

## PREMIERS RÉSULTATS DU PROJET RELAPA : GÉNOMIQUE POUR LA RÉSISTANCE GÉNÉTIQUE DES LAPINS À LA PASTEURSELLOSE

Gunia Mélanie<sup>1\*</sup>, Lantier Frédéric<sup>2</sup>, Babilliot Jean-Marc<sup>3</sup>, Balmisse Elodie<sup>4</sup>, Bed'hom Bertrand<sup>3</sup>, Belmonte Elodie<sup>5</sup>, Bertagnoli Stéphane<sup>6</sup>, Boucher Samuel<sup>7</sup>, Breton Sylvain<sup>8</sup>, Chambellon Emilie<sup>2</sup>, Chaumeil Thierry<sup>8</sup>, Coisne Fabien<sup>9</sup>, Delaunay Remi<sup>8</sup>, Fadeau Alain<sup>10</sup>, Guitton Edouard<sup>8</sup>, Héliès Virginie<sup>4</sup>, Hurtaud Jacques<sup>11</sup>, Jardet Deborah<sup>3</sup>, Kempf Florent<sup>2</sup>, Lantier Isabelle<sup>2</sup>, Lavillate Sébastien<sup>8</sup>, Le Cren Dominique<sup>12</sup>, Lenoir Guillaume<sup>9</sup>, Le Normand Bernadette<sup>13</sup>, Marais Coralie<sup>2</sup>, Maupin Mickaël<sup>11</sup>, Morin Hervé<sup>14</sup>, Poncet Charles<sup>5</sup>, Pujol Sébastien<sup>4</sup>, Robert Raphaël<sup>15</sup>, Rossignol Christelle<sup>2</sup>, Ruesche Julien<sup>2</sup>, Sarce Fanny<sup>8</sup>, Thiebot Colomba<sup>15</sup>, Helloin Emmanuelle<sup>2</sup>, Garreau Hervé<sup>1</sup>

<sup>1</sup>GenPhySE, INRA, INPT, ENVT, Université de Toulouse, 31326 Castanet Tolosan, France

<sup>2</sup>ISP, INRA, Université François Rabelais de Tours, UMR 1282, 37380 Nouzilly, France

<sup>3</sup>GABI, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78352 Jouy-en-Josas, France

<sup>4</sup>PECTOUL, INRA, 31326 Castanet-Tolosan, France

<sup>5</sup>GDEC, INRA, 63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>6</sup>IHAP, Université de Toulouse, INRA, ENVT, 31076 Toulouse, France

<sup>7</sup>LABOVET CONSEIL (Réseau Cristal), BP 539, 85505 Les Herbiers, France

<sup>8</sup>PFIE, INRA, 37380 Nouzilly, France

<sup>9</sup>HYCOLE, Route de Villers-Plouich, 59159 Marcoing, France

<sup>10</sup>LABORATOIRE DE TOURAINE, B.P. 67357, 37073 Tours cedex 2, France

<sup>11</sup>HYPHARM SAS, La Corbière, Roussay, 49450 Sèvremoine, France

<sup>12</sup>CLIPP, 75009 Paris, France

<sup>13</sup>VeLVet, 47 bd Leclerc, 35460 St Brice en Cogles

<sup>14</sup>FILAVIE, La Corbière, Roussay, 49450 Sèvremoine, France

<sup>15</sup>EUROLAP, Le Germillan, B.P. 21, 35140 Gosné, France

Correspondant : melanie.gunia@inra.fr

**Résumé** – La pasteurellose est la première cause de mortalité des femelles en élevage cunicole. Le projet RELAPA (Génomique pour la RESistance génétique des LAPins à la PASTeurellose) a pour objectif de mettre en évidence des régions du génome associées à la réponse à la pasteurellose. Pour ce faire, 955 lapins ont été inoculés à 6 semaines d'âge avec une souche de *Pasteurella multocida* pyogène et suivis pendant 14 jours. La réponse des animaux était très variable, avec 7% de lapins résistants (sans aucun symptôme de pasteurellose et sans *Pasteurella multocida* détectée dans les organes) et 11% d'animaux très sensibles (morts ou euthanasiés pendant l'essai avec des *Pasteurella multocida* détectées). L'effet du père sur les caractères mesurés est très significatif, ce qui laisse présager l'existence d'une variabilité génétique importante dans la résistance à la pasteurellose.

### Abstract – First results of the RELAPA project: Genomics for genetic resistance to pasteurellosis in rabbit.

Pasteurellosis is the first cause of female mortality in rabbit farms. The RELAPA project (Genomics for genetic resistance to pasteurellosis in rabbit) aims at identifying genomic regions associated with the response to pasteurellosis. A total of 955 rabbits were inoculated at 6 weeks of age with a pyogenic strain of *Pasteurella multocida* and were monitored during 14 days. Disease response was very variable among animals, with 7 % of resistant animals (rabbit without any pasteurellosis symptoms and without any *Pasteurella multocida* detected in the organs) and 11% of highly sensitive rabbits (dead or euthanized rabbits with *Pasteurella multocida* bacteria detected in the organs or abscesses). The sire effect is highly significant for the measured traits, which suggests some genetic variability of resistance to pasteurellosis in rabbits.

## Introduction

La Pasteurellose est une des maladies bactériennes les plus répandues dans les élevages cunicoles commerciaux (Coudert et al., 2006a). Les pneumonies, causées principalement par *Pasteurella multocida* (*Pm*) sont la première cause de mortalité des femelles dans les élevages, avec 37,8% de la mortalité (Lopez et al., 2013). La sélection génétique pour la résistance à la pasteurellose est donc un enjeu important. A la suite d'un programme de collecte et de caractérisation de souches de *Pm* (Helloin et al., 2013), le projet RELAPA (Génomique pour la REsistance génétique des LAPins à la PAspasteurellose) a pour but de mettre en évidence des régions du génome associées à la réponse à la pasteurellose. Cette étude présente les premiers résultats de réponse à l'infection expérimentale de lapins inoculés par une souche de *Pm*.

### 1. Matériel et méthodes

#### 1.1. Production des animaux

Un total de 1030 animaux expérimentaux ont été produits au Pôle d'expérimentation cunicole toulousain (Pectoul) par croisement entre 111 femelles de la lignée maternelle INRA 1777 et 65 mâles des 6 lignées grand-parentales maternelles des 3 sélectionneurs français de lapins de chair (Eurolap, Hycole, Hypharm). Les lapins ont été produits en 5 bandes. Ils étaient sevrés à 35 jours et transportés le lendemain du sevrage à la Plateforme d'infectiologie Expérimentale (PFIE). Au total, 955 lapins inoculés et 48 témoins ont été conservés pour cette étude ; 27 lapins inoculés ou devant l'être et 2 témoins ont été exclus de l'étude pour cause de mortalité précoce (avant ou dans les 2 jours suivant l'inoculation) non associée à la pasteurellose. Ces animaux présentaient des diarrhées ou des symptômes d'Entéropathie Epizootique des Lapins (EEL).

#### 1.2. Infection expérimentale et suivi

Les animaux étaient logés en cage de 5, dans deux salles, avec une répartition équilibrée des sexes et des origines paternelles et maternelles au sein des cages et des salles. Après 1 semaine d'adaptation, les lapins étaient inoculés à l'âge de 42 jours (J0), par injection sous-cutanée entre les omoplates d'une dose de 8000 bactéries / 0,1 ml de la souche LVT62 de *Pm* pyogène.

Les animaux des bandes 1 et 2 ont été nourris *ad libitum*. Avec l'apparition de symptômes d'EEL après le sevrage de la bande 3, un rationnement à 90% des besoins moyens quotidiens a été mis en place pour les lapins inoculés et témoins des bandes 3, 4 et 5.

L'état sanitaire des animaux était suivi quotidiennement. Les animaux étaient pesés à J-1, J7 et J14. La température rectale était mesurée quotidiennement de J-1 à J10. La présence et la répartition des abcès sur le corps des animaux étaient enregistrées au moment de l'autopsie, de même que la présence de lésions dues à l'EEL. A l'exception des

animaux morts ou euthanasiés au cours de l'étude, tous les animaux ont été abattus et autopsiés 14 jours après l'inoculation. Au final, 7% des animaux inoculés conservés dans l'étude présentaient des symptômes d'EEL à l'autopsie.

#### 1.3. Echantillon

Des prises de sang ont été effectuées à J-5, J7 et J14 pour permettre des comptages d'anticorps anti-*Pm*, de cellules sanguines et des études d'expression ultérieures. Des biopsies d'oreille ont été prélevées afin d'en extraire l'ADN et de l'utiliser pour génotyper les animaux. Des échantillons de rate, poumons, foie et d'abcès (quand il y en avait) ont été prélevés pour les analyses bactériologiques. Les échantillons de rate et de foie ont été cryo-conservés pour des études ultérieures d'expression génique.

#### 1.4. Caractères étudiés et analyses statistiques

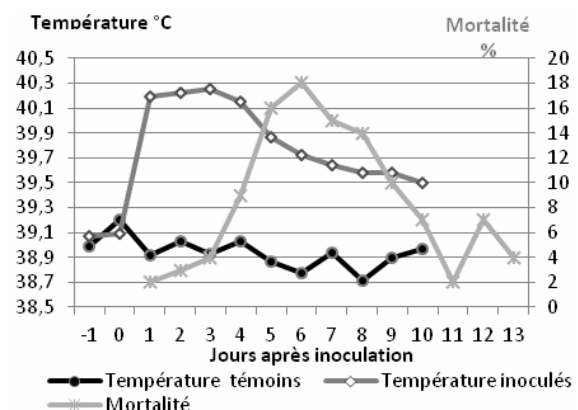
Le Gain Moyen Quotidien des animaux a été calculé en semaine 1 (de J-1 à J7, GMQ s1), en semaine 2 (J7 à J14, GMQ s2) et sur la période totale (J-1 à J14, GMQ tot). A partir des températures rectales quotidiennes, nous avons calculé le nombre de jours de fièvre de la première semaine (Fièvre s1). C'est le nombre de jours où l'animal présente une température supérieure à 39,5°C (95<sup>ème</sup> percentile de la température des animaux témoins). Des notes (de 1 à 5) d'abcès, de bactériologie et une note de résistance associant ces deux critères ont été attribuées aux animaux à partir des résultats d'autopsie pour rendre compte de la dissémination et de la sévérité de l'infection. L'effet de différents facteurs sur ces caractères a été analysé avec un modèle linéaire (Proc Mixed du logiciel SAS).

## 2. Résultats et discussion

### 2.1. Description des caractères mesurés

La courbe de température des animaux inoculés et témoins est présentée en figure 1, ainsi que la mortalité des lapins inoculés.

**Figure 1 : Evolution de la température moyenne et de la mortalité**



Les animaux connaissent un pic de température dès le lendemain de l'infection. La température diminue à

partir du 4<sup>ème</sup> jour. A J10 elle n'est pas revenue à un niveau normal. La mortalité connaît un pic au 6<sup>ème</sup> jour après l'inoculation. Elle s'élève à 11% en moyenne sur la durée totale de l'essai pour les lapins inoculés. Elle est nulle pour les 48 témoins.

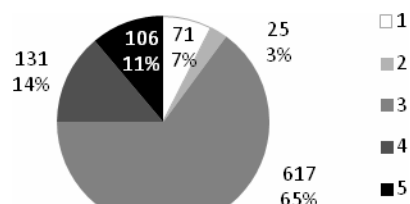
Les statistiques de base des caractères quantitatifs sont présentées au tableau 1.

**Tableau 1: Description des caractères quantitatifs.**

Groupe	Caractère	N	Moyenne	Ecart-type
Témoins	GMQ s1	43	35,3	7,0
	GMQ s2	43	39,3	8,3
	GMQ tot	43	37,0	4,5
	Fièvre s1	48	0,5	0,8
Inoculés	GMQ s1	910	2,6	18,3
	GMQ s2	851	19,7	17,9
	GMQ tot	853	11,1	14,4
	Fièvre s1	896	5,2	1,9

Concernant la note d'abcès : 8% des animaux ne présentaient pas d'abcès, 3% présentaient un abcès uniquement au site d'inoculation, 24% avaient des abcès à l'avant du corps (tête poitrail, cage thoracique), 51% avaient des abcès à l'avant et à l'arrière du corps, et 14% avaient des abcès dans les cavités internes ou les organes. Concernant la note de bactériologie : pour 9% aucune *Pm* n'a pu être détectée tandis que 65% des lapins présentaient ces bactéries au niveau des abcès uniquement, 13% présentaient en plus des bactéries dans un organe, 6% dans 2 organes, et 7% étaient morts avec des *Pm* détectées dans tous les organes prélevés. La proportion d'animaux résistants est présentée en Figure 2.

**Figure 2 : Nombre et proportion de lapins inoculés par note de résistance de 1 (très résistant) à 5 (très sensible)**



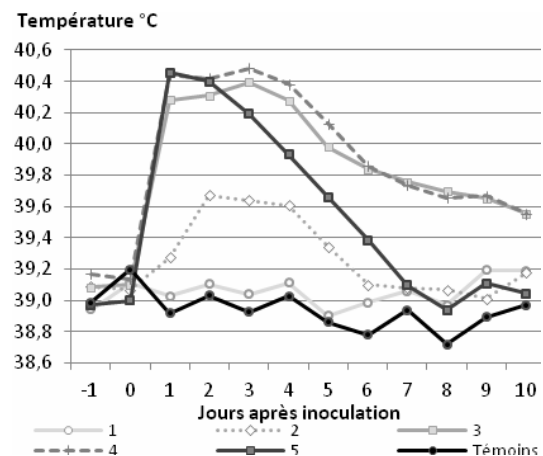
Les animaux très résistants (note 1), n'ont aucun symptôme de pasteurellose et aucune pasteurelle n'a été détectée sur les organes prélevés à l'autopsie, cette note a pu être attribuée à 7% des lapins. Les animaux résistants (note 2) ont un abcès uniquement au site d'inoculation, et aucune pasteurelle détectée dans les organes (3%). Les animaux intermédiaires (note 3) ont des abcès à la surface du corps, mais aucun abcès ni bactérie détectés dans les organes (65%). Les animaux sensibles (note 4) ont des abcès dans les

cavités internes et/ou des organes contaminés par *Pm* (14%). Les animaux très sensibles (note 5) sont ceux morts ou euthanasiés au cours de l'essai et porteurs de *Pm* (11%).

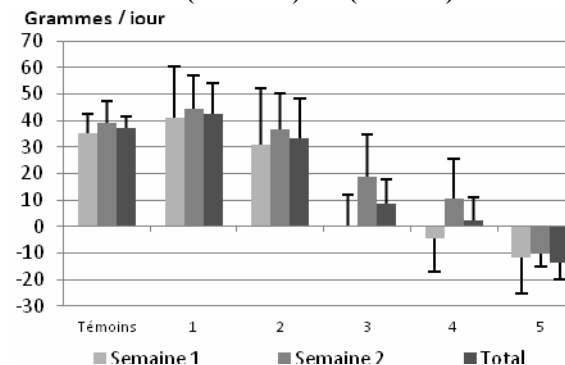
## 2.2. Liens entre les caractères

Les liens entre note de résistance, températures et GMQ sont présentés en Figures 3 et 4.

**Figure 3 : Evolution de la température selon la note de résistance de 1 (résistant) à 5 (sensible)**



**Figure 4 : Gain Moyen Quotidien selon la note de résistance de 1 (résistant) à 5 (sensible)**



Les animaux très résistants (note 1) ont une courbe de température similaire aux témoins, et même une croissance supérieure en moyenne. Les animaux résistants (note 2) présentent un pic de température beaucoup plus bas que les animaux sensibles et reviennent dès J6 à une température normale, ils ont une croissance positive, légèrement inférieure aux témoins. Les animaux présentant des notes de résistance de 3 et 4 ont un pic de température dès J1, des températures élevées jusqu'à J4 qui diminuent ensuite progressivement. Ils ont tendance à perdre du poids en semaine 1. Les animaux très sensibles (note 5), connaissent un déclin rapide de leur température (en dessous de 38,0°C pour une partie d'entre eux) après un pic à J1, accompagné d'une forte perte de poids, qui se terminera par la mort ou l'euthanasie de ces animaux. Les corrélations entre caractères sont présentées dans le Tableau 2.

**Tableau 2: Corrélations de Pearson entre les caractères pour les animaux inoculés**

	Note abcès	Note bactériologie	GMQ semaine 1	GMQ semaine 2	GMQ Total	Nb jours fièvre s1
Note résistance	0,80	0,86	-0,63	-0,50	-0,73	0,59
Note abcès		0,58	-0,63	-0,53	-0,73	0,64
Note bactériologie			-0,46	-0,49	-0,58	0,40
GMQ semaine 1				0,28	0,84	-0,54
GMQ semaine 2					0,75	-0,45
GMQ Total						-0,64

Toutes les corrélations sont significativement différentes de 0 à  $P < 0,001$ .

Plus l'animal est sensible, plus sa note d'abcès et de bactériologie est élevée, plus son GMQ est bas, et plus les jours de fièvre sont nombreux. On observe une corrélation modérément élevée entre Note d'abcès et Nombre de jours de fièvre, qui traduit bien l'augmentation de température liée à la présence d'abcès. Le GMQ en 1<sup>ère</sup> semaine présente des corrélations plus élevées avec les autres caractères que le GMQ en 2<sup>ème</sup> semaine, traduisant l'importance de la réponse du lapin à la maladie dans les premiers jours qui suivent l'inoculation.

### 2.3. Effet fixes

Le Tableau 3 présente la significativité des effets fixes que sont la bande, le sexe, la présence d'EEL, la lignée du père, et de l'effet aléatoire du père sur les caractères mesurés.

**Tableau 3: Significativité des effets fixes (en ligne) sur les caractères mesurés (en colonne)**

	Bande	sexe	EEL	père	lignée
Résistance	***	n.s.	***	*	*
Abcès	**	n.s.	***	*	n.s.
Bactério	***	n.s.	***	n.s.	*
Mortalité	*	n.s.	***	n.s.	**
GMQ s1	***	n.s.	***	**	n.s.
GMQ s2	n.s.	n.s.	**	*	**
GMQ tot	***	n.s.	**	**	n.s.
Fièvre s1	***	n.s.	*	n.s.	n.s.

n.s.=non significatif ;  $P < 0,05 = *$ ;  $P < 0,01 = **$ ;  $P < 0,001 = ***$ .

Les effets bandes et EEL sont significatifs pour presque tous les caractères. L'effet EEL indique une interaction probable entre les 2 maladies. Les différences de réponse à l'infection entre mâles et femelles sont non significatives. L'effet du père est significatif pour presque tous les caractères, et quand il ne l'est pas, l'effet lignée est significatif (sauf pour Fièvre s1). Ces résultats laissent présager l'existence d'une variabilité génétique pouvant expliquer une partie de la variabilité des caractères phénotypiques observés.

Cet essai montre la grande variabilité de la réponse des lapins à l'inoculation de la souche de *Pm* utilisée. Les animaux très résistants réussissent à éliminer le pathogène, ont une croissance normale et ne connaissent pas le pic de température à J1 des animaux sensibles. Cette résistance semble donc s'exprimer très précocement, probablement dans les heures qui suivent l'inoculation. Les animaux ayant une note de résistance de 2, réussissent eux à contenir l'infection au site d'inoculation. Les animaux ayant des notes de 3 et 4 sont très impactés par la maladie, mais semblent se rétablir, avec une légère reprise de poids en semaine 2 et une baisse de leur température corporelle. Les animaux du groupe 5 ne réussissent pas à faire face à l'infection par *Pm*, ou à l'effet combiné de cette dernière et de l'EEL.

### Conclusions

Cette première étape du projet RELAPA montre une grande variabilité de réponses des animaux à l'infection, avec des profils allant d'animaux très résistants à très sensibles. L'effet significatif du père sur les caractères mesurés laisse présager l'existence d'une variabilité génétique sous-jacente.

### Remerciements

Les auteurs remercient l'ensemble des participants au projet RELAPA pour la qualité de leur travail, en particulier les équipes de PECTOUL et de la PFIE.

### Références

- Coudert P., Rideau P., Virag G., Cerrone A., 2006. Pasteurellosis in rabbit. Recent Advances in rabbit science. ILVO publ., 146-162.
- Helloin E., Garreau H., Slugocki C., Hilgenberg M., Le Beux C., Licois D., Boucher S., Le Normand B., Morin H., Baumier L.M., Coisne F., Fournier E., Moreno C., Lantier F. 2015. Vers une amélioration de la résistance du lapin à la pasteurellose. In : 16èmes J. Rech. Cunicoles Fr, Le Mans (INRA ed.), ITAVI publ., Paris., 43-46.
- Lopez S., Chretien L., Salaün J.M., Wacquez P.A. 2013. Etude descriptive des mortalités des femelles reproductrices en élevage cunicole. In: 15èmes J. Rech. Cunicoles Fr, Le Mans, 193-196