

# Réponse du microbiote commensal de lapins EOPS à une reproduction expérimentale de l'EEL par l'inoculum TEC4 : résultats préliminaires de pyroséquençage 454

S. COMBES<sup>1</sup>, D. LICOIS<sup>2</sup>, L. CAUQUIL<sup>1</sup>, N. EL ABED<sup>1</sup>, L. FORTUN-LAMOTHE<sup>1</sup>, T. GIDENNE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRA, INP-ENSAT, INP-ENVY UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

<sup>2</sup> INRA, UR86, Unité Infectiologie Animale et Santé Publique, F-37380 Nouzilly, France

**Résumé :** L'objectif de ce travail était d'étudier la réponse de la communauté bactérienne digestive de lapins EOPS, après reproduction expérimentale de l'entéropathie épizootique du lapin, à l'aide de l'inoculum TEC4. Les communautés bactériennes des fèces de 7 lapins ont été suivies à J0 (âge des animaux le jour de l'inoculation=39j), J7 et J14 par séquençage 454 de la région V3-V4 des gènes codant pour l'ARN 16S. Une évolution significative des abondances relatives a été observée pour 9 genres sur les 402, et pour 10 familles bactériennes sur les 112 détectées. L'analyse globale de la communauté bactérienne fécale et de l'inoculum TEC4 n'a pas permis de regrouper les échantillons en fonction du temps ou de l'individu. L'inoculum TEC4 se distingue cependant du microbiote fécal par une abondance plus élevée, d'un groupe d'entérobactéries appartenant à la famille des Enterobacteriaceae (9,3% vs <0,1%) et de Clostridium (2,7% vs <0,1%).

**Abstract - Response of rabbit bacterial community to an experimental infection with Epizootic Rabbit Enteropathy syndrome (ERE).** This work aimed to study the response of bacterial community of SPF rabbits to an ERE infection with the inoculum TEC4. Fecal bacterial community was studied in 7 inoculated rabbits, using 454 pyrosequencing of the V3-V4 region of 16S RNA genes at D0 (inoculation=39d. old), D7 and D14. Significant changes in relative abundance were observed for 9 out of 402 genera, and for 10 families out of the 112 detected. The overall analysis of fecal bacterial community samples and of TEC4 inoculum failed to cluster according to time or individual. The TEC4 inoculum however differed from the fecal microbiota samples with a higher abundance of a group of enterobacteria belonging to the family Enterobacteriaceae (9.3% vs <0.1%) and of Clostridium (2.7% vs <0.1%).

## Introduction

Apparue en France en 1997, l'entéropathie épizootique du lapin (EEL) s'est répandue dans toute l'Europe, avec des taux de mortalité élevés (30 à 80%, Marlier *et al.*, 2003). Ce syndrome digestif atteint les lapereaux dès le sevrage et se caractérise par de faibles diarrhées aqueuses, une forte dilatation intestinale (sans inflammation) et stomacale, et une perte d'appétit. À ce jour, l'agent étiologique n'a pas été identifié (Huybens *et al.*, 2011; 2013). Toutefois, la piste virale a été écartée (Licois *et al.*, 2005). Un inoculum stable (TEC4) capable de reproduire les symptômes de l'EEL a été préparé à partir d'animaux malades (Licois et Coudert, 2005). Récemment Huybens *et al.* (2013) ont caractérisé la communauté bactérienne présente dans quatre échantillons d'inoculum virulents dont le TEC4, une fraction de l'inoculum TEC4 non virulente, ainsi que dans un pool de contenu caecal de 4 lapins EOPS sains. Les résultats obtenus n'ont pas permis de relier virulence et composition (au niveau phylum et genre) ou diversité des communautés bactériennes

Afin d'étudier l'impact de l'EEL sur le microbiote digestif du lapin, l'inoculum TEC4 a été administré à des lapins EOPS (Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiés). Cette étude a fait l'objet d'une première publication lors des 13èmes JRC (Combes *et al.*, 2009). Nos premiers résultats, basés sur une technique d'empreinte moléculaire, montraient que la

communauté bactérienne fécale, en termes de densité, de richesse et de structure, n'était pas modifiée par l'inoculation de TEC4 chez des lapins EOPS. Cependant au sein de cette communauté globale, nous avons pu observer une diminution de la quantité de *Bacteroides-Prevotella* chez les animaux inoculés comparativement aux témoins.

La présente étude, poursuit l'analyse du microbiote de ces mêmes échantillons, mais avec une technique plus puissante et précise, d'affiliation phylogénétique après un séquençage de la région V3-V4 des gènes codant pour l'ARN 16S.

## 1. Matériels et méthodes

### 1.1. Animaux

Le protocole d'inoculation *per os*, réalisé sur des lapins EOPS, à 39 j d'âge (= J0), soit une semaine après le sevrage (32 jours), à la Plateforme d'Infectiologie Expérimentale de l'INRA de Nouzilly, a été précédemment décrit (Combes *et al.*, 2009).

### 1.2. Analyse de la composition de la communauté bactérienne fécale par pyroséquençage

La composition de la communauté bactérienne fécale de 7 lapins inoculés a été suivie à J0, J7 et J14 par pyroséquençage 454 des régions V3-V4 des gènes codant pour l'ARN16S sur la plateforme GeT de Toulouse. Un total de 181607 séquences a été nettoyé et assigné à un taxon en utilisant le logiciel MOTHUR

(Schloss *et al.*, 2009) permettant la production d'un profil taxonomique pour chaque échantillon. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (<http://www.r-project.org/>). Les données ont été normalisées et standardisées (transformation racine carrée). Seuls les taxons ayant une abondance relative supérieure à 0,1 % ont été considérés. Un modèle linéaire mixte a été utilisé : l'effet du délai post-inoculation (J0, J7 et J14) a été déclaré comme effet fixe, tandis que l'individu a été déclaré comme effet aléatoire. Une représentation simultanée des classifications (algorithme de Ward et distance de Manhattan) des échantillons et de l'inoculum TEC4 en colonne et des genres bactériens en ligne a été réalisée. Les genres représentés ont été sélectionnés sur leur abondance différentielle en fonction du temps ou sur l'abondance différentielle de leur famille (résultat du modèle mixte).

## 2. Résultats et discussion

Comme décrit précédemment dans le caecum des animaux EOPS (Huybens *et al.*, 2013) ou conventionnels (Combes *et al.*, 2013 ; Massip *et al.*, 2012) le phylum des Firmicutes domine l'écosystème fécal, avec une abondance relative de 73% (Tableau 1). Dans ce phylum, les Lachnospiraceae (30 %) et les

Ruminococcaceae (29%) sont les familles majoritaires (figure 1). Contrairement à ce qui est observé chez les animaux conventionnels (Combes *et al.*, 2013) le phylum des Protéobacteria (14%) semble plus développé que celui des Bacteroidetes (8%) chez les animaux EOPS. Les genres cultivables les plus fréquemment observés sont *Pseudomonas*, *Moryella*, *Subdoligranulum*, *Hydrogenophilus*, *Ruminococcus*, *Alistipes*, *Bacteroides*, *Geobacillus*, *Blautia*, et *Prevotella*.

Les abondances relatives 10 familles sur les 112 détectées et de 9 genres sur 402 présents dans les fèces, montrent une évolution avec le temps (Tableaux 2 et 3 respectivement). Lors de l'analyse de ces résultats, on ne peut exclure que le microbiote fécal puisse évoluer durant les 2 semaines suivant l'inoculation (Combes *et al.*, 2011 ; Combes *et al.* 2013). Cependant, les résultats préliminaires obtenus par empreinte moléculaire (CE-SSCP) pour ces mêmes échantillons (Combes *et al.*, 2009) montraient que la structure, la richesse de la communauté bactérienne fécale n'étaient pas modifiées au cours du temps chez les lapins témoins (inoculés avec du contenu caecal de lapin EOPS sain).

**Tableau 1 : Evolution dans le temps après l'inoculation de TEC4 des phyla bactériens dominants (abondance relative, %) dans les fèces de lapins (n=7), La valeur de ces abondances relatives est également donnée pour l'inoculum TEC4.**

Phylum (abondance relative, %)	J0	J7	J14	ETM <sup>1</sup>	Effet jour Pr<F	inoculum TEC4
Actinobacteria	3,8	5,3	3,8	0,7	0,122	7,2
Bacteroidetes	13,0 a	6,6 b	5,2 b	1,3	0,050	1,9
Firmicutes	70,10 b	62,3 ab	86,3a	4,3	0,004	75,1
Proteobacteria	13,0	25,6	4,6	3,8	0,106	15,7

<sup>a, b</sup>: Les moyennes affectées d'une lettre différente diffèrent au seuil de  $P < 0,05$

<sup>1</sup> ETM Ecart type de la moyenne

**Tableau 2 : Familles bactériennes dominantes (abondance relative, %) dans les fèces de lapins montrant une évolution dans le temps après l'inoculation de TEC4 (n=7). La valeur de ces abondances relatives est également donnée pour l'inoculum TEC4**

Famille (abondance relative, %)	J0	J7	J14	ETM <sup>1</sup>	Effet jour Pr<F	inoculum TEC4
Ruminococcaceae	25,4 <sup>b</sup>	22,9 <sup>ab</sup>	38,5 <sup>a</sup>	3,25	0,006	25,5
Pseudomonadaceae	6,92 <sup>ab</sup>	14,6 <sup>a</sup>	1,72 <sup>b</sup>	2,31	0,045	1,78
Bacteroidaceae	5,64 <sup>a</sup>	0,55 <sup>b</sup>	0,47 <sup>b</sup>	0,68	<0,001	0,51
Rikenellaceae	3,43 <sup>a</sup>	0,98 <sup>b</sup>	3,76 <sup>a</sup>	0,71	0,005	0,54
Porphyromonadaceae	2,43 <sup>a</sup>	0,12 <sup>b</sup>	0,33 <sup>b</sup>	0,31	<0,001	0,43
Alcaligenaceae	0,16 <sup>a</sup>	0,28 <sup>a</sup>	0,06 <sup>b</sup>	0,04	0,012	0,03
Pasteurellaceae	0,09 <sup>ab</sup>	0,26 <sup>a</sup>	0,04 <sup>b</sup>	0,05	0,015	0,16
Paenibacillaceae	0,16 <sup>ab</sup>	0,51 <sup>a</sup>	0,07 <sup>b</sup>	0,09	0,032	0,01
Sphingobacteriaceae	0,04 <sup>ab</sup>	0,21 <sup>a</sup>	0,01 <sup>b</sup>	0,03	0,052	0,03
Actinomycineae	0,10	0,23	0,01	0,04	0,082	0,12

<sup>a, b</sup>: Les moyennes affectées d'une lettre différente diffèrent au seuil de  $P < 0,05$  ; ND : non détecté

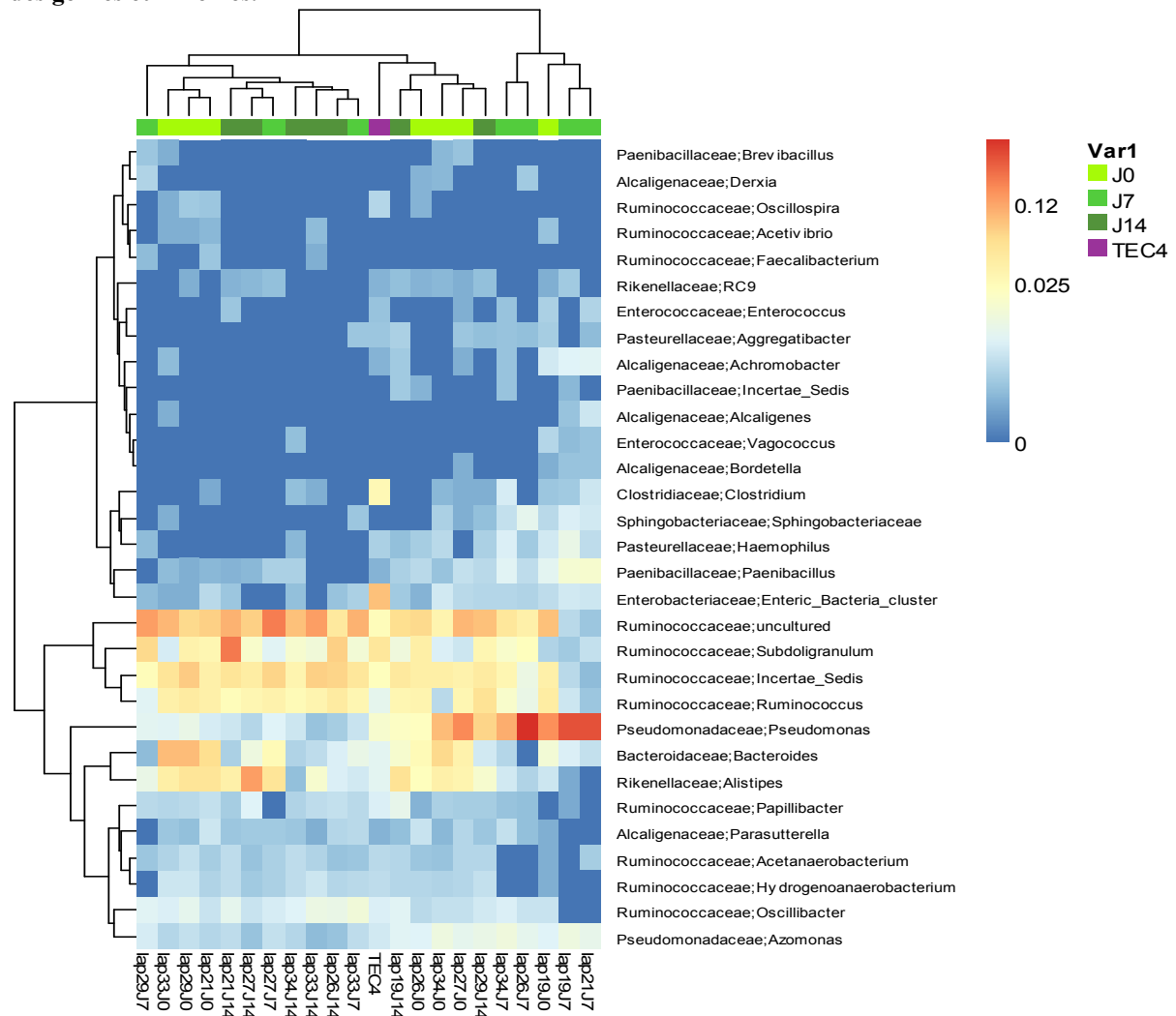
<sup>1</sup> ETM Ecart type de la moyenne

**Tableau 3. Genres bactériens dominants (abondance relative, %) dans les fèces de lapins montrant une évolution dans le temps après l'inoculation de TEC4 (n=7). La valeur de ces abondances relatives est également donnée pour l'inoculum TEC4**

Genre (abondance relative, %)	J0	J7	J14	ETM	Effet jour Pr<F	inoculum TEC4
<i>Pseudomonas</i>	6,37 <sup>ab</sup>	13,8 <sup>a</sup>	1,43 <sup>b</sup>	2,22	0,049	1,42
<i>Bacteroides</i>	5,64 <sup>a</sup>	0,55 <sup>b</sup>	0,47 <sup>b</sup>	0,68	<0,001	0,51
<i>Alistipes</i>	3,40 <sup>a</sup>	0,96 <sup>b</sup>	3,74 <sup>a</sup>	0,70	0,003	0,51
<i>Ruminococcus</i>	3,15 <sup>ab</sup>	1,35 <sup>b</sup>	3,41 <sup>a</sup>	0,34	0,002	0,57
<i>Subdoligranulum</i>	1,60 <sup>b</sup>	1,76 <sup>ab</sup>	4,94 <sup>a</sup>	0,91	<0,001	5,13
<i>Barnesiella</i>	1,98 <sup>a</sup>	0,04 <sup>b</sup>	0,23 <sup>ab</sup>	0,26	0,006	0,07
<i>Azomonas</i>	0,40 <sup>ab</sup>	0,54 <sup>a</sup>	0,22 <sup>b</sup>	0,06	0,003	0,30
<i>Haemophilus</i>	0,07 <sup>b</sup>	0,20 <sup>a</sup>	0,02 <sup>b</sup>	0,04	0,02	0,09
<i>Papillibacter</i>	0,09 <sup>ab</sup>	0,05 <sup>b</sup>	0,24 <sup>a</sup>	0,03	0,045	0,38

<sup>a, b</sup>: Les moyennes affectées d'une lettre différente diffèrent au seuil de  $P < 0,05$

**Figure 1 : Représentation simultanée des classifications en colonne des échantillons (fèces de 7 lapins prélevés à J0, J7 et J14 après inoculation de TEC4) et de l'inoculum TEC4 et en ligne des genres bactériens. Les genres représentés ont été sélectionnés sur leur abondance différentielle de leur famille ou des genres eux mêmes.**



Ainsi, de J0 à J14, nous détectons une baisse de l'abondance du phylum des Bacteroidetes, de la famille des Bacteroidaceae, du genre des

*Bacteroides* en faveur du phylum des Firmicutes et de la famille des Ruminococcaceae est en accord avec une évolution avec l'âge décrite

précédemment (Combes *et al.*, 2013). Cependant nous avons mis en évidence par qPCR une diminution du groupe *Bacteroides Prevotella* à J7 chez les lapins inoculés, mais pas chez les lapins témoins (Combes *et al.*, 2009).

A l'inverse, les baisses ou les augmentations de certains taxons à J7 pourraient être une signature de l'effet de l'inoculation, puisqu'à cette date le symptôme de perte de poids est maximal (Combes *et al.*, 2009). A J7, l'abondance relative de la famille des Ruminococcaceae, du genre *Ruminococcus* et *Alistipes* (Bacteroidetes) tend à diminuer, tandis qu'elle retrouve son niveau initial à J14 (Tableaux 2 et 3). A l'inverse, les abondances relatives de Pseudomonadaceae, et *Pseudomonas* tendent à être plus élevées à J7 comparativement aux deux autres temps.

Lorsque l'on analyse les communautés bactériennes fécales de manière globale, en sélectionnant les familles ou des genres différenciellement observés (figure 1), aucun regroupement des échantillons en fonction du temps après inoculation ou de l'individu n'est observé. De même, la composition taxonomique globale de l'inoculum TEC4 ne se distingue pas de la composition des échantillons fécaux aux différents temps (figure 1). Cependant la dominance d'un groupe d'entérobactéries appartenant à la famille des Enterobacteriaceae (9,3%) est observée dans l'inoculum. Cette dominance n'existe pas dans les échantillons (<0,1%). Ces résultats corroborent ceux de Huybens *et al.* (2013). Selon ces auteurs, elle pourrait correspondre à de nouveaux genres difficilement cultivables proches d'*Escherichia*. En Espagne, les analyses des communautés bactériennes de lapins atteints spontanément d'EEL indiquent une recrudescence de *Clostridium perfringens*, *Campylobacter spp.*, et *Helicobacter spp.* (Chamorro *et al.*, 2007; Gómez-Conde *et al.*, 2007). Le genre *Helicobacter* n'a pas été retrouvé ni dans l'inoculum ni dans les échantillons, tandis que *Campylobacter* n'est retrouvé que de manière sporadique (<0,1%). Enfin le genre *Clostridium* n'est présent de manière significative que dans l'inoculum (2,7%)

### Conclusion

Nous avons montré précédemment par qPCR et empreinte moléculaire que l'inoculation de TEC4 ne modifiait ni la structure, la diversité ou la densité de la population bactérienne fécale. Les résultats obtenus par pyroséquençage semblent corroborer ces premières conclusions puisqu'il n'a pas été possible de mettre en évidence de lien temporel entre les échantillons. Néanmoins, l'analyse de l'inoculum montre un profil microbien différent de celui observé au niveau fécal, chez les lapins inoculés avec cet inoculum. De plus, après inoculations, les fluctuations de certains taxons

pourraient constituer une signature de l'infection par EEL dans les fèces.

### Remerciements

Le personnel technique de l'UMR TANDEM (INRA Toulouse) et de la PFIE (INRA Tours) est remercié pour son appui.

### Références

- CHAMORRO S., GOMEZ-CONDE M.S., PEREZ DE ROZAS A.M., CARABAÑO R., DE BLAS J.C. 2007. Effect on digestion and performance of dietary protein content and of increased substitution of lucerne hay with soya-bean protein concentrate in starter diets for young rabbits. *Animal*, 1, 651-659.
- COMBES S., NICE F., LICOIS D., CAUQUIL L., FORTUN-LAMOTHE L., GIDENNE T., 2009. Réponse de l'écosystème digestif de lapins EOPS à une reproduction expérimentale de l'EEL par l'inoculum standard TEC4. *In Proc.: 13èmes Journées de la Recherche Cunicole, Bolet G. (Ed.) ITAVI, publ., Le Mans, France, 227-230.*
- COMBES S., MICHELLAND R.J., MONTEILS V., CAUQUIL L., SOULIE V., TRAN N.U., GIDENNE T., FORTUN-LAMOTHE L. 2011. Postnatal development of the rabbit caecal microbiota composition and activity. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 77, 680-689.
- COMBES S., GIDENNE T., CAUQUIL L., BALMISSE E., AYMARD P., BONNEMERE J.M., BANNELIER C., GABINAUD B., SEGURA M. TARTIE V., FORTUN-LAMOTHE L. 2013. Stimuler le comportement naturel de coprophagie des lapereaux au nid, modifie l'implantation de leur microbiote et améliore leur santé. *In Proc.: 13èmes Journées de la Recherche Cunicole, Bolet G. (Ed.) ITAVI, publ., Le Mans, France.*
- GOMEZ-CONDE M.S., GARCIA J., CHAMORRO S., EIRAS P., REBOLLAR P.G., PEREZ DE ROZAS A., BADIOLA I., DE BLAS C., CARABAÑO R. 2007. Neutral detergent-soluble fiber improves gut barrier function in twenty-five-day-old weaned rabbits. *J. Anim. Sci.*, 85, 3313-3321.
- HUYBENS N., HOUËIX J., LICOIS D., MAINIL J., MARLIER D. 2011. Epizootic rabbit enteropathy: Comparison of PCR-based RAPD fingerprints from virulent and non-virulent samples. *The Veterinary Journal*, 190, 416-417.
- HUYBENS N., HOUËIX J., LICOIS D., MAINIL J., MARLIER D. 2013. Pyrosequencing of epizootic rabbit enteropathy inocula and rabbit caecal samples. *The Veterinary Journal*, 196, 109-110.
- LICOIS D., COUDERT P., 2005. Entéropathie épizootique du lapin. Pouvoir infectieux de l'inoculum TEC4 : effet dose et maintien de virulence en fonction du temps. *In Proc.: 11èmes Journées de la Recherche Cunicole, Bolet G. (Ed.) Itavi, publ., Paris (France), 265-268.*
- LICOIS D., WYERS M., COUDERT P. 2005. Epizootic Rabbit Enteropathy: experimental transmission and clinical characterization. *Vet. Res.*, 36, 601-613.
- MARLIER D., DEWREE R., DELLEUR V., LICOIS D., LASSENCE C., POULIPOULIS A., VINDEVOGEL H. 2003. Description des principales étiologies des maladies digestives chez le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*). *Ann. Méd. Vét.*, 147, 385-392.
- MASSIP K., COMBES S., CAUQUIL L., ZEMB O., GIDENNE T., 2012. High throughput 16S-DNA sequencing for phylogenetic affiliation of the caecal bacterial community in the rabbit - Impact of the hygiene of housing and of the intake level. *In Proc.: VIIIth INRA-RRI Symposium on Gut Microbiology. Gut microbiota: friend or foe?, INRA Rowett Institute of Nutrition and Health (Ed.) publ., Clermont-Ferrand - France, 17 - 20 June, p57.*