

NOTE D'INFORMATION

SUR LES TRAVAUX DE RECHERCHE

CONDUITS SUR L'ENTÉROCOLITE ÉPIZOOTIQUE DU LAPIN

Note N°10 – 23 novembre 1999 - 4ème trimestre de 1999

Rédaction : D. LICOIS, F. LEBAS, P. COUDERT et G. LE GALL
Diffusion sous la responsabilité de l'ITAVI, 28 Rue du Rocher 75008 Paris

Préambule : Cette note est rédigée dans le cadre du groupe d'étude sur l'Entérocolite Épizootique de Lapin, ou EEL, sous la responsabilité MM Licois D., Lebas F. et Coudert P., chercheurs à l'INRA, et de Colin P. et Le Gall G. chercheurs à l'AFSSA Ploufragan. La périodicité minimum de cette note est désormais de 6 mois. Elle est aussi disponible sur le web : www.rabbit-science.com.

Responsabilité civile: Cette note rassemble les informations les plus fiables possibles au jour de sa rédaction, mais elle ne prétend pas à l'exhaustivité. Par ailleurs, la responsabilité des auteurs, ni celle des organismes qui les emploient ne saurait être retenue vis-à-vis de toute interprétation des faits rapportés ou des suggestions incluses.

Situation de l'EEL en France

Depuis l'automne 99, on assiste dans certaines régions à une recrudescence des cas d'entérocolite malgré le maintien d'une couverture antibiotique. Cependant, les taux de mortalité rencontrés (10-20% contre 5 à 8% quand "tout va bien") n'atteignent plus les sommets des 50-70% de mortalité qui avaient été observés aux débuts de l'épizootie d'entérocolite en 1997. Même dans ces situations critiques, l'usage raisonné des barrières sanitaires et celui de la conduite en bandes uniques continuent à démontrer leurs avantages

L'autorisation provisoire d'utilisation de la bacitracine a été prolongée pour une année en juin dernier, mais il est plus que probable qu'elle ne sera plus renouvelée. En effet, la Sté Sanofi a déposé une AMM pour l'utilisation spécifique de la Tiamuline chez le Lapin. Il y a tout lieu de penser que l'AMM sera obtenue d'ici quelques mois. Compte tenu des éléments du dossier diffusés par la Sté Sanofi elle-même, le délai de retrait devrait être réduit, permettant une protection des animaux presque jusqu'à la fin de l'engraissement.

Avancement des travaux de recherche conduits à l'INRA-Nouzilly

A - Reproduction expérimentale de la maladie

A partir de produits digestifs d'origine différente

Rappelons que dès le début des travaux de recherche sur l'entérocolite nous avons été confrontés à la difficulté de reproduire la maladie, non seulement parce que la mortalité est faible avec des lapins EOPS (lapins exempts de tout germe pathogène connu) mais aussi parce qu'il n'a pas été facile de trouver un inoculum répondant positivement. Sur les 5 ou 6 prélèvements de matériel digestif réalisés à cette époque sur des animaux d'élevage présentant toutes les caractéristiques cliniques et lésionnelles de l'EEL (Entérocolite Épizootique du Lapin), un seul avait permis, sur nos animaux, de reproduire sans ambiguïté, la maladie. C'est à partir de cet échantillon que les travaux de 1997 et 1998 ont été réalisés. Il convenait

cependant d'élargir la représentativité, par rapport au terrain, des échantillons manipulés au laboratoire.

D'autres prélèvements ont donc été testés, dont un provenant d'un élevage où les animaux étaient encore en maternité. Ils étaient morts à l'âge de 21-26 jours avec *a priori*, les signes cliniques d'EEL. La maladie a pu être transmise, avec ce produit biologique, chez des lapins EOPS sevrés. Ceci constitue donc une réponse à une des questions posées lors des dernières Journées de la Recherche Cunicole, sur l'intervention effective de l'agent pathogène, chez des lapereaux sous la mère. Notons que si l'absence de diarrhée importante ou d'inflammation constituent toujours une constante, des variations ont pu être observées par rapport à notre inoculum habituel (moins d'animaux présentant une dilatation de l'estomac et de l'intestin grêle, pratiquement pas de parésie cæcale).

En faisant varier les modalités d'administration des inoculum

Un premier essai a consisté à comparer la réponse des animaux inoculés, soit par sonde intra-oesophagienne = S, soit via l'eau de boisson = E, à raison de 10 ml de contenu digestif par animal, pour les 2 groupes. De plus pour chacun d'eux, 2 inoculum différents ont été testés : l'un correspondait à celui avec lequel nous travaillons depuis 2 ans = P ; l'autre avait pour origine un élevage de Vendée (animaux de 7-8 semaines, morts d'EEL) = V. Il y avait 15 lapins âgés de 5 semaines, par lot. Il y a eu 1 mort dans chacun des lots SV et SP contre 3 et 4 respectivement pour les lots EV et EP. Ainsi; aucune différence significative liée à l'inoculum n'a pu être mise en évidence. En revanche, ce sont les animaux inoculés par voie buccale qui ont été les plus touchés (P=0,08), ce qui, compte tenu des effectifs, représente un résultat intéressant.

Reproduction de l'EEL avant sevrage

Lors d'un autre protocole, nous avons constitué 3 lots de 20 animaux chacun, âgés de 23 jours à l'inoculation: dans le premier, les lapins ont été inoculés via l'eau de boisson (l'inoculum était celui issu des animaux sous la mère, cités précédemment = R) ; dans le 2^{ème} et le 3^{ème} lot, l'inoculum a été pulvérisé respectivement sur l'aliment présent dans la mangeoire ou sur le museau des animaux (5

ml /animal, quel que soit le lot). La mortalité a été respectivement de 35% pour les lots 1 et 2 et de 25% pour le lot 3. Cet essai confirme la sensibilité à l'EEL des lapereaux non sevrés. La mortalité étant ici plus forte qu'à l'accoutumée, il n'est pas possible de savoir à ce stade si c'est l'âge des lapins ou bien l'inoculum, différent de celui utilisé habituellement, qui en est responsable.

Effet âge (6 semaines vs 9 semaines)

Un essai a été effectué, à nouveau avec l'inoculum R, chez des lapins âgés de 6 semaines (24 animaux) ou de 9 semaines (12 animaux). Il y avait également 17 lapins témoins non inoculés (9 de 6 semaines et 8 de 9 semaines), dans la même salle. L'inoculation (10 ml au total par animal) a été réalisée en additionnant la pulvérisation nasale, la pulvérisation sur l'aliment et la distribution par l'eau de boisson. Entre le 4^{ème} et le 7^{ème} jour suivant l'inoculation, la mortalité a touché 29,2% des lapins de 6 semaines et 41,6% de ceux de 9 semaines (différence non significative au vu des effectifs). Il y a eu 3 morts chez les témoins, entre J6 et J10 (phénomène classique de contamination par leurs congénères).

Étude de l'immunité :

A la suite du protocole précédent, en utilisant tous les animaux survivants ayant présenté des signes de maladie (essentiellement un ralentissement de la croissance), une étude de l'immunité conférée par ce qui est contenu dans l'inoculum a été réalisée. Vingt-cinq lapins issus de la première partie de l'essai ainsi que 16 lapins naïfs âgés de 7 semaines à l'inoculation, ont été inoculés de la même manière et avec le même produit que ceux employés dans cette partie. 75% des lapins naïfs sont morts au cours de cette seconde partie de l'essai contre seulement 4% (1/25) chez ceux qui avaient survécu à une première inoculation. Il semble donc qu'une protection s'installe bien après une primo-infection.

Étude de la maladie avec et sans antibiotique

L'étude a été faite pendant 10 semaines dans un élevage atteint d'entérocolite depuis 18 mois. L'aliment supplémenté en antibiotique fut distribué dès la 3^{ème} semaine d'âge des lapereaux et la supplémentation a cessé 6 semaines après (lapins âgés de 9 semaines.). Il y avait en outre un lot Témoin sans aucun traitement (aliment 'blanc'). On n'a observé aucune mortalité de femelles et aucun abandon de portée. Par ailleurs, entre J22 et J35 (sevrage), sur les 697 lapereaux mis en expérimentation, il n'y a eu que 9 morts (1,3%), répartis sur l'ensemble des lots. Pendant la période de supplémentation, la mortalité fut de 22,5% chez les Témoins et de 2,6% avec l'antibiotique. Jusqu'à l'arrêt de l'antibiotique, le lot supplémenté n'a présenté aucun signe de maladie et la croissance était élevée (45g/jour, soit 10g/jour de plus que les lots non supplémentés). Dans les 2 semaines qui ont suivi l'arrêt de la supplémentation, la mortalité globale est devenue identique à celle des Témoins !

Conclusion : l'antibiotique contrôle totalement les manifestations de la maladie mais son effet cesse immédiatement après sa suppression (malgré 6 semaines de traitement !) et les animaux se comportent comme des

animaux non immunisés ! Nous ne savons pas interpréter ce résultat. A partir de l'étude des animaux survivants en fin d'expérience, il apparaît clairement que les animaux non supplémentés et qui ne vont pas mourir sont malades dès le sevrage. La mortalité n'est donc qu'une facette de la maladie.

En résumé, l'ensemble de ces données rejoint celles du terrain ou de certaines expérimentations qui utilisent l'aliment contaminé pour reproduire la maladie. L'inoculation par voie orale semble être plus « efficace » qu'une inoculation directement dans l'estomac. Cela correspond-il à un développement primaire du virus dans les parties antérieures du système digestif ? La variabilité des aspects lésionnels pourrait être liée à la variabilité de la microflore qui n'est pas certainement pas identique d'un inoculum à l'autre. Par ailleurs, le mode de contamination naturelle, par voie orale ou aérienne, reste à déterminer. En ce qui concerne l'immunité, celle-ci semble s'instaurer après infection. Elle pourrait donc bien rendre compte du fait que les reproducteurs, dans les élevages qui ont été atteints, soient plus résistants à la maladie. Le dernier point relatant une reprise de mortalité après arrêt de traitement antibiotique est également conforme aux observations du terrain.

B - Étude histopathologique

En collaboration avec l'École Nationale Vétérinaire de Nantes (Pr M. Wyers), une importante étude histopathologique sur lapins EOPS, immuno-déprimés (corticoïde) ou non et inoculés ou non, a été mise œuvre. Des abattages séquentiels d'animaux à différents stades d'infection ont été effectués et des prélèvements de divers organes ont été réalisés, afin de mieux caractériser l'EEL et de mieux cerner le (ou les) site(s) de développement de l'agent pathogène. Les résultats obtenus sont les suivants :

- les lésions principalement épithéliales de l'intestin grêle, sont surtout marquées vers la partie distale (ileon) et caractérisée par une prolifération des glandes, une atrophie marquée et généralisée des villosités et des images de dégénérescence et de nécrose épithéliale souvent discrètes et disséminées,
- les lésions épithéliales du gros intestin sont essentiellement dégénératives mais discrètes,
- les signes d'inflammations sont modérés et inconstants,
- au niveau des poumons, les lésions de pneumonie interstitielle sont diffuses et d'intensité variable.
- au niveau des autres organes (foie, rate, ganglion mésentérique, thymus, cœur, rein, surrénales), aucune lésion n'a été détectée en dehors de celles liées à une corticothérapie chez les lapins immuno-déprimés.

Ces lésions sont surtout évidentes chez des lapins préalablement immuno-déprimés ; elles sont plus marquées chez des lapins ayant extériorisés les signes cliniques de l'EEL. L'aspect lésionnel de l'intestin grêle évoque fortement l'intervention d'un agent infectieux viral responsable de lésions épithéliales prédominantes qui entraînent des anomalies glandulaires et une réduction importante de la surface absorbante des villosités pouvant expliquer les troubles cliniques constatés. La spécificité des lésions est faible ; de nombreux virus semblent susceptibles d'entraîner des lésions de cette nature ou de nature proche

et ceci chez de nombreuses espèces animales. Les lésions pulmonaires doivent être interprétées avec prudence car des lésions de même type sont retrouvées, de manière moins marquée, chez les témoins sains.

C - Recherche de l'agent pathogène

Purification

Rappelons que l'un des points tangibles en microscopie électronique (ME), qui nous a conforté dans notre priorité à explorer la piste virale, a été l'observation, de particules relativement homogènes retrouvées dans une des fractions, après purification d'extraits digestifs d'animaux malades et absentes chez les animaux sains. Ces particules faisant penser à des virus enveloppés et à ARN, ont cependant été retrouvées en quantité faible et variable selon les jours post-inoculation (après infection expérimentale) mais aussi selon les animaux, à un jour donné.

Afin d'augmenter le rendement des purifications, diverses méthodes ont été mises en œuvre : précipitation (Coussin de saccharose 20%, polyéthylène glycol, sulfate d'ammonium...) puis séparation en gradient de vitesse et/ou de densité (saccharose, tartrate de potassium-glycérol, chlorure de césium). C'est la précipitation au sulfate d'ammonium associée à une séparation en gradient de densité de saccharose qui a permis d'obtenir les plus belles fractions. Mais les observations en ME après coloration négative se sont révélées à chaque fois assez décevantes car il y avait trop peu de particules pour conclure.

Soulignons qu'une purification c'est au minimum 2 jours de travail (préparation des gradients de centrifugation, préparation de l'échantillon (extraction, clarification, précipitation), centrifugation (16 heures), récupération des fractions, observation en ME. A l'heure actuelle plus de 30 échantillons ont été traités (extraits digestifs et pulmonaires d'animaux sains et d'animaux malades, à différents moments de la maladie, sur des inoculum d'origine différente ...).

Etude histologique en microscopie électronique

Une étude a été réalisée en coupes ultra-fines et semi-fines sur des échantillons d'intestin grêle (duodénum, iléon, jéjunum), caecum et côlon, prélevés chez des lapins inoculés et abattus chaque jour, entre J1 et J7 PI. L'analyse qui n'est pas encore totalement terminée confirme les lésions intestinales déjà décrites en microscopie photonique par M. Wyers (diminution de la taille des villosités). De plus, des anastomoses ont été observées au niveau des microvillosités.

Par contre aucune particule virale n'a été détectée au niveau des différents tissus étudiés.

Recherche sur la structure génomique

Deux banques d'ADNc ont été réalisées à partir des ARN extraits des fractions purifiées (les plus riches d'après les observations en ME). Au total 6000 clones ont été obtenus. Parmi eux, 120 avaient inséré un fragment supérieur à 700 paires de bases et ont été séquencées puis comparées avec des séquences nucléiques d'organismes connus présents dans des banques de données internationales. Aucune corrélation n'a été trouvée entre les

séquences virales des bases de données et celles des clones recombinants. Par contre, des analogies ont été mises en évidence avec des séquences appartenant soit au lapin, soit à des phages soit à des bactéries.

On peut estimer que ce travail considérable a nécessité l'équivalent de plus de 6 mois d'étude à temps plein.

Face à la faiblesse des résultats découlant de cette approche qui pourrait être due à la présence du virus en trop faible quantité dans les prélèvements, une autre démarche a été envisagée. En utilisant des amorces oligo-nucléotidiques spécifiques, un screening de virus entérotropes connus a débuté. Il est encore trop tôt pour savoir si cette nouvelle technique de biologie moléculaire donne des résultats intéressants.

Recherches bactériologiques

Parmi les séquences nucléiques identifiées, le nom de *Yersinia enterocolitica* est apparu plusieurs fois. Bien que les symptômes et signes cliniques des troubles provoqués par cette bactérie soient nettement différents de ceux de l'EEL, une étude a été néanmoins menée sur ce germe. Une vingtaine d'échantillons provenant de différents animaux et de divers inoculum ont été ensemencés sur milieu sélectif. La bactérie en question n'a jamais pu être isolée.

Par ailleurs, quelques échantillons parmi les plus représentatifs ont été envoyés au laboratoire de M. Popoff à l'Institut Pasteur pour un complément d'étude sur les bactéries anaérobies et notamment sur les Clostridium. Cette étude est en cours

En conclusion des travaux conduits par l'INRA

Les travaux conduits à la Station Pathologie Aviaire et de Parasitologie au Centre INRA de Nouzilly au cours des 6 derniers mois ont permis de nettement mieux déterminer les conditions de développement de l'EEL. En particulier ils ont montré que des mortalités dues à l'agent de l'EEL peuvent bien être observés avant sevrage. Il a aussi été montré qu'une immunité pouvait se développer après une première infection si celle-ci était suivie d'une maladie. En revanche, les animaux infectés qui n'extériorisent pas la maladie ne sont pas immunisés (ce qui n'est pas un cas tout à fait banal). Par ailleurs, la vitesse de réapparition de l'EEL après l'arrêt d'une couverture antibiotique de 6 semaines laisse penser que d'une façon ou d'une autre le développement de l'agent primaire est inhibé par les antibiotiques utilisés mais qu'il reste présent; il est difficile d'interpréter ce résultat pour une infection virale... Enfin, les recherches directes et indirectes du virus soupçonné d'être l'agent responsable de l'EEL n'ont toujours pas abouti, malgré des recherches qui restent très actives et imaginatives.

Avancement des travaux de recherches conduits à l'AFSSA-Ploufragan

A - Reproduction expérimentale de l'EEL, mise au point d'un modèle expérimental d'étude de la maladie : action concertée INRA Nouzilly - AFSSA Ploufragan

A l'INRA Tours, des lapins EOPS immunodéprimés ont été inoculés avec un inoculum infectieux. Les prélèvements digestifs des lapins morts 2, 4 et 7 jours après, ont été inoculés à des lapins conventionnels au cours d'un essai réalisé par l'AFSSA-Ploufragan en animalerie protégée. Cet essai a montré que les prélèvements digestifs d'animaux immunodéprimés morts dès le deuxième jour après inoculation, donc très précocement, sont susceptibles d'entraîner une mortalité avec des lésions d'EEL. Un autre essai mené en parallèle en animalerie protégée à l'AFSSA-Ploufragan à partir des mêmes prélèvements digestifs réalisés à l'INRA, a démontré que l'infectiosité de l'échantillon était conservée après une dilution d'au moins 1/10^{ème}, ce qui doit permettre d'infecter plus d'animaux à partir d'un inoculum initial.

B - Recherche de l'agent pathogène : action concertée INRA Nouzilly - AFSSA Ploufragan – Écoles Vétérinaires

Suite à l'hypothèse qu'un parvovirus pourrait être à l'origine de l'EEL, les recherches ont été poursuivies à l'AFSSA-Ploufragan pour isoler ce type de virus, dans un premier temps à partir d'échantillons de poumons et de cæcum de lapins provenant d'élevages récemment atteints d'EEL. Ces études ont été menées en biologie moléculaire (PCR) mais aucun virus de la famille des parvovirus n'a pu être isolé. Suite aux résultats obtenus en histologie en cours d'année par l'École Nationale Vétérinaire de Nantes (Pr Monique WYERS), montrant des lésions d'origine virale dans les intestins grêles d'animaux expérimentalement contaminés (voir plus haut "étude histopathologique"), nous avons repris l'analyse d'échantillons d'intestins grêles de différentes origines stockés au laboratoire. Plusieurs échantillons ont été étudiés, pour l'instant sans succès. Des recherches sont aussi en cours pour tenter isoler d'autres familles virales (*Circoviridae* notamment) à partir de ces prélèvements.

Parallèlement à ces travaux de biologie moléculaire, les prélèvements (poumons ou intestins grêles) sont tous

examinés en microscopie électronique mais aucune particule virale n'a été observée jusqu'à présent.

Concertations et Financements

Luc Maertens (Président de la WRSA) et P. Coudert (vice Président) ont présenté un projet COST, pour un financement au niveau Européen. Après avoir franchi la première phase, celui-ci est en cours d'évaluation finale. Il comprend un volet important consacré à la pathologie du lapin. Il a pour but de faciliter les échanges entre chercheurs notamment à propos de leurs travaux sur l'EEL. Par ailleurs, P. Coudert a participé à une réunion de travail à Berlin pour étudier la possibilité de monter un projet de recherche européen sur l'EEL. Le financement du Projet COST devrait faciliter sa mise en place.

La convention cadre entre la DGAL (Ministère de l'Agriculture) et l'AFSSA a été signée cet automne. Un Ingénieur épidémiologiste a été recruté à l'AFSSA-Ploufragan pour une durée de trois ans et commencera le 1^{er} janvier 2000. Il est notamment chargé d'élaborer et de suivre sur le terrain une enquête épidémiologique sur l'EEL. Il faut toutefois garder à l'esprit qu'il s'agit d'un travail de longue haleine, nécessitant plusieurs années pour porter ses fruits. De même sur cette convention, un technicien de recherche est en cours de recrutement et aidera à la réalisation de l'étude sur le terrain d'une part, et aux travaux menés en animalerie protégée et au laboratoire d'autre part.

Enfin, lors de la visite d'un élevage de lapins organisée début novembre 99 dans le Sud-Ouest à l'initiative de la Fenalap, le Ministre de l'Agriculture a promis d'ouvrir une enveloppe de 2 millions de Francs pour aider la recherche sur l'EEL - à suivre au cours de prochains mois.

Pour finir, quelques nouvelles concrètes pour la poursuite des travaux de recherche: suite à la démarche du Comité de coordination INRA-ITAVI en direction des Régions, l'une d'elles (Région Pays de la Loire) a décidé d'une participation financière de 380 000F aux travaux de l'Inra-Nouzilly. Cette somme est disponible depuis l'automne 1999.