

# Effet de l'âge au sevrage, de la teneur en fibre alimentaire et de l'hygiène du logement, sur le dénombrement caecal de colonies de *Clostridium perfringens* et la mortalité chez le lapereau

C. ROMERO<sup>1</sup>, N. NICODEMUS<sup>1</sup>, A. CORUJO<sup>2</sup>, J.R. ASTILLERO<sup>1</sup>, C. DE BLAS<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad Politécnica de Madrid. Dpto Producción Animal, 28040. Madrid. Espagne

<sup>2</sup> Nutreco Poultry and Rabbit Research Centre. Casarrubios del Monte. 45950. Toledo. Espagne.

**Résumé.** Les portées consécutives de 80 lapines ont été distribuées selon différents traitements: l'âge au sevrage (28 ou 42 jours), le taux de fibres de l'aliment (25 vs 20% d'ADF), l'hygiène du logement (désinfecté ou non au début de l'expérience). Les résultats montrent un effet favorable ( $P < 0,0001$ ) de la désinfection sur le dénombrement, 14 jours après sevrage, de *C. perfringens* et sur la mortalité (entre 28 et 56j d'âge). Une teneur élevée en fibre de l'aliment, de même qu'un sevrage tardif à 42j, ne présentèrent pas d'effets significatifs sur le dénombrement de *C. perfringens*, ni sur la mortalité. Seulement dans des conditions de non désinfection, sevrer à 42j présenta un effet favorable sur le dénombrement et sur la mortalité.

**Abstract. Effect of weaning age, level of dietary fibre and environmental hygiene on the *Clostridium perfringens* quantification in the digestive tract of rabbits and on the mortality.** Rabbits from eighty litters were allocated to different experimental treatments: age at weaning (28 or 42 days), level of dietary fibre (25 vs 20% of ADF) and housing hygiene conditions (disinfection or not at the beginning of the experiment). The results show that disinfection of the farm had a significant effect on the caecal concentration of *C. perfringens* 14 days after weaning and on the fattening mortality ( $P < 0,0001$ ). A delay in weaning also improved fattening mortality and reduced caecal concentration of *C. perfringens* 14 days after weaning, but the effects were only significant in poor hygiene housing conditions. Dietary fibre content did not affect any of the traits studied.

## Introduction

Apparue en 1997, l'Entéropathie Epizootique du Lapin (EEL) est encore aujourd'hui une des maladies les plus graves atteignant les élevages européens. Cependant, à l'heure actuelle, l'agent étiologique demeure encore inconnu (Licois *et al.*, 2006). Toutefois, la bactérie *Clostridium perfringens* serait susceptible de jouer un rôle majeur dans ce syndrome digestif (Le Normand *et al.*, 2003; Dewrée *et al.*, 2003; Marlier *et al.*, 2003). Bien que certains antibiotiques, tels que la bacitracine (Coudert et Licois, 2005) et la tiamuline (Bouvier *et al.*, 2005), semblent pouvoir contrôler les taux de mortalité, il est important d'étudier d'autres solutions alternatives pour réduire les effets de l'EEL. Tout d'abord, sachant que des échantillons d'air collectés dans des locaux hébergeant des lapins ont permis de reproduire l'EEL (Licois *et al.*, 2003), la propreté des installations doit être tenue en compte. Par ailleurs, la nutrition des lapereaux pendant l'engraissement serait aussi un élément important. Ainsi, le niveau et le type de fibre de l'aliment peuvent prévenir certains troubles digestifs (Gidenne, 2003, Nicodemus *et al.*, 2004, Alvarez *et al.*, 2006). Finalement, de récents travaux ont mis en évidence in-vitro l'action bactéricide de certains acides gras à chaîne moyenne (C8:0 et C10:0) présents en concentration élevée dans le lait de la lapine (Marounek *et al.*, 2004). En conséquence, l'objectif de cette étude est de mesurer la mortalité et le dénombrement caecal de *C. perfringens*, en fonction des 3 facteurs suivants: l'âge au sevrage (28 ou 42 jours), le taux de fibres de l'aliment (25 vs 20% d'ADF), l'hygiène du logement (désinfecté ou non au début de l'expérience).

## 1. Matériel et méthodes

### 1.1. Animaux

Quatre-vingts lapines primipares de deux souches développées par l'Université Polytechnique de Valence (Espagne) ont été utilisées. Les portées de quarante de ces lapines ont été sevrées à l'âge de 28 jours (rythme intensif: intervalle mise bas/insémination 4 jours) alors que l'autre moitié a été maintenue avec la mère jusqu'à 42 jours (rythme extensif: intervalle mise bas/insémination 14 jours). Pour chaque rythme reproductif, vingt portées ont été nourries avec l'aliment C1 riche en fibres (ADF=25%), et les vingt autres avec l'aliment C2 (ADF=20%, tableau 1). De plus, au début de l'étude les bâtiments ont été sérieusement nettoyés et désinfectés avec un produit sporicide (Composition: 15% glutaraldehyde, 10% chlorure de didecyl dimethyl ammonium, 100% dissolvants et excipients). C'est pourquoi, lors du premier sevrage (cycle 1), à l'âge de 28 ou de 42 jours, tous les lapereaux ont été logés dans des locaux propres (12 heures de lumière; cages de 670 x 250 x 330 mm; deux lapereaux par cage en moyenne). Après 4 ou 3 portées consécutives (rythme intensif ou extensif respectivement), le deuxième cycle expérimental a débuté. Les lapereaux étaient alors logés dans les mêmes cages que le cycle 1, mais sans désinfection préalable. Pour tous les groupes, un même aliment solide a été distribué à volonté aux lapereaux dès 21 jours d'âge et jusqu'à 56 jours d'âge (fin de l'étude). Pour connaître l'état de propreté, des échantillons de poussière ont été prélevés sur les ventilateurs des locaux, servant d'indices de la charge microbienne d'ambiance.

**Tableau 1.** Composition des régimes expérimentaux (en %)

Ingrédients (%)	Aliment	C1	C2
Son de blé		15,0	-
Orge		6,0	31,0
Tourteau de tournesol		19,7	19,7
Luzerne		28,1	28,3
Paille de blé		10,0	-
Pulpe de betterave déshydratée		15,0	15,0
Huile de soja		2,1	2,1
Sel		0,4	0,5
Carbonate de calcium		1,4	1,15
Phosphate monocalcique		0,57	0,50
L-Lysine		0,15	0,15
L-Thréonine		-	0,10
Sépiolite		0,88	1,0
Bicarbonate de sodium		0,2	-
Prémix <sup>1</sup>		0,5	0,5

<sup>1</sup> Prémix fourni par Trouw Nutrition International. Il contenait un anticoccidien (robénidine).

### 1.2. Alimentation

Les tableaux 1 et 2 montrent la composition en ingrédients et en nutriments des aliments C1 et C2. Tous les deux étaient exempts d'antibiotiques.

### 1.3. Paramètres contrôlés

Pour chaque cycle, quatre portées de chaque traitement (seize au total) ont été sélectionnées pour les mesures de microbiologie. Ainsi, toutes les 2 semaines (à l'âge de 28, 42 et 56 jours), trois lapereaux de chaque portée (48 au total) ont été sacrifiés pour faire un prélèvement d'échantillon au niveau iléal et caecal. Au cours du premier cycle expérimental, un échantillon de contenu caecal et iléal était pris sur chaque lapin. Cependant, le manque de matériel iléal suffisant à l'âge de 28 et 42 jours a conduit à prélever pendant le second cycle, uniquement à 56 jours. Les échantillons ont été conservés dans des tubes stériles de polystyrène, gardés en anaérobiose dans des sacs GENbag

(bioMérieux, Marcy l'Étoile, France), et analysés dans la même journée, selon la norme ISO 7937, 1997, pour le comptage des colonies de *C. perfringens*. Selon ce même processus, mais en chauffant au préalable (75°C, 15 min), le nombre de spores de *C. perfringens* des ventilateurs a été déterminé. Par ailleurs, la mortalité 28-56j de 647 lapereaux non choisis pour l'étude microbiologique (367 et 280 au premier et au second cycle respectivement) fut enregistrée tous les jours.

### 1.4. Analyses chimiques

Elles ont été réalisées sur les aliments, conformément aux procédures de l'Association of Official Analytical Chemists (2000) pour la Matière sèche "MS" (930.15), les cendres (923.03), l'azote (méthode de Dumas, 968.06), les matières grasses brutes (920.39), la cellulose brute (978.10), les sucres totaux (974.06) et l'amidon enzymatique (996.11). Les teneurs de NDF, ADF et ADL furent déterminées selon la méthode séquentielle de Van Soest *et al.* (1991).

**Tableau 2.** Analyse chimique des régimes expérimentaux (en % de la matière sèche)

Nutriments (% MS)	Aliment	C1	C2
Matière sèche		90,8	90,9
Protéines Brutes – Dumas		14,7	15,5
Matières grasses brutes		4,0	4,0
Cendres		9,9	8,6
Amidon Enzymatique		6,7	14,9
Cellulose Brute		19,9	15,7
NDF		42,5	33,0
ADF		24,9	20,3
ADL		5,5	4,7
Sucres totaux		0,9	3,5
Fibres Solubles <sup>2</sup>		12,1	11,4

<sup>2</sup> FS = MS – Cendres – PB – MG – NDF – Amidon – Sucres

### 1.5. Analyses statistiques

Les données ont été analysées suivant un plan complètement randomisé avec comme effets principaux : l'âge des lapins au sevrage, l'aliment, le cycle et les interactions, et en utilisant la procédure

GLM de SAS (1991). L'homogénéité des variances du dénombrement caecal de *C. perfringens* a été vérifiée sur la base du test de Levene. Du fait que les variances n'étaient pas homogènes, une transformation logarithmique a dû être appliquée de manière à stabiliser les variances.

**Tableau 3.** Effet du cycle, du rythme reproductif, de la teneur en fibre de l'aliment et de l'hygiène sur le dénombrement caecal de colonies de *C. perfringens* et la mortalité (%) chez le lapereau

		<i>C. perfringens</i> (UFC/g)*	<i>C. perfringens</i> (log UFC/g)*	Mortalité de 28 à 56 jours	
Cycle 1	Sevrage 28 jours	C1	7,80	0,00	
		C2	27785	5,16	
	Sevrage 42 jours	C1	33931	4,48	7,89
		C2	441	2,44	7,37
Cycle 2	Sevrage 28 jours	C1	257102	5,24	20,3
		C2	385567	0,07	32,1
	Sevrage 42 jours	C1	174987	5,23	18,9
		C2	88394	4,87	12,0
SEM		71034 (n=12)	0,29 (n=12)	3,50 (n=81)	
Probabilités	Cycle	<0,0001	<0,0001	<0,0001	
	Sevrage	0,075	0,16	0,24	
	Aliment	0,89	0,25	0,92	
	Cycle x sevrage	0,074	0,044	0,0058	
	Cycle x aliment	0,80	0,12	0,88	
	Sevrage x aliment	0,20	0,082	0,12	
	Cycle x Sevrage x Aliment	0,45	0,44	0,061	

\*mesuré 14 jours après le sevrage, soit à 42 ou à 56 jours selon l'âge au sevrage

## 2. Résultats

Le comptage caecal de colonies de *C. perfringens*, présenté au tableau 3, est celui mesuré 14 jours après le sevrage (indépendamment de l'âge au sevrage, soit à 42 et à 56j). Le dénombrement à 14 jours post-sevrage ainsi que la mortalité ont été plus élevés ( $P < 0,0001$ ) au 2<sup>nd</sup> cycle. Ceci pourrait avoir un rapport avec la contamination en spores dans l'ambiance de l'élevage (700 UFC/g au 1<sup>er</sup> cycle vs 840000 UFC/g au 2<sup>nd</sup>, soit 3 mois plus tard). Le sevrage extensif (42j) tendrait à réduire le nombre de colonies mais seulement au second cycle (131691 vs 320785 UFC/g ;  $P = 0,0016$ ). Il en est de même pour la mortalité 28-56 jours (15,50 vs 26,24% ;  $P = 0,0053$ ). Le taux de fibre n'affecte ni le comptage, ni la mortalité.

## 3. Discussion

Dans ce travail, la présence de *C. perfringens* a été détectée dans le 100% des animaux. De même, la bactérie a été repérée dès l'âge de 28 jours. Les résultats ont indiqué qu'il existe une forte corrélation entre l'incidence d'EEL et le dénombrement de *C. perfringens*. Sur les 269 échantillons de contenu caecal analysés, 14 appartenaient à des animaux malades (diminution de la croissance, borborygme, estomac et intestin grêle dilatés par un contenu liquide et gazeux, contenu caecal liquide ou bien compacte, présence de mucus sur le colon) qui présentèrent plus de  $2 \times 10^6$  UFC/g. Aucun animal avec

moins de  $2 \times 10^6$  UFC/g ne présenta symptômes propres de l'EEL. Ces observations sont en concordance avec la détection de la présence de *C. perfringens* dans une proportion élevée (10/12) dans des échantillons intestinaux d'animaux morts avec symptômes d'EEL (Dewrée *et al.*, 2003).

Même si le dénombrement caecal de *C. perfringens* fut mesuré à 28, 42 et 56 jours d'âge des lapereaux, seulement les résultats 14 jours post-sevrage sont présentés. Une corrélation importante ( $r = +0,96$  ;  $P < 0,0001$ ) entre ces derniers résultats et la mortalité due à l'EEL souligne l'intérêt du dénombrement de *C. perfringens* 14 jours post-sevrage.

### Conclusion

Notre étude met en évidence l'importance de l'hygiène d'élevage sur le contrôle de l'EEL. L'emploi d'un sporicide permet désormais de faire face à ce syndrome sans recourir aux antibiotiques. Ce facteur semble prépondérant par rapport à l'âge au sevrage ou par rapport à la teneur en fibres alimentaires.

### Références

- ALVAREZ J.L., MARGUENDA I., GARCÍA-REBOLLAR P., CARABAÑO R., DE BLAS C., CORUJO A., GARCÍA-RUIZ A.I., 2006. Effects of type and level of fibre on digestive physiology and performance in reproducing and growing rabbits. *World Rabbit Sci.*, 15:9 - 17.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 2000. Official methods of analysis, 17<sup>th</sup> edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.

- BOUVIER A. C., JACQUINET C., MANCO B., 2005. Étude récente sur la sensibilité de différentes souches de *Clostridium* prélevées sur des lapins avec signes cliniques d'EEL, vis-à-vis de la tiamuline. *11èmes Journ. Rech. Cunicole*, INRA-ITAVI, 29-30/11/2005, Paris, ITAVI éd. Paris, 253-256.
- COUDERT P., LICOIS D., 2005. Entéropathie Epizootique du Lapin. Étude des phénomènes précoces avec l'inoculum standard (TEC3). *11èmes Journ. Rech. Cunicole*, INRA-ITAVI, 29-30/11/2005, Paris, ITAVI éd. Paris, 269-272.
- DEWRÉE R., LICOIS D., COUDERT P., LASSENCE C., VINDEVOGEL H., MARLIER D., 2003. L'entéropathie épizootique du lapin (EEL) : étude du rôle des infections par *Clostridium perfringens* dans l'étiopathogénie de ce syndrome. *10èmes Journ. Rech. Cunicole*, INRA-ITAVI, 19-20/11/2003, Paris, ITAVI éd. Paris, 251-254.
- GIDENNE T., 2003. Fibres in rabbit feeding for digestive troubles prevention : respective role of low-digested and digestible fibre. *Liv. Prod. Sci.* 81 (2003) 105-117.
- 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. *10èmes Journ. Rech. Cunicole*, INRA-ITAVI, 19-20/11/2003, Paris, ITAVI éd. Paris, 239-241.
- LICOIS D., FRANCHET C., PERSILLON C., 2003. Obtention d'échantillons d'air, prélevés dans des locaux expérimentaux à l'aide de bio-collecteurs, chez des lapins sains et des lapins après reproduction expérimentale de l'entéropathie épizootique (EEL). Test d'infectiosité des échantillons collectés. *10èmes Journ. Rech. Cunicole*, INRA-ITAVI, 19-20/11/2003, Paris, ITAVI éd. Paris, 259-262.
- LICOIS D., COUDERT P., MARLIER D., 2006. Epizootic rabbit enteropathy. In: *Recent Advances in Rabbit Sciences*. L. Maertens et P. Coudert (Eds.) ILVO, Melle 2006, 163-170.
- MARLIER D., DEWRÉE R., LICOIS D., COUDERT P., LASSENCE C., POULIPOULIS A., VINDEVOGEL H., 2003. L'Entéropathie Epizootique du Lapin (EEL) : un bilan provisoire des résultats après 20 mois de recherches. *10èmes Journ. Rech. Cunicole*, INRA-ITAVI, 19-20/11/2003, Paris, ITAVI éd. Paris, 247-250.
- MAROUNEK M., SKRIVANOVÁ E., DLOUHÁ G., 2004. Some factors influencing antimicrobial activity of medium-chain fatty acids against *Clostridium perfringens*. COST ACTION 848. Proceedings of the Joint Scientific meeting of Pathology and Prophylaxis and Nutrition (WG3 and WG4). T. Gidenne, D. Licois et J. García (Eds.) pp:29.
- NICODEMUS N., PÉREZ-ALBA L., CARABAÑO R., DE BLAS C., BADIOLA I., PÉREZ DE ROZAS A., GARCÍA J., 2004. Effect of level of fibre and level of ground of fibre sources on digestion and ileal and caecal characterization of microbiota of early weaned rabbits. *8th World Rabbit Congress - 7-10/09/2004*, Puebla – Mexico - Feeding and Nutrition - Short Paper -Volume 1, 928-929.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS INSTITUTE 1991. User's guide, statistics, version 6.03, edition. SAS institute Inc., Cary, NC.
- VAN SOEST J.P., ROBERTSON J.B., LEWIS B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583-3597.