

# Cinétique de bactéricidie de la tiamuline vis-à-vis de souches appartenant au genre *Clostridium* d'origine cunicole

B. MANCO, P. BUTTY, L. FLORENT, V. KALTSATOS

CEVA Santé Animale, La ballastière BP126, Libourne 33501, France.

**Résumé.** Les épisodes d'entéropathie épizootique du lapin (EEL) ne restent que partiellement maîtrisés. Les bactéries entériques appartenant au genre *Clostridium* sont reconnues pour être plus fréquemment isolées lors du dérèglement de l'écosystème intestinal dans l'étiologie de cette maladie. Parmi l'arsenal antibiotique déployé contre l'EEL, la tiamuline est un antibiotique de choix ciblé contre les clostridies. Dans cette étude, les techniques *in vitro* ont permis d'évaluer l'efficacité de cette pleuromutiline à 2; 4; 8 et 16 fois la CMI en réalisant des cinétiques de bactéricidie sur une période de 24 heures et sur 3 souches de *Cl. perfringens*, 2 souches de *Cl. difficile* et 1 souche de *Cl. sordellii* fraîchement prélevées en 2004 à partir de caeca de lapins lourdement affectés par la maladie. Durant les 6 premières heures de contact, une décroissance très nette est observée sans recroissance à 24 heures. Les courbes de bactéricidie obtenues sont conformes à un effet de type temps-dépendant.

**Abstract.** Bactericide kinetics of tiamulin for strains belonging to *Clostridium* genus of rabbit origin. The episodes of Rabbit Epizootic Enteropathy (REE) remain partially resolved. Enteric bacteria belonging to *Clostridium* genus are known to be more frequently isolated during the imbalance of the intestinal ecosystem in the disease etiology. Among the antibiotic gear used against REE, tiamulin is an antibiotic of choice which targets *Clostridium*. In this study, *in vitro* techniques allowed to determine the efficiency of this pleuromutilin at 2, 4, 8 and 16 times the MIC by performing bactericide kinetics over a period of 24 hours and for 3 strains of *Cl. perfringens*, 2 strains of *Cl. difficile* and 1 strain of *Cl. sordellii* freshly isolated in 2004 from rabbit caeca heavily affected by the disease. During the first six hours of contact, a significant decrease was observed without any regrowth phase at 24 hours. The curve of bactericide complies with a time-dependant effect.

## Introduction.

La tiamuline est une pleuromutiline apparentée aux macrolides. Elle est active contre les bactéries Gram positif. Son utilisation en cuniculture est connue de longue date pour prévenir l'Entéropathie Epizootique du Lapin (EEL). La plupart des facteurs favorisant l'apparition de l'EEL et permettant sa propagation sont connus. Parmi eux, le facteur bactérien a souvent été impliqué dans l'étiologie de cette maladie mais malgré les nombreux travaux réalisés, le rôle des différentes espèces bactériennes n'a pas été clairement défini. Mesurer et évaluer un impact sur le pool bactérien contenant le genre *Clostridium* présente un grand intérêt car certaines des espèces de clostridies sont non seulement isolées des selles de lapins affectés naturellement par l'EEL mais sont également retrouvées dans les inocula utilisés dans le cadre des infections expérimentales de l'EEL (Persillon *et al.*, 2005 ; Licois *et al.*, 2005). Si les corps bactériens ne sont pas systématiquement recherchés, la détection des gènes codant pour des toxines spécifiques au genre *Clostridium* confirme la présence des Clostridies (Le Normand *et al.*, 2003 ; Dewree *et al.* 2003, ). Parmi les espèces appartenant au genre *Clostridium*, certaines sont actuellement considérées comme des pathogènes opportunistes (Licois *et al.*, 2003). Le fait que ces bactéries puissent potentiellement sécréter des toxines pourraient accentuer la morbidité de la maladie et la mortalité des animaux affectés. Il a été antérieurement démontré que la tiamuline agissait avec efficacité contre les *Clostridia* (Bouvier *et al.*, 2005). L'objectif

de ce travail est de déterminer le profil de bactéricidie de la Tiamuline vis-à-vis des Clostridies.

## 1. Matériel et méthodes.

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la tiamuline vis-à-vis de *Clostridium* est déterminée au préalable. L'activité des concentrations multiples de la CMI jusqu'à 8 CMI sont testées en fonction du temps de contact.

### 1.1. Les souches bactériennes

Les *Clostridia* testées ont été isolées en 2004 d'élevages de lapins atteints d'EEL. Le diagnostic de la pathologie a été réalisé à partir de critères cliniques sur des lapins de 40 à 59 jours infectés naturellement. Les lapins présentant les symptômes cliniques d'EEL ont été autopsiés et des morceaux de caeca ligaturés ont été prélevés et immédiatement congelés à -20°C. Six souches de *Clostridium* ont été isolées à partir de ces prélèvements : 3 souches de *Cl. Perfringens*, 1 souche de *Cl. Sordellii* et 2 souches de *Cl. difficile*.

### 1.2. Antibiotique utilisé

l'antibiotique utilisé est le fumarate de tiamuline (laboratoire CEVA S.A.). Les concentrations testées sont exprimées en µg/ml de principe actif (tiamuline base).

### 1.3. Détermination des CMI (concentration minimale inhibitrice)

La détermination des CMI de tiamuline vis-à-vis des souches étudiées est réalisée par la méthode de dilution en milieu solide (tableau 1).

**Tableau 1.** Concentration minimale inhibitrice (CMI) de Tiamuline des souches testées en cinétique de bactéricidie.

Souches testées	CMI Tiamuline
<i>Cl. perfringens</i> n°1	0,5 µg/ml
<i>Cl. perfringens</i> n°2	1 µg/ml
<i>Cl. perfringens</i> n°3	0,125 µg/ml
<i>Cl. sordellii</i> n°4	0,5 µg/ml
<i>Cl. difficile</i> n°5	1 µg/ml
<i>Cl. difficile</i> n°6	1 µg/ml

#### 1.4. Méthode de cinétique de bactéricidie (« Time killing curves »)

Cette méthode consiste à analyser l'évolution de la population bactérienne dans le temps en dénombrant les bactéries survivantes mises en contact avec l'antibiotique.

Le dénombrement bactérien est effectué avant incubation (T0), après 1, 3, 6 heures d'incubation à 37°C (phase précoce) puis à 24 heures (phase tardive).

**Tableau 1.** Effet *in vitro* de différentes concentrations de Tiamuline (en X CMI) sur différentes espèces de *Clostridium* en déterminant la réduction logarithmique du nombre de bactéries survivantes en fonction du temps de contact avec l'antibiotique.

Temps (h)	<i>Cl. perfringens</i> n°1					<i>Cl. perfringens</i> n°2					<i>Cl. perfringens</i> n°3					
	Conc.	0,5	1	2	4	8	1	2	4	8	16	0,125	0,25	0,5	1	2
1		0.00	-0.24	-0.27	-0.28	-0.31	-0.12	-0.29	-0.32	-0.38	-0.37	-0.05	-0.35	-0.35	-0.42	-0.50
3		-0.20	-1.97	-2.03	-2.21	-2.32	-0.27	-1.61	-2.25	-2.26	-2.41	-0.86	-1.43	-1.41	-1.56	-2.20
6		-0.51	-3.21	-3.21	-3.27	-3.21	-1.09	-3.12	-4.20	-3.73	-3.73	-1.62	-2.63	-3.58	-3.58	-3.58
24		-4.11	-4.11	-4.11	-4.11	-4.11	-3.73	-4.20	-4.20	-4.20	-4.20	-4.28	-4.28	-4.28	-4.28	-4.28
Temps (h)	<i>Cl. sordellii</i> n°4					<i>Cl. difficile</i> n°5					<i>Cl. difficile</i> n°6					
	Conc.	0,5	1	2	4	8	1	2	4	8	16	1	2	4	8	16
1		-0.07	-0.10	-0.12	-0.12	-0.12	-0.05	-0.33	-0.34	-0.39	-0.39	-0.07	-0.28	-0.30	-0.37	-0.35
3		-0.88	-1.10	-1.46	-1.69	-1.69	-0.36	-2.24	-2.34	-2.42	-2.47	-0.18	-2.00	-2.19	-2.23	-2.23
6		-1.25	-3.21	-3.69	-3.69	-3.99	-0.91	-3.3	-3.75	-3.75	-3.75	-0.58	-3.24	-3.34	-3.51	-3.41
24		-3.39	-3.99	-3.99	-3.99	-3.99	-3.75	-4.23	-4.23	-4.23	-4.23	-3.81	-4.11	-4.11	-4.11	-4.11

### 3. Discussion et conclusion

La présence du genre *Clostridium* dans les selles de lapins atteints d'EEL a été largement documentée dans la bibliographie scientifique. Dans ce genre bactérien toutes les espèces n'ont pas le même niveau d'implication dans la maladie. Par exemple, *Cl. spiroforme* semble présent aussi bien chez les animaux atteints d'EEL que chez les animaux sains. Par contre, la parésie ileo-caeco-colique engendre une stase de l'écosystème intestinal propice au développement de germes anaérobies. Parmi eux, les espèces *Cl. difficile* et *Cl. perfringens* sont bien représentées. L'augmentation de la densité bactérienne des clostridies ne fait qu'accroître les risques de mortalité des animaux. Des travaux ont

La courbe de cinétique est tracée avec le temps (en h) en abscisse et le logarithme (base 10) du nombre d'unités formant des colonies par ml (UFC/ml) en ordonnée.

### 2. Résultats

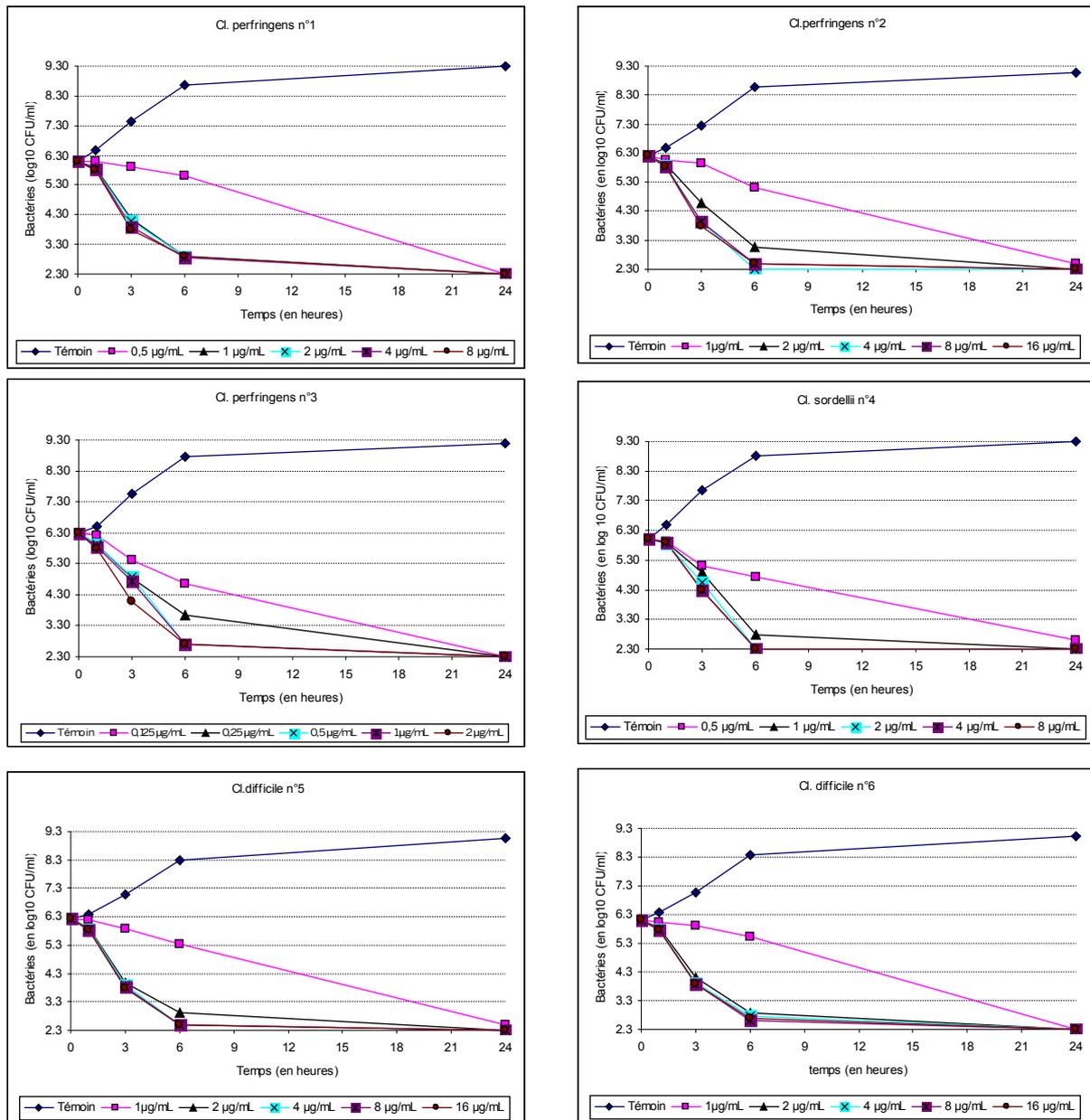
Les cinétiques de bactéricidie des différentes concentrations de Tiamuline testées vis-à-vis des 6 souches sont représentées dans la figure 1.

Pendant la phase précoce de la cinétique, quel que soient les concentrations de 2 à 8 CMI de tiamuline, la bactéricidie est totale. L'antibiotique agit comme un temps-dépendant mais après seulement 6 heures de contact avec l'antibiotique. Pendant la phase tardive, il n'y a pas de recroissance, la bactéricidie est maintenue jusqu'à 24 heures.

La réduction logarithmique du nombre de bactéries après 6 heures de contact est de - 3 log par rapport au dénombrement de la suspension bactérienne de départ. Les réductions logarithmiques en fonction des temps testés sont présentées dans le tableau 2.

déjà montré que la tiamuline agit efficacement contre le genre *Clostridium* quel que soit l'espèce bactérienne concernée (Bouvier *et al.*, 2005). Les clostridies isolées du lapin présentent en effet une bonne sensibilité vis à vis de la tiamuline peut-être du fait que cet antibiotique est le seul représentant des pleuromutilines et des molécules apparentées (macrolides) utilisées en cuniculture. Le fait que l'antibiotique agisse rapidement permet d'intervenir dès le frémissement des cas d'EEL et ainsi d'être conforme à un usage raisonné d'antibiotique en cuniculture. Cette rapidité d'action présente un impact très positif car *in vivo*, il est nécessaire d'enrayer le développement de tels germes opportunistes potentiellement toxigènes si l'on désire augmenter les chances de survie des lapins atteints d'EEL.

**Figure 1.** Représentations graphiques des cinétiques de bactéricidie de la tiamuline vis-à-vis de 6 souches de *Clostridium* testées.



### Références

BOUVIER AC., JACQUINET C., MANCO B., 2005. Etude récente sur la sensibilité de différentes souches de *Clostridium* prélevées sur des lapins avec signes cliniques d'EEL, vis-à-vis de la tiamuline. 11<sup>ème</sup> journée de la Recherche Cunicole, 29-30/11/2005, 253-. ITAVI Ed., Paris

DEWREE R., LICOIS D., COUDERT P., C. LASSENCE C., VINDEVOGEL H., D. MARLIER D., 2003. L'entéropathie épizootique du lapin (EEL) : étude du rôle des infections par *Clostridium perfringens* dans l'étiopathogénie de ce syndrome. 10<sup>ème</sup> Journée de la Recherche Cunicole, 19-20/11/2003, 251-254. ITAVI Ed., Paris.

LE NORMAND B., LE GUENEC J., MOALIC P.Y., 2003. Contribution à l'étude toxinotypique des souches de *Clostridium perfringens* isolées dans l'entéropathie épizootique du lapin (EEL). Relation avec la clinique observée. 10<sup>ème</sup> Journée de la Recherche Cunicole, 19-20/11/2003, 243-246. ITAVI Ed., Paris.

LICOIS D., DEWREE R., COUDERT P., VINDEVOGEL H., MARLIER D., 2003. Essai de reproduction expérimentale de l'entéropathie épizootique du lapin (EEL) avec des inoculum originaires de Belgique et des Pays-Bas et avec des souches bactériennes isolées de ces inoculum ainsi que de TEC2 et TEC3 (inoculum INRA). 10<sup>ème</sup> Journée de la Recherche Cunicole, 19-20/11/2003 : 255-. ITAVI Ed., Paris.

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

PERSILLON C., FRANCHET C., LICOIS D., RAVOT G., 2005. Détection de différents agents potentiellement pathogènes chez des lapins atteints d'entéropathie épizootique du lapin. Recherche de corrélation entre la présence de ces agents et l'observation de la pathologie par comparaison avec des lapins non atteints. 11<sup>ème</sup> Journée de la Recherche Cunicole ; 29-30/11/2005, 273-. ITAVI Ed., Paris.

