

Reproduction Expérimentale de l'Entéropathie Epizootique du Lapin (EEL) avec un nouvel inoculum : TEC 2.1

J. DUPERRAY¹, A. GUYONVARCH¹, J.M. LAURENT¹,
R. ADELIS¹, F. HABERKORN¹, D. LICOIS²

¹ Evalis, Talhoüet, B.P. 2350, 56006 Vannes Cedex, France

² INRA UR1282 Infectiologie Animale et Santé Publique, Nouzilly, France

Résumé. L'objectif est de tester la virulence de l'inoculum TEC2.1 constitué d'anciens inoculums conservés à -20°C depuis près de 10 ans et de valider sa méthode d'inoculation adéquate. Deux cent quarante lapins sont logés en cages collectives de 8 animaux dès le sevrage. Cinq lots ont été constitués. Le lot témoin est non inoculé. Dans les lots 1/50 et 1/500, un neuvième lapin inoculé avec 50µl ou 500µl de TEC2.1 respectivement est ajouté dans chaque cage ; les 8 autres lapins de la cage ne sont pas inoculés. Dans les lots 8/50 et 8/500, les 8 lapins de chaque cage sont inoculés avec 50µl et 500µl de TEC2.1 respectivement. Le TEC2.1 permet une reproduction de l'EEL. La mortalité augmente avec le nombre d'animaux inoculés (26.0% et 37.5% avec 1 et 8 lapins inoculés respectivement, P<0.05). La dose d'inoculum impacte la précocité de l'expression de la maladie. Le TEC2.1 peut donc être considéré comme un outil de recherche, permettant de travailler sur l'EEL en conditions expérimentales.

Abstract. Experimental reproduction of Epizootic Rabbit Enteropathy (ERE) with a new inoculum: TEC 2.1. The aim was to test the virulence of inoculum TEC2.1 produced from a mix of 10 year-old TEC inoculums kept at -20°C and to test how to inoculate it. Two hundred forty weaned rabbits are housed in collective cages of 8 rabbits. A control group is not inoculated. In the 1/50 and 1/500 groups, a ninth rabbit which is inoculated with 50µl or 500µl of TEC2.1 respectively is added in each cage; the 8 other rabbits are not inoculated. In the 8/50 and 8/500 groups, the 8 rabbits of each cage are inoculated with 50µl or 500µl of TEC2.1 respectively. ERE was experimentally reproduced with TEC2.1 inoculation. Mortality rate increased when more rabbits were inoculated (26.0% and 37.5% with 1 and 8 inoculated rabbits/cage respectively, P<0.05). TEC2.1 dose had an impact on disease precocity. TEC2.1 can be considered as a research tool to work on ERE in experimental conditions.

Introduction

L'EEL (Entéropathie Epizootique du Lapin) est une maladie qui affecte les élevages cunicoles depuis 1996 et qui persiste encore aujourd'hui, bien qu'elle soit de mieux en mieux maîtrisée. Plusieurs inoculums TEC ont été mis au point successivement par l'INRA depuis 1998. Ils ont permis de reproduire la maladie en conditions expérimentales de manière répétable, tant sur des lapins EOPS (Exempt d'Organismes Pathogène Spécifique) que sur des lapins conventionnels (Licois, 2005a). La maîtrise d'un tel outil expérimental a permis de mieux caractériser la maladie (Licois, 2001) et de réaliser des travaux de recherche sur ce thème (Boisot, 2005). Le premier inoculum TEC1 a été mis au point en mélangeant les contenus caecaux de lapins EOPS ayant été contaminés par le contenu caecal d'animaux du terrain présentant les signes de la maladie. Les inoculums TECn successifs (TEC2 à TEC4) ont ensuite été mis au point par le mélange de contenus caecaux de lapins EOPS ayant été contaminés par le TECn-1. Cet article a pour but de présenter l'origine d'un nouvel inoculum : l'inoculum TEC2.1. L'objectif est de valider la capacité de cet inoculum à reproduire expérimentalement l'EEL afin de valider son utilisation comme modèle de reproduction expérimentale de la maladie. Enfin, il vise à identifier le dispositif d'infection le plus adapté à ce nouvel inoculum pour garantir l'expression de la maladie.

1. Matériel et méthodes

1.1. Préparation de l'inoculum

L'inoculum TEC 2.1 a été mis au point par l'unité de recherche 'Infectiologie Animale et Santé Publique' de l'INRA de Nouzilly selon une méthode différente de celle utilisée lors de la mise au point des TEC 1 à 4. En effet, entre 1998 et 2004, les TEC 1 à 4 furent mis au point en mélangeant les contenus caecaux de lapins EOPS préalablement inoculés avec le contenu caecal d'animaux terrain présentant les signes d'EEL (cas du TEC1) ou préalablement contaminés avec le contenu caecal d'animaux inoculés avec le TEC précédent et exprimant la maladie. L'inoculum utilisé dans cet essai ne correspond pas à une filiation directe du TEC4 et ne peut donc pas être considéré comme le TEC5. Il a été obtenu en 2009 en mélangeant des échantillons issus du passage sur animaux du premier inoculum terrain, du TEC1, du TEC2 et du TEC3, tous ayant été conservés à -20°C depuis 1998 à 2001 soit plus de 10 ans pour la quasi-totalité.

1.2. Animaux

L'essai est réalisé sur le site expérimental d'Evalis. 240 animaux sont répartis en 5 lots au moment du sevrage (32 jours d'âge) en fonction de leur poids vif à 31 jours d'âge, de leur portée d'origine et de leur sexe. Ils sont répartis en cage de 8 lapins, chaque lot comptant ainsi 6 cages chacun, soit 48 lapins par lot. Les animaux proviennent de la maternité de la station expérimentale et n'ont reçu aucun aliment médicamenteux au cours de la période de lactation.

Tous les animaux de l'essai sont logés dans la même salle, sans condition de cloisonnement particulière entre les lots.

1.3. Aliment

Tous les animaux sont nourris à volonté avec un même aliment engraissement dont les principales caractéristiques sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1. Principales caractéristiques de l'aliment engraissement

	En % dans l'aliment
Protéine	15.8
Amidon	13.2
Cellulose	16.9

1.4. Traitements :

Le but de cet essai est de valider la capacité de l'inoculum TEC2.1 à reproduire expérimentalement l'EEL et de tester le protocole d'inoculation le plus approprié à ce nouvel inoculum pour infecter les animaux. Cinq lots d'animaux sont comparés afin de tester plusieurs méthodes d'inoculation. Le lot C est le lot Témoin ou lot Contact dans lequel aucun animal n'est inoculé. Ce lot est en contact avec le reste des lots. Dans les lots 1/50 et 1/500, aucun des 8 lapins par cage n'est inoculé mais un neuvième lapin est ajouté dans chaque cage, lequel est inoculé (per os) à 33 jours d'âge avec 50µl ou 500µl d'inoculum INRA TEC2.1 respectivement. Les lapins supplémentaires sont retirés des cages à 47 jours d'âge. Dans le lot 8/50 et 8/500, les 8 lapins de chaque cage sont inoculés (per os) à 33 jours d'âge avec 50µl ou 500µl de TEC2.1, respectivement.

1.5. Mesures

Chaque jour, la mortalité est contrôlée. Les animaux sont pesés à 31 ; 54 et 66 jours d'âge. La morbidité est contrôlée aux mêmes dates par examen externe des animaux. Quelques morts sont envoyés au laboratoire pour autopsie.

1.6. Analyses statistiques

Les résultats de mortalité et de morbidité sont analysés par comparaison de fréquence à l'aide d'un test de Chi². Les résultats de poids vif et de GMQ (Gain Moyen Quotidien) sont comparés par une analyse de la variance.

2. Résultats

2.1. Mortalité

Le taux de mortalité globale de l'engraissement est de 33%. Les résultats de mortalité cumulée par lot à 66 jours d'âge sont présentés dans le tableau 2. La figure 1 présente l'évolution de la mortalité selon les lots. Le lot témoin (lot C) présente un taux de mortalité parmi les plus hauts de l'essai, ce qui met en évidence la contamination de ce lot par les animaux des autres lots. Les différences de mortalité observées ne sont

pas significatives. Toutefois, pour une même dose d'inoculum, la mortalité est supérieure lorsque les 8 animaux de la cage sont inoculés par rapport à l'inoculation d'un lapin additionnel. Pour une inoculation de 50µl, la mortalité est de 25.0% et 33.3% lorsque 1 et 8 lapins sont inoculés respectivement. De la même façon, pour une inoculation de 500µl, 27.1% et 41.7% des animaux meurent lorsque 1 et 8 lapins sont inoculés respectivement. Par ailleurs, pour un même nombre de lapins inoculés, la mortalité est numériquement supérieure lorsque la dose d'inoculum augmente (25.0% et 27.1% lorsque un lapin est inoculé avec 50µl et 500µl respectivement et 33.3% et 41.7% lorsque 8 lapins sont inoculés avec 50µl et 500µl respectivement).

Tableau 2. Résultats de mortalité cumulée (en %) à 66 jours selon les lots

	C	1/50	8/50	1/500	8/500	P chi ²
%	39.6	25.0	33.3	27.1	41.7	0.32
morts						

L'analyse de la mortalité est effectuée pour chaque facteur indépendamment (nombre de lapins inoculés et dose d'inoculum). Les résultats figurent dans le tableau 3.

Tableau 3. Résultats de mortalité cumulée (en %) à 66 jours selon le facteur

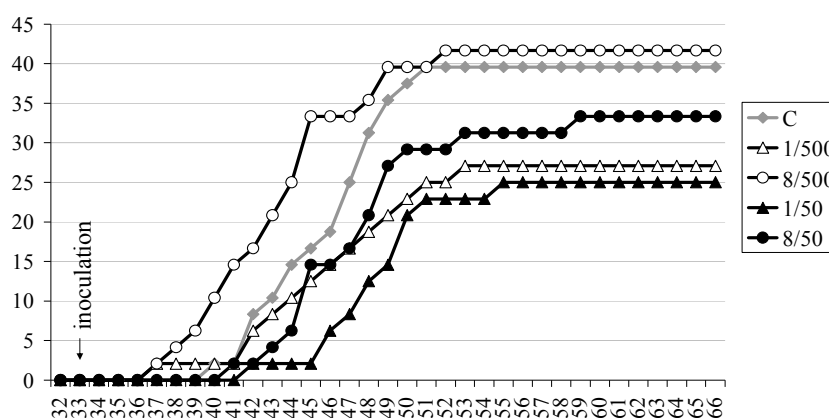
	Lapins inoculés		Dose d'inoculum		P Chi ²	
	1	8	50µl	500µl	P n lap.	P dose
%	26.0	34.4	29.2	34.4	0.03	0.40
morts	a	b				

L'analyse par facteur révèle que le nombre de lapins inoculés impacte de manière significative le taux de mortalité. 26.0% des animaux meurent lorsqu'un lapin supplémentaire est inoculé dans chaque cage alors que 34.4% meurent lorsque les 8 lapins d'une cage sont inoculés (P<0.05). Malgré la différence de mortalité observée lorsque la dose d'inoculum change, l'effet de ce facteur n'est pas significatif.

Parmi les 19 lapins autopsiés, 15 présentaient des signes caractéristiques de l'EEL. Parmi les 4 autres, une parésie caecale et une entérite hémorragique ont été diagnostiquées, les deux derniers n'ayant pas fait l'objet d'un diagnostic précis.

La mortalité intervient à des moments différents selon les lots (Fig. 1). Ainsi, le premier lapin mort est détecté 4 jours après inoculation dans les lots 1/500 et 8/500, alors qu'il est détecté à 8 et 9 jours après inoculation dans les lots 8/50 et 1/50 respectivement. Le premier lapin mort dans le lot témoin apparaît 7 jours après inoculation.

Figure 1. Evolution de la mortalité cumulée (en %) selon les lots en fonction de l'âge



2.2. Morbidité et risque sanitaire

L'évaluation du statut sanitaire des animaux est complétée par le contrôle de la morbidité à 54 et 66 jours d'âge. Le tableau 4 présente la morbidité ainsi que l'indice de risque sanitaire (IRS), celui-ci représentant la part des animaux morts ou morbides par rapport à l'effectif initial.

Tableau 4. Résultats de morbidité et d'IRS

	C	1/50	8/50	1/500	8/500	P
Morbidité (% des animaux vivants)						
54j	37.9	35.1	12.1	22.9	32.1	0.13
66j	3.4	8.3	0	0	0	0.11
IRS (% de l'effectif initial)						
54j	62.5	50.0	39.6	43.8	60.4	0.10
	c	abc	a	ab	bc	
66j	41.7	31.3	33.3	27.1	41.7	0.47

Les lettres indiquent les groupes statistiquement homogènes au seuil de 10%.

A 54 jours, la morbidité peut toucher plus d'un lapin sur 3 dans le lot C et près de 2 lapins sur 3 sont alors morts ou morbides dans ce même lot, confirmant la forte virulence du TEC2.1 et la transmission de l'agent pathogène. En fin d'engraissement, la morbidité a quasiment disparu. Les lapins alors présents ont traversé le passage d'EEL et semblent rétablis. Lors du pic de morbidité et de mortalité, l'indice de risque sanitaire diffère entre les lots ($P=0.10$), les lots les plus atteints étant le lot C non inoculé et le lot 8/500 le plus fortement inoculé. En fin d'engraissement, l'IRS est similaire entre les lots.

2.3. Croissance

Les données de poids et de GMQ collectées sur les animaux ayant survécu à l'épreuve sont présentées dans le tableau 5. Elles constituent un bon indicateur de la morbidité rencontrée sur chacun des lots.

Des différences significatives de poids se créent dès 54 jours d'âge ($P<0.05$) et aboutissent à des écarts de poids significatifs à 66 jours entre les lots 1/500 et 8/500 ($P<0.05$), les autres lots étant intermédiaires. Le premier présente un poids de 2272g, alors que le second présente un poids plus lourd de 176g en moyenne. Ces résultats se retrouvent sur les données de GMQ, puisqu'en première partie d'engraissement

le lot 8/500 présente un GMQ supérieur de 7.9 à 9.4g/j aux lots C, 8/50 et 1/500 ($P<0.05$), le lot 1/50 étant intermédiaire. Sur la période de finition, le lot 8/500 présente la croissance la plus faible (51.4g/j) alors que le lot 8/50 semble bénéficier d'une croissance compensatrice ($P<0.05$). De manière globale, le lot 8/500 présente une meilleure croissance que les lots C et 1/500 ($P<0.05$).

Tableau 5. Résultats de poids vif et de GMQ

	C	1/50	8/50	1/500	8/500	P
Poids (g)						
31j	806	807	807	807	808	0.994
54j	1665	1723	1633	1620	1825	0.004
	ab	ab	a	a	b	
66j	2351	2338	2322	2272	2448	0.010
	ab	ab	ab	a	b	
GMQ (g/j)						
31-	35.3	38.7	36.8	35.7	44.7	0.002
54j	a	ab	a	a	b	
54-	55.1	52.8	57.4	55.0	51.4	0.015
66j	ab	ab	b	ab	a	
31-	42.2	43.4	43.9	42.1	47.1	0.002
66j	a	ab	ab	a	b	

3. Discussion

Les résultats montrent clairement que l'inoculum TEC2.1 permet d'induire expérimentalement de la mortalité et de la morbidité. La plupart des autopsies réalisées sur animaux morts au cours de l'essai permettent de mettre en évidence un tableau lésionnel de l'EEL. Par ailleurs, le contrôle des animaux au cours du relevé de morbidité a révélé de nombreux cas de ballonnements et de diarrhées. Ces signes cliniques sont en accord avec le diagnostic dressé lors des autopsies et sont conformes à ceux décrits pour l'EEL (Licois et al., 2005b). L'inoculum TEC2.1 reproduit donc bien expérimentalement l'EEL. La quantité importante de TEC2.1 (plusieurs litres) obtenue par l'INRA constitue donc un nouveau stock d'inoculum qui va permettre à la filière cunicole de travailler en conditions de recherche sur l'EEL. Par ailleurs, l'un des points intéressants de cet essai est qu'il met en évidence la très bonne conservation de la

virulence de l'agent impliqué dans l'EEL. En effet, les inoculums utilisés dans la mise au point du TEC2.1 ont été conservés à -20°C depuis 1998 pour les plus vieux.

Les résultats de mortalité indiquent que la dose d'inoculum n'a pas d'effet significatif sur le taux de mortalité. En effet, bien que le taux de mortalité soit supérieur dans les lots ayant reçu 500µl de TEC2.1, il n'est pas différent de celui des lots ayant reçu 50µl ou encore du témoin. Toutefois, il semblerait que la dose de 500µl favorise une apparition plus précoce de la mortalité (4 jours après inoculation) par rapport au lot témoin ou aux lots ayant reçu 50µl (7 à 9 jours après inoculation). Le taux de mortalité observé dans le lot témoin non inoculé montre que la contamination de l'environnement est responsable de la propagation et de la sévérité clinique de la maladie. Ils montrent que le contact avec des animaux infectés suffit à déclencher l'EEL.

Les résultats de cet essai indiquent également que la mortalité augmente lorsque le nombre d'animaux inoculés augmente. En effet, l'inoculation de tous les lapins d'une cage (8 lapins) engendre davantage de mortalité que l'inoculation d'un seul lapin par cage. Ce résultat ne va pas dans le même sens que les travaux de Boisot et al. (2005), dans lesquels aucune différence de mortalité n'avait été observée entre l'inoculation de 1 ou 2 lapins par cage.

Les résultats de GMQ et de poids vif sont de bons indicateurs de la morbidité. Ils indiquent ainsi que le lot 8/500 présentant le taux de mortalité le plus haut est le lot qui montre les meilleures performances de croissance et donc la morbidité la plus faible sur l'ensemble de l'engraissement même si à la date de contrôle (54j), ce n'est pas ce lot qui présente le moins de signes de morbidité. L'inoculation de tous les lapins d'une cage avec 500µl conduit ainsi à une virulence trop forte, provoquant la mort des lapins. La virulence générée par l'inoculation d'un seul lapin par cage étant plus modérée, les animaux se maintiennent davantage en vie et expriment la maladie par un ralentissement de leur croissance et une mortalité moindre. Dans un contexte expérimental avec de faibles effectifs à disposition, il est plus aisé de mettre en évidence des différences statistiques de croissance que des différences de mortalité. Ainsi, une inoculation modérément pathogène, affectant le taux de survie mais également la croissance est à privilégier dans le cadre de la reproduction expérimentale de l'EEL, visant par exemple à comparer plusieurs traitements. En effet, une trop

forte pathogénicité entraîne la disparition des animaux étudiés expérimentalement et conduit à une diminution du nombre de données exploitables en fin d'essai. La méthode d'inoculation de l'EEL la plus appropriée avec le TEC2.1 semble donc être l'inoculation d'un seul lapin supplémentaire par cage.

Avec un stock important de TEC2.1, la filière cunicole dispose aujourd'hui d'un matériel biologique nouveau mais tout à fait comparable aux précédents inoculums (TECn) ouvrant des voies intéressantes pour travailler l'EEL en conditions expérimentales, tant dans un contexte de recherche fondamentale que de recherche appliquée. L'inoculum TEC2.1 apparaît être un outil de recherche fortement utile pour avancer dans la démedicalisation des élevages cunicoles. En effet, il permet aux acteurs de la filière de travailler la mise au point de produits non médicamenteux pour maîtriser l'EEL dans le contexte actuel de production où la démedicalisation est l'un des enjeux d'importance auquel les professionnels doivent rapidement apporter des réponses et des solutions.

Conclusion

Pour conclure, cet essai met en avant le fait que la virulence de l'agent impliqué dans l'EEL reste très forte même après plus de 10 ans de conservation à -20°C, température à laquelle l'inoculum est lui-même conservé. Le nouvel inoculum TEC2.1 obtenu par mélange d'anciens échantillons issus des expérimentations sur l'EEL, conduites à L'INRA entre 1998 et 2001, permet de reproduire l'EEL de manière expérimentale et apparaît donc comme un outil de recherche capable de faire avancer la filière cunicole dans sa démarche de démedicalisation.

Références

- BOISOT P., DUPERRAY J., GUYONVARCH, LICOIS D., COUDERT P., Méthodologie de reproduction de Entéropathie Epizootique du Lapin (EEL) : contamination par contact direct ou indirect avec un ou plusieurs lapins inoculés avec l'inoculum TEC2, *11èmes Journées de la Recherche Cunicole*, 257-260, 2005
- LICOIS D., COUDERT P., Entéropathie épizootique du lapin : reproduction expérimentale, symptômes et lésions observées, *9èmes Journées de la Recherche Cunicole*, 139-142, 2001
- LICOIS D., COUDERT P., Entéropathie épizootique du lapin. Pouvoir infectieux de l'inoculum TEC4 : effet dose et maintien de la virulence en fonction du temps, *11èmes Journées de la Recherche Cunicole*, 265-268, 2005a
- LICOIS D., WYERS M., COUDERT P. 2005b. Epizootic rabbit enteropathy: experimental transmission and clinical characterization. *Vet Res.* 36, 601-613