C
Taq I	T ↓ C G A	65°C

Figure 2 : Fractionnement par adhérence cellulaire



Coloration de gram d'une culture de RK13 sur lame lab-teck inoculée avec la fraction 50% de la centrifugation sur coussin de sucrose

ACT T 3' en utilisant un cycle de 5 minutes à 94°C suivi par 30 cycles de (30s à 94°C, 30s à 61,5°C, 90s à 72°C) puis d'une dernière élongation de 5 minutes à 72°C. Les produits de PCR ont été dialysés sur membrane millipore (0,025 µm). La quantité d'ADN obtenue a été quantifiée par spectrophotométrie à 260 nm.

Les différents échantillons ont été digérés par une enzyme de restriction, six enzymes différentes ont été utilisées (tableau I). Pour ce faire, 1µg d'ADN purifié a été mis en contact avec 1 U d'enzyme dans un volume total de 20 µl d'eau contenant 2 µl de tampon spécifique à l'enzyme, pendant une heure aux températures d'activités spécifiques des enzymes. Les profils de restriction obtenus ont été analysés avec le logiciel Bio-Gene (Vilber Lourmat).

Résultats

Les fractionnements

Les différentes fractions de la centrifugation sur coussin de sucrose sont visibles à la figure 1.

La visualisation des fractionnements par adhérence cellulaire a permis de mettre en évidence des bactéries gram + en contact avec les cellules RK13 (figure 2). Sur 6 champs pris au hasard lors de la visualisation au microscope, 80,5 % +/- 10,7 % (IC = 95 %) étaient en contact étroit avec les cellules pour l'inoculum RK501 91,9 % +/- 9,2 % (IC = 95 %) pour l'inoculum RK502. Dans un puits témoin sans tapis cellulaire, une faible quantité de bactéries gram + et gram - adhérentes à la lame de culture a été mise en évidence.

Inoculation des fractions de TEC sur lapins sensibles

Fractions 50 % et RK501

Les mortalités ont débuté à J4 pour le lot RK501 (deux lapins sur dix-huit) et le lot 50 % (un lapin sur dix-huit). Des mortalités ont également été observées à J5, pour 3 lapins / 16 restants chez les animaux inoculés avec le RK501 et 1/ 17 restant chez les animaux inoculés avec la fraction 50 %. Le taux de mortalité total est de 11 % et 28 % respectivement pour les animaux inoculés avec la fraction 50 % ou RK501.

Figure 3 : Lésions de dilatation du tractus digestif retrouvées sur trois lapins morts d'EEL



Photos prises par le Docteur Dominique Licois

A l'autopsie, tous les sujets morts présentaient les lésions typiques d'entéropathie, à savoir une sévère dilatation de la partie antérieure du tube digestif, estomac compris, une parésie caecale, une quantité anormale de mucus dans le tractus intestinal, en l'absence d'inflammation dans les différents organes (figure 3).

L'analyse des GQM est présentée à la figure 4. Une chute nette du GQM est présente dès le troisième jour post inoculation tant chez les lapins inoculés avec la fraction 50 % ($P = 0.0014$) que ceux inoculés avec la fraction RK501 ($P = 0.0091$). Aucune différence significative de GQM n'a été mise en évidence entre les lots inoculés. Dans chaque lot, 17 des 18 lapins inoculés ont présenté une chute de poids significative (morbidité est donc de 94 %).

Fractions RIN, PLA et RK502

Seules deux mortalités ont été observées respectivement à J4 dans le lot PLA et J5 dans le lot RK502. Le lapin du lot PLA ne présentait comme lésion, qu'une légère distension de l'intestin grêle sans atteinte stomacale, probablement *post-mortem*. Par contre, celui du lot RK502 présentait les lésions caractéristiques de l'EEL. Aucune mortalité n'a été observée parmi les animaux inoculés avec RIN

L'analyse des GQM est présentée à la figure 5. Une chute globale des GQM a été observée entre J0 et J2 post-inoculation pour le lot RIN et le lot RK502 (respectivement $P = 0,0156$ et $P = 0,0226$) et entre J1 et J3 pour le lot PLA ($P < 0,0001$). Aucune chute significative de GQM n'est remarquée dans le lot témoin. Les lots traités ne présentent aucune différence significative entre eux mais, ont tous un GQM inférieur au lot témoin ($P = 0,0105$ pour le lot RIN, $P = 0,006$ pour le lot RK502 et $P = < 0,0001$ pour le lot PLA). Aucun lapin inoculé n'a présenté de chute de GQM pendant plusieurs jours consécutifs.

Etude bactérioscopique des fractions 50 % et RK501

Les comptages bactériens sont présentés au tableau IV et à la figure 6. Le profil de la fraction 50 % du TEC 4 est semblable à celui observé pour la fraction 50 % du TEC3 bien que les « spores » semblent moins fréquentes dans TEC4. L'inoculum RK501 ne contient que des bactéries réagissant positivement à la réaction de Gram, les spores et les bactéries réagissant négativement à la coloration de Gram n'étant pas observées.

Figure 4 : Evolution des GQM lors de l'inoculation de lapins sensibles avec les fractions RK501 et 50%

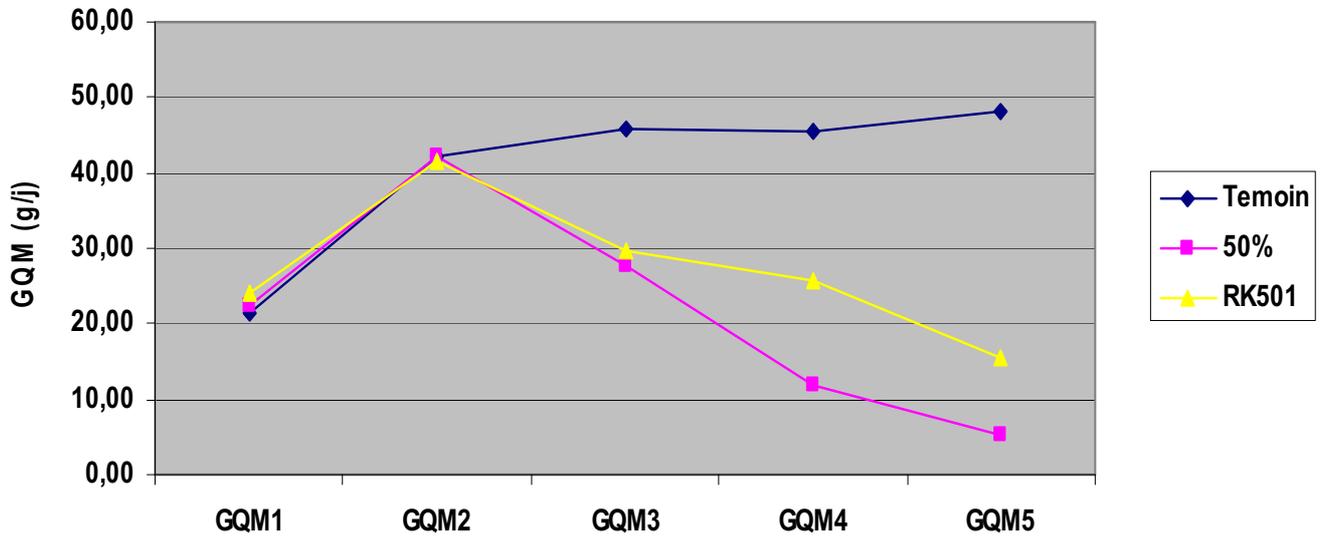


Figure 5 : Evolution des GQM de l'inoculation de lapins sensibles avec les fractions RK502, PLA et RIN

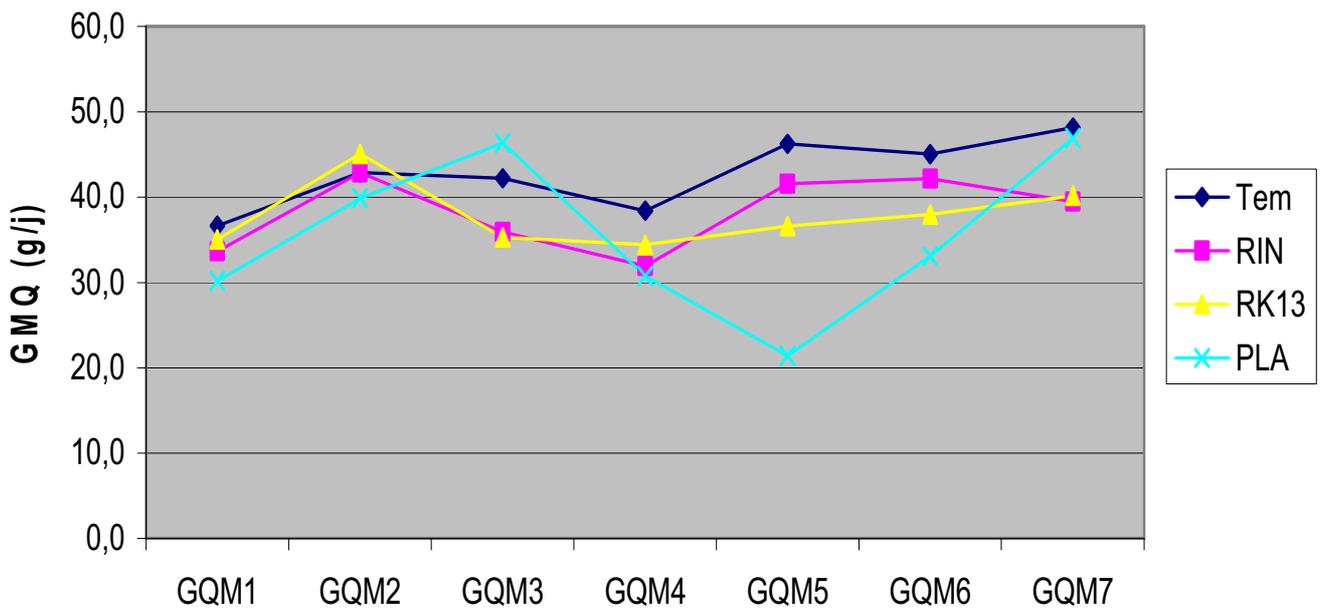


Tableau IV : Répartition des bactéries en fonction de leur forme et leur capacité tinctoriale à la coloration de gram, dans les fractions de TEC4

	50% TEC4	50% TEC3 ¹	RK501 TEC4
Grand bacille gram - (BB-)	0%	3,80%	0%
Bacille moyen gram - (MB-)	19%	16%	0%
Petit bacille gram - (SB-)	11%	18%	0%
Coque -	9%	6%	0%
Spore	4%	21,80%	0%
Grand bacille gram + (BB+)	1%	6,50%	3%
Bacille moyen gram + (MB+)	30%	7,10%	30%
Petit bacille gram + (SB+)	12%	8,20%	27%
Coque +	13%	12,50%	40%

¹ : Szalo, *et al.*, 2006

Figure 6 : Répartition des bactéries en fonction de leur forme et leur capacité tinctoriale à la coloration de gram, dans les fractions de TEC4

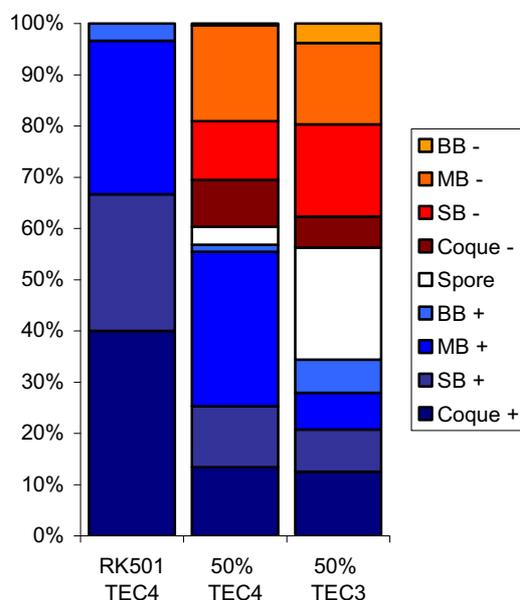


Tableau V : Etude bactériologique des fractions de TEC 4

	Milieu	Bactéries	CFU/ml moyen ¹
TEC4	CSB aérobie		10,5.10 ⁶
	CSB anaérobie		
	SH anaérobie		
50%	CSB aérobie	<i>Brevundimonas vesicularis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Bacillus sp</i> <i>Mannheimia haemolytica</i>	2,6.10 ⁶
	CSB anaérobie	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Clostridium glycolicum</i> <i>Clostridium histolyticum</i> <i>Clostridium sporogenes</i> <i>Clostridium septicum</i> <i>Clostridium fallax</i> <i>Clostridium sordelli</i>	
	SH anaérobie	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Bacillus sp</i> <i>Clostridium fallax</i> <i>Clostridium tyrobutyricum</i> <i>Clostridium glycolicum</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Clostridium sporogenes</i> <i>Clostridium acetobutylicum</i>	
RK501	CSB aérobie		0,65.10 ⁶
	CSB anaérobie		
	SH anaérobie		
RK502	CSB aérobie	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Sphingobacterium spiritivorum</i>	1,5.10 ⁶
	CSB anaérobie	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Clostridium septicum</i> <i>Clostridium fallax</i>	
	SH anaérobie	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Gemella morbillorum</i>	

CSB = Gélose colombia au sang de mouton

SH = Gélose de Schaedler

¹ calculé sur 6 comptages (2 sur CSB en aérobie, 2 sur SH en anaérobie et 2 sur CSB en anaérobie)

Etude bactériologique des fractions 50 %, RK501 et RK502

Les inventaires des flores bactériennes cultivables des fractions 50 % et RK502 sont présentés dans le tableau V.

Etude des profils de restriction des fractions de TEC4

Acc I

Le profil de restriction ainsi que le dendrogramme associé sont présentés à la figure 7. Les fractions 40 %, 50 %, culot et RK501 partagent le même profil, les fractions 20 % et 30 % partagent un profil différent. Aucune bande n'est visible sur le profil du RK502. Une bande d'environ 550 pb est visible dans le profil des fractions RK501, TEC3, TEC4, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, culot et est absente chez les témoins et la fraction surnageant. Sur le dendrogramme, toutes les fractions de TEC4 sont éloignées de celui-ci ainsi que des autres échantillons non fractionnés (TEM1, TEM2, TEM3 et TEC3).

Ava II

Le profil de restriction ainsi que le dendrogramme associé est présentés à la figure 8. Toutes les fractions sucrose (Surnageant, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % et culot) partagent le même profil, très différent de celui des fractions RK501 et RK502 dont une seule bande est visible. Sur le dendrogramme, ceux-ci sont très éloignés des autres fractions à l'exception de TEC3. Les profils des témoins sont différents l'un de l'autre et ont peu de bandes communes avec les fractions de TEC4

Cfo I

Le profil de restriction ainsi que le dendrogramme associé sont présentés à la figure 9. Toutes les fractions sucrose ont le même profil, à l'exception de la fraction surnageant. Celle-ci reste néanmoins très proche des autres sur le dendrogramme, une seule bande d'environ 700 pb présente sur le surnageant les différenciant. Les témoins négatifs (TEM1, TEM2 et TEM3) sont eux aussi proches l'un de l'autre sur le dendrogramme. Une bande d'environ 370 pb apparaît sur la fraction RK501 alors qu'elle n'est présente sur aucune autre fraction du TEC4 ou le TEC lui-même. Le profil de la fraction RK502 n'est pas visible sur le gel.

Figure 8 : Profil de restriction de Ava II sur les différentes fractions du TEC4, TEC3, les témoins négatifs et le dendrogramme associé

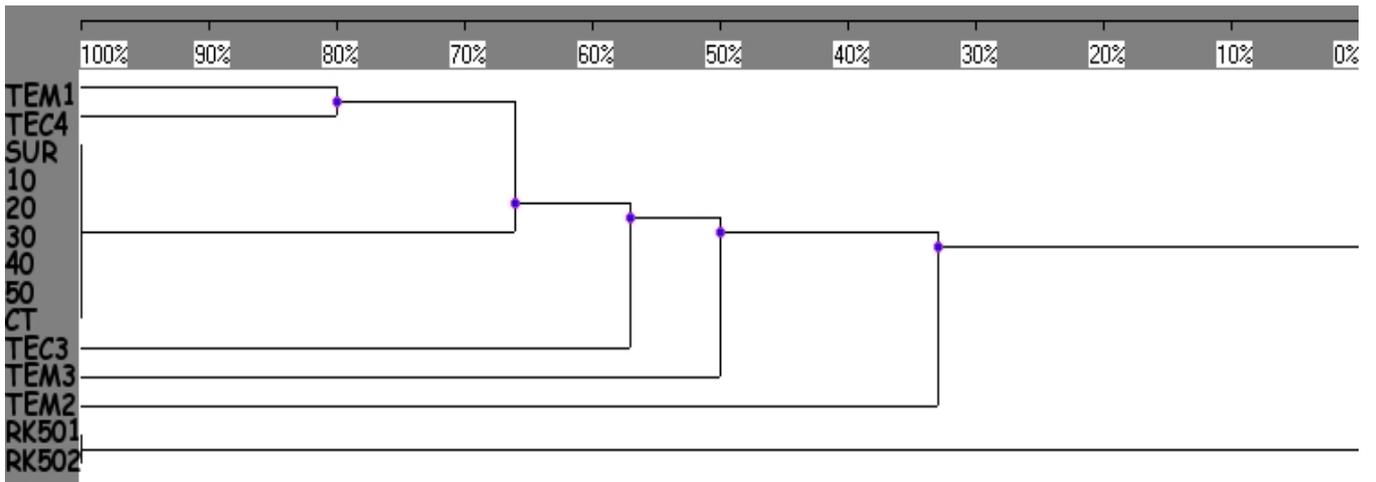
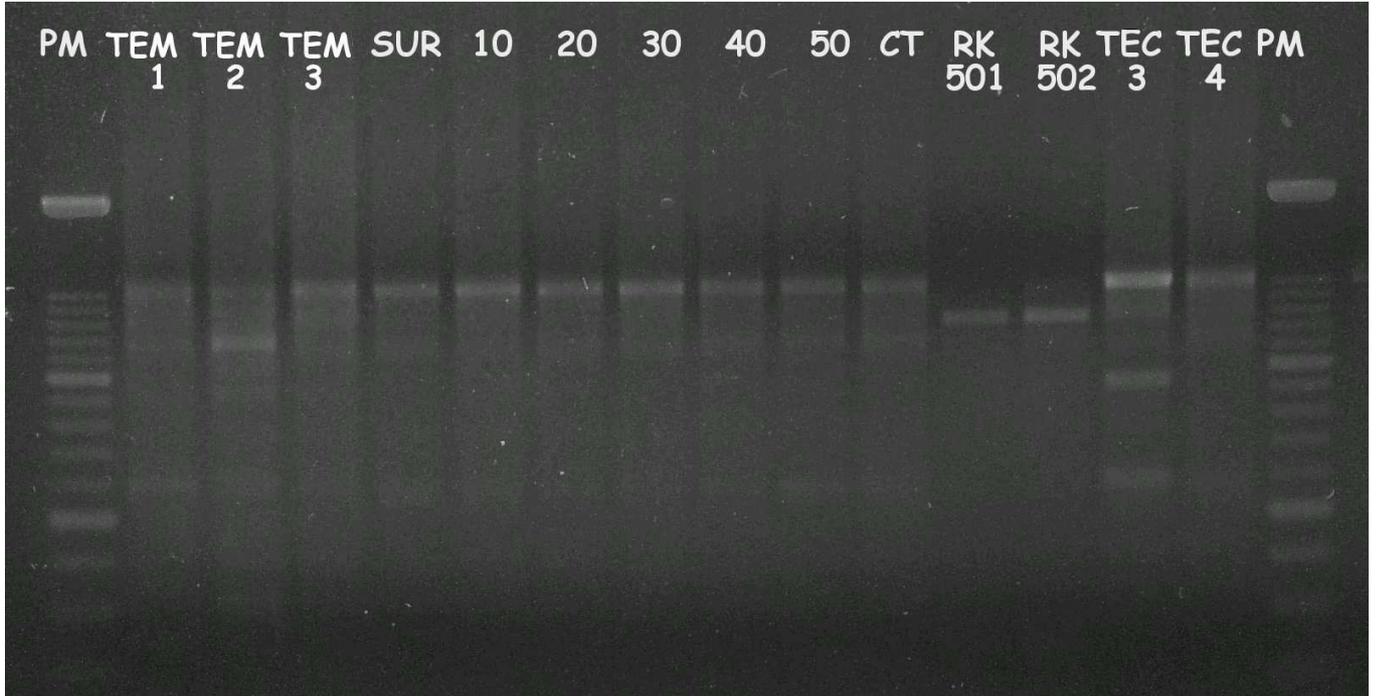


Figure 9 : Profil de restriction de Cfo I sur les différentes fractions du TEC4, TEC3, les témoins négatifs et le dendrogramme associé

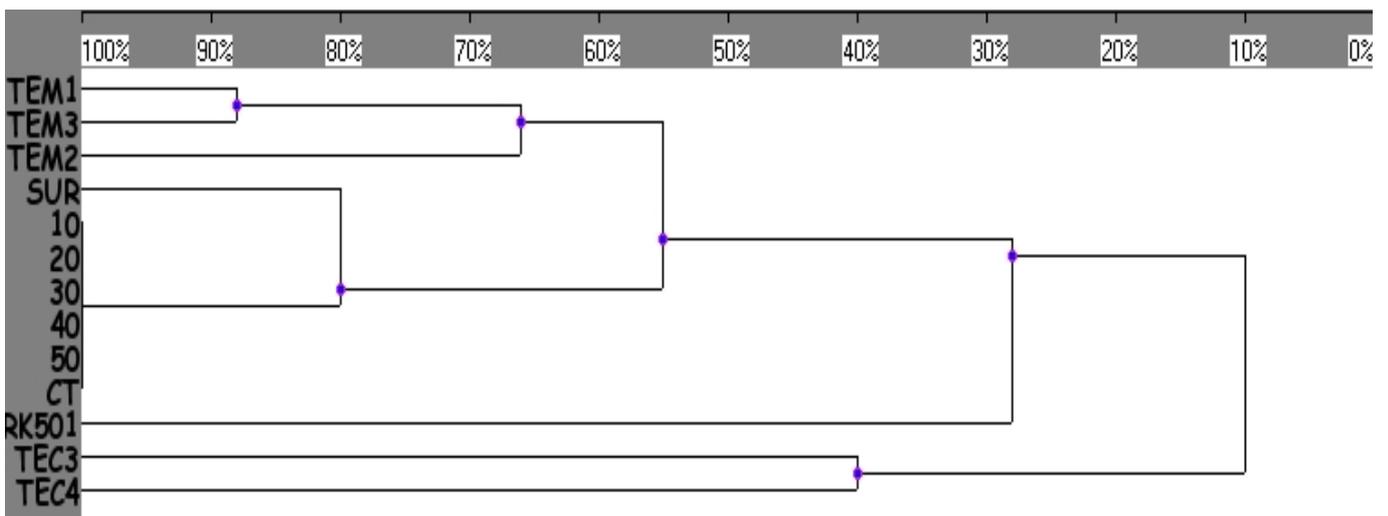
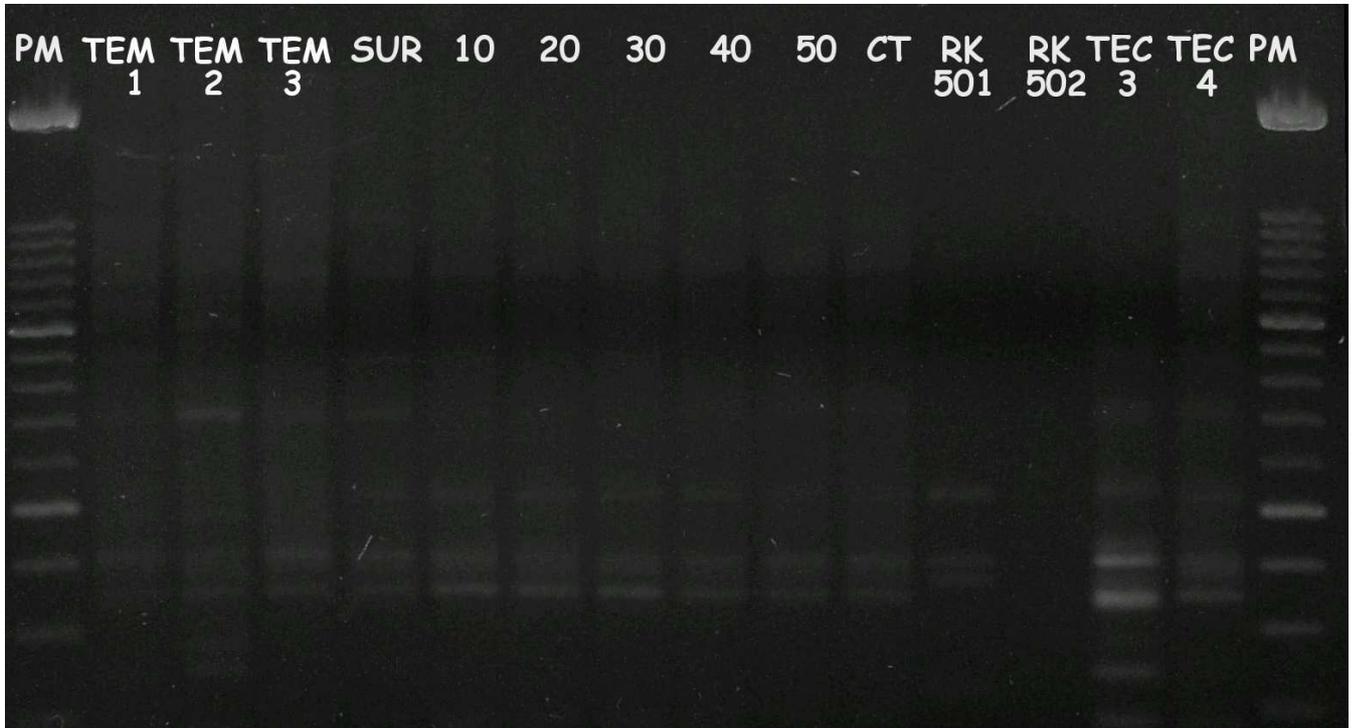


Figure 10 : Profil de restriction de Rsa I sur les différentes fractions du TEC4, TEC3, les témoins négatifs et le dendrogramme associé

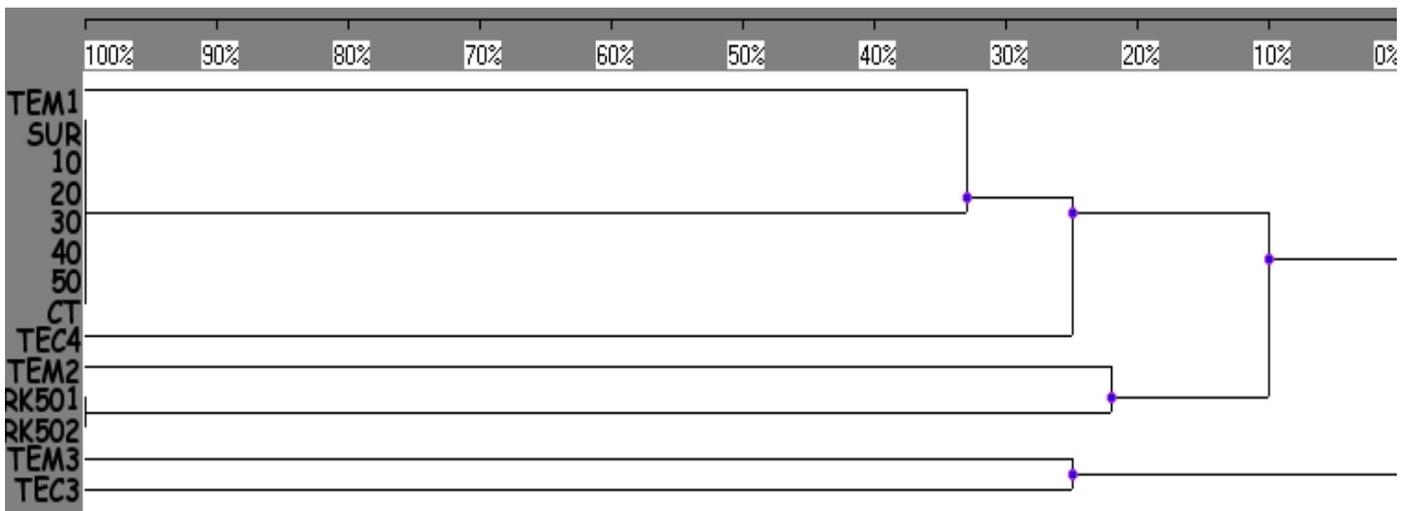


Figure 11 : Profil de restriction de Sau 3A I sur les différentes fractions du TEC4, TEC3, les témoins négatifs et le dendrogramme associé

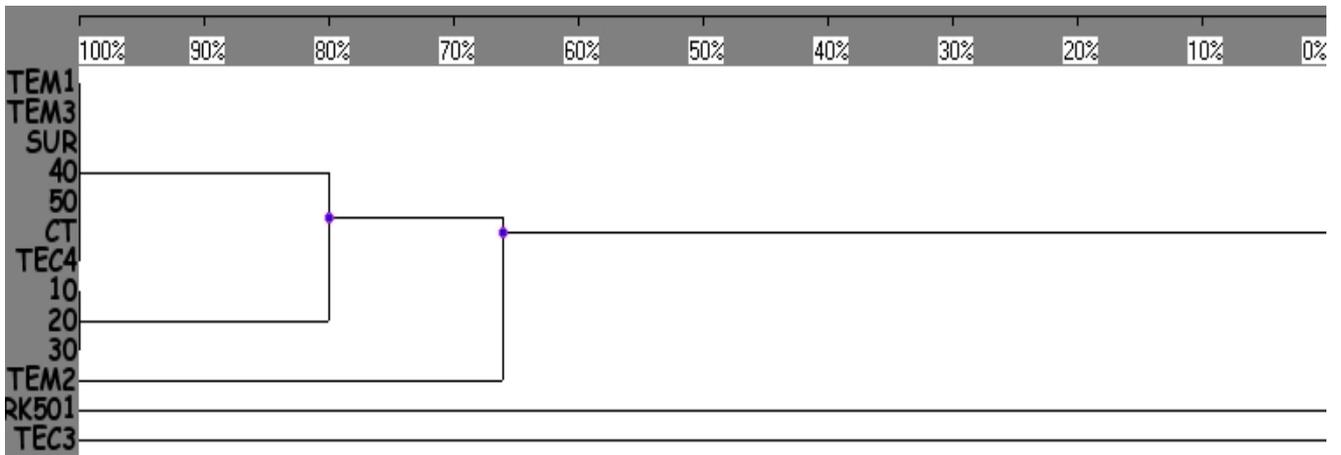
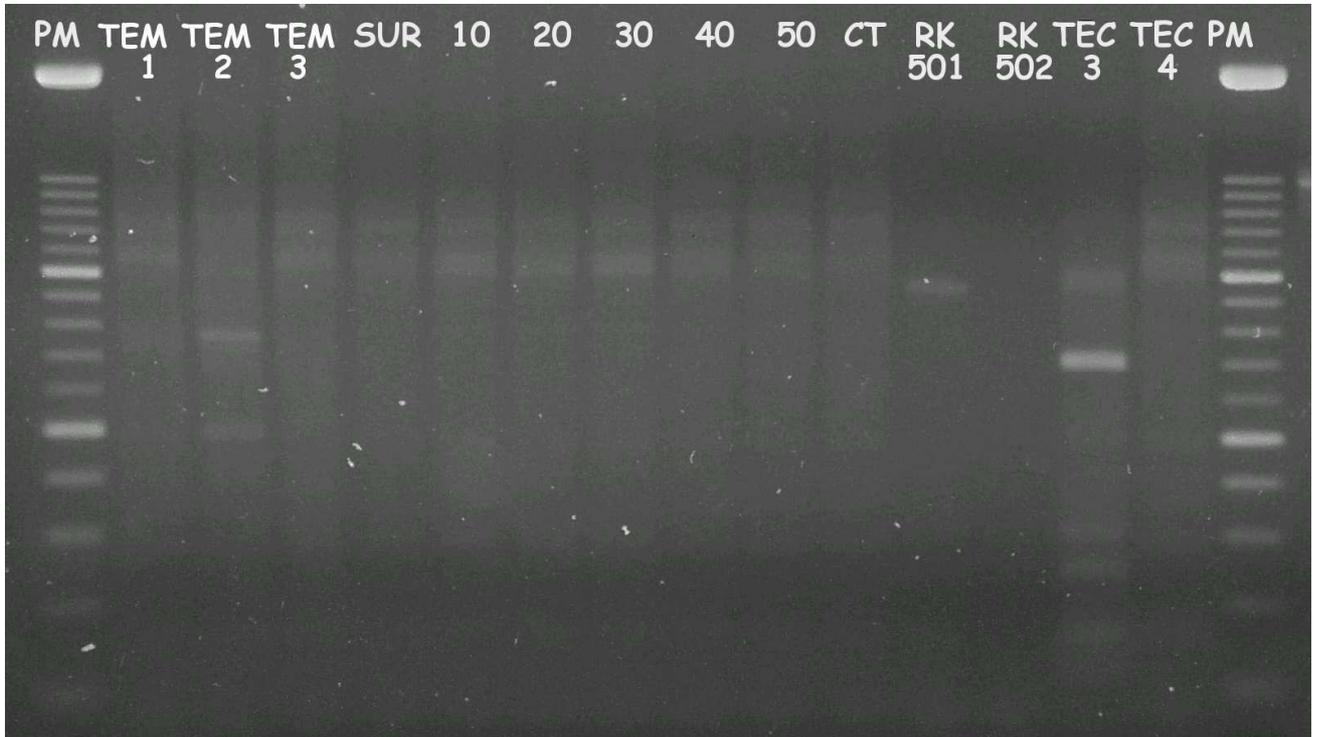
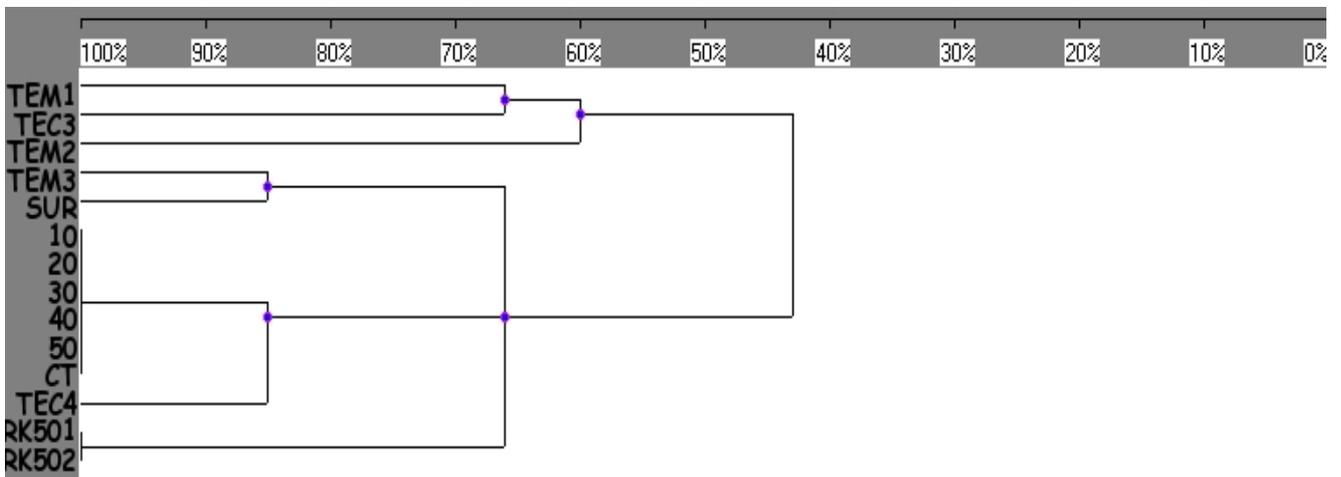
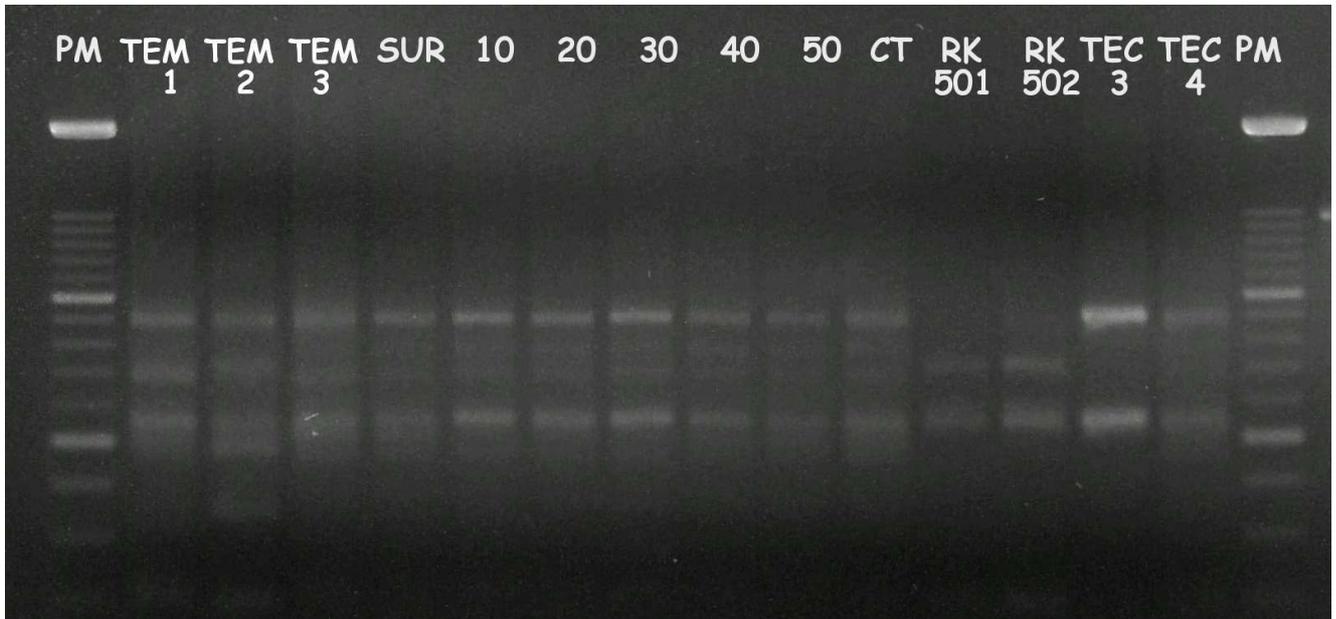


Figure 12 : Profil de restriction de Taq I sur les différentes fractions du TEC4, TEC3, les témoins négatifs et le dendrogramme associé



Rsa I

Le profil de restriction ainsi que le dendrogramme associé sont présentés à la figure 10. A nouveau, les fractions sucrose partagent le même profil. Les fractions RK501 et RK502 ont, comme à chaque fois, un profil identique. Néanmoins, à l'exception de ces groupes, les autres profils partagent très peu de similitude (moins de 40 %).

Sau 3A I

Le profil de restriction ainsi que le dendrogramme associé sont présentés à la figure 11. Les profils de TEM1, TEM3, TEC4, surnageant, 40 %, 50 % et culot sont identiques et ne diffèrent que d'une seule bande d'environ 1000 pb des fractions 10 %, 20 % et 30 %. Les autres fractions partagent 0% de similitude avec les premières et entre elles. Le profil de RK502 n'est pas visible.

Taq I

Le profil de restriction ainsi que le dendrogramme associé sont présentés à la figure 12. Les fractions sucrose possèdent encore une fois le même profil, différent de celui des fractions RK501 et RK502 aussi. Les autres profils sont assez semblables, ils ne diffèrent généralement l'un de l'autre que d'une ou deux bandes.

Discussion

En fonction des recherches déjà effectuées, l'hypothèse étiologique la plus probable est un agent bactérien. En effet, malgré la présence fréquente de rotavirus (Marlier, *et al.*, 2003b), les autres familles virales n'ont jamais été mises en évidence chez les animaux malades ou dans le TEC (Licois, *et al.*, 2005). De plus, les particules virales se retrouvent dans le surnageant après centrifugation sur gradient discontinu de sucrose, fraction ne reproduisant pas la maladie (Szalo, *et al.*, 2006).

Les études bactériologiques traditionnelles n'ayant, à ce jour, pas permis la mise en évidence d'un agent bactérien responsable de l'EEL (Licois, *et al.*, 2005, Marlier, *et al.*, 2006, Szalo, *et al.*, 2006), une étude moléculaire de l'inoculum semble être une approche incontournable pour la mise en évidence de l'étiologie de l'EEL. Les résultats d'études préliminaires (Badiola, *et al.*, 2005, Szalo et Marlier, 2006) sont par ailleurs encourageants. En dépit de la grande efficacité de ces méthodes, un appauvrissement de la flore bactérienne de l'inoculum TEC4 est apparue comme une condition

essentielle aux études moléculaires. Cet appauvrissement facilitera par après les tentatives de mise en culture de l'agent, une fois que celui-ci aura été identifié.

La méthode de fractionnement sur coussin de sucrose a déjà été employée par Szalo et collaborateurs (2006) sur l'inoculum de référence TEC3. Les différentes fractions ont été inoculées avec des résultats variables, démontrant l'efficacité de la méthode pour une première sélection différentielle des flores bactériennes. La fraction 50 % obtenue à partir de TEC4 a été sélectionnée pour le second fractionnement, l'agent étant présent en quantité suffisante tout en étant débarrassé d'une grande partie des débris végétaux présents dans TEC4. Malgré une légère différence de composition avec la fraction 50 % du TEC3, la fraction 50 % du TEC4 reproduit fidèlement la pathologie comme le montre l'inoculation des animaux EOPS. Ces résultats confirment ceux obtenus par Szalo et collaborateurs (2006) concernant une étiologie bactérienne, les particules virales se retrouvant dans la fraction surnageant. Ces données ont été confirmées par Licois (communication personnelle).

Après un premier fractionnement mécanique, un fractionnement biologique a été effectué par adhérence sur tapis cellulaire. Ce fractionnement permet de sélectionner les bactéries capables d'adhésion, qui est souvent la première phase d'une pathologie bactérienne. Des lignées d'entérocytes de lapin n'étant pas disponibles, Marlier et Szalo (référence) ont développé une méthode de production de culture primaire des cellules de la muqueuse intestinale de lapin. Ces cultures primaires étant fastidieuses et peu résistantes, la lignée RK13 a été sélectionnée pour les tests d'adhésion préliminaires sur base de leur origine spécifique (le lapin), de leur facilité de culture ainsi que sur base d'une étude sur l'adhérence d'*E. coli* entéropathogène du lapin (Marches, *et al.*, 2000). Comme la virulence du TEC4 permet de reproduire la pathologie au millième de la dose habituellement inoculée (Licois et Coudert, 2005), un double passage sur cellule ainsi qu'un triple rinçage étaient nécessaires pour ne sélectionner que les bactéries adhérentes et limiter les risques de contamination. Ayant remarqué la capacité d'adhérence de certaines bactéries au plastic, l'inoculum PLA était nécessaire pour confirmer que l'agent était bien adhérent aux cellules et non au plastic. Le liquide du dernier rinçage a été gardé pour vérifier l'efficacité de ceux-ci.

L'inoculation des animaux au moyen de RK501 et 50 % reproduit parfaitement l'entéropathie selon les critères habituels. Même si le taux de mortalité total n'atteint pas les valeurs observées en élevage, elles sont comparables aux autres reproductions expérimentales (Licois, 1998, Marlier, *et al.*, 2003b, Marlier, *et al.*, 2006, Szalo, *et al.*, 2006). La morbidité est, quant à elle, très élevée (94 %) démontrant bien la présence de l'agent dans les deux fractions testées.

A l'inverse, l'inoculation au moyen de RK502, RIN et PLA ne permet pas de poser de telles conclusions. Bien qu'une différence significative existe entre le GQM des lots traités et du lot non traité, aucun lapin ne présente de chute de GQM plusieurs jours consécutifs. La morbidité est donc difficile à estimer et la mortalité est très faible, respectivement 0 %, 5,5 % et 5,2 % pour les lots RIN, RK502 et PLA. Ayant retrouvé les lésions typiques de l'EEL sur un cadavre et notant tout de même une différence de poids entre les lapins traités et non traités, il ne fait aucun doute que l'agent soit présent dans les différentes fractions testées. Néanmoins sa concentration ou sa forme pourrait être altérée ce qui pourrait expliquer la forme atypique retrouvée dans cette reproduction ; tout comme à dose plus faible, TEC4 reproduit la pathologie avec une cinétique variable (Licois, *et al.*, 2005).

Les analyses bactérioscopiques des fractions ont permis de comparer leurs compositions sans passer par une sélection sur boîte de culture. Les différences remarquées par rapport aux comptages précédents (Szalo, *et al.*, 2006), notamment au niveau des spores, peuvent être expliquées par la différence entre TEC3 et TEC4. En effet, même si les inoculums sont préparés de la même façon, TEC4 est reconnu comme étant plus virulent et donc de composition différente de ses prédécesseurs (Licois et Coudert, 2005). La non visualisation des bactéries gram négatives après passage sur culture cellulaire peut s'expliquer, à la fois par une grande diminution de leur nombre, mais également par la difficulté de les mettre en évidence au milieu des débris cellulaires de même caractéristique tinctoriale.

Une sélection importante de la flore bactérienne semble avoir été faite entre la fraction 50 % et RK502 puisque sur les 13 espèces identifiées dans la fraction 50 %, seules 4 sont encore retrouvées dans la fraction RK502. Deux nouvelles espèces sont également mises en évidence dans cette fraction par rapport à la fraction 50 % : *Sphingobacterium spiritivorum* et *Gemella morbillorum*. Si les CFU/ml sont comparables, la population bactérienne présente est bien différente.

Les espèces bactériennes identifiées dans la fraction 50 % avaient déjà été mises en évidence lors de précédentes études (Marlier, *et al.*, 2003b, Marlier, *et al.*, 2006, Szalo et Marlier, 2006) à l'exception de *Brevundimonas vesicularis* et *Mannheimia haemolytica*. La première est une espèce ubiquiste qui se retrouve dans le tractus digestif (Euzéby, 1998). Anciennement classée dans la famille des *Pseudomonas*, *Brevundimonas vesicularis* est un pathogène opportuniste, responsable, la plupart du temps, de maladies nosocomiales de type septicémie (Yang, *et al.*, 2006). A l'inverse, *Mannheimia haemolytica* est un pathogène primaire des ruminants, responsable de pneumonies, de mammites et de septicémies (Euzéby, 1998). Néanmoins, le pourcentage d'identification étant relativement faible (75,4 %) la bactérie isolée pourrait fort bien être une *Pasteurella*, espèce bactérienne commensale du lapin (Kpodekon, *et al.*, 1999).

Les nouvelles espèces bactériennes isolées de la fraction RK502, *Sphingobacterium spiritivorum* et *Gemella morbillorum* sont également responsables d'infections nosocomiales (La Scola et Raoult, 1998, Hiar, *et al.*, 2002). *Sphingobacterium spiritivorum* est présent dans l'environnement (Hiar, *et al.*, 2002) tandis que *Gemella morbillorum* est un habitant naturel des tractus digestif, respiratoire et urogénital (Valipour, *et al.*, 2005). A ma connaissance, les capacités d'adhérence cellulaire de ces deux espèces bactériennes n'ont pas fait l'objet de recherches spécifiques.

Les profils de restrictions des différentes fractions de sucrose sont semblables (Sau 3A I, Acc I) voir identiques pour les enzymes Ava II, Rsa I, Taq I et Cfo I à l'exception de la fraction surnageant. Ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus par Szalo et Marlier (2006) qui avaient mis en évidence une bande spécifique d'environ 700 pb aux fractions reproduisant la maladie grâce à l'enzyme Sau 3A I. L'étude de Szalo et Marlier, effectuée sur le TEC3, n'est que peu comparable avec celle-ci. En effet, même si les profils de TEC3 sont comparables entre ces deux études, ceux de TEC4 et de ses fractions sont bien distincts. La différence entre ces deux inoculum est encore démontrée par les patterns obtenus dans cette étude, en effet ceux-ci ont souvent peu de bande en commun.

Si les bandes d'intérêts mises en évidence par Szalo et Marlier ne sont pas retrouvées ici, trois autres bandes ont suscité un intérêt dans cette étude. La première, de 532 pb dans la restriction Cfo est retrouvée sur tous les inoculum reproduisant la pathologie, excepté le TEC3, elle est malencontreusement présente dans la fraction surnageant, qui ne reproduit pas la maladie. Son intensité est plus élevée dans les fractions 10 %, 20 % et RK501. La seconde, de 607 pb est visible sur la restriction Ava II dans toutes les fractions de sucrose, TEC3 et TEC4 mais est malheureusement absente des fractions RK501 et RK502. Ces fragments sont intéressants mais ne permettent pas une distinction nette entre les fractions reproduisant la maladie et celles ne la reproduisant pas, ils permettent néanmoins une distinction entre la plupart des inoculum et les témoins négatifs. Cela pourrait avoir une importance dans le cadre d'une étiologie multiple.

La troisième bande mise en évidence se retrouve dans la restriction Acc I. Elle mesure 552 pb et est présente dans toutes les fractions reproduisant la maladie ainsi que dans le surnageant mais en intensité plus faible. Elle est la seule bande d'intérêt mise en évidence pour cette étude. L'apparition de bandes dans les fractions RK501 et RK502, non visibles sur la fraction 50 % ni sur le TEC4 sont certainement dues à la sélection et au développement plus important de certaines bactéries lors du fractionnement. Les dendrogrammes ne permettent aucun regroupement « phénotypique » des différents échantillons, comme l'avait remarqué Badiola dans son étude sur les exploitations atteintes d'EEL (2005).

L'absence du profil de RK502 dans les restrictions Acc I, Cfo I et Sau A3 I s'explique difficilement mais n'est pas d'une grande importance. En effet, dans chacun des profils accomplis, RK501 et RK502 possèdent exactement le même pattern. Les profils manquant seront tout de même effectués à nouveau pour confirmer ce résultat préliminaire.

Perspectives d'avenir

Les fractionnements testés par inoculation montre une sélection de la flore bactérienne ainsi qu'une persistance de l'agent même si une seconde inoculation de la fraction RK502 à triple dose est prévue pour confirmer ces résultats. Ces conclusions permettent à l'avenir de se passer des cultures cellulaires primaires de muqueuse intestinale dont la mise en place est laborieuse. De plus, ces fractions permettent la visualisation de certaines bandes d'intérêts dans les profils de restrictions. Celles-ci pourront être clonées, séquencées et comparées dans des banques de données de séquence 16S. Leur présence pourra également être recherchée dans les élevages touchés par l'entéropathie. Une fois un lien établi entre la séquence génomique et la présence de l'agent, une méthode de culture de celui-ci devra être mise en place. Au cas où aucun lien ne pourrait être établi, d'autres techniques de biologie moléculaire pourraient être employées, par exemple la Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), la Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA) ou la Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP).

Bibliographie

- ABECIA L., MCEWAN N. R., NEWBOLD C. J., FONDEVILA M. and BALCELLS J. Molecular profiling of the major bacterial species in the rabbit caecum as affected by therapeutical doses of antibiotics. In: Proceedings of the 8th World Rabbit Congress, September 7-10, 2004, Pueblo, Mexico. 2005, 404-409.
- BADIOLA I., PEREZ DE ROZAS A. M., ROCA M., CARABANO R., GOMEZ M., GARCIA J. and BLAS C. D. Characterization of the microbial diversity of rabbit intestinal tract by restriction fragment length polymorphism. In: Proceedings of the 8th World Rabbit Congress, September 7-10, 2004, Pueblo, Mexico. 2005, 746-751.
- BADIOLA J. I., FAUS C., PÉREZ DE ROZAS A. M., GOROSTIAGA O. and ROSELL J. M. Mucoïd enteropathy: treatment with apramycin of naturally infected rabbits. In: Proceedings of the 7th world Rabbit Congress, 4-7 July 2000. World Rabbit Sci: Valencia, 2000, 195-198.
- BARROW G. I. and FELTHAM R. K. A. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. Cambridge University Press: Cambridge, 1993, 351.
- BOISOT P., DUPERRAY J., GUYONVARCH A., RICHARD A., D L. and P C. Evaluation of the effectiveness of soluble bacitracin (bacivet s) in drinking water compared to bacitrcin in the feed (albac), during an experimental reproduction of epizootic rabbit enteropathy syndrome. In: Proceedings of the 8th world Rabbit Congress, 7-10 September, 2004. World Rabbit Sci: Puebla Mexico, 2004, 457-462.
- BOISOT P., DUPERRAY J., GUYONVARCH A., LICOIS D. and COUDERT P. Méthodologie de reproduction de l'Entéropathie Epizootique du Lapin (EEL) : contamination par contact direct ou indirect avec un ou plusieurs lapins inoculés avec l'inoculum TEC2 In : 11èmes journées de la recherche cunicole : 29 et 30 novembre 2005 à Paris. ITAVI : Paris, 2005, 257-260.
- BOLET G. Problèmes liés à l'accroissement de la productivité chez la lapine reproductrice. *INRA Prod. Anim.*, 1998, **11**, 235-238
- COLIN P. and LEBAS F. La lapin dans la monde. Association Française de cuniculture : Lempdes, 1995, 330.
- COUDERT P., LEBAS F. and LICOIS D. Une nouvelle pathologie ravage les élevages. La profession se mobilise. *Cuniculture*, 1997, **24**, 225-229
- COUDERT P., LICOIS D. and ZONNEKEYN V. Epizootic rabbit enterocolitis and coccidiosis : a criminal conspiracy. In: Proceedings of the 7th world Rabbit Congress, 4-7 July 2000. World Rabbit Sci.: Valencia, 2000a, 215-218.
- COUDERT P., RIDEAUD P. and RABOTEAU D. Epizootic Rabbit Enterocolitis: spontaneous evolution and attempt to control the disease. In: Proceedings of the 7th world Rabbit Congress, 4-7 July 2000. World Rabbit Sci: Valencia, 2000b, 219-224.
- COUDERT P. Relation entre l' entéropathie épizootique du lapin (EEL) et l'infestation par les coccidies : enquête épidémiologique. In: 10^{èmes} journées de la recherche cunicole, Paris, 19 et 20 novembre 2003. ITAVI: Paris, 2003, 239-242.

COUDERT P. and LICOIS D. Epizootic rabbit enteropathy. Study of early phenomena with fresh inoculum and attempt at inactivation. *World Rabbit Sci.*, 2005, **13**, 229-238.

DEWREE R., LICOIS D., COUDERT P., LASSENCE C., VINDEVOGEL H. and MARLIER D. L'entéropathie épizootique du lapin (EEL) : étude du rôle des infections par *Clostridium perfringens* dans l'étiopathogénie de ce syndrome. In : 10^{èmes} journées de la recherche cunicole, Paris, 19 et 20 novembre 2003. ITAVI: Paris, 2003, 251-254.

DEWRÉE R., MEULEMANS L., LASSENCE C., DESMECHT D., DUCATELLE R., MAST J., LICOIS D., VINDEVOGEL H. and MARLIER D. Experimentally induced epizootic rabbit enteropathy : clinical, histopathological, ultrastructural, bacteriological and haematological findings. *World Rabbit Sci.*, in press.

DUPERRAY J., BOISOT P., GYONVARCH A. and RICHARD A. Persistance de l'efficacité de la bacitracine pour lutter contre l'entéropathie épizootique du lapin (EEL) après quatre années d'utilisation sur le terrain. In : 10^{èmes} journées de la recherche cunicole, Paris, 19 et 20 novembre 2003. ITAVI : Paris, 2003, 271-274.

DUVAL M. L. Développement de l'entérocolite en France. In : 7^{èmes} journées de la Recherche Cunicole. Lyon : 13-14 mai 1998. Séance d'actualité : L'entérocolite épizootique. ITAVI : Paris, 1998, 1-8.

EUZÉBY J. P. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. [en ligne] (13 juin 2007) Adresse url : <http://www.bacterio.cict.fr> Consulté le 01-07-2007.

FILÈRE AVICOLE ET CUNICOLE. Secteur lapin. [en ligne] (sans date) Adresse url : <http://www.facw.be/services.php> Consulté le 03/04/07.

GARREAU H., LICOIS D., RUPP R. and ROCHAMBEAU H. Variabilité génétique de la résistance à l'entéropathie épizootique du lapin : nouveaux résultats. In : 11^{èmes} journées de la recherche cunicole : 29 et 30 novembre 2005 à Paris. ITAVI : Paris, 2005, 277 - 280.

GUITAN J., CORRALES J. C., PRIETO C., VEGA M. D., CACHALDORA P., FERNANDEZ P., HERMIDA M. J., SANJUAN M. L. and YUS E. An assay of experimental mucoid enteropathy with commercial dry rabbits pellets. In: Proceedings of the 7th world Rabbit Congress, 4-7 July 2000. *World Rabbit Sci.*: Valencia, 2000, 261-264.

HIAR I., GENTRIC A., TANDE D., KOCHOWSKI S. and GARRE M. Bacteriémie à *Sphingobacterium spiritivorum*. *Medicine et Maladies Infectieuses*, 2002, **32**, 200-201.

JACQUINET C., LE NORMAND B. and NOUAILLE L. Etude nationale des pratiques et des comportements des éleveurs cuniques face à l'entérocolite à l'aide d'un programme interactif. In : 9^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole. Paris 28-29 novembre 2001. ITAVI : Paris, 2001, 143-148.

JONES J. R. and DUFF J. P. Rabbit epizootic enterocolitis. *Vet. Rec.*, 2001, **149**, 532.

KPODEKON M., RIDEAUD P. and COUDERT P. Pasteurellosis in rabbits: a review. *Revue de Médecine Veterinaire*, 1999, **150**, 221-232.

LA SCOLA B. and RAOULT D. Molecular Identification of *Gemella* Species from Three Patients with Endocarditis. *J. Clin. Microbiol.*, 1998, **36**, 866-871.

LAROUR G., JOBERT J. L., BALAINE L., EONO F., KLEIN M. F., LEDEIN T., BOUQUIN S. L. and GUITTET M. Etude des facteurs de risque de l'expression aigue de l'enterocolite epizootique du lapin en engraissement. *Epidemiologie et Sante Animale*, 2004, 91-99.

LE GALL J. P., PICAULT J. P., ALLÉE C., LE BIHANNIC P. and COLIN P. Essais de reproduction expérimentale de l'entérite epizootique du lapin (E.E.L.). In : 7èmes journées de la Recherche Cunicole. Lyon : 13-14 mai 1998. Séance d'actualité : L'entérocolite épizootique. ITAVI : Paris, 1998, 13-19.

LEBAS F., COUDERT P., DE ROCHAMBEAU H. and THÉBAULT R. G. The rabbit husbandry, health and production. Food and agriculture organization of the united nations : Rome, 1997, 227p.

LEBAS F. Entérocolite épizootique et alimentation du lapin. In : 7èmes journées de la Recherche Cunicole. Lyon : 13-14 mai 1998. Séance d'actualité : L'entérocolite épizootique. ITAVI : Paris, 1998, 9-12.

LEBAS F. Historique de la domestication et des méthodes l'élevage des lapins. [en ligne] (sans date) Adresse url : <http://www.cuniculture.info/Docs/Elevage/Histori-01.htm> Consulté le 11/05/2007.

LICOIS D. Bilan des travaux réalisés à l'INRA sur l'entérocolite épizootique, dans l'hypothèse d'une étiologie virale de la maladie. In : 7èmes journées de la Recherche Cunicole. Lyon : 13-14 mai 1998. Séance d'actualité : L'entérocolite épizootique. ITAVI : Paris, 1998, 20-25.

LICOIS D. and COUDERT P. Le point de recherche sur l'entérocolite épizootique du lapin. In : 8^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole. Paris 9-10 juin 1999. ITAVI : Paris, 1999, 33-36.

LICOIS D., COUDERT P., CERÉ N. and VAUTHEROT J. F. Epizootic enterocolitis of the rabbit : review of current research. In: Proceedings of the 7th world Rabbit Congress, 4-7 July 2000. World Rabbit Sci.: Valencia, 2000, 187-194.

LICOIS D. and COUDERT P. Entéropathie Epizootique du Lapin : reproduction expérimentale, symptômes et lésions observées. In : 10^{èmes} journées de la recherche cunicole, Paris, 19 et 20 novembre 2003. ITAVI : Paris, 2003, 139-144.

LICOIS D. and COUDERT P. Entéropathie épizootique du lapin. Pouvoir infectieux de l'inoculum TEC4 : effet dose et maintien de la virulence en fonction du temps. In : 11èmes journées de la recherche cunicole. 29 et 30 novembre 2005 à Paris. ITAVI: Paris, 2005, 265-268.

LICOIS D., WYERS M. and COUDERT P. Epizootic rabbit enteropathy: experimental transmission and clinical characterization. *Vet. Res.*, 2005, **36**, 601-613

MACCHIONI P., MARIANI G. and FINZI A. Epidemiology of epizootic rabbit enterocolitis in rabbits raised without chemical treatments. In : Proceedings of the 7th world Rabbit Congress, 4-7 July 2000. World Rabbit Sci: Valencia, 2000, 307-310.

MAERTENS L., CORNEZ B., VERECKEN M. and OYE S. V. Efficacy study of soluble bacitracin (Bacivet S(R)) in a chronically infected Epizootic Rabbit Enteropathy environment. *World Rabbit Sci.*, 2005, **13**, 165-178.

MARCHES O., NOUGAYREDE J. P., BOULLIER S., MAINIL J., CHARLIER G., RAYMOND I., POHL P., BOURY M., DE RYCKE J., MILON A. and OSWALD E. Role of tir and intimin in the virulence of rabbit enteropathogenic Escherichia coli serotype O103:H2. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 2171-2182.

- MARLIER D. and VINDEVOGEL H. L'entérocolite épizootique du lapin. *Ann. Méd. Vét.*, 1998, **142**, 281-284.
- MARLIER D., DEWREE R., DELLEUR V., LICOIS D., LASSENCE C., POULIPOULIS A. and VINDEVOGEL H. A review of the major causes of digestive disorders in the European rabbit. *Annales de Médecine Veterinaire*, 2003a, **147**, 385-392.
- MARLIER D., DEWREE R., LICOIS D., COUDERT P., LASSENCE C., POULIPOULIS A. and VINDEVOGEL H. L'Entéropathie Epizootique du Lapin (EEL) : un bilan provisoire des résultats après 20 mois de recherches. In : 10^{èmes} journées de la recherche cunicole, Paris, 19 et 20 novembre 2003. ITAVI: Paris, 2003b, 247-250.
- MARLIER D., DEWREE R., LASSENCE C., LICOIS D., MAINIL J., COUDERT P., MEULEMANS L., DUCATELLE R. and VINDEVOGEL H. Infectious agents associated with epizootic rabbit enteropathy : Isolation and attempts to reproduce the syndrome. *Vet. J.*, 2006, **172**, 493-500.
- NIEMANN H. H., SCHUBERT W.-D. and HEINZ D. W. Adhesins and invasins of pathogenic bacteria: a structural view. *Microbes Infect.*, 2004, **6**, 101-112.
- PEETERS J. E. Ademhalings- en spijsverteringsstoornissen in de industriële slachtkonijnenhouderij. *Diergeneeskundig Memorandum*, 1989, **3**, 130.
- RICHARD A., REMOIS G. and LAFARGUE-HAURET P. Effect of bacitracin on epizootic rabbit enterocolitis. In : Proceedings of the 7th world Rabbit Congress, 4-7 July 2000. World Rabbit Sci.: Valencia, 2000, 345-350.
- ROCHAMBEAU H. D., LICOIS D., GIDENNE T., VERDELHAN S., COUDERT P. and ELSSEN J. M. Genetic variability of the resistance for three types of enteropathy in the growing rabbit. *Livestock Science*, 2006, **101**, 110-115.
- SZALO I. M., LASSENCE C., LICOIS D., COUDERT P., POULIPOULIS A., VINDEVOGEL H. and MARLIER D. Fractionation of the reference inoculum of epizootic rabbit enteropathy in discontinuous sucrose gradient identifies aetiological agents in high density fractions. *Vet. J.*, 2006, **173**, 652-657
- SZALO I. M. and MARLIER D. Rapport scientifique : Janvier 2006 CONVENTION n° S - 6143 du Ministère de la Santé Publique, de la Sécurité de la Chaîne Alimentaire et de l'Environnement : *L'entéropathie épizootique du lapin (Oryctolagus cuniculus): étude approfondie du (des) agent(s) infectieux responsable(s) et développement de vaccins*. 2006, **Données confidentielles**, 74p.
- VALIPOUR A., KOLLER H., SETINEK U. and BURGHUBER O. C. Pleural empyema associated with *Gemella morbillorum*: Report of a case and review of the literature. *Scand. J. Infect. Dis.*, 2005, **37**, 378 – 381.
- WHITWELL K. and NEEDHAM J. Mucoid enteropathy in UK rabbits: dysautonomia confirmed. *Vet. Rec.*, 1996, **139**, 323-323.
- YANG M.-L., CHEN Y.-H., CHEN T.-C., LIN W.-R., LIN C.-Y. and LU P.-L. Case report: Infective endocarditis caused by *Brevundimonas vesicularis*. *BMC Infect. Dis.*, 2006, **6**, 179.